

琉球特産生薬データベースの開発

申請代表者 有田 正規 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻 准教授
所内共同研究者 田中 謙 資源開発部門 生薬資源科学分野 准教授

【報告セミナー要旨】

【研究の背景と目的】

本研究は、富山大学を中心とした和漢薬情報発信拠点を確立し、そこから生薬を含む日本固有または伝統的に利用されてきた植物情報を発信することを目的とする。平成23年度は、琉球特産生薬の解析をテーマとした。沖縄県には本土に見られない多種多様な薬用植物が自生し、さまざまな形で利用されている。それらの知識をデジタル化し、二次代謝成分のプロファイリングをおこなう作業は日本固有の植物情報の知識化という環境保全・生物多様性の観点からも重要な活動である。沖縄で収穫される大型のウコン栽培種（収穫時の根茎重量が1 kgを超える）の分析依頼を受け、その中に含まれる生理活性成分を測定するとともに、それらの情報をウェブ上にデータベース化する作業をおこなうことを目標とした。

【手法と結果】

まずウコン根茎が巨大化する理由を探ることにした。細胞内のDNA量を測定したが、測定箇所によって異なる倍数性が確認され、従来報告されるウコン染色体数の揺らぎを再確認するにとどまった。次に栽培種の試料と同じ土壌で栽培した通常のウコン (*Curcuma longa*) を提供してもらい、その中に含まれる成分をLC-MS, GC-MS, および元素分析に供した。その結果、金属イオンをキレートすることで知られるフィチン酸が少なく、鉄やマグネシウムなどの金属イオン含量も少ないことがわかった。ただしフィチン酸の合成経路を欠損させたイネ等で植物体量の増加が確認されないことから、大型化との関連は今後の課題である。またウコンを特徴付ける成分であるクルクミンは当該栽培種に少なく、逆にテトラヒドロキシクルクミン含量が多いことも確認できた。これまでウコン根茎では合成されないとされていた labdane diterpene の一種を同定した。

以上のデータをウェブ上で公開する手段として、クロマトグラムを表示するブラウザ (JCAMP Viewer) と増すスペクトルを検索するソフトウェア (MassBank) を融合させたソフトウェアを開発した。まだ公開には至らないが、これによりクロマトグラム上のピークを選択して、スペクトルデータベースに検索をかけることが可能になる。これまでMassBankソフトウェアは指定されたOS上にApache, Tomcat, Perl, MySQL, C++という様々なソフトウェアを指定されたとおりにインストールしないと動かない仕組みであったが、今回開発したアプリケーションはJava言語のみで書かれており、ほとんど同じ機能を有している。JNLPと呼ばれるブラウザ上で起動する仕組みを用いて実装されているため、富山大で開発する和漢薬データベースやその他のデータベース上から起動させることも可能である。

【考察と今後の展望】

今年度はウコンの解析にとどまったうえ、品種の巨大化の理由もまだ解明できていない。今後クロマトグラムやスペクトル情報をウェブ上に載せる予定である。また和漢薬データベースを含めた複数のデータベースの連携作業を来年度以降も進める。

【発表論文等】

1. Arita M, Yoshimoto M, Suwa K, Hirai A, Kanaya S, Shibahara N, Tanaka K "Database for crude drugs and kampo medicine" Genome Informatics 25(1) Special Issue JSBi2010, 1-11, 2011
2. Tanaka K, Hayashi K, Fahad A, Arita M "Multi-stage mass spectrometric analysis of saponins in glycyrrhiza radix" Natural Product Communications 6(1):7-10, 2011
3. 有田 正規(編)「使えるデータベース・ウェブツール」実験医学別冊 9月 29(15), 羊土社, 2011

■背景・目的

本研究は、富山大学を中心とした和漢薬情報発信拠点を確立し、そこから生薬を含む日本固有または伝統的に利用されてきた植物情報を発信することを目的としている。昨年度までに和漢薬データベースの開発を進め、生薬の名称や成分など学術情報を中心にデータ収集をおこなった。平成23年度は、それらを活用する具体例として琉球特産生薬の解析をテーマとした。沖縄県には本土に見られない多種多様な薬用植物が自生し、さまざまな形で利用されている。よく知られるものが睡眠作用を持つクワンソウや健康食品にも利用されるウコンである。その他沖縄で用いられる薬草情報を、沖縄県工業技術センターの協力を得て、<http://metabolomics.jp/wiki/Index:OITC/Herb> にまとめて掲載した。こうした情報に追加する形で二次代謝成分のプロファイリングを提供する作業は日本固有の植物情報の知識化という環境保全・生物多様性の観点からも重要な活動である。沖縄で収穫される大型のウコン栽培種（収穫時の根茎重量が1 kgを超える）の分析を通して、その中に含まれる生理活性成分を測定するとともに、それらの情報をウェブ上にデータベース化する作業をおこなうことを目標とした。

■結果・考察

ウコンの分析

まずウコン根茎が巨大化する理由を探ってみた。理化学研究所植物科学研究センター杉本ユニットの協力を得て細胞内のDNA量をフローサイトメーターで測定したが、葉の測定箇所によって異なる倍数性が確認された。ただしDNA量が正確に整数倍されてもおらず、倍数性とも言い切れない曖昧さが残っている。従来も報告されてきたウコン染色体数の揺らぎを再確認するとどまった。しかし富山大学の薬草園から入手した標準ウコン(*Curcuma longa*)と大型栽培種との間に差がない点は確認できた。次に栽培種の試料と同じ沖縄の土壌で栽培した標準ウコンを用いて、その中に含まれる成分をLC-MS, GC-MS, および元素分析に供した。元素分析からは、大型栽培種は鉄、マグネシウム、亜鉛などの金属イオン含量が少ないことが確認された。セレン等ごく一部の金属は標準ウコンよりも多かった。同一の土壌で栽培した標準ウコンより金属イオン含量が少ない点は興味深い。ウコン粉末中の鉄イオンによる肝障害が注目されている昨今（NHKためしてガッテン2011年6月29日肝臓の健康を守れSP「ウコンの意外な落とし穴」）、健康食品等に利用する上では好ましい性質と考えられる。

質量分析の結果から、大型栽培種は金属イオンをキレートすることで知られるフィチン酸が少ないことがわかった。フィチン酸は金属イオンを細胞内に保持する機能を有するため、金属イオン量が少ない事とも辻褄が合う。フィチン酸はリン酸蓄積体としても知られるため、土壌中の金属やリン酸を植物体に蓄積しなくてよい状況を示唆しているかもしれない。しかし同一土壌で栽培した標準ウコン

は巨大化しないことから、大型化の原因は環境だけでないことは明らかである。大型化と環境との関係は、土壌成分を含めて今後調べる必要がある。また、フィチン酸の合成経路を欠損させたイネ等では植物体量の増加が確認されないことから、大型化とフィチン酸との直接的な関連もみいだせない。ウコンの主要二次代謝成分を計測すると、クルクミンは大型栽培種に少なく、逆にテトラヒドロシクルクミン含量が多いことを確認できる。品種によって二次代謝物の組成が大きく異なることはこれまでも知られていたが、こうした成分含量と大型化との関係は解明できなかった。

同定できた二次代謝物の中で注目に値するのがこれまでウコン根茎では合成されないとされていたラブダンジテルペン的一种である(表1)。ラブダン類は品種によって組成が異なるためショウガ科の化学系統分類(chemotaxonomy)に用いられる物質である。この中でも Labda-8(17)-12-diene-15,16-dial (1) は抗菌・抗マラリア活性を持つ代謝物で *Hedychium coronarium* (Nat Prod Res 22(14): 1249-56, 2008), *Alpinia javanica*, *purpurata*, *Zingiber ottensii*, *puberulum*, *spectabile*, *griffithii*, *zerumbet* 等の根茎に含まれる (Phytochem 36(3) 699-701, 1994)。しかし、同論文および

表 1.

PLANTS	LABDA-8(17)12-DIENE-15,16-DIAL	CORONARIN E	CORONARIN D
CURCUMA			
C. LONGA	- → + (OUR STUDY)	-	
C. MANGGA	+	-	
ALPINIA			
A. JAVANICA	+	+	
A. GALANGA	-	-	
ZINGIBER			
Z. OFFICINALE	-	-	
Z. ZERUMBET	+	-	
HEDYCHIUM			
H. CORONARIUM	-	+	+
H. LONGICORNUTUM	+	-	

類似の文献ではウコン (*C. longa*) 根茎に 1 は無いとされ、葉における発現量は報告されてこなかった (表 1)。今回、*C. longa* の根茎には含まれないが、葉に多く含まれることを明らかにし、また *C. aromatic*, *zedoaria* には根茎、葉とも 1 が含まれないことを確認した。クルクマ属では *mangga* に含まれることが知られている。これらの結果は 1 の生合成経路がウコン類にも存在するものの転写調節のレベルで *longa* の根茎で発現しないように制御されることを示唆している。今後はジテルペンの合成酵素およびその転写調節因子の解析を進めたい。また応用面として、栽培における余剰物として大量に廃棄されているウコン葉から成分を抽出し抗菌活性などを利用した再利用品への活用が期待できる。

データベースの構築

以上のデータをウェブ上で公開する手段として、クロマトグラムを表示するブラウザ (JCAMP Viewer) とマススペクトルを検索するソフトウェア (MassBank) を融合させたソフトウェアを開発した。この開発は JST ライフサイエンスデータベース統合事業「メタボローム・データベースの開発」(代表: 金谷重彦) とも連携した内容であり、富山大学のデータベースを日本のライフサイエンス基盤に組み込むことを目指している。まだ公開には至らないが、このソフトウェアによりウェブ上で公開されるクロマトグラム上のピークを選択して、スペクトルデータベースに検索をかけることが可能になる。

これまでの MassBank ソフトウェアは大変便利なインストーラが提供されてはいるものの、新しい PC を用意して指定された OS 上に Apache, Tomcat, Perl, MySQL, C++ という様々なソフトウェアを指定されたとおりにインストールしないと動かない仕組みであった。世界中から協力者を募って富山大学を含め 20 以上の研究グループがスペクトルを公開しているが、これらのスペクトルも MassBank のサイトでのみ閲覧できるという仕組みに見えてしまい、データを共有するという当初の意図とは異なる方向にも受け取れてしまう。また検索画面は複数のページに分割されており、質量による検索と名前による検索などはほぼ同一の機能を提供しているにもかかわらず画面を切り替えねばならない状況になっていた。今回開発したソフトウェアはこうした公開データの局在を解消し、検索方法のスリム化を図る目的で設計されている。まず、開発したアプリケーションは Java 言語のみで書かれており、Java 実行環境をインストールするだけで MassBank とほぼ同じ機能を享受できる。さらに、JNLP と呼ばれるブラウザからアプリケーション起動をする仕組みを用いて実装されているため、ブラウザ上からでもローカルな PC 上でも同一のソフトウェアを動かすことができる。平成 23 年度に MassBank のデータはウェブ上でダウンロード可能になったため、ダウンロードしたスペクトルに自分で好きなデータを追加・削除した後でスペクトルの検索が可能になった。

今回開発しているアプリケーションソフトウェアは富山大が開発する和漢薬データベースやその他のウェブデータベース上から簡単に起動させることも可能である。現在、和漢薬データベースには富山大学で計測する生薬のクロマトグラムおよび質量スペクトルが掲載されている。これらのデータは JCAMP Viewer を用いてインタラクティブな閲覧が可能になっているものの、注目したスペクトルによる検索や各スペクトルの標準品との比較をユーザが確認することは難しかった。(例えばデータを MassBank のウェブサイトにデータをコピーして検索せねばならなかった。) 今回開発したソフトウェアによって和漢薬データベースの上から直接スペクトルの比較検索をおこなえるようになる。現在、検索ソフトウェアの開発を継続しており平成 24 年度中には和漢薬データベースにも実装したいと考えている。

■結論

平成23年度は、生薬の具体例として琉球特産生薬の解析をテーマとした。沖縄で収穫される大型のウコン栽培種の分析を通して、その中に含まれる生理活性成分を測定するとともに、それらの情報をウェブ上にデータベース化する作業をおこなうことを目標としが、ウコンが巨大化する理由については今年度の解析から示唆をえることができなかった。しかし、ウコン葉から抗菌活性を持つ成分を新規に同定するなど、当初は期待していなかった発見をすることができた。今後は計測したクロマトグラムやスペクトル情報をウェブ上（和漢薬データベース）に載せる予定である。また和漢薬データベースとMassBankデータベースを連携させるなど、複数のデータベースを統合する作業を今後も進めていく。

■発表論文等

1. Arita M, Yoshimoto M, Suwa K, Hirai A, Kanaya S, Shibahara N, Tanaka K “Database for crude drugs and kampo medicine” *Genome Informatics* 25(1) Special Issue JSBi2010, 1-11, 2011

昨年度および今年度の共同研究により開発した和漢薬データベースの内容を論文化したもの。和漢薬の学術情報と文献情報をあわせて公開し、検索機能を付したものの概要を紹介している。現在 metabolomics.jp 上にある情報は順次富山大学の和漢薬データベースに移管中である。

2. Tanaka K, Hayashi K, Fahad A, Arita M “Multi-stage mass spectrometric analysis of saponins in *glycyrrhiza radix*” *Natural Product Communications* 6(1):7-10, 2011

カンゾウ根に含まれるグリチルリチン類をIT型質量分析計で計測し、多段の開裂情報から糖鎖部分および骨格の測定情報を記したもの。グリチルリチンの開裂スキームを明確に示した。

3. 有田 正規(編)「使えるデータベース・ウェブツール」*実験医学別冊* 9月 29(15), 羊土社, 2011

国内で開発される、バイオインフォマティクス関連のデータベース、ウェブツールをまとめた別冊。全章についてソフトウェアの比較対照表をつけ、各ツールのメリットとデメリットを明確にした。