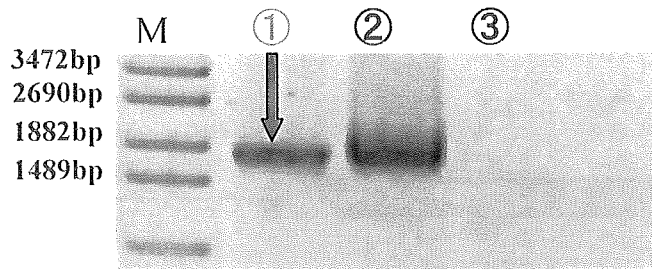


コロニーPCR



genomic DNA PCR



sample number:

①: WLYPDI/AR10

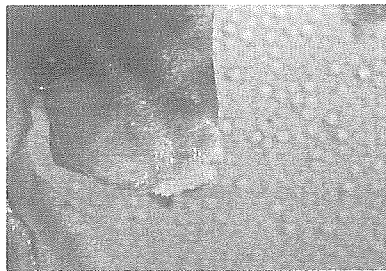
②: positive control

③: negative control

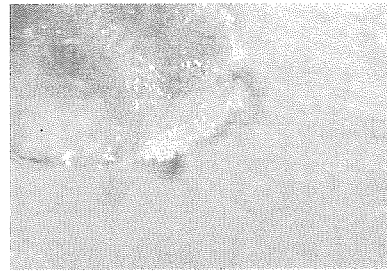
M: Marker: λ -EcoT141 digest

図5

写真1

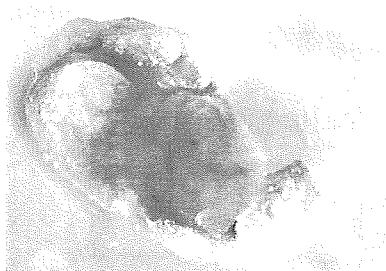


(after two weeks)



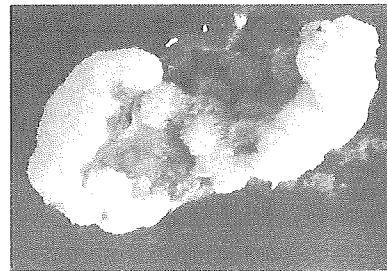
(after four weeks)

MS+NAA 1mg/L, BA 10mg/L, Claforan 0.5g/L



(after six weeks)

MS+NAA 1mg/L, BA 10mg/L,
Claforan 0.5g/L, hygromycin 25mg/L



MS+NAA 1mg/L, LBA 10mg/L,
Claforan 0.5g/L

写真2

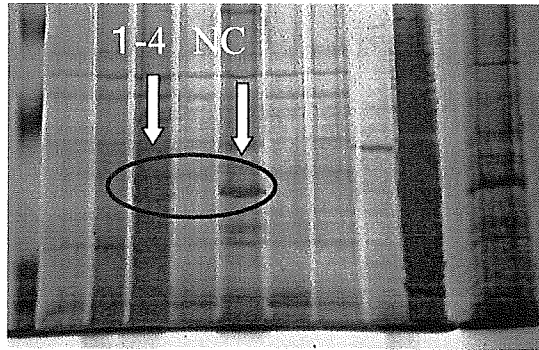
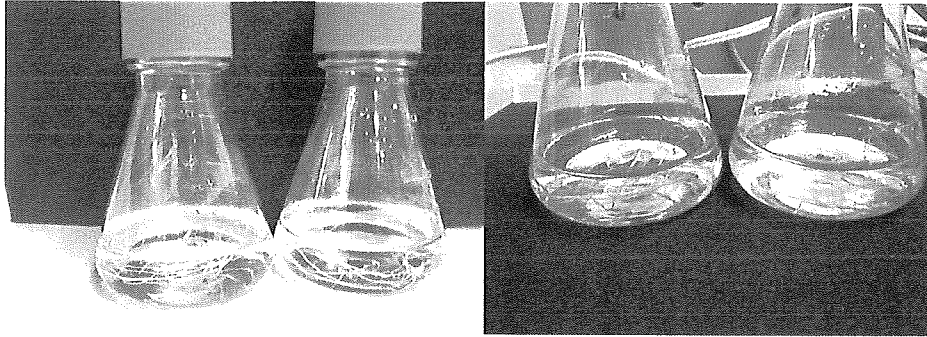


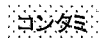
図6 SDS-PAGE写真 三つのサンプルの中に、1番濃く出るのは1-4である。NC(negative control)に比べると出たバンドの位置明らかに違うことが分かった

表1 Sample of hairy roots

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1-1	1-2	1-3	1-4	コンタミ	1-6	1-7	1-8
2	コンタミ	コンタミ	コンタミ	コンタミ	コンタミ	サンプル 未採集		
3	3-1	3-2	コンタミ	中止				
4	4-1	4-2	4-3	4-4				
5	コンタミ	5-2	中止	中止	中止			

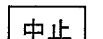


タンパク質レベルで確認できたもの



コンタミ

無菌操作の不注意でコンタミを起こしたもの



中止

毛状根の成長は培養の途中で停止したもの
(原因:成長点を含んでない毛状根を切り取った)

液体培養条件: 100rpm/min振とう、25°C暗所培養



図7 1 2 3 4 5 6

Lane 1:Wako Pure systemを用いて、発現されたyPDI(タンパク質糖鎖が付加しない)
 Lane 2、lane3:コウジカビ発現系を用いて、発現されたyPDI
 Lane 4,lane5,lane 6:毛状根1-4、3-1、4-1から発現できたタンパク質

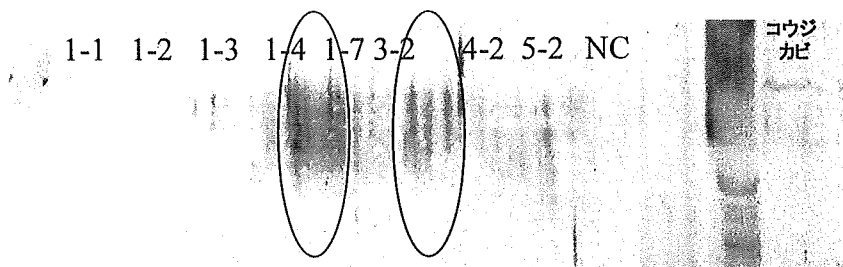


図8

Negative control(NC:野生型ペラドンナ)に比べると、1-3、1-4、1-7、3-1、3-2、4-1、4-2毛状根サンプルにyPDIが組み込まれたことが分かった。この中1-4と3-2のタンパク質の発現量が一番多いことが分かった。
 また、Wako pure systemで発現されたyPDIの分子量と比べると、毛状根で発現されたyPDIは糖鎖が付加しないことを考えられる。



写真3



写真4



写真5



写真6

薬用植物の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 野口博司 静岡県立大学 薬学部 ・教授

カルコン合成酵素（CHS）スーパーファミリーを形成するⅢ型ポリケタイド合成酵素(PKSIII)の中には、近年、マロニル CoA のみを基質としてナフタレンなどカルコン以外の骨格を構築する酵素が報告され注目を集めている。クロモンやアントラキノンなど複数のポリケタイドを生産する薬用植物である大黃 (*Rheum palmatum*) はこれら新規酵素遺伝子の資源として期待される。ダイオウより得られた PKSIII としては、これまでジケタイド骨格を構築するベンザルアセトン合成酵素 (BAS) が知られていたが、本研究の過程で CHS 並びにヘプタケタイドを合成する新規 PKSIII をコードする遺伝子が得られ、これらの酵素の機能の詳細と触媒機構について概説する。

薬用植物としてのダイオウ (*Rheum palmatum*) の抗炎症活性本体と目されてきたリンドレインのジケタイド部分を生合成すると考えられる、BAS 遺伝子を他の植物内で恒常的に発現させるようにベクターを構築し、*Agrobacterium* を用いた形質転換系によってこれをシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に導入し、組換え植物体を作成し、ホモ転換系の種子を確保した。

A. 研究目的

1) 遺伝子組換え植物の環境に及ぼす影響の検討; 在来薬用植物の二次代謝成分の生成、ことに分子の修飾ではなく骨格形成、に関わる遺伝子が特定の植物に組込まれた際の当該植物の代謝変動、あるいは在来と異なる代謝産物の生成蓄積、あるいはその植物の二次代謝産物生成蓄積への影響に対する検討例は乏しい。

そのような検討を実施するには導入遺伝子はその遺伝子のコードする酵素の活性が明らかとなるように導入先のゲノムに存在せず、かつ酵素基質は導入先に潤沢に存在し、その酵素タンパクが生産された時その触媒機能が発現されることが期待されなくてはならない。

フラボノイドは高等植物に普遍的の存在するが、BA(phenyl butanone)型の植物ポリフェノールを生合成する種は限られている。ダイオウの他にはラズベリー、生薬基源植物としては生姜やウコンなど限られた単子葉植物が中心である。シロイヌナズナには当然フラボノイド、アントシアンの代謝系は存在するが、BA 型の、即ち C6-C4 型の化合物を生産することは知られていない。従ってダイオウ(*Rheum palmatum*)由来の BAS 遺伝子(*bas*)が導入され強制発現した場合に、i) 本酵素の基

質は *p*-coumaroyl CoA, malonyl CoA でありシロイヌナズナに常在するフラボノイド類生合成に係るカルコン合成酵素(CHS)基質と同一である、ii) *bas* は約 1.4Kb の大きさで、*chs* スーパーファミリーとしては平均的なものである。同一ファミリー内の酵素のフォールディング形状は一般的に類似しており、細胞内で異物として認識されにくい。iii) 補酵素等の要求性もない、iv) 通常細胞質で機能する。v) 知られている限り BA の蓄積は直接細胞の生存を脅かすことはない。vi) BAS は単一酵素で抗炎症作用本体とされ、もしくはラズベリーの香気成分となる骨格を構築できる—これらの点から、BAS が細胞中で生合成されれば、細胞内に BA が蓄積される可能性が高く、しかもそれが導入遺伝子によるものであることが容易に判別される、という利点がある。シロイヌナズナは多くの蔬菜となる植物を含むアブラナ科に属し、その知見を広範な農業分野に応用できる可能性が高い。またシロイヌナズナを用いれば年4回程度の経代が可能であり、短期間に遺伝的形質変化を追跡することができる。

以上の点を考慮しダイオウより単離した *bas* をシロイヌナズナに導入し、その発現によって招来されるシロイヌナズナ個体及びその遺伝的・生理的

変化並びにその土壌への影響を調査研究することとした。

2) ダイオウ由来 III 型植物ポリケタイド合成酵素 (PKS) の機能解明; ダイオウにはカテキンや複数のラタンニンと呼ばれるプロシアニジンが存在すること、さらにスチルベン、アントラキノン、ナフトパイロン等の多様なポリケタイド誘導体を含むことは良く知られている。既に我々はダイオウから BAS を単離したが、当然のことながら典型的ポリケタイド合成酵素である CHS, アントラキノン骨格生合成にかかわるオクタケタイド合成酵素等多様な PKS をコードする遺伝子の存在が予想される。これらの多様な植物ポリケタイドが果たして、III 型 PKS で生合成されるか否かは未だ明らかにされていない。我々はこれらの生合成が I, II 型 PKS によるものではなく、III 型 PKS が関与しているものと想定した。これらの遺伝子の配列を明らかにできれば、同一植物に属するだけに、そのアミノ酸配置の差異は、植物種による異動ではなく、機能に基づくものである可能性が高く、酵素の触媒機能を決定づけている要素を解明できる可能性が高い。ひいては特定の炭素炭素結合を構築する機能を有する酵素をデザインする上で必要な情報を得る可能性があり、遺伝子情報の資源化につながるかと考え検討を開始した。

B. 研究方法

本学薬用植物園で栽培されているダイオウ *Rheum palmatum* 苗の葉及び根より、夫々 AGPC法を用いて total RNA を抽出し、逆転写反応により 1st strand cDNA を作成した。渋谷の開発した縮重入りのプライマー CHS-112S, CHS-380A を用いて第一 PCR を、次にこの反応液を鋳型として、CHS174S, CHS-368A を用いて nested PCR を行った。予想された 600 bp のバンドが出現したのでこれを精製し、pT7Blue にサブクローニングし、塩基配列の解析を行い、葉より二種、根より三種計 5 種の cDNA コア配列を得、順に leaf 1, leaf 2, root 3, root 4, root 5 と名付け、3'-RACE、5'-RACE 法 (5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL(R))) により配列の解析を行った。leaf 1, leaf 2 については既に Phenyl butanone を生成する BAS をコードしていることが明らかとなっている。root 3, root 4, root 5 について、全長配列を決定した。各遺伝子の全長 ORF の C 末端にヒスチジンタグを付加した融合タンパクとして大腸菌内で異種発現を行い、Niキレートカラムを通過させた分画を精製酵素として酵素反応に用いた。組換え酵素の存在を SDS-PAGE にて確かめた。

酵素反応は、acetyl CoA、*p*-coumaroyl CoA 或いは

別表に記した各種 acyl CoA を開始基質とし、ポリケタイド鎖伸長基質として malonyl CoA 或いは methylmalonyl CoA を精製酵素と共に 30 °C、20 分以上インキュベートすることにより行い、塩酸の添加により反応を停止し、酢酸エチルで反応生成物を抽出し、逆相の HPLC による分析を行った。

酵素反応生成物の物理分光法による構造決定に際しては下記の反応条件による酵素反応を行った。

20 mg Enzyme

280.8 μM malonyl CoA

Reaction buffer total 100 mL

↓ 20% HCl 10 mL、反応停止。

↓ 200 mL EtOAc で抽出 (3 回)。

↓ EtOAc 層を等量の H₂O で洗浄。

↓ Na₂SO₄ で EtOAc 層を乾燥、EtOAc を留去。

↓ MeOHsol、分取 (HPLC)、画分を凍結乾燥。

↓ 溶媒留去。

↓ 比較的大きなピークを LC-ESIMS で確認。

↓ HPLC の条件を変更、分取、精製。

↓ ¹H-NMR (CD₃OD)。

(生成物)

Aloesone, Sek4, Sek4b, *p*-Coumaroyl Triacetic Acid Lactone derivatives, BisNorYangonin derivatives, 2,7-Dihydroxy-5-methyl chromone 等

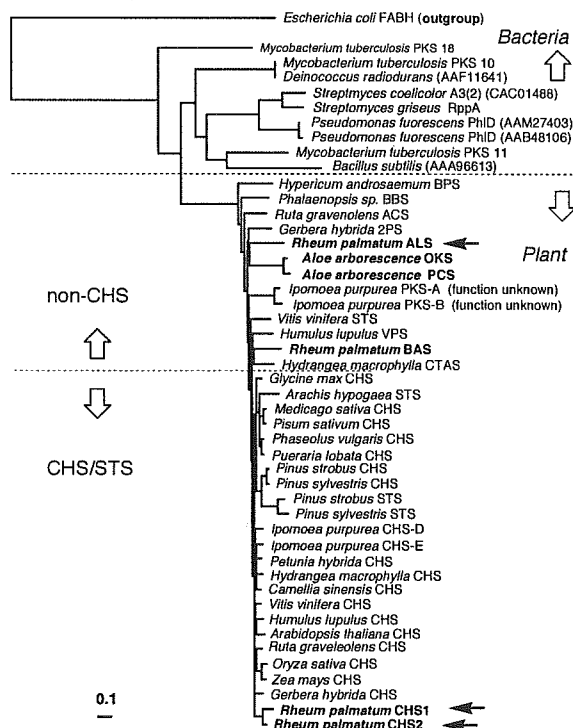
ダイオウ由来ベンザルアセトン合成酵素 (BAS) 遺伝子 (*bas*) については別個記載した。ベクター pET-22b(+):*bas*-his.tag を *Bam*HI/ *Bpu*1102I の制限酵素処理により *bas*-his.tag 断片を切り出しアガロースゲルより回収後 (QuantumPrep Freeze 'N Spuceze DNA Gel Extraction Spin Columns, BIO-RAD 使用)、T4 DNA polymerase (Takara) により平滑化を行った。バイナリーベクター pSMAB704 は *Sma*I/*Sac*I 処理後平滑化を行った、平滑化 *bas*-his.tag 断片は pSMAB704 の *uidA* 領域にライゲーションした。JM109 に形質転換しスペクチノマイシン耐性菌を選抜した。プラスミドを調整し *Xho*I/*Eco*RI 処理後アガロースゲル電気泳動を行い導入方向を確認した。*bas* 導入シロイヌナズナ形質転換系統の作製については、上記プラスミド PSMAB704:35S-*bas*-his tag をアグロバクテリウム GV3101 にエレクトロポレーションにより形質転換を行った。プラスミドを調整し *Sac*II 処理後、アガロースゲル電気泳動を行いプラスミドの導入を確認した。バイナリーベクターを形質転換したアグロバクテリウム (GV3101) を、スペクチノマイシン 100 μg/ml、ゲンタマイシン 25 μg/ml、リファンピシン 50 μg/ml を含む LB 液体培地で 28 °C 約 170 rpm 約 20 時間培養を行った。遠心して集菌した菌を、Infiltration Medium に懸濁させた。Infiltration Medium は Murashige-Skoog 培地にサイトカニンとして終濃度 Benzyladenin 0.1 ppm, silicone L77 0.2

μL/ml が添加されたものを用いた。

シロイヌナズナ野生系統 Columbia 種の開花直前の蕾が出てきた頃の株を用いた。直接懸濁液に浸して 3 分おき、感染させ、形質転換を行った。種子を収穫しグルホシネート耐性となった個体を選抜した。

C. 研究結果

ダイオウからは何故かこれまで典型的カルコン合成酵素(CHS)は単離されてこなかった。root3, root4 (CHS1, CHS2)の全長配列を決定し、遺伝子の機能を解析した結果これらがCHSであることが確定した。

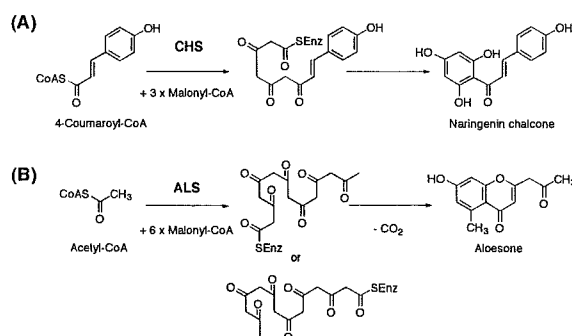


夫々1,176-bp, 391アミノ酸、1,179-bp、392アミノ酸よりなり、互いに90%の相同性があり、他の植物由来III型PKSとの間には概ね60-80%の相同性が見られた。これまで述べてきたBAS³⁾とは70%、次に述べる root5のコードしていたAloesone合成酵素(ALS)とは60%の相同性が見られた。*Rheum tataricum*⁵⁾由来のスチルベン合成酵素(STS)とは70%相同性が見られた。どちらのCHSも多くIII型PKSで保存されている3アミノ酸 Cys164, His303, Asn336は保存され、その他 Met137, Gly211, Gly216, Ile254, Gly256, Phe265, Ser338, Pro375, Phe215も保存されていた。興味深いことには、やはり典型的CHSであるコガネバナのCHSでもこれらのアミノ酸残基は保存されているが、コガネバナで受容されたC4~C12の鎖長、あるいはピーナッツのSTSで受容された鎖長~C14の脂肪酸CoAエステルを越え、C20までの脂肪酸CoAエステルを受容しテトラケタイドラクトンを生成すること、則ち3個の

malonyl CoAを縮合することが分った。

root 5は開始基質としてCHS、STS、BASの本来の基質である

UV: λ_{\max} 243, 259, 291 nm. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): d 9.55 (1H, s, 7-OH), 6.59 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 6-H), 6.56 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 8-H), 6.01 (1H, s, 3-H), 3.83 (2H, s, 1'-H), 2.63 (3H, s, 5-Me), 2.19 (3H, s, 3'-Me). EI-MS *m/z* (rel. int.): 232 (*M*⁺, 81), 190 (100), 161 (21), 151 (46), 43 (76)

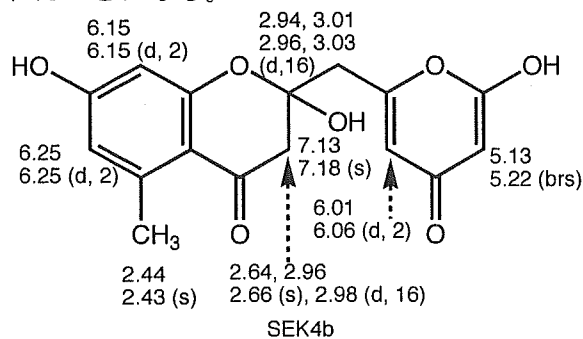


カルコン合成酵素(CHS)、スチルベン合成酵素(STS)ではスターター基質に対する基質特異性が甘く、様々な構造のアナログ体を基質として受け入れることが古くから知られ、BASについても同様の結果が得られている^{2,3,4)}。ALSの基質特異性を検討したところCHS、STS、BASの本来の基質である1H-NMRの結果から図1に示す如く、Actinorhodinを産生するII型が

基質	CTAL type	BNY type
<i>n</i> -Butyryl CoA	○	○
<i>n</i> -Hexanoyl CoA	○	○
<i>n</i> -Octanoyl CoA	○	○
<i>n</i> -Decanoyl CoA	○	○
<i>n</i> -Lauroyl CoA	○	○
<i>n</i> -Myristoyl CoA	○	○
<i>n</i> -Palmitoyl CoA	○	○
<i>n</i> -Stearoyl CoA	○	○
<i>p</i> -Coumaroyl CoA	×	×
Benzoyl CoA	×	×
Cinnamoyl CoA	○	○
<i>p</i> -Dihydrocoumaroyl CoA	○	×
Phenylacetyl CoA	○	○
Isobutyryl CoA	○	○
Isovaleryl CoA	○	○
Acetoacetyl CoA	×	×
Methylmalonyl CoA	—	—
Succinyl CoA	—	—

リケタイド合成酵素のminimal PKSが生産する代謝産物として知られているSEK4bあるいはSEK4ではないかと疑われた⁵⁾。

そこでAloesoneの場合と同様に標品との比較により構造決定すべく、C. KhoslaよりSEK4とSEK4bの混合物を御恵与頂き、¹H-NMR、GC-EIMS、FAB-MSを測定し酵素反応生成物と比較したところ⁶⁾、¹H-NMRの測定値が図程度に一致したことでSEK4及びSEK4であると現在考えている。両化合物はともにオクタケタイドである。これまでIII型PKSとしては、知られていなかったオクタケタイドの生成が認められたことになる。

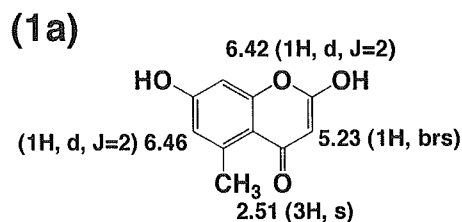


	K_m (μM)	K_{cat} (min^{-1})
CHS1	61.1	1.12
CHS2	36.1	0.79
ALS	121.0 \pm 24.6	0.032
<i>M. sativa</i> CHS2	4.7 \pm 1.1	4.58
BAS	10.0	1.79

*;値は夫々の最適条件にて。

一般には組換え体で、新たな活性の得られるこ

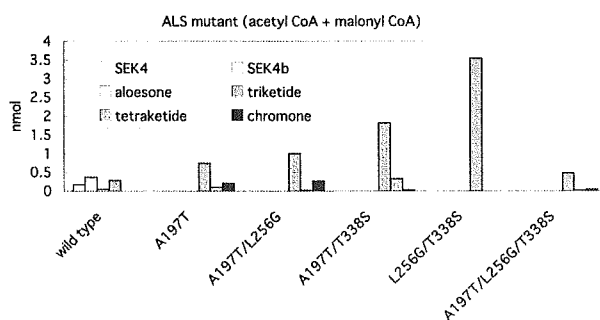
とは稀であるが、ALSについて組換え酵素を作成してみると興味深い結果が得られた。A197T, A197L変異酵素ではRt 23.1 minに、新たに[M+H]⁺ = 193の単一ピークが見られた。¹H NMRの解析から2,7-dihydroxy-5-methylchromone (1a)と推定され、標品と同一した。



2,7-dihydroxy-5-methylchromone
RT = 23.1 min [M+H]⁺ = 193.2 λ max 308 nm

T133S, V194C, V194T変異酵素においては活性が减弱したが、野生型と同様の生成物を得た。254番目のMet、256番目のLeu、338番目のThrに変異を導入したM254I, L256G, L256Y, T338A, では、T338S変異酵素がAloesoneの合成能を失い、副産物のトリケタイドラクトン (TAL)やテトラケタイドラクトンのみを生成した。更に見ると、野生型では*p*-coumaroyl CoAを基質として受け入れなかったことに対してL256G変異酵素においては2分子のmalonyl CoAを縮合したトリケタイドラクトン bisnoryangonin (BNY)、3分子のmalonyl CoAを縮合したテトラケタイドラクトン *p*-coumaroyltriacetic acid lactone (CTAL)を産物として得た。T133S, V194C, V194T, M254I, L256Yにおいては両産物を得たものの、生成量はわずかであった。また、A197L, A197T, T338A, T338S, T338Iでは野生型と同様、酵素反応は進行しなかった。

そこで点変異でなくダブル、トリプルミュータントを作成し、酵素活性を検討した。前項での、A197T 変異酵素のプラスミドを鋳型とし



A197T/L256G, A197T/ T338S 変異導入を、L256G 変異酵素のプラスミドを鋳型としL256G/T338S 変異導入を、A197T/ L256G 変異酵素のプラスミドを鋳型としA197T/L256G/T338S 変異導入を行った。この組換え体は、ALS では受容されない

p-coumaroyl CoA と malonyl CoA を適用した場合、点変異体である L256G 変異酵素においてトリケタイドラクトン (BNY)、テトラケタイドラクトン (CTAL) を生成した場合と同様に、ダブル、トリプルミュータントにおいても L256G に変異を入れた変異酵素全てに両生成物の活性が見られた。一方、L256G/T338S 変異酵素においては生成量に変化はなかったものの A197T/L256G 変異酵素においては CTAL、BNY 共に生成量が増大し、特に BNY の顕著な生成が見られた。5-メチルクロモンの生成については A197T 変異酵素が最も *kcat*/*Km* の値が大きく、変異を入れる毎に低下し、特に T338S に同時に変異導入したものでは *kcat* の値が劇的に低下した。

既に197番目のアミノ酸残基は長鎖ポリケタイド鎖の伸長に関与しているのではないかと述べたが、開始基質が acetyl CoA と *p*-coumaroyl CoA の両者の場合で197番目のアミノ酸残基は伸長反応の回数を制御しているように思われる。NoelらのX線解析の結果から、活性キャビティの構造を見ると197番目のアミノ酸残基は acetyl CoA をスターター基質とした場合は長鎖ポケットの入り口を形成し、*p*-coumaroyl CoA をスターター基質とした場合はこのアミノ酸の側鎖がポリケタイド鎖の先端がクマロイルポケットに進む途中に位置すると考えられる。恐らく197番目のアミノ酸残基は、長鎖ポリケタイド化合物の場合では長鎖ポケットにポリケタイド鎖が入るか否かを、カルコンの場合では Thr¹⁹⁷ の OH 基によってポリケタイド鎖のフォールディング形成とそのことによる malonyl CoA の縮合数の制御に寄与しているであろう。またさらに T338S の変異を導入することでキャビティの形が CHS に近づき、カルコンの構造異性体である CTAL 生成が増大したと考えられる。ここでキャビティを形成するアミノ酸残基のうち Val¹⁹⁵, Asp²¹⁸, Met²⁵⁴ の CHS に対応するアミノ酸をトリプルミュータントに導入したが、活性に変化は見られなかった。

一方コガネバナ (*Scutellaria baicalensis*) 由来カルコン合成酵素 (CHS-P) は我々が最初に取り上げた典型カルコン合成酵素であるが Aloesone のアミノ酸配置である T197A /G256L /S338V 組換え体を作成し、生成物を検討したが Aloesone の生成が見られなかった。T339I ではタンパク質全体のフォールディングの問題か、異種発現は成功しなかった。

形質転換シロイヌナズナについては、現在のところ抗生物質耐性と農薬耐性を有する株 3 2 系統

を得、これらについて *bas* の導入を確認した。酵素タンパク質の発現の有無良否は未だ検討していない。これらを相互に交配し、一応 *bas* のホモに導入された筈の種子を獲得したところである。今後ホモ変異体の栽培及び二次代謝成分の変動について検討する。

D. 考察

本研究によりダイオウの III 型ポリケタイド合成酵素ファミリーのうち、肝腎のアントラキノン合成酵素を除いては、単一植物種より、典型的カルコン合成酵素をコードする遺伝子から本来ダイオウではなく、同じ瀉剤であっても、異種のアロエの成分として知られる、Aloesone を生成する酵素をコードする遺伝子を得ることができた。ALS に関しては、生理的条件下での生成物については未だ疑問が残る。合成中間体は一般的には蓄積されず、直ちに次の過程の前駆体(基質)として利用され、代謝されていくことを考慮する時、この ALS と、其の次の過程を担う酵素を併存させた実験を実施すれば異なった機能を示す可能性もあるのではないかという予想もできないこともない。其の意味ではダイオウの PKS に関する研究が緒についたということもできよう。

ここで行った様々な組換え酵素の生成物の反応は III 型 PKS の機作について以下のような解釈も可能とした。III 型 PKS は開始基質として *p*-coumaroyl CoA や cinnamoyl CoA 等芳香環を含むもの、あるいは acetyl CoA や hexanoyl CoA など直鎖の CoA エステルを取り込んだ時 256 番目のアミノ酸は開始基質の特異性を決定する重要なファクターの一つであり、この部分が Gly のように立体的に小さい CHS や STS では芳香環を含む基質を取り込んで伸長反応をおこなうことができる。しかし Leu のように立体的に大きい時、例えば ALS や OKS では芳香環を含む CoA エステルは取り込みにくく、acetyl CoA 等の側鎖が小さい CoA エステルを取り込んで伸長反応をおこなう。

スターター基質が取り込まれると malonyl CoA を基質としてポリケタイド鎖の伸長反応が起こるがこの伸長数を制御しているアミノ酸の一つが 197 番目である。芳香環を含む基質はクマロイルポケットと呼ばれる部分へ、acetyl CoA の場合は長鎖ポケットと呼ばれる、夫々異なった活性部位の方向へ向かって伸長させると考えられる。

197 番目のアミノ酸はどちらの場合も伸長途中に位置し、その立体的形状およびその大きさから伸長数を制御して、ポリケタイド鎖が長鎖ポケット、クマロイルポケットのどちらに向かうかを決定しているのが 338 番目のアミノ酸

であると考えられる。CHS などクマロイルポケットの方向にポリケタイド鎖を伸長させる場合は Ser となっており、おそらく活性中心近傍に位置する OH 基の静電的影響からポリケタイド鎖の進行方向が決められていると思われる。

ALS など長鎖ポケットに伸長させる場合には OH 基は存在せず、256 番目のアミノ酸残基の立体的大きさに依存して、長鎖ポケットの方向に向かうと考えられる。

ポリケタイド鎖の伸長が終了すると閉環反応の違いにより、生成物の多様性が生まれるのではないかと。さらに閉環反応の違いを探ることで本酵素の特異性と広範な触媒活性を生かした III 型 PKS によるコンビナトリアルケミストリーの発展、非天然型化合物ライブラリーの構築が期待されよう。

参考文献

- 1) I. Abe, Y. Takahashi, H. Morita, and H. Noguchi, *Eur. J. of Biochem.*, **268**, 3354-3359 (2001)
- 2) Abe, I., Morita, H., Nomura, A., Noguchi, H. : *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 11242-11243 (2000)
- 3) Abe, I., Takahashi, Y., Lou, W., Noguchi, H. : *Org. Lett.* **5**, 1277-1280 (2003)
- 4) Abe, I., Watanabe, T., Noguchi, H. : *Phytochemistry*. **65**, 2447-2453 (2004)
- 5) Fu, H., Hopwood, D. A., Khosla, C. : *Chemistry & Biology*. **1**, 205-210 (1994)
- 6) Fu, H., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A., Khosla, C. : *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4166-4170 (1994)
- 7) Samappito, S., Page, J. E., Schmidt, J., De-Eknamkul, W., Kutchan, T. M. : *Phytochemistry* **62**, 313-323 (2003)

E. 研究発表

1. 論文発表 : I. Abe, T. Watanabe, H. Morita, T. Kohno and H. Noguchi; Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides: Manipulation of Chalcone Synthase, *Org. Lett.*, **8**(3), 499-502, (2006)
2. I. Abe, T. Watanabe, W. Lou, H. Noguchi; Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase, *FEBS Journal (EUR. J. BIOCHEM.)*, **273**, 208- 218, (2006)
3. I. Abe, T. Watanabe and H. Noguchi; Chalcone Synthase Superfamily of Type III Polyketide Synthases from Rhubarb (*Rheum palmatum*), *Proc. Japan Acad.*, **81**, Ser. B 434- 440, (2005)
4. I. Abe, S. Oguro, Y. Utsumi, Y. Sano, and H. Noguchi; Engineered Biosynthesis of Plant

Polyketides: Chain Length Control in an Octaketide-Producing Plant Type III Polyketide Synthase, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (36), 12709- 12716, (2005)

5. I. Abe, T. Watanabe and H. Noguchi; Enzymatic formation of long-chain polyketide pyrones by plant type III polyketide synthases; *Phytochem.*, **65**, 2447-2453, (2004)

2)学会発表

1. 阿部郁朗、内海依子、佐野幸恵、小黒聡、野口博司、大黃由来新規III型ポリケタイド合成酵素の機能解析 日本薬学会第124年会 (大阪) 31-P 2-440 (2004)
2. 小黒聡史、阿部郁朗、野口博司 : 植物由来ポリケタイド合成酵素のクローニングと機能解析 第39回 天然物化学談話会(淡路島)、要旨集、2004年7月22日
3. 渡辺達也、阿部郁朗、野口博司 : 植物由来ポリケタイド合成酵素の基質特異性と非天然型ポリケタイドの創出 第39回 天然物化学談話会(淡路島)、要旨集、2004年7月22日
4. 阿部郁朗、内海依子、Lou Weiwei、小黒聡史、渡辺達也、野口博司 : 大黃由来芳香族ヘプタケタイドの骨格を構築する新規III型ポリケタイド合成酵素の構造機能解析 日本生薬学会第51回年会(神戸)、要旨集、p. 133、2004年9月10日
5. 阿部郁朗、渡辺達也、内海依子、野口博司 : 長鎖脂肪酸 CoA エステルに対する植物ポリケタイド合成酵素の基質特異性の検討 日本生薬学会第51回年会(神戸)、要旨集、p. 135、2004年9月10日
6. 阿部郁朗、渡辺達也、Lou Weiwei、野口博司 : 芳香族ヘプタケタイドの骨格を構築する大黃由来新規III型ポリケタイド合成酵素の構造機能解析 第125回 日本薬学会年会(東京)、要旨集4、p.173、2005年3月31日
7. 渡辺達也、野口博司、阿部郁朗 : 植物ポリケタイドの生合成工学:カルコン合成酵素への点変異導入によるオクタケタイドの生成 日本生薬学会第52回年会(金沢)、要旨集、p. 49、2005年9月16日。
8. 安部剛史、渡辺達也、小黒聡史、阿部郁朗、野口博司 : 植物ポリケタイドの生合成工学:ベンザルアセトン合成酵素の構造機能解析 日本生薬学会第52回年会(金沢)、要旨集、p. 50、2005年9月16日

F. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

二次代謝酵素遺伝子の導入が内生的代謝機能に及ぼす影響

分担研究者 水上 元 名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

ニチニチソウの curcumin 配糖化酵素遺伝子を導入したシロイヌナズナ植物体および培養細胞の代謝産物組成を解析した。形質転換培養細胞では curcumin の配糖化能を獲得したことに加えて、野生株培養細胞と比較して著しく多量の coniferin が蓄積していた。一方、植物体では代謝産物組成の顕著な変化は観察されなかった。遺伝子組換え薬用植物の安全性評価においては、その二次代謝プロファイルの詳細な解析が必要である。

A. 研究目的

薬用植物分子育種における重要なターゲットとして、二次代謝系酵素をコードする遺伝子の導入と発現による二次代謝系の人為的制御が挙げられる。このような研究では、通常ある特定の二次代謝産物生産能が問題とされ、その代謝産物にいたる生合成経路の律側段階を触媒する酵素をコードする遺伝子 (cDNA) を導入し、その成分の消長を解析することが多い。しかしながら、生合成経路の最終段階で化合物の基本骨格を修飾するような、基質特異性がある程度広い酵素の遺伝子を導入、発現させた場合には、対象とする二次代謝産物以外にも、ターゲットとした代謝系以外から生成する、種々の低分子成分の組成や含量への影響が予測される。

本研究では、単一遺伝子の導入によって植物の二次代謝産物がどのように変化するかを解明していく上でのモデル実験系および実験方法の確立に資することを期待して、モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に広範な基質特異性を有するニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) の UDP-glucosyltransferase (CaUGT2) cDNA を導入・発現させ、二次代謝産物の組成が全体としてどのように変動するかを検討した。

B. 研究方法

CaUGT2 を構成的に発現するカセットを組み込んだ植物発現用バイナリーベクター pBI121-CaUGT2 を作製し、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナ野生株に導入した形質転換植物体を得た。この形質転換植物体の T₂ 世代をカナマイシン含有 Linsmaier and Skoog (LS) 寒天培地に無菌的に播種し、生育した個体を土に移した。それらの個体の成熟葉から簡易的にゲノム DNA を抽出し、PCR により目的の発現カセットの導入を確認した。さらに、成熟葉から total RNA を抽出し、ノザンブロットティングにより、CaUGT2 発現量を調べた。プローブは CaUGT2 cDNA 全長を用いた。CaUGT2 の高発現が確認できた個体から次世代の種子を得るとともに、植物組織からメタノール抽出を行い、その代謝産物組成を HPLC により比較した。また、野生株と CaUGT2 高発現体の間で、表現型について通常生育条件下で比較した。

一方、T₂ 世代の芽生えをカルス誘導培地に移し、新たにカルス誘導を行った。これらについても、植物体と同様にノザンブロットティングにより、CaUGT2 発現量を調べた。CaUGT2 の高発現が確認できたカルスを生育させ、液体培養を行うとともに、カルスからメタノール抽出を行い、その代謝産物組成を HPLC により比較した。また、この

液体培養細胞にDMSOに溶解した curcumin を添加し、その変換産物を HPLC を用いて分析した。

C. 研究結果

(1) CaUGT2 高発現体の選抜

ニチニチソウの配糖化酵素 CaUGT2 を導入したシロイヌナズナ形質転換植物体について、自殖を繰り返すことにより T₂ 世代を育成した。この T₂ 世代を対象として CaUGT2 の発現量と代謝産物組成の相関について解析するため、ノザンブロットングによる選抜を試みた。培地上で薬剤感受性による選抜を行った芽生えを土に移し、さらに生育させた。成熟葉から簡易的に抽出したゲノム DNA を用いて、カナマイシン耐性遺伝子および CaUGT2 をそれぞれ増幅することのできるプライマーにより PCR を行い、目的の発現カセットの導入を確認した。さらに、total RNA を抽出し、CaUGT2 全長をプローブとしたノザン解析を行った結果、6 個体で CaUGT2 が高発現していることを確認した (図 1)。これらの個体は次世代 (T₃) の種子を得て、以後の解析に用いた。

また、シロイヌナズナカルスに CaUGT2 を *Agrobacterium* を介して導入した形質転換ライン 1 つおよび形質転換植物体の種子 (T₂) よりカルス誘導を行って CaUGT2 を高発現する 9 ラインのカルスを新たに得た (図 2)。これらは、液体培地に移して、振とう培養細胞も確立した。

(2) CaUGT2 高発現植物体における二次代謝産物組成と表現型

選抜した CaUGT2 高発現植物体の T₃ 世代の植物組織から MeOH 抽出を行い、その二次代謝産物組成について HPLC により解析した。その結果、野生株と比較して高発現植物体で顕著に変化したピークは認められなかった。後述するよう

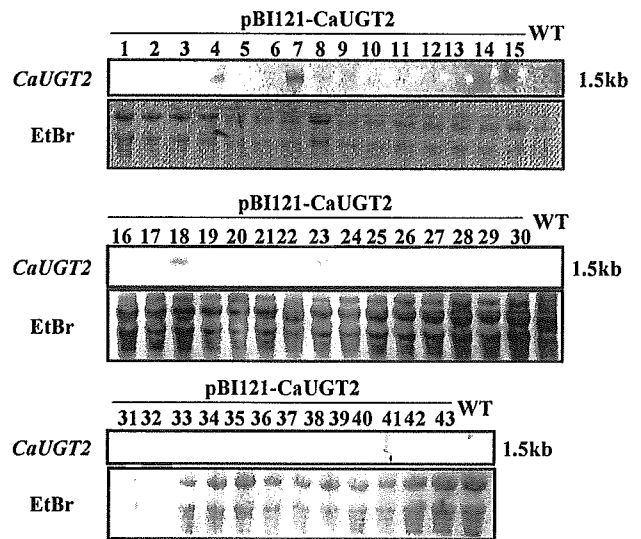


図 1 CaUGT2 導入形質転換植物体のノザン解析 (1-43, 形質転換植物体; WT, 野生株)

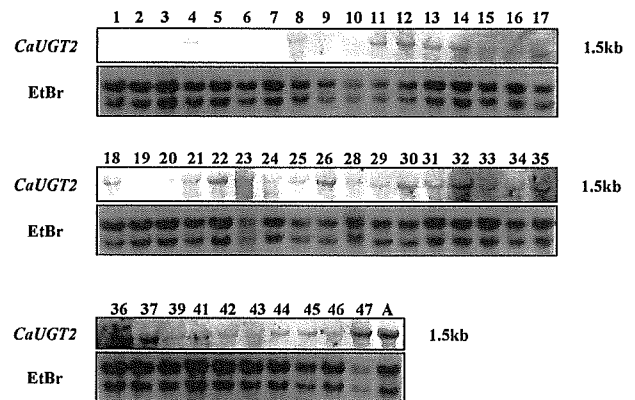


図 2 CaUGT2 導入培養細胞のノザン解析 (1-47, 形質転換植物体由来; A, 直接導入株)

に、CaUGT2 高発現液体培養細胞では coniferin (coniferyl alcohol 1-O-β, D-glucoside) が高蓄積しているが、植物体においては検索した範囲内ではその二次代謝産物組成に大きな影響は及ぼさないことが示唆された。また、高発現植物体の表現型について、通常生育条件下において野生株と比較を行ったが、これに関しても顕著な表現型の変化は観察されなかった。

(3) CaUGT2 高発現培養細胞における二次代謝産物組成

CaUGT2 高発現培養細胞における二次代謝産

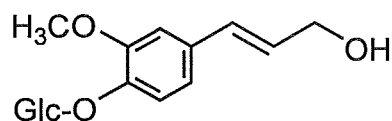


図3 coniferin (coniferyl alcohol 1-O-β, D-glucoside)

物組成には変化が見られるかについて調べた。ノザン解析により CaUGT2 が高発現していることを確認した培養細胞と野生株培養細胞の MeOH 抽出液について、その HPLC プロファイルと比較したところ、高発現培養細胞で coniferin が増大していた (図 4)。また、coniferin 以外にもその含量が増大したピークがいくつか観察されたが、その化合物の同定までには至らなかった。また、coniferin の蓄積量と CaUGT2 の発現量との相関については、定量的な解析が今後必要であると考えられる。ラインによる差はあるが、CaUGT2 高発現培養細胞において、coniferin の蓄積が見られ、一方、高発現培養細胞、野生株培養細胞のいずれにおいても coniferyl alcohol の蓄積はほとんど検出できなかった。Coniferyl alcohol は、*p*-coumaroyl alcohol や sinapyl alcohol と並んで monolignol の一種として lignin の構成単位として機能している。したがって、通常は lignin などへと活発に変換されており、細胞内に多量には蓄積していない。CaUGT2 を導入した形質転換細胞では、発現した酵素によって配糖化されることにより、lignin にいたる代謝の流れからいわば引き抜かれ、液胞中に蓄積しているものと考えられる。

(4) 形質転換細胞における curcumin の配糖化

野生型細胞では curcumin はまったく配糖化されなかった。形質転換細胞では 5 つのピークが検出された。β-Glucosidase で処理するとこれらのピークはすべて消失して curcumin を生じたことから Curcumin 配糖化酵素 (CaUGT2) 遺伝子を導入した形質転換培養細胞および野生株細胞に curcumin

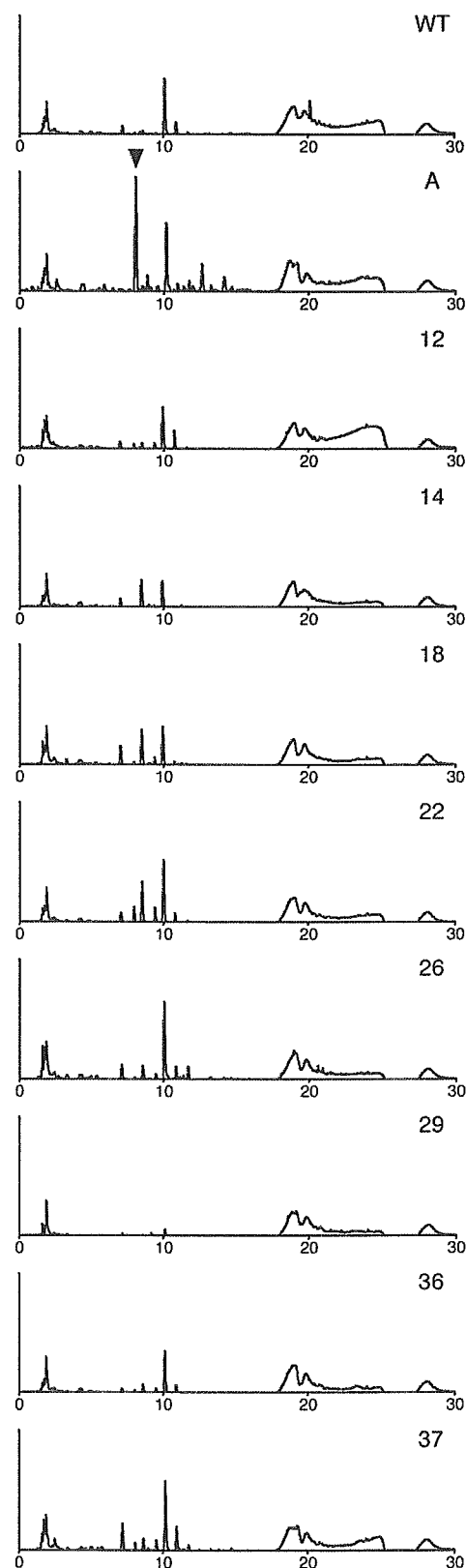


図4 CaUGT2 高発現培養細胞および野生株培養細胞の MeOH 抽出液の HPLC プロファイル (検出波長, 260 nm; ▼, coniferin)

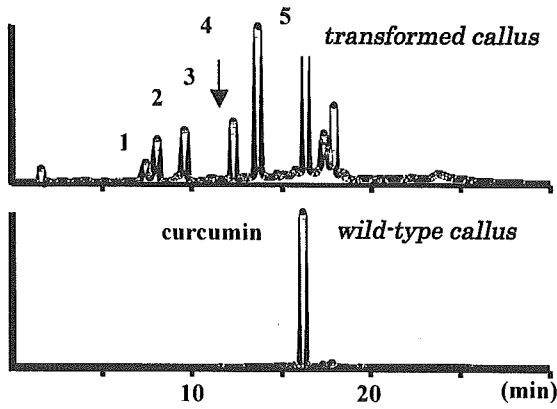


図5 Curcumin 配糖化産物の HPLC による分析 (検出波長 425nm)

を添加し、その配糖化産物を比較した(図5)。

curcumin の β -glucoside であると推定された。5つのピークのうちピーク2とピーク4は Rt および UV スペクトルから CaUGT2 による配糖化産物である curcumin diglucoside および curcumin monoglucoside であると同定された。もっとも多量に蓄積していたピーク5に相当する化合物を HPLC によって精製して、その $^1\text{H-NMR}$ と FT-MS を測定することにより、ピーク5は curcumin malonylmonoglucoside であると同定した。この結果は、導入遺伝子の産物である CaUGT2 によって curcumin から curcumin monoglucoside に変換された後に、シロイヌナズナの malonyltransferase によってアシル化されたことを示している (図6)。異

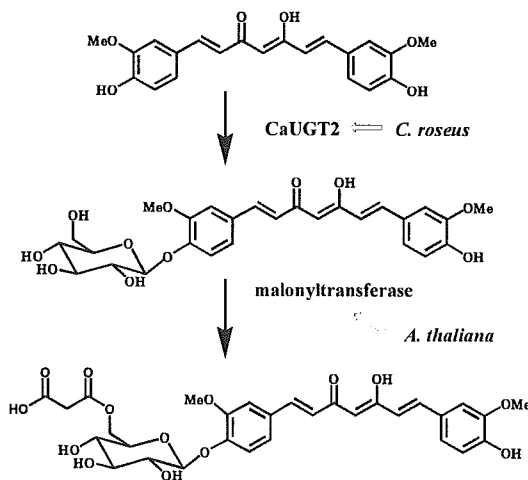


図6 形質転換細胞における curcumin の配糖化

種植物の遺伝子を導入することによって、導入遺伝子と遺伝子のレシピエント側の植物種が本来持っている遺伝子の両者の機能によって構造的に新しい化合物を作出できる可能性を示唆している。

D. 結論

ニチニチソウの curcumin 配糖化酵素 CaUGT2 の遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換植物体および培養細胞を解析した結果、植物体においては、その二次代謝産物組成に顕著な変化は見られなかった。

一方、培養細胞では、昨年度確立したラインに加えて、複数のラインを解析した結果、CaUGT2 の導入によって内生的な代謝産物プロファイルも変化しており、野生型細胞と比較して coniferin が著しく多量に蓄積していた。このことは、代謝酵素遺伝子の導入によって本来の意図した代謝系とは別に、意図していない代謝産物のレベルも変動を受ける可能性があることを示している。代謝工学的な手法を用いて作製した組換え薬用植物の安全性評価に当たっては、metabolic profiling の手法を活用して、できるだけ広範な代謝産物の変化を検討することが重要である。

今後は、植物個体と培養細胞間で見られた差についても考慮にいれ、内在性の代謝関連遺伝子の発現変動等についても解析することにより、二次代謝系遺伝子の導入による内在の代謝系への影響についてより詳細に明らかにできると考えられる。

遺伝子組換え薬用植物の成分評価法に関する研究

分担研究者 瀧野裕之 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 主任研究員
分担研究者 木内文之 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター センター長

遺伝子組換え薬用植物における成分の変化を評価する手法として、LC-MS/MS 並びにプロトン NMR を用いた多変量解析を検討した。LC-MS/MS を用いる分離分析は、変化が予想される成分を高感度で検出できる方法であり、特に遺伝子組換えによって本来対象の植物が作らない化合物を生産させることを目的とする場合の成分評価に有用であることが明らかとなった。一方、特定の成分ではなく総合的な成分評価を行う方法として、最近開発された NMR による多変量解析を種々の *Curcuma* 属植物をモデルとして検討した結果、本手法は総合的な成分評価に応用可能であると考えられた。

A. 研究目的

植物は多種多様な成分を生合成している。一般に薬用植物をその成分の面から評価する場合、その薬用植物に特有な成分或はその薬用植物の薬効を担うような特徴的な成分に着目し、それらの含有量などを指標として評価するのが通常である。今後開発が予想される遺伝子組換え薬用植物としては、現在農作物で実用化している農薬や害虫に対する抵抗性遺伝子の導入の他に、薬効成分の含量を高めたり、新たな薬効成分を作らせたりするための遺伝子の導入が考えられる。前者では、本来遺伝子の導入により薬効成分の含量等は変わらないと考えられるが、薬効成分の生合成に関わる遺伝子の近傍に外来遺伝子が導入された場合、成分変化が起こる可能性が考えられる。一方、後者では薬効成分の生合成に関

与する遺伝子を導入することにより成分の質的・量的な変化が起こることが期待されるが、高等植物の二次代謝産物の生合成過程は、生合成に関わる様々な酵素が複雑に絡み合った代謝系からできているため、目的とする成分以外の成分が変化する可能性も大きい。薬用植物の有効成分は生物活性成分であり、その変化を把握することは、アレロパシーや昆虫への影響等、遺伝子組換え薬用植物が環境に与える影響を評価する上で重要である。更に、薬用植物は、それ自体を生薬として使うため、そこに含まれる総ての成分が、その有効性・安全性に関与してくることから、遺伝子組換え薬用植物を成分面から評価するためには、ある特定のマーカーのみに着目するアプローチでは不十分であり、遺伝子組換えによって変化が予想される成分に関連する一連の化合

物群，更にはその薬用植物に含まれる広範な化合物の変化を評価できるアプローチが必要である。

本研究では，遺伝子組換え薬用植物における成分変化を LC-MS/MS を用いて把握する方法を，本研究事業で作出が試みられているマルバダイオウを用いて検討するとともに，広範な成分を混合物のまま測定・評価できる核磁気共鳴スペクトル(NMR)を用いた多変量解析を，ウコン属植物をモデルとして用いて行い，これらの手法が遺伝子組換え薬用植物の成分の総合的な評価手法として適用可能であるかを検討した。

今回遺伝子導入植物として用いているマルバダイオウ *Rheum rhaponticum* L.には，生薬大黄 (*R. palmatum* L., *R. tanguticum* MAXIM., *R. officinale* BAILL., *R. coreanum* NAKAI) の有効成分として瀉下作用を示すセンノサイド A, B や消炎作用を示すベンジルアセトン配糖体である lindleyin が含まれるとの報告はないが，rhaponticin (rhapontin) のようなスチルベ

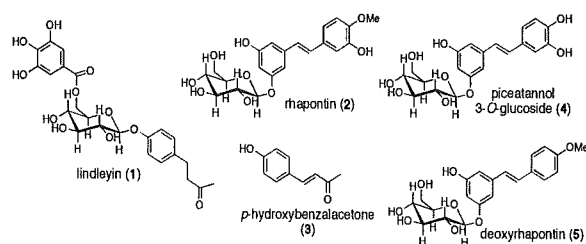


図 1

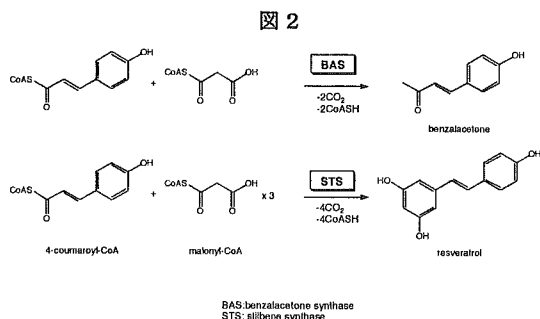


図 2

ン配糖体を含有するので，フェニルブタノイド生合成に必要な前駆体を全て生合成する能力を持っていると考えられる。従って，すでにダイオウからクローニングされているベンザルアセトン合成酵素遺伝子をマルバダイオウに導入することにより，消炎作用物質 lindleyin が根茎および葉柄，またはいずれかで生産・蓄積されることが期待される。マルバダイオウは，薬用としては不適とされるが，古くから食用とされ，栽培は生薬大黄より比較的容易であることから，消炎作用物質生産のキーとなる酵素を遺伝子導入することにより，瀉下作用を有さない消炎効果を得られるほか，生薬大黄よりも生産しやすいという利益がもたらされる。初年度は遺伝子導入による成分変化の検討の前段階として，遺伝子導入前の植物の成分精査ならびに成分比較のために適当な分析法の検討を行った。その結果ベンザルアセトン誘導体を感度よく検出する条件を設定し，マルバダイオウの根茎について主要成分として3種のスチルベン配糖体を検出し，葉柄については rhapontin を認めた。また次年度にはマルバダイオウの葉柄について rhapontin 以外のスチルベン配糖体の検出を試みるため，rhapontin のマスマススペクトルを測定し，主要なプロダクトイオンと同じ分子量のイオンを産する化合物（分子イオン）の探索を葉柄のメタノールエキスを用いて行った。また，lindleyin についても同様に同じプロダクトイオンを持つ化合物の探索を行った。

一方，NMR による多変量解析手法の検討には現在当センターにおいて多数系統保存を行

っているウコン類を用いた。ウコン類は近年健康食品などとしても人気があるがその分類には混乱がみられている。しかしながら顕著な薬効を示すことや種間における成分変異が激しいことから遺伝子組換え植物の対象としては格好の材料とも言える。そこでウコン類を検体として用いて NMR による多変量解析手法の有効性を検討した。

B. 研究方法

(1) 遺伝子導入前植物体の成分精査

試料には当センター標本園で栽培している *R. rhaponticum* L. の風乾した葉柄および根茎を用いた。

粉末にメタノールを加え室温で4日間抽出、ろ過後濃縮しメタノールを加え濃度調整した。分析には、PDA 検出器付き HPLC システムに API3000 (MS/MS) 装置を接続した LC-MS システムを用い、吸光度、マススペクトル (product ion scan, precursor ion scan すべて negative mode) を測定した。

LC 条件：カラム Mightysil ODS RP-18, 150x3mm (3mm)；溶媒，酢酸-アセトニトリル；グラジエント，0 min (10%アセトニトリル) -20min (60%アセトニトリル)-25-35 min (100%アセトニトリル) -40-50 min (10%アセトニトリル)；流速，0.150 ml/min；検出：PDA (240-600 nm)，MS (m/z 150-700)。

葉柄については，スチルベン配糖体の含有率が少ないことから，シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール)により，メタノールエキスの分画を行った。

(2) 核磁気共鳴スペクトルによる主成分解

析(多変量解析)手法の開発

試料として，*Curcuma* 属植物31種類を用いた。核磁気共鳴スペクトル装置は日本電子社製 α -500 (Winalpha) を用い，また多変量解析は，ALICE Version 5 (日本電子) を用いた。

試料をすりおろし，その後その試料をはかり取り，重水素化溶媒を加え10分間震盪した。その後遠心分離を行って，上層を取り脱水処理を行い，その後プロトン NMR を測定した。

得られたプロトン NMR データをデータ解析ソフト ALICE Version 5 にて，多変量解析を行った。また，スペクトル上で解析を妨害するシグナルは認識されないように除外した。

C. 研究結果

(1) 遺伝子導入前植物体の成分精査

薬用大黄と薬用には不適とされるダイオウを区別する成分として rhapontin が知られているが，マルバダイオウはこの他にも多くのスチルベン誘導体を含んでいることが報告されている。

上述の分析条件にて LC-MS/MS を測定した結果，根茎のメタノール抽出物のクロマトグラムは3つの主要ピークを示したが，全てスチルベン配糖体であり，溶出順に piceatannol 3-O-glucoside, rhapontin, deoxyrhapontin と考えられた。しかし，lindleyin および今回導入を予定しているベンザルアセトン合成酵素の直接の産物である *p*-hydroxybenzalacetone のピークは全く検出されなかった。

葉柄のメタノール抽出物のクロマトグラムは多数のピークを示し，根茎で主成分であった3種のスチルベン配糖体についても，

rhapontin の小さなピークが認められるのみで、他の2成分はほとんど認められなかった。また、葉柄においても lindleyin および *p*-hydroxybenzalacetone のピークは検出されなかった。

葉柄にスチルベン配糖体の含有率が少ないことから、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、エキスの分画を行い、各フラクションについて rhapontin (419) で見られるプロダクトイオンピーク（主に 257, 240）と同じプロダクトイオンを有するピークを探索したところ、フラクション1より共通のプロダクトイオン 240 を有する分子イオンピーク 269、フラクション3より rhapontin 419 のピークを検出した。マルバダイオウはスチルベン誘導体として数種の化合物を含有することが報告されているが、これらの分子イオンピークの探索を行ったところ、フラクション1から deoxyrhapontigenin, resveratrol, フラクション3から piceid の分子イオンに相当するピークが得られた。また、メタノールエキスにおいてもこれらの分子イオンピークが検出できるかどうか試験したが、resveratrol については検出されなかった。

標品 lindleyin (477) についてプロダクトイオンピークを測定したところ、主に 313, 169 に認められたが、これらと共通するプロダクトイオンを有するピークはエキス中および各フラクションにおいて観測されなかった。

(2) 核磁気共鳴スペクトルによる主成分解析 (多変量解析) 手法の開発

前述の方法を用いてウコン類試料を調整後プロトン NMR を測定し、それらのデータを

ALICE PCA 解析ソフトにより、主成分解析 (PCA)を行った。

PCA 解析を行った結果、第1成分と第2成分によるプロットにより、クスリウコン、キョウオウ、ウコン、ガジュツとおおよそのグループに分かれることがわかった (図3-6)。これは含まれる成分、とくに低極性の精油成分などが同様なパターンを示すことによるものである。特にウコン類を特徴づける低極性成分である curcumin 類は、その化学構造の中に芳香環やオレフィン等を有するために、NMR において比較的解析のしやすい低磁場側にシグナルを示す。その結果、図にみられるようにウコン、ガジュツ、クスリウコン、キョウオウとある一定の群を形成して分布することがわかった。

D. 考察および結論

マルバダイオウの根茎の主成分はスチルベン配糖体であり、生合成遺伝子の導入を予定している *p*-hydroxybenzalacetone およびこれから誘導される lindleyin は検出されなかつ

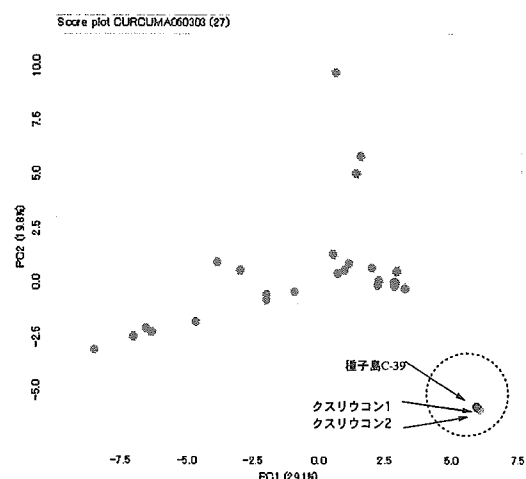


図3 クスリウコン類のPCAにおける分布位置

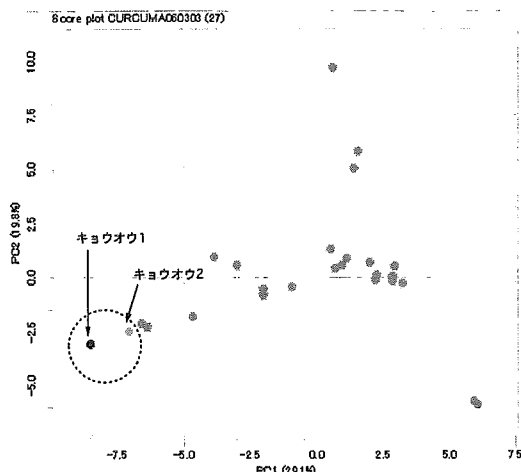


図4 キョウオウのPCAにおける分布位置

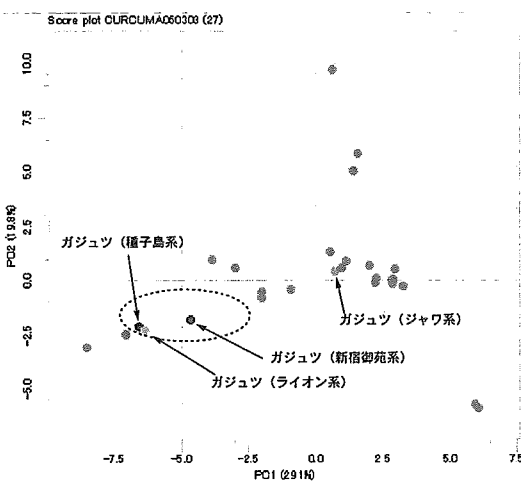


図5 ガジュツのPCAにおける分布位置

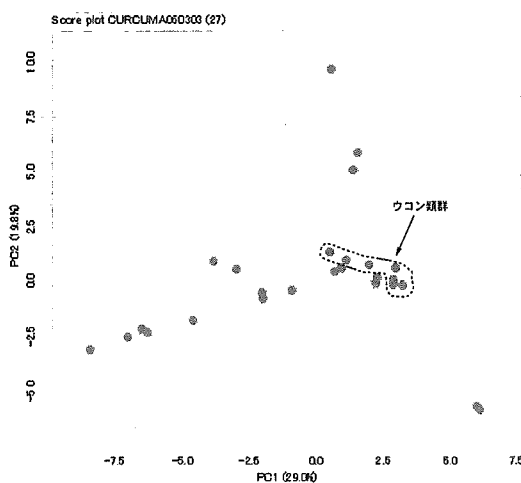


図6 ウコンのPCAにおける分布位置

た。根茎ではスチルベン誘導体が主成分であることから、同じ原料を生合成前駆体とするベンザルアセトンの合成酵素を導入し、その発現を調べるのには非常によい材料であることがわかった。葉柄にもlindleyin等は含まれていなかったが、スチルベン配糖体の含量も少ないため、ベンザルアセトン合成酵素が葉柄で発現しても、フェニルブタノイドの蓄積がほとんど見られない可能性も考えられた。

よって、遺伝子導入による上記物質の生産の成否の判別は容易と考えられた。また数種のスチルベン誘導体のピーク面積を測定することにより、遺伝子導入によって基質の競合する化合物の生合成に変化が及んだか否かを判断することができる。この場合、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画によって粗精製し、より精密に成分変化を追うことも可能であるが、LC-MS/MSによる分析においてはメタノールエキスでも問題ないことが分かった。

ウコン類のNMRによるPCA解析を行った結果、クスリウコン、キョウオウ、ウコン、ガジュツとおおよそのグループを示すことがわかった。今回の試料として用いたサンプルのうち、種子島系サンプルは種が不明であるが、今回の結果から、それらはそれぞれの群に属するものもあり、種の同定にも本手法は有効であることが示された。ただしキョウオウとガジュツは、PCAにおいて群が近接しており、その近傍にある種子島サンプルはこのデータのみからでは判別が付きにくい、その他植物の形態面などを考慮に加えれば有る程度の判別は可能と考えられた。

NMR を用いた多変量解析法を用いた植物種の解析法は過去に例が少なく、今後この手法を用いた様々な植物の解析が行われていくものと考えられ、遺伝子組換え植物体の成分評価にも利用できるものと考えられた。さらに測定サンプルを増やし、集計数を多くする

ことにより信頼性を高めるとともに、SIMCA 解析などの手法を試み、遺伝子組換え薬用植物の成分評価への応用の可能性を更に検討する予定である。