

し塩基配列解析を行った。その結果、全長 cDNA の配列は数ヶ所の PCRミスと考えられる部分以外は、ゲノム解析ならびに RACE 法により得られた各部分長配列と矛盾なく、*PsWRKY1* は全長 1572 bp で 523 アミノ酸のタンパクをコードしていると推定された。また、相同性解析の結果、本遺伝子はシロイヌナズナ (*A. thaliana*) 由来 WRKY transcription factor 4 (WRKY4, AF 425835) とは DNA レベルで 65%、アミノ酸レベルでは 57%、また、タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来 DNA-binding protein 2 (WRKY2, AF 096299) とは DNA レベルで 65%、アミノ酸レベルでは 58% の相同性を示し、WRKY 遺伝子ファミリーの新規遺伝子であることが確認された。

### 3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

リゾビウム感染条件、植物材料および導入遺伝子がベラドンナおよびマルバダイオウのカルス化および不定芽形成に与える影響を表 3 に示した。まず、導入遺伝子による影響を排除し、感染条件がカルス化および不定芽形成に及ぼす影響について評価するため、LBA4404/pBI121(GUS)株を感染させた区で、それぞれの感染条件下でのカルス化および不定芽形成率を比較すると、ベラドンナ、マルバダイオウ両植物とも、今回実験に用いた試料数では差異は認められなかった。

マルバダイオウにおいて、リゾビウム感染に用いた材料(胚軸または子葉)別のカルス化および不定芽形成率の差異を比較すると、LBA4404/pBI121(GUS)株を胚軸に感染させた場合は、カルス化率 100% (6/6)であり、同菌種を子葉に感染させた場合の 13% (1/8)と比較して効率が良かった。また、不定芽が形成されたのは感染条件(I)で胚軸を材料とした場合の 1 例のみであった。BAS または STS を導入した系列についても不定芽形成率は低く、LBA4404/

STS 株を胚軸に感染条件 I および II で感染させた場合のそれぞれ 1 例ずつのみであり、LBA4404/BAS 株では不定芽形成には至らなかった。

## D. 考察

### 1. セリバオウレンの効率的な組換え体作出法の開発及び組換え体の超低温保存法の検討

感染条件を詳細に検討し、設定することにより、高い形質転換効率での組換えセリバオウレンの作出に成功した。今回得られた *gus* 組換えセリバオウレン植物体における GUS 遺伝子発現部位を詳細に解析することにより、本強発現プロモーターがセリバオウレン植物体内のどこで実際に発現し、影響を与えているのかを解析することが可能となる。この知見は本プロモーターをセリバオウレンにおいて高度に利用する上で重要である。また、GUS 活性染色により容易に組換え体を検出できることから、遺伝子組換え薬用植物が環境に与える影響を評価するための実験系を開発する上でのモデル植物としての利用が可能である。

### 2. ケシのリゾビウム形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索

ファイトロンで栽培したケシのリゾビウム T-DNA 挿入形質転換体は、野生株と比較して開花時期の遅延、矮化、花卉の形態異常が観察された。また、当植物の乾燥あへんを分析すると、野生株においてはほとんど蓄積されないテバインが 16% と大量に蓄積する一方、モルヒネ含量は野生株の 11% から 1.3% へと低下していた。これらの形態ならびにアヘンアルカロイド成分変異等の形質変異は、リゾビウム由来 T-DNA のケシゲノム DNA への挿入に起因するものと考えられたため、その挿入部位ならびにコピー数について精査を行った。

今回明らかになったケシゲノム上の4ヶ所の T-DNA挿入部位は、いずれもタンパク質をコードするORFを分断し破壊するものではないことが相同性解析などにより推定されるが、イントロンの中間部である可能性は否定できず、それらの上流および下流のゲノム構造について解析を進める必要がある。また、WRKYについても直接遺伝子破壊が起っているわけではないが、京大院生命の佐藤文彦教授の研究グループよりWRKYがイソキノリンアルカロイドの生産調節のスイッチであることを示唆するデータが報告されており、本植物においてもWRKYによるモルヒネ生合成経路の調節が行われている可能性は高く、引き続き機能解析を進める必要がある。

### 3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

マルバダイオウの場合、今回試みた感染条件 I および II のいずれのリゾビウム感染方法においても、胚軸を感染材料とした方が、子葉を材料とした場合と比較してカルス化率が高いことが判明した。試料数の問題は残るが、感染方法の違いによるカルス化または不定芽形成率への影響は、マルバダイオウにおいては感染に用いた材料の差異に因るものと比較すると小さく、ベラドンナにおいても影響は無いか、あっても小さいと考えられる。なお、標的遺伝子の植物ゲノム DNA への導入については未確認であるが、LBA4404/STS 株を感染させた系統において不定芽の発生率が高いことから、STS による代謝物が植物成長調節物質様作用を示していることも考えられ、興味深い。

### E. 結論

セリバオウレン、ケシ、ダイオウなどの薬用植物を材料として、遺伝子組換え体の作出、保存、評価に関する実験を行った。

その結果、セリバオウレンの高効率遺伝子組換え体作出法およびレポーター遺伝子を用いた遺伝子組換え体の検出法、そして組換え体の超低温保存法に関する有用な知見が得られた。また、ケシのリゾビウム形質転換体についてはそのリゾビウム T-DNA のケシゲノム DNA への挿入様式および形質変異の関連遺伝子(候補)に関する情報が得られた。さらに、マルバダイオウの遺伝子組換え体作出に関しても高効率な感染材料(部位)に関する情報が得られた。

今回得られた知見および情報はいずれも、薬用植物分野における遺伝子組換え体作出に関わる、遺伝子導入から遺伝子組換え植物体の選抜および再生、そして形質転換体の化合物レベルおよび遺伝子レベルの評価、さらに有用組換え体の長期保存におよぶ、すべてのステップにおいて重要なものであり、遺伝子組換え薬用植物の実用化へ向けた基盤技術の確立にいずれも欠くことのできないものであると言える。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

1. 吉松嘉代、河野徳昭、木内文之、ケシ形質転換体の形態およびアルカロイド成分変異、第22回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(秋田) 要旨集 pp. 138 (2Bp06) (2004年8月9-10日)
2. 吉松嘉代、土反伸和、木内文之、佐藤文彦、矢崎一史、オウレンの分種育種の効率化、第22回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(秋田) 要旨集 pp. 117 (2Ap05) (2004年8月9-10日)
3. Kayo Yoshimatsu, Noriaki Kawano, Fumiyuki Kiuchi; "Aberrant morphology and altered composition of opium alkaloids in

*Rhizobium* transformed opium poppy cultivated in a phytotron"; German-Japan Seminar on Molecular Regulation of Plant Secondary Metabolism (Kazusa Academia Park, Japan) Abstract book P20 (2004年9月20-23日)

4. 河野徳昭、吉松嘉代、木内文之、ケシの *Rhizobium* 形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索、日本薬学会第125年会(東京) 要旨集 4 pp. 127 (31-0652) (2005年3月29-31日)

5. 吉松嘉代、土反伸和、河野徳昭、木内文之、佐藤文彦、矢崎一史、組換え薬用植物の作出法に関する研究-組換えオウレンの作出と超低温保存、日本薬学会第125年会(東京) 要旨集 4 pp. 126 (31-0644, W2-1) (2005年3月29-31日)

## G. 知的財産権の取得状況

### 1. 特許出願

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## H. 参考文献

1) Shitan, N., Bazin, I., Dan, K., Obata, K., Kigawa, K., Ueda, K., Sato, F., Forestier, C. and Yazaki, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 751-756 (2003)

2) Yoshimatsu, K. and Shimomura, K.: *Plant Cell Rep.* **11**, 132-136 (1992)

3) Abe, I., Takahashi, Y., Morita, H. and Noguchi, H.: *Eur. J. Biochem.* **268**, 3354-3359 (2001)

4) Schröder, G. and Schröder, J.: *J. Biol. Chem.* **267**, 20558-20560 (1992)

表1. リゾビウム菌感染方法とセリバオウレン形質転換率

実験 番号	前培養		感染方法	供試切 片数	カルス形成		形質転換		
	培地	日数			切片数	形成率%	切片数	形質転換率%	クローン数
1	WPGHF	9	共存培養、3日間	28	8	28.6	2	7.1	6
2	WPGNK	16	共存培養、2日間	15	13	86.6	5	33.3	7
3			菌液に60分間浸漬	12	11	91.7	0	0	0



図1. セリバオウレンGUS形質転換体のGUS活性染色(実験2: クローン5-2、7-1及び8-1)

表2. 超低温保存を行ったCjmdr1セリバオウレン形質転換体の再生率

供試材料	供試切片数	再生が認められた切片数	再生率(%)
不定胚(カルス)	10	4	40
不定根	13	0	0

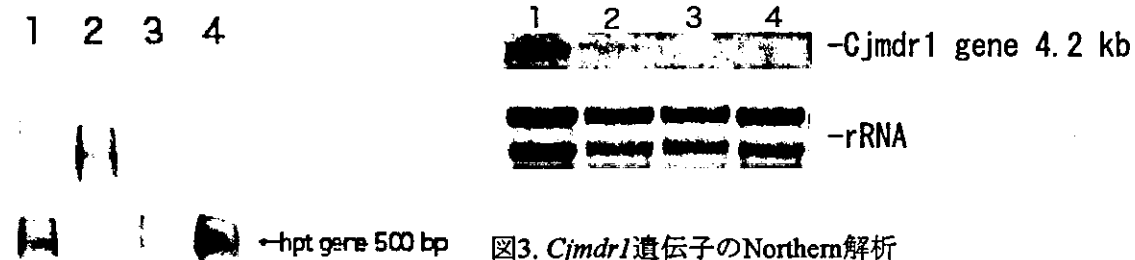


図3. Cjmdr1遺伝子のNorthern解析

1: 高ベルベリン生産性オウレン培養細胞、2: 非形質転換不定胚、3: 未保存Cjmdr1センス組換え体、4: 超低温保存後のセンス組換え体

図2. ゲノムPCRによるhpt遺伝子の確認  
1: 超低温保存後のCjmdr1センス組換え体、2: セリバオウレンWT、3: 未保存Cjmdr1センス組換え体、4: ベクター

<i>A. belladonna</i> (葉)			<i>R. rhaporticum</i> (胚軸)			<i>R. rhaporticum</i> (子葉)		
Gene	感染条件		Gene	感染条件		Gene	感染条件	
	I	II		I	II		I	II
pBI121(GUS)	4/10 (0/10)	6/10 (0/10)	pBI121(GUS)	3/3 (1/3)	3/3 (0/3)	pBI121(GUS)	1/4 (0/4)	0/4 (0/4)
BAS	5/10 (0/10)	6/10 (0/10)	BAS	1/3 (0/3)	0/4 (0/4)	BAS	0/4 (0/4)	0/4 (0/4)
STS	7/10 (3/10)	4/10 (2/10)	STS	2/3 (1/3)	2/3 (1/3)	STS	0/4 (0/4)	0/4 (0/4)

表3. リゾビウム感染条件、植物材料、導入遺伝子がカルス化および不定芽形成に与える影響  
カルス化個体数/試料数(不定芽形成固体数/試料数)

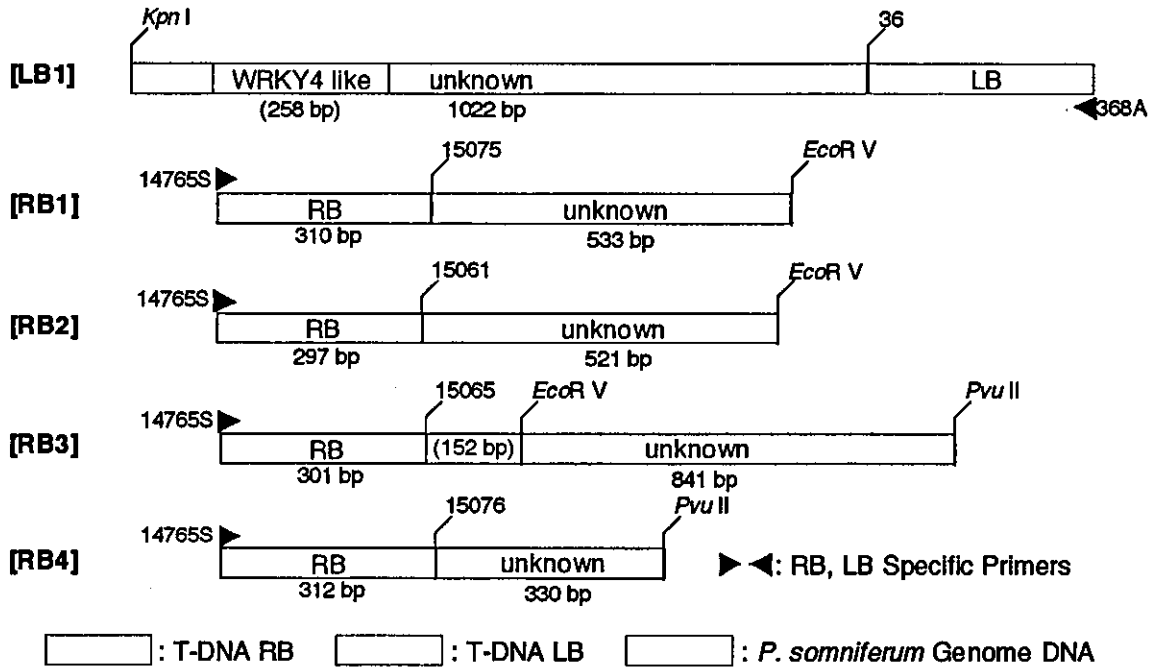


図4. T-DNAのRB, LB末端部および隣接ゲノムDNAの構造.  
数値はT-DNA(全長15098 bp)の塩基番号を表す.

分担研究報告

遺伝子組み替え薬用植物の環境に与える影響に関する研究

分担研究者 大塚 謙 お茶の水女子大学 生活環境研究センター・教授

パン酵母由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 遺伝子を薬用植物に組みこむために以下の研究を行った。PDI の全長遺伝子が組みこまれている pMATE6 プラスミドから PCR 法により全長遺伝子を増幅し、pGEM-T easy ベクターに組みこんだ。得られた株を培養し、プラスミドを単離し、制限酵素で切って、アグロバクテリウムと大腸菌の両方で使えるベクター-pIG' -Hm プラスミドのマルチクローニングサイトにつなぎ変えた。このプラスミドをアグロバクテリウムにエレクトロポレーション法によりトランスフォーメーションし、PDI 遺伝子をアグロバクテリウムに導入した。得られた株の菌体から DNA を抽出し PCR により酵母 PDI 遺伝子が組みこまれているかを確認した所、間違い無く組みこまれていた。得られたアグロバクテリウムを薬用植物ペラドンナに感染させるため、共存培養した組織片を抗生物質を含む培地で培養したところ、カルスの発生を認めた。このカルスからシュートの誘発を試みた。

目的

遺伝子組み替え植物が数多く作られているが薬用植物での組み替えの例はほとんど無いものの異種遺伝子を組み込みこんだ薬用植物を作るとは今後幅広く行われるものと考えられる。しかしながら薬用植物を宿主とする遺伝子組み替え植物を実験室外に持ち出して栽培することは生理活性物質を持っているがために通常の植物より危険性が高いことも予想されその環境への影響を十分に把握しておかなければならない。植物個体に遺伝子を挿入する方法としてアグロバクテリウムを用いる方法に毛状根を形成させる Ri プラスミドを用いる方法がある。Ri プラスミドを用いる方法はすでに薬用植物ペラドンナへの遺伝子導入で用いられているが形質転換植物の様々な性質や安全性については調べられていない。

これまでパンの商業生産には生地を膨張させ、焼き上がりを良くするために小麦粉の品質改良剤として臭素酸カリウムが使用されてきたが、その後の研究により、国際ガン研究機関 (IARC) の基準で「ヒトに対して発ガン性がある可能性がある」とするグループ 2B に指定された。現在では、最終食品に臭素酸カリウムが残存しないことを条件に、使用が許可されているが、使用を自粛しているメーカーも多い。そのため臭素酸カリウムの代わりにアスコルビン酸が膨化剤としてもちいられているが、生地の伸びが悪く、焼き上がり

が硬いなどの問題点がある。

Protein Disulfide Isomerase (PDI EC 5. 3. 4. 1) は、小胞体内腔に存在する約 55kDa のタンパク質で、翻訳後タンパク質のジスルフィド結合を正しく架け替えタンパク質の高次構造形成と機能の発現を促進させる働きをもつ。このジスルフィド結合を架け替えるという性質から、食品への添加により、食品中タンパク質の構造を変化させ、新たな物性を生み出すことなどが期待されパン製造への応用も考えられる。PDI 遺伝子は、水永らによって 1991 年に全長遺伝子がクローニングされているので、本研究ではアグロバクテリウムを用い薬用植物ペラドンナに PDI 遺伝子を導入し PDI を生産するとともに組み替え体植物の安全性を検証するための基礎研究を行った。

実験方法

1. プラスミド

酵母 (*S. cerevisiae*) の全長 PDI 遺伝子 (D00842) をクローニングした pMTY17 のインサート DNA を pUC18 に挿入した pMTE 6 をサンプルとしてもちいた (図 1)。

2. アグロバクテリウムへ Ri プラスミドの導入

2.1 アグロバクテリウムコンピテントセルの調製

### ・試薬

agrobacterium rhizogenes AR10  
YEB 培地  
10%Glycerol

### ・方法

- 1) 前培養 YEB 培地 2ml で 28°C, overnight 振とう培養した。
- 2) 本培養 YEB 培地 100ml に前培養液 2ml 植菌し、28°C 7~8hr 振とう培養した。OD<sub>600</sub> = 0.5 程度で培養を止めた。
- 3) 培養液を氷冷した。(10min)  
以下の操作は、全て氷中で行った。
- 4) 5000 g、4°C、5min 遠心分離により集菌した。
- 5) 上清をすてた。
- 6) 10%Glycerol (4°C氷冷) 50ml に懸濁した。
- 7) 5000 g、4°C、5min 遠心分離により集菌した。
- 8) 上清を棄てた。
- 9) 同様の操作を 30ml、2ml の 10%Glycerol (4°C氷冷) で繰り返し行った。
- 10) 10%Glycerol (4°C氷冷) 1ml に懸濁した。
- 11) 50~100 ずつ分注し、-80°C 保存。これをエレクトロコンピテントセルとした。

## 2.2 エレクトロポレーション

### ・試薬

Agrobacterium rhizogenes AR10 エレクトロコンピテントセル  
WLYPDI/pIG' -Hm プラスミド DNA  
エレクトロポレーター  
SOC 培地  
YEB/Rif Km agar 培地

### ・方法

- 1) -80°C 保存エレクトロコンピテントセル 50 μl を氷中で融解した。
- 2) プラスミド DNA 0.5 μg (2.5 μl) を加えた。
- 3) 氷冷したキュベット (0.2 cm ギャップ) に移した。
- 4) エレクトロポレーション 1800 V (9.0 kV/cm)  
50 μF  
200 Ω  
1 pulse
- 5) パルスの直後に SOC 培地 450 μl を加え、菌を回収した。
- 6) 28°C 1~2hr 静置培養した。
- 7) YEB/Rif Km agar 培地にプレーティングした。
- 8) 28°C 2 days 培養した。  
リファンピシン (Rif) とカナマイシン (Km) による相同組み換えが起こった形質転換体を選抜した。

## 実験結果

全長 PDI 両側に発現用ベクターへ組込む際に必要な制限酵素認識サイトを付加するため、一度 pMTE6 由来の (retention signal) を含む全長 PDI を PCR で増幅し、pGEM-T easy ベクターにサブクローニングした。得たプラスミドベクターを WLYPDI/T と命名した (図 1)。

薬用植物ベラドンナの組み換え実験にはアグロバクテリウムと相同組換えできるベクター pIG' -Hm を用いた (図 2)。

pIG' -Hm プラスミドベクターのマルチクローニングサイトに幾つかの制限酵素認識サイトがある。さらに、カナマイシン耐性遺伝子 NPTII やハイグロマイシン耐性遺伝子を持っている。制限酵素 Not I で pIG' -Hm ベクターと WLYPDI/T のマルチクローニングサイトをそれぞれを切断し、ライゲーションとトランスフォーメーションし pIG' -Hm ベクターに組み込んだ (図 2)。

それぞれのコロニーの中に PDI 遺伝子が含まれているかどうかを PCR 法で確認し遺伝子の入っているコロニーを選択した。得られたコロニーからプラスミドを単離し、PDI 遺伝子の含まれていたプラスミドの中に望み通りの方向に組み込まれているかどうかを制限酵素処理で解明した (図 3)。

写真①番②番はコントロールと形質転換体 WLY/pIG' -Hm をそれぞれを制限酵素 SalI で処理した結果である。③番④番はコントロールと WLYPDI/pIG' -Hm をそれぞれを制限酵素 HindIII で処理した結果である。正方向に PDI 遺伝子が挿入されていると SalI で約 600bp と約 10000bp、HindIII で約 1200bp、283bp、9000bp の位置にバンドが確認できることから、PDI 遺伝子は正しい方向で pIG' -Hm ベクターに組み込まれたことが判明した (図 3)。

次に WLYPDI/pIG' -Hm を用いて、エレクトロポレーション法で PDI 遺伝子をアグロバクテリウム rhizogenes AR10 に導入した (図 4)。

エレクトロポレーションにより形質転換されたとされるアグロバクテリウムのコロニーが出現した。得られたコロニーの中からいくつかを選びコロニー PCR を行ったところ、一つのコロニーに PDI 遺伝子が組み込まれていたことが確認できた (図 5 上)。

そこでさらにこのコロニーのゲノム DNA を抽出し、PCR をかけた (図 5 下)。PCR の結果 WLYPDI/AR10 形質転換体に PDI 遺伝子が AR10 に込みこ込まれたものと判明した。

得られた形質転換体 WLYPDI/AR10 をリフリーディスク法でベラドンナに感染した (図 4)。アグロバクテリウムと共存培養した組織片を抗生物質 claforan を含む培地で培養した。二週間後除菌されたベラドンナ

組織片の肥大（ひだい）が観察され(図6左上)、4週間後ぐらいにはカルスの成長もみられた(図6右上)。

形質転換したカルスを選択のため、抗生物質 hygromycin を添加した培地にベラドンナ葉片を植え継いだ。一ヵ月後抗生物質で選択され、大きくなったカルスからシュートを誘発するため、抗生物質を含まない、植物ホルモンを減量した培地にカルスを植え継いだ(図6右下)。カルスからシュートを誘導するときの培養条件を検討するため、カルスを16時間/8時間明暗サイクル培養と暗所培養を行った。今後、カルスから誘導されたシュートをPCR方やオパイン assay 法などで pDI を組み込まれたかどうかを確認し、シュートからトランスジェニックベラドンナを再生させる予定である。

学会発表

日本農芸化学会（広島） 2004年



図 1

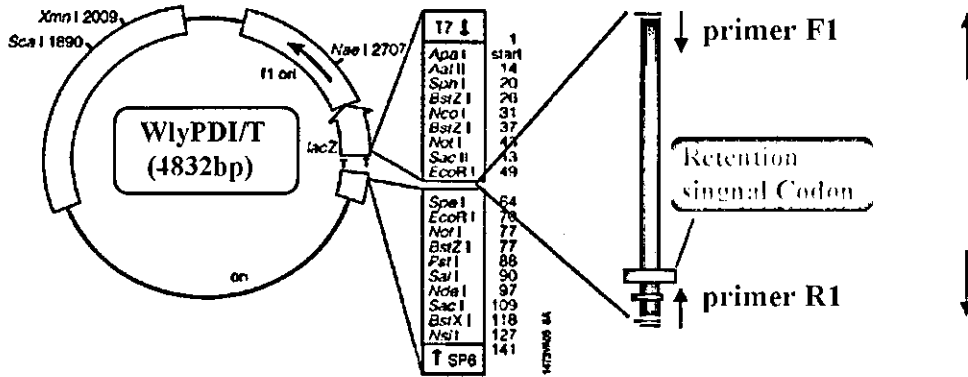


図 2

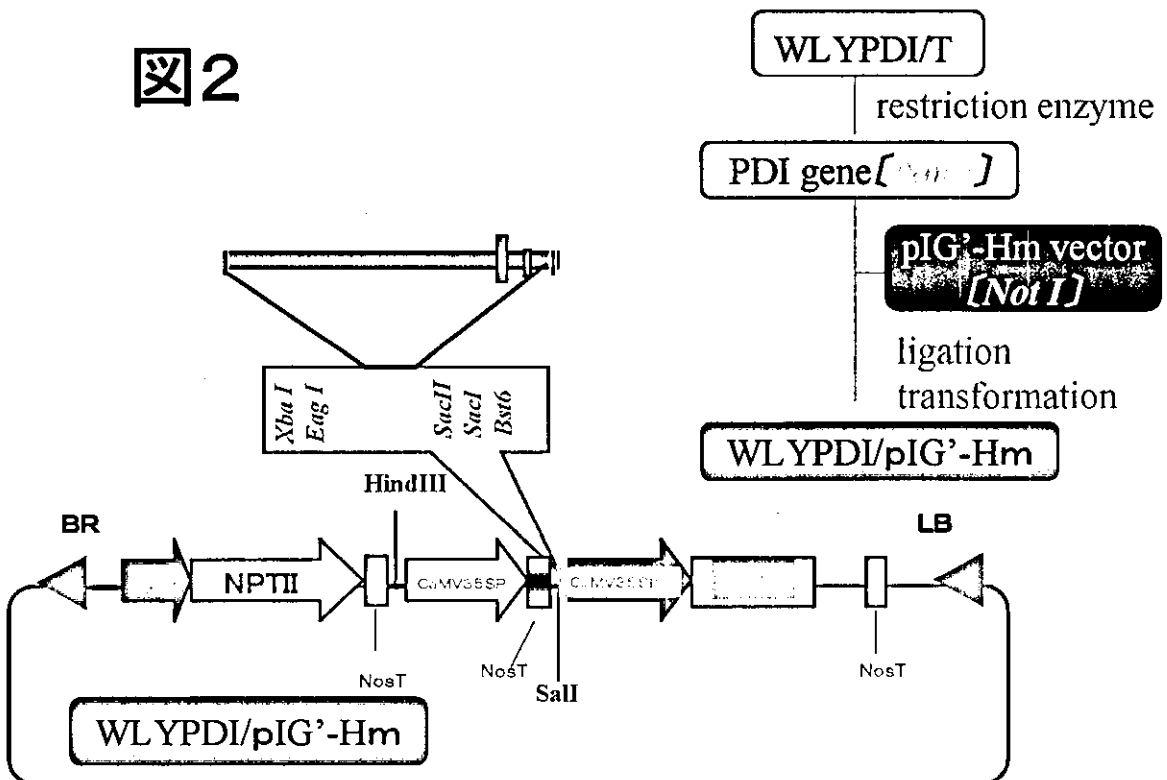


図3

RE-digestion

- Sample number
- ①: pIG'-Hm vector
  - ②: WLYPDI/pIG'-Hm
  - ③: pIG'-Hm vector
  - ④: WLYPDI/pIG'-Hm
- } *Sal I*
- } *Hind III*

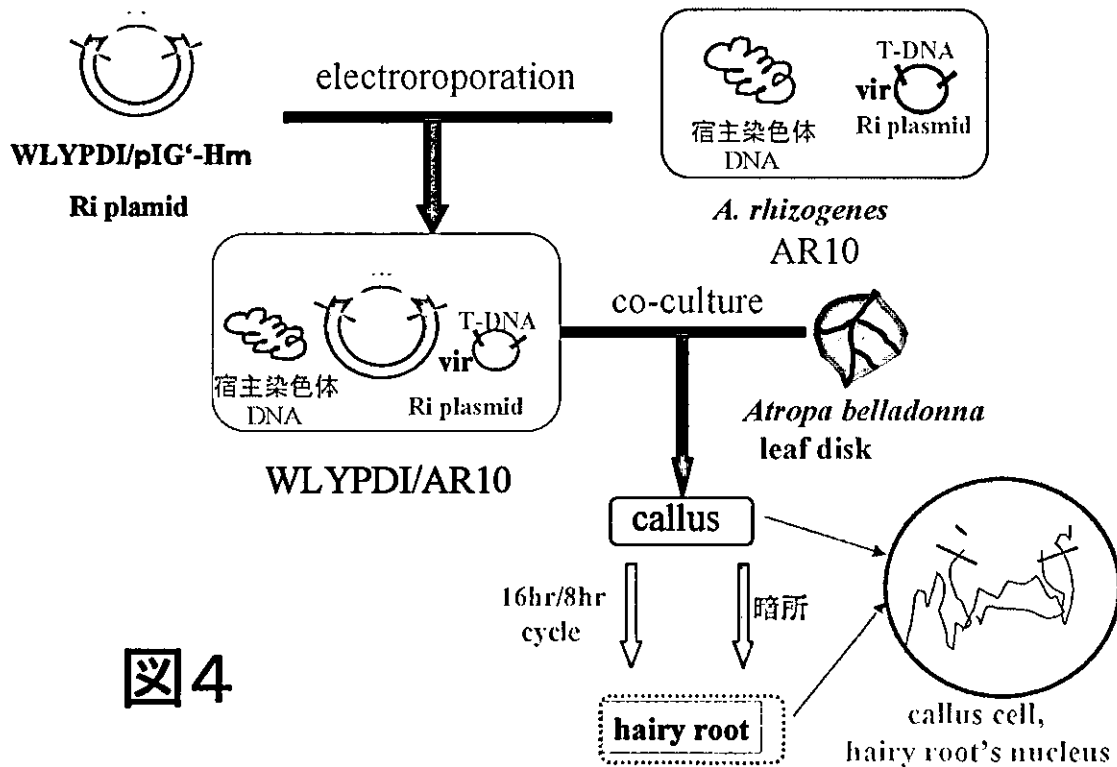
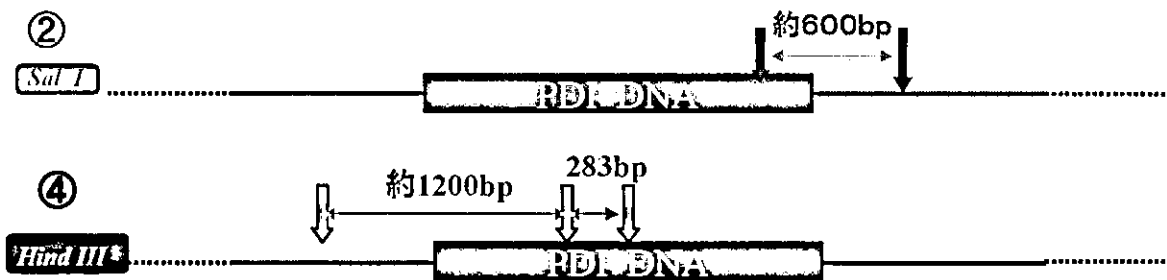
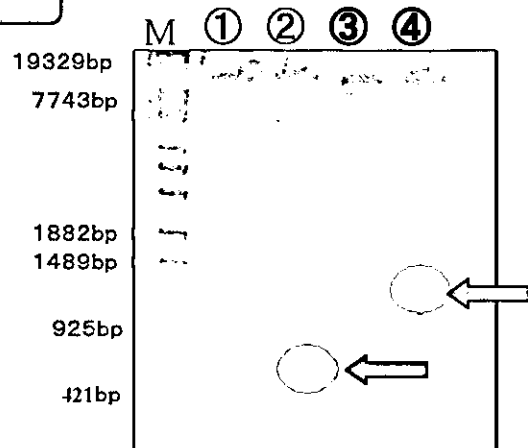
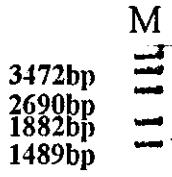


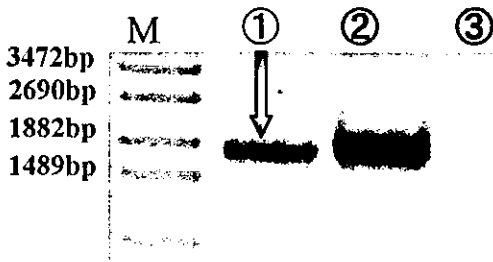
図4

**コロニ-PCR**

**図5**



**genomic DNA PCR**



sample number:

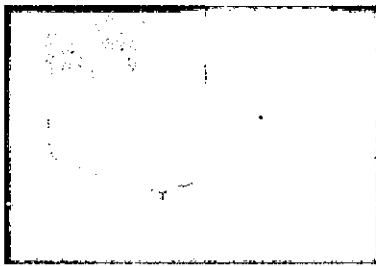
①: WLYPDI/AR10

②: positive control

③: negative control)

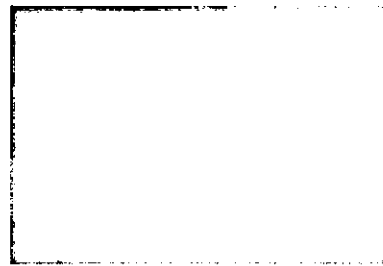
M: Marker: λ-EcoT141 digest

**図6**



(after two weeks)

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



(after four weeks)



(after six weeks)

MS+NAA 1mg/LBA 10mg/L,  
Claforan 0.5g/L,hygromycin25mg/L



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

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

薬用植物の有用成分生合成酵素遺伝子解析に関する研究

ダイオウ由来ポリケチド生合成酵素遺伝子群の解析とその異種同種植物への導入・発現について

分担研究者 氏名 野口博司

所属・職 静岡県立大学 薬学部 ・教授

研究要旨

薬用植物ダイオウ (*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、ベンザルアセトン合成酵素 (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た。 *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、組換え植物体を選別した。

前回報告したダイオウ由来ヘプタケタイド、アロエソン (*Aloesone*) 合成酵素遺伝子の機能解析を行い基質特異性並びに副次生成物について検討した。すると本酵素がマロニル CoA ばかりでなく多くの直鎖脂肪酸 CoA エステルや *p*-Dihydrocoumaroyl CoA、Phenylacetyl CoA を基質として2ないし3個のマロニル CoA を縮合させる触媒機能を有していることが明らかとなった。

A. 研究目的

本年は1) ベンザルアセトン合成酵素(BAS)遺伝子の、高等植物におけるモデル系であるシロイヌナズナへ(*Arabidopsis thaliana* Columbia)の導入。

2) アロエソン(*Aloesone*)合成酵素(ALS)遺伝子のコードする酵素タンパクの機能解析、を目的とした。

研究の背景：1) BA(phenyl butanone)型のポリフェノールを生合成する高等植物は限られており、昨年報告した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<sup>1)</sup>。シロイヌナズナではこれまで知られている限り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。一方ダイオウ(*Rheum palmatum*)由来のBAS遺伝子(*bas*)が導入され発現した場合、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、補酵素等の要求性もない、iii) 通常細胞質で機能する。iv) 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。v) 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 が細胞中で生成すれば、細胞内にBAが蓄積される可能性が極めて高く、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、短期間に遺伝的変化を追跡することができる。そこで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) 昨年報告したダイオウの根よりクローニングされた遺伝子 (*root 5*) は malonyl CoA を基質としてヘプタケタイドを生合成する触媒機能を示すタンパクをコードしており *Aloesone* 合成酵素遺伝子と考えた。このようなポリケチド合成酵素遺伝子は高等植物ではキク科のガーベラに含まれるパイロン合成酵素のみであり、本酵素のように malonyl CoA を基質として、芳香環を形成するものは類例がなかった。そこで本酵素の機能の解明を目指し基質特異性等をさらに検討した。

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法により配列の解析を行った。根よりとれたクローンroot 5はAloesone合成酵素(ALS)遺伝子(*als*)とした。*Als*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(ALS)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ある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あるいはmethylmalonyl CoAを精製酵素と共に30℃、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。

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H<sub>2</sub>Oで洗浄。

↓ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>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。

↓ <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD)。

Aloesone, Sek4, Sek4b, *p*-Coumaroyl Triacetic Acid Lactone derivatives, BisNorYangonin derivatives

ダイオウ由来ベンザルアセトン合成酵素(BAS)遺伝子(*bas*)については既に記載した。ベクターpET-22b(+):*bas*-his.tagをBamHI/Bpu1102I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 Spueeze 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SmaI/SacI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XhoI/EcoRI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システムの作製については、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SalI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 100μg/ml、ゲンタマイシン 25μg/ml、リファンピシリン 50μg/mlを含むLB液体培地で28℃約170rpm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 0.1ppm, 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

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<sup>2,3,4)</sup>。しかし夫々固有の基質特異性を示すところから、今回ALSの基質特異性を検討した。CHS、STS、BASの本来の基質である*p*-coumaroyl CoAは受け入れなかったものの、cinnamoyl CoAや脂肪酸CoAなど様々な基質を受け入れることが判明した。(表1.) (ここでは受け入れるとはポリケタイド鎖を形成するところまで反応が進行した際にこの言葉を用いている。) ALSが受容しなかった基質は*p*-coumaroyl CoA、benzoyl CoA、acetoacetyl CoA、succinyl CoAであった。当初は*p*-coumaroyl CoAとbenzoyl CoAを受け入れないことから、芳香環を持った基質は受け入れないのではないかと予想したが、その他の芳香環を有する基質、特に*p*-dihydrocoumaroyl CoAとcinnamoyl CoAは*p*-coumaroyl CoAとの構造の違いが二重結合と水酸基の部分であるにも関わらず、受容して2乃至3個のmalonyl CoAを縮合・脱炭酸してポリケトメチレン鎖を生成することが判明した。ALSは他にも多種多様な基質を受け入れ、脂肪酸

表 1. 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	○	×
Phenylacetyl CoA	○	○
Isobutyryl CoA	○	○
Isovaleryl CoA	○	○
Acetoacetyl CoA	×	×
Methylmalonyl CoA	—	—
Succinyl CoA	—	—

表 1. ALS の基質特異性

CoAエステルに至っては炭素鎖18のstearoyl CoAまでも基質として受け入れたことは極めて興味深い。昨年本酵素反応生成物はAloesoneであったが、副次生成物を検討すると、Aloesoneの他にポリケチドの生成が確認された。質量分析においてM+H=319を示すこと、<sup>1</sup>H-NMRの結果から図1に示す如く、Actinorhodinを産生するII型ポリケチド合成酵素の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<sup>5)</sup>。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、<sup>1</sup>H-NMR、GC-EIMS、FAB-MSを測定し酵素反応生成物と比較したところ<sup>6)</sup>、<sup>1</sup>H-NMRの測定値が図1程度に一致したことでSEK4及びSEK4bであると現在考えている。両化合物はともにオクタケチドである。これまでIII型ポリケチド合成酵素としては、知られていなかったオクタケチドを生成した。キネティクスについてALSとCHS2を比較すると、ALSは $K_m = 121.0 \pm 24.6 \mu\text{M}$ 、 $K_{cat} = 32.4 \pm 3.0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ 、CHS2は $K_m = 4.7 \pm 1.1 \mu\text{M}$ 、 $K_{cat} = 4580 \pm 240 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ であり、ALSはCHS2に比べ触媒機能が著しく低いように見える。

BAS遺伝子組換えシロイヌナズナは方法の項に記した通り植物体を選抜した。形質転換シロイヌナズナを作出した。

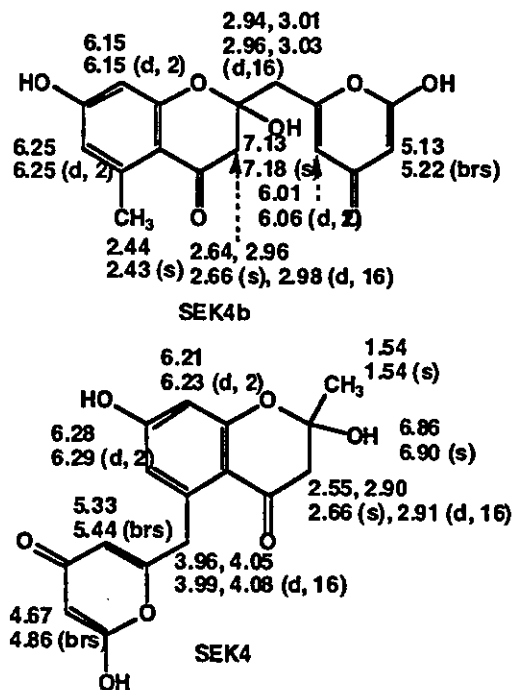


図 1. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>); SEK4b と SEK4. 数値上は酵素反応生成物の測定値、下は文献値

#### D. 考察

昨年は本alsについて、「高等植物で唯一のマロニルCoAのみを利用して、ポリケチドを生合成する酵素をコードしている遺伝子である。」と報告したが、今回ALSに<sup>14</sup>CマロニルCoAと<sup>14</sup>CアセチルCoAを比較投与した際の比活性の値は、アセチルCoAを直接基質として考えた方が妥当な結果であった。そもそもこれまでmalonyl CoAのみを受容する*rppA*は、放線菌由来である。RppAは5分子のmalonyl CoAからTHNを生合成する。この機序を考えた場合、ポリケチドメチレン鎖が伸長する際の脱炭酸の過程は、仮にacetyl CoAを基質とした場合より一回多く、その分エネルギーを多く消費することになる。高等植物由来の酵素がacetyl CoAをも基質として受容するのは、より効率的に化合物を生合成するために進化した結果ではないかと考えた。放線菌や糸状菌に存在するI型、II型PKSが複雑で巨大であるのに対し、主に植物に存在するIII型PKSは、KSのみで構成される42~44 kDaのホモダイマーである。このように植物由来の酵素は、進化の過程で非常にコンパクトにまとまり、少ないエネルギーで効率的にポリケチド化合物を生産できるようになったものの、malonyl CoAだけでも酵素反応が進行するのは、ポリケチドメチレン鎖を伸長するために不可欠な脱炭酸能は決して失われないからだとも考えられる。

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について検討した

ところであって、酵素タンパク質の発現の有無までは検討していないものの、一応*bas*の導入された形質転換植物個体の作出には成功したと考えている。次年度は形質転換個体における本酵素タンパクの発現、ホモ変異体の作出及び二次代謝成分の変動について検討する。

#### 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)

#### E. 研究発表

1. 論文発表 : S. Oguro, T. Akashi, S. Ayabe, H. Noguchi, and I. Abe; Probing Biosynthesis of Plant Polyketides with Synthetic *N*-Acetylcysteamine Thioesters; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325** (2): 561-567 (2004)
2. I. Abe, Y. Utsumi, S. Oguro, H. Morita, Y. Sano, H. Noguchi; A Plant Type III Polyketide Synthase that Produces Pentaketide Chromone; *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(5), 1362-1363 (2005)
3. I. Abe, Y. Utsumi, S. Oguro, H. Morita, Y. Sano, H. Noguchi, Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides; Identification of Active-site Residues for Substrate and Product Specificities in the Heptaketide-producing Type III Polyketide Synthase”, *manuscript in preparation* (2005)
4. Ikuro Abe, Yoriko Utsumi, Satoshi Oguro and Hiroshi Noguchi; The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide, *FEBS Letters*, **562**, Issues 1-3, 171-176 (2004) (昨年報告済み)

#### 2)学会発表

1. 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

2. 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
3. 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
4. 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

#### 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

遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響に関する研究

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

研究要旨 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培養細胞及び植物個体を作成した。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、野生型細胞に比較して著しく多量の coniferin が蓄積していた。遺伝子組み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のひとつは、二次代謝酵素をコードする遺伝子の導入と発現による二次代謝の人為的制御である。このような研究では、通常ある特定の二次代謝成分生産能が問題とされ、その代謝成分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、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物質以外にも、種々の低分子成分の含量が影響を受けることが予測される。

本研究は、単一遺伝子の導入によって植物の二次代謝成分がどのように影響するの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、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-glucosyl-transferase (CaUGT2)cDNA を導入・発現させたときに、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す

ることを目的として実施した。

B. 研究方法

pMAL-c2 ベクターにクローニングされている CaUGT2 の ORF を植物発現ベクター pBI121 にサブクローニングして pBI121-CaUGT2 を作成した。組換えベクターは、エレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) に導入した。シロイヌナズナのカルスをアグロバクテリウム菌液と共存培養後、カナマイシンとカルベニシリンを含む Linsmaier and Skoog (LS) 寒天培地で培養して選抜、除菌することにより、形質転換カルスを得た。形質転換カルスをカナマイシンを含む LS 液体培地に移植して経代培養することにより懸濁培養細胞を作成した。

シロイヌナズナの蕾および若い花をアグロバクテリウム培養液に浸漬して T1 種子を得た。この種子をカナマイシンを含む LS 寒天培地に播種し、正常に発芽してくる個体を選抜して T1 植物体を生育させた。

Curcumin は DMSO に懸濁して培養細胞に添



加した。細胞は収穫後に液体窒素中で凍結破砕し、実験に用いるまで-75℃で保存した。凍結破砕した細胞は MeOH を加えて超音波抽出し、遠心後その上清を HPLC を用いて分析した。

### C. 研究結果

#### (1)形質転換体個体および培養細胞の作出

ニチニチソウの配糖化酵素 CaUGT2 の ORF を含む植物発現ベクター pBI121-CaUGT2 を作成し、アグロバクテリウムを介した形質転換を試みた。

花芽の浸漬による形質転換個体の作出を試みたところ、菌株として *A. tumefaciens* LBA4404 を用いた場合には形質転換個体はまったく得られなかった。そこで *A. tumefaciens* GV3101 を用いて同じ実験を試みたところ、約 750 粒の種子から選択培地上で正常に発芽する 13 個体の幼植物を得た。幼植物から育成したこれらの個体での遺伝子の導入は、CaUGT2 および CaMV35S プロモーターの存在を PCR で検出することにより確認した。また、RT-PCR を行うことにより CaUGT2 が地上部で発現していることも確認した。今後、T2 個体を得て、その二次代謝プロファイルを詳細に解析する予定である。

シロイヌナズナの発芽種子から誘導したカルスを pBI121-CaUGT2 を保持するアグロバクテリウム (*A. tumefaciens* LBA4404) と共存培養し、カナマイシンを含む選択培地で培養を繰り返すことにより、形質転換カルスを得た。形質転換カルスへの遺伝子導入は、植物個体と同様に CaUGT2 と CaMV35S プロモーターを PCR で増幅し、検出することによって確認した。また、カルスの増殖サイクルにおける CaUGT2 の発現を RT-PCR によって検討した結果、CaUGT2 は増殖サイクルのいずれにおいても

発現していることが明らかになった。このカルスを液体培地に移植して振とう培養することにより、形質転換懸濁培養系を確立した。

#### (2)形質転換細胞における curcumin の配糖化

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 を添加し、その配糖化産物を比較した (図 1)。

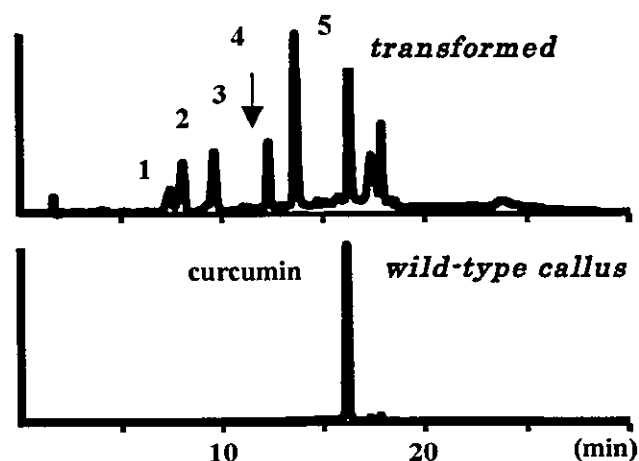


図 1 Curcumin 配糖化産物の HPLC による分析(検出波長 425nm)

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。 $\beta$ -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 の  $\beta$ -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

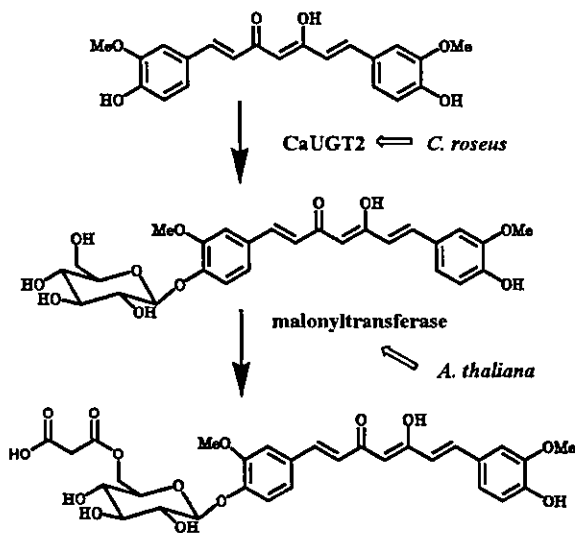


図2 形質転換細胞における curcumin の配糖化

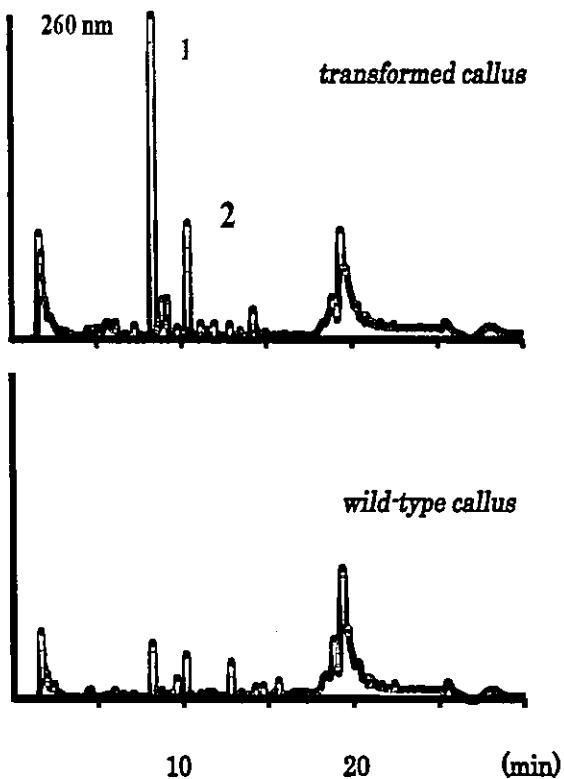


図3 形質転換細胞および野生株細胞の MeOH 抽出液の HPLC プロファイル (検出波長 260nm)

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 2)。異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。

### (3) 形質転換細胞における二次代謝成分組成の変化

形質転換細胞における二次代謝成分組成が外来遺伝子である CaUGT2 の導入によってどのように変化するかを調べた。形質転換細胞と野生型細胞の 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、Rt=8 min と 11min 付近に形質転換細胞で著しく増大している 2 つのピーク (ピーク 1 およびピーク 2) を検出した (図 3)。抽出液を  $\beta$ -glucosidase で処理すると、ピーク 1 は消失し、あらたに Rt=13 min の新しいピーク (ピーク 3) が生じた。ピーク 2 は  $\beta$ -glucosidase 処理では変化しなかった。ピーク 3 の Rt および UV スペクトルは coniferyl alcohol とよく一致した。また、UDP-glucose の存在下で coniferyl alcohol と大腸菌で発現させた組換え CaUGT2 を反応させるとピーク 1 に相当する化合物を生じた。また、ピーク 1 の UV スペクトルは bathochromic shift を示さなかった。これらの結果から、ピーク 1 は coniferyl alcohol 1-O- $\beta$ ,D-glucoside であると同定した (図 4)。

一方、形質転換細胞、野生型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、

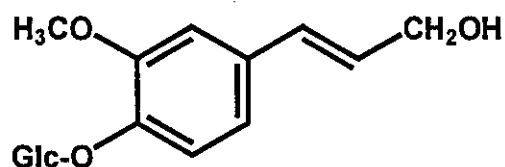


図4 Coniferylalcohol 1-O-β, D-glucoside  
(coniferin)

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。

#### D. 結論

ニチチソウの curcumin 配糖化酵素 CaUGT2 の遺伝子をシロイヌナズナ培養細胞に導入することによって細胞に予想通り curcumin の配糖化能を付与することができた。生じた curcumin monoglucoside は、シロイヌナズナ自身の持つ malonyltransferase によってアシル化され、malonylglucoside として細胞に蓄積している。

さらに、形質転換細胞では 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。代謝工学的な手法で作成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、トランスジェニック個体について、その内生的な二次代謝の変動を解析していくことを予定している。

#### E. 研究発表

##### 1 論文発表

Yasubisa Kaminaga, F. Pinar Sahin, Hajime Mizukami (2004) Molecular cloning and characterization of a glucosyltransferase catalyzing glucosylation of curcumin in cultured *Catharanthus roseus* cells. *FEBS Letters* **567**, 197-202.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

「新規糖転移酵素、及びそれを利用したクルクミン配糖体の製造」(神永靖久、水上 元、清水亮輔、森脇将光) 特願 2004-131967 (2004)

マルバダイオウの成分に関する研究

分担研究者 淵野裕之 国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場

協力研究者 高橋真理衣 国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場

ダイオウ (*Rheum palmatum* L.) よりクローニングされたベンジルアセトン合成酵素遺伝子をマルバダイオウ (*R. rhaponticum* L.) に導入し、その発現を検討する前段階としてマルバダイオウ成分の検討を行っている。遺伝子導入により、基質の競合する生合成過程を有するスチルベン誘導体は生産が減少することが考えられるが、遺伝子導入前のマルバダイオウ葉柄のメタノールエキスにおいてスチルベン誘導体がどの程度検出されるか試験した。その結果前回測定した rhapontin を含む 5 種のスチルベン誘導体と思われるピークを検出し、粗分画したものとメタノールエキスでの比較では、1 種類を除いてメタノールエキスでも検出が可能であった。

A. 研究目的

局方生薬ダイオウの基原植物は *Rheum palmatum* L., *R. tanguticum* MAXIM., *R. officinale* BAILL., *R. coreanum* NAKAI, およびこれらの種間雑種が定められている。これらの植物が冷涼な気候でしか生育しないのに対し、食用大黄として知られる同属の *R. rhaponticum* L. (マルバダイオウ) は比較的温暖な気候でも生育する。マルバダイオウはルバーブと呼ばれ、ハーブの一種としてその葉柄を生または煮込んで食用とするが、薬用には不適とされている。実際、大黄の有効成

分として瀉下作用を示すセンノサイド A, B はマルバダイオウには含まれていない [Zwaving J. H., *Planta Medica* (1972), 21, 254-262]。一方ダイオウのもう一つの重要な作用である消炎作用はベンジルアセトン (フェニルブタノイド) 配糖体である lindleyin が寄与するものと考えられている。このような成分がマルバダイオウに含まれるとの報告はないが、マルバダイオウは rhaponticin (rhapontin) のようなスチルベ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つ