

薬用植物における雄性不稔制御因子の探索と解析

分担研究者 佐藤文彦 京都大学生命科学研究科 教授

薬用植物における花芽形成、雄性不稔関連遺伝子の単離を行ない、同遺伝子を用いて薬用植物に不稔性を付与することを目的に該当遺伝子の単離と解析を試みている。本年度は、薬用植物の分子育種を行なう上で、重要な課題である再分化形成率の向上をケシ科のハナビシソウをモデルに検討するとともに、花芽形成の鍵遺伝子と考えられる FT 遺伝子を導入した形質転換細胞を作製した。検討の結果、遺伝子 X の導入によって、ハナビシソウ形質転換細胞において不定胚形成効率の顕著な向上が認められた。また、シロイヌナズナの FT 遺伝子を導入したハナビシソウ形質転換細胞からも効率が悪いが不定胚と思われる細胞集塊をえることができ、現在、これら形質転換体からの個体再生と、その開花特性について検討を行なっている。なお、X 遺伝子の導入によって、シロイヌナズナの花芽形成を顕著に促進できることが明らかになった。

A. 研究目的

薬用植物の多くは、育種が十分にされておらず、その特性の安定性に不安があり、近縁種との交雑により、特性が変化していくことが危惧されている。従って、栄養繁殖することにより、特性の維持管理が計られることが多い。栄養繁殖できることは、遺伝子組換えした場合にも、容易に繁殖でき、その普及を計るうえで有利である。一方、このことは、薬用植物が比較的高い交雑性を持つということを意味している。従って、薬用植物の稔性を制御し、均質な植物体を作製管理する技術を開発することは、単に遺伝子組み換え体における導入遺伝子の拡散のリスクに対して予防する観点からのみならず、薬用植物の品質管理という観点からも重要である。

さらに、ある種の薬用植物では、開花にともない成分の低下が生じることが知られており、こうした場合には、積極的に開花／あるいは、稔性を抑制することにより、より高品質な薬用植物の育成が期待できる。また、雄性不稔

性を導入することにより、均一性が高く、かつ、収量性、耐病性などの農業形質が優れた一代雑種（F1）種子を生産するシステムを構築することも期待できる。

このように、不稔性、特に、雄性不稔性の導入は、遺伝子組み換え薬用植物の安全性の担保とともに、薬用植物の特性の向上に貢献することが期待できるものである。

本研究では、このように薬用植物に（雄性）不稔性を導入するために有用な遺伝子の探索を行なうとともに、その遺伝子の特性を解析し、応用への展開を図ることを目的としている。

B. 研究方法

すでに、多くの植物において花器官の発達に植物ホルモンであるジャスモン酸やエチレンなどが深く関わっていることが知られている。さらに、近年、タバコにおいてエチレンが胚珠成熟に関わっているという報告 [Martinis et al., Plant Cell, 11(6):1061-72, 1999] や、

エチレンレセプター阻害剤で処理された花芽では葯の開裂と開花が同調しないとの報告があった[Rieu et al., *Planta*. 217(1):131-7, 2003]ことより、エチレンシグナル伝達の下流で機能する転写因子 ERF が花器の発達において果たす役割を昨年解析した。その結果、ERF4 の発現抑制により、タバコにおいて葯の解裂を部分的に阻害することが可能であることが判明した。このことは、エチレンシグナル伝達系が花粉の発達に関与しているとするこれまでの報告を支持するものであったが、その効果は部分的であった。このことは、エチレンシグナル伝達において ERF が重複して機能している可能性、あるいは、全く別のシグナル伝達系が ERF4 の機能を相補している可能性が考えられた。現時点で得られている葯の解裂抑制の効果は限られていることから、ERF4 遺伝子とともに、新たに開花あるいは花粉形成に関与する遺伝子の単離が必要と考えられた。

一方、モデル植物シロイヌナズナにおいては、既に LEAFY、AP1、TFL 等の花成制御因子が単離されており、これらの遺伝子の機能欠失により、花芽形成の異常が起こること、あるいは、異所的過剰発現による花成促進が知られていた。これら遺伝子のうちで、特に、FT 遺伝子は開花促進因子として注目されており、多くの植物種から遺伝子が単離されるとともに、その過剰発現により花芽形成が誘導されることが知られていた。薬用植物においても同様に FT 遺伝子の機能制御により、開花を制御し、不稔性を与えることも可能と考え、昨年、シロイヌナズナから FT 遺伝子を単離した。今年度は、FT 遺伝子の過剰発現ベクターを作製するとともに、イソキノリンアルカロイドを生産するケシ科のハナビシソウ (*Eschscholtzia californica*) に遺伝子導入し、その開花に与える効果を検討することとした。

一方、ハナビシソウを含め、多くの薬用植物

においては、培養細胞からの個体再生の効率が極めて低く、形質転換による開花制御において大きな課題となることが予測されたことより、ニンジンにおける不定胚形成に関わる遺伝子の単離過程において新たに同定した遺伝子 X を用いて、その不定胚形成におよぼす効果を検討した。また、同遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、有意にシロイヌナズナの花芽形成を促進することが新たに発見されたことより、その結果についてもあわせて報告する。

C. 研究結果

シロイヌナズナより、報告されている配列情報をもとに FT 遺伝子の cDNA を PCR により増幅するとともに、島根大学遺伝子実験センター中川強博士より供与頂いた高発現ベクター pGWB2 に Gateway System (Invitrogen 社) を用いて導入し、発現ベクター pGWB2AtFT を作製した。一方、再分化効率の向上を検討するために、ニンジン不定胚形成系 (Takahata et al., *Plant Cell Physiol.*, 45, 1658-1668 (2004)) において単離された複数の遺伝子のうち X 遺伝子を pBI121 に導入し、発現ベクター pBI121X1 を作製した。これらの発現ベクターが正しく作製されていることを塩基配列決定により確認した。

ついで、これらの発現ベクターを *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 にエレクトロポレーションにて導入後、ハナビシソウの形質転換を行なった。ハナビシソウの種子 (カネコ種苗株式会社) を除菌したのち、植物体用培地に播種し、25°C で培養した。発芽後 2 ~ 3 週間後の植物体より調製した葉および葉柄に *Agrobacterium tumefaciens* (pGWB2, pGWB2FT, pBI121, pBI121X1) を感染させたのち、適当な

抗生物質を含む選抜培地にて、選抜培養した。その結果、表1に示すような形質転換体をえることができた。表1に示すように、カルス化効率は、形質転換の有無に関わらず、いずれの場合にも20%前後であったが(図1参照)、得られたカルスからの不定胚(図2、表1参照)は、形質転換のない場合、20%程度であるのに対し、pBI121X1を除く形質転換では、10%以下であった。一方、pBI121X1を導入した場合には、30%に不定胚形成効率が向上することがみとめられた。シロイヌナズナFT遺伝子を導入した場合にもコントロールに比べ、不定胚形成効率の向上が認められた(図3)が、その効果は、pBI121X1に及ばなかった。現在、これら不定胚からの個体の再生を試みており、その花芽形成におよぼす効果の評価を今後行なう予定である。

一方、pBI121X1をシロイヌナズナに導入することも試みた。In planta法により、形質転換体を作製し、その後代における開花特性を検討した結果、図4に示すように、長日、短日の両条件において開花が野生株よりも顕著に促進されることを認めた。開花促進の分子機構に関しては、まだ、今後の解析が必要であるが、従来の分子機構とは異なる機構と考えられる。

D. 考察

本研究では、イソキノリンアルカロイド生産性薬用植物のモデル植物としてハナビシソウにおける再分化系の効率化を検討するとともに、雄性不稔制御因子の探索と解析のための

材料として、早期開花特性を有する実験用植物体の育成を試みた。これまでに、再分化を制御する遺伝子としては、サイトカイニン受容体などが単離されてはいるが、不定胚形成を促進する因子は未だほとんど知られていない。今回、ハナビシソウにおいて効果が認められた遺伝子Xは新規な不定胚誘導促進因子として、期待が持てるものである。また、同遺伝子の過剰発現により、シロイヌナズナで、通常開花が阻害される短日条件でも開花の促進が認められ、新しい開花特性を有する実験材料としての利用が期待できる。まだ、ハナビシソウでは、形質転換再分化個体がえられていないために、今後の解析に待つ必要があるが、これらの遺伝子資源は今後の解析において有用と考えられる。

E. 結論

新規な遺伝子Xを導入することにより、通常不定胚形成効率の悪いハナビシソウにおいて、その不定胚形成効率を著しく向上することに成功した。また、同遺伝子の過剰発現はシロイヌナズナにおいて、開花の促進効果を示すものであり、FT遺伝子を導入した個体とともに、不稔性因子探索のよい実験素材が育成できたと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

特許申請準備中のため、未発表

2. 学会発表

特許申請準備中のため、未発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請準備中

表1 ハナビシソウにおけるカルス形成と不定胚形成

WT:形質転換していないハナビシソウ葉、葉柄からのカルス化ならびに再分化を示す。PBI121X1, pBI121, pGWB2AtFT, pGWB2 はそれぞれ、発現ベクター発現ベクターを含む Agrobacterium による形質転換体からのカルス化ならびに再分化を示す。

		不定胚形成	カルス	不定胚形成率 (%)	average	SD	
pBI121X1	プレート1	10	21	47.6	34.2	2.3	pBI121X1
	プレート2	9	29	31.0			
	プレート3	6	25	24.0			
pBI121	プレート1	1	19	5.3	5.6	1.1	pBI121
	プレート2	1	25	4.0			
	プレート3	2	27	7.4			
pGWB2AtFT	プレート1	1	7	14.3	7.2	5.1	pGWB2AtFT
	プレート2	0	18	0.0			
	プレート3	2	27	7.4			
pGWB2	プレート1	0	21	0.0	2.2	1.5	pGWB2
	プレート2	1	23	4.3			
	プレート3						
WT	プレート1	6	18	33.3	21.3	5.9	WT
	プレート2	3	23	13.0			
	プレート3	3	17	17.6			

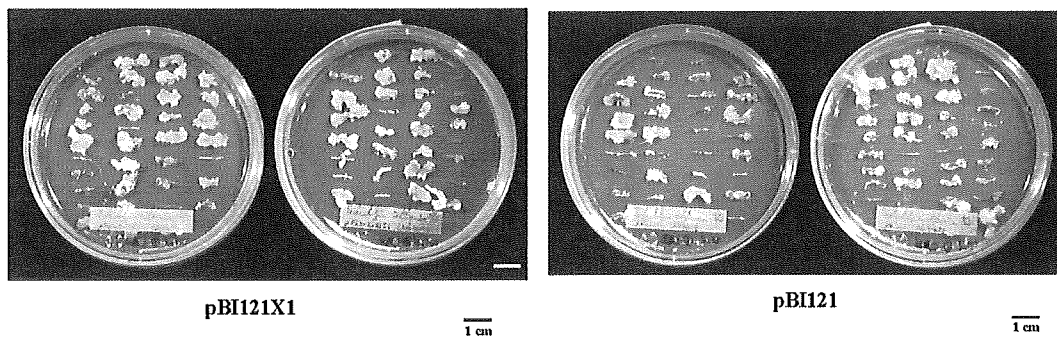
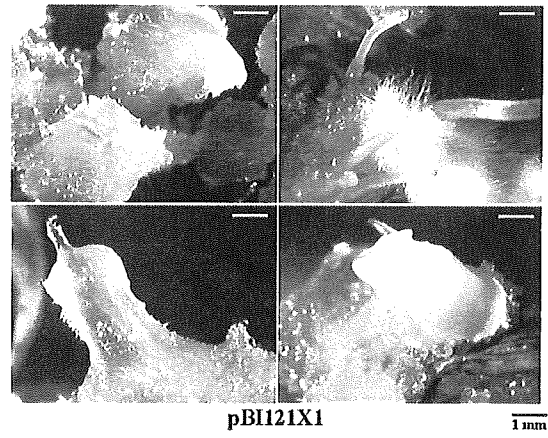
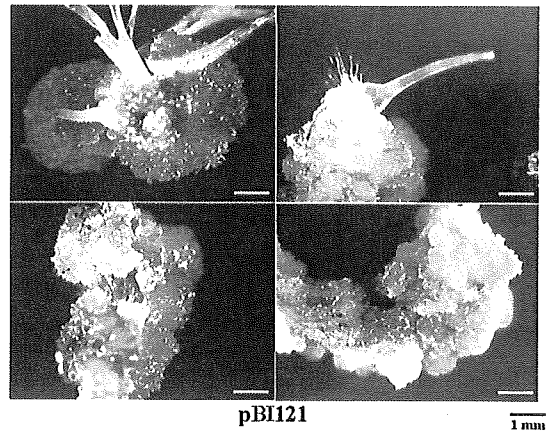


図1 pBI121 ならびに pBI121X1 を導入したハナビシソウ葉ならびに葉柄からのカルス化



pBI121X1

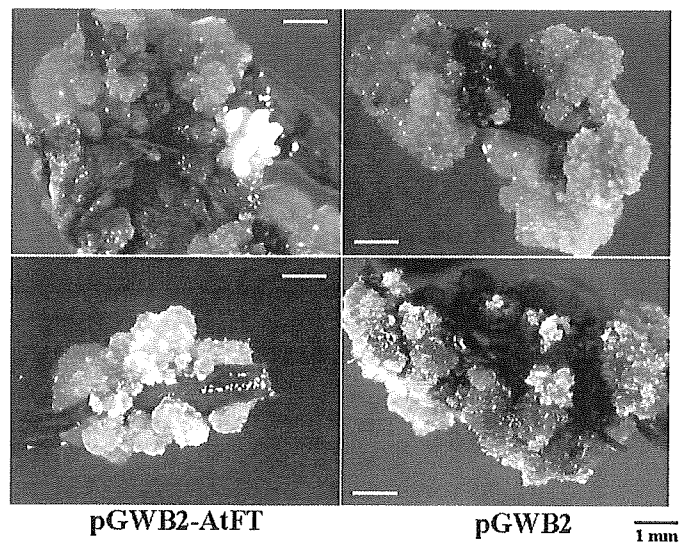
1 mm



pBI121

1 mm

図2 pBI121 ならびに pBI121X1 を導入したハナビシソウ葉ならびに葉柄からの再分化



pGWB2-AtFT

pGWB2

1 mm

図3 pGWB2AtFT 遺伝子を導入したハナビシソウ細胞からの再分化



図4 遺伝子 X を導入したシロイヌナズナ(T3 3-3A)における開花促進
WT : 野生株、短日条件にて栽培したもの

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

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

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、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既に得ていた。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キングにより、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。

C. 研究結果

(1) CaUGT2 高発現体の選抜

昨年度までに作製していたニチニチソウの配糖化酵素 CaUGT2 を高発現するシロイヌナズナ形質転換植物体を用いて、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、形質が安定すると考えられた T₃ 世代を用いることとし、ノザンブロッキ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。

一方、昨年度までに得ていた CaUGT2 高発現カルスは 1 ラインであったため、今年度はさらにラインを増やし、定量的な解析を行うため、形質転換植物体の種子 (T₂) よりカルス誘導を行った。カルス誘導培地で生育させたカルスについても、植物体と同様にノザン解析を行い、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。

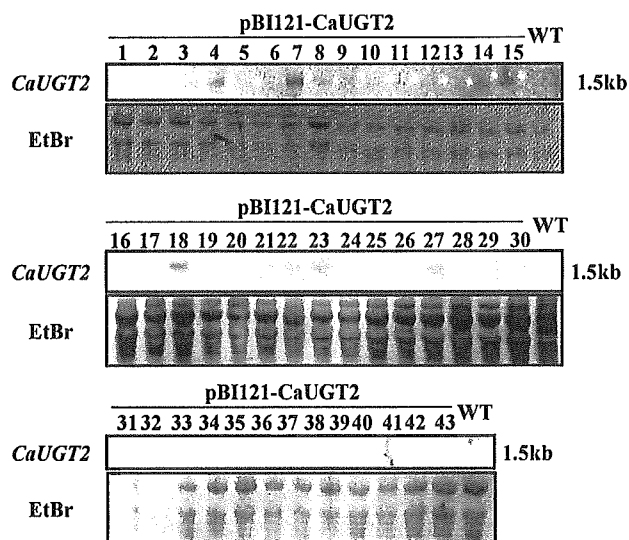


図 1 CaUGT2 導入形質転換植物体のノザン解析 (1-43, 形質転換植物体; WT, 野生株)

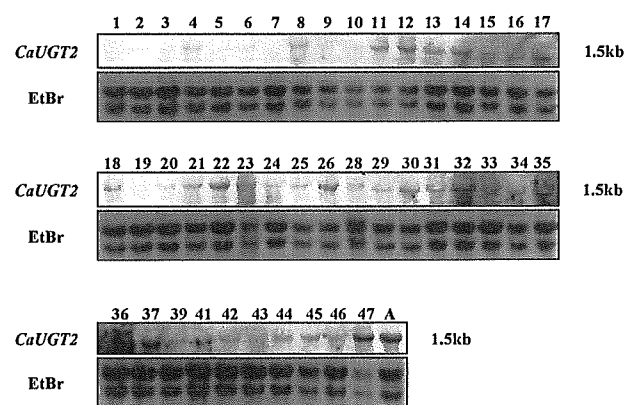


図 2 CaUGT2 導入培養細胞のノザン解析 (1-47, 形質転換植物体; A, 昨年度作製の株)

(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。昨年度、CaUGT2 高発現液体培養細胞では、coniferin (coniferyl alcohol 1-O-β, D-glucoside) (図 3) が高蓄積していることを明らかにしたが、植物体において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。

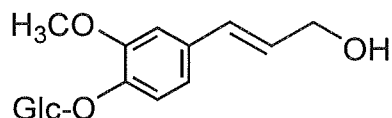


図3 coniferin (coniferyl alcohol 1-O-β, D-glucoside)

(3) CaUGT2 高発現培養細胞における二次代謝産物組成

今年度新たに誘導した CaUGT2 高発現培養細胞における二次代謝産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、昨年度確立した培養細胞と同様に、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 の発現量との関係については、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。

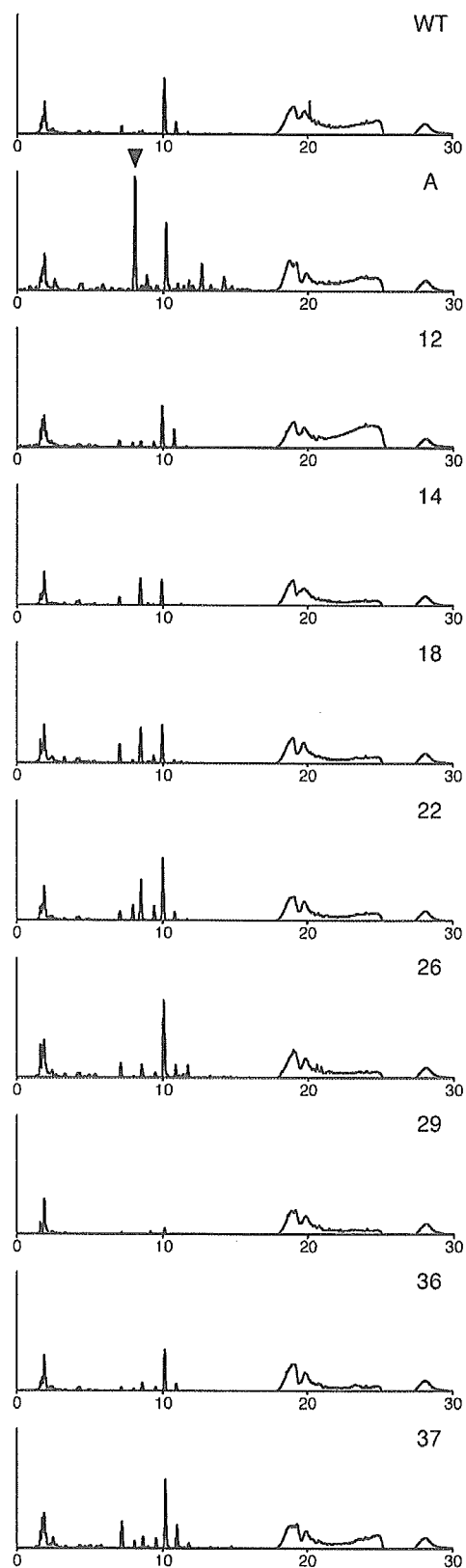


図4 CaUGT2 高発現培養細胞および野生株培養細胞の MeOH 抽出液の HPLC プロファイル (検出波長, 260 nm; ▼, coniferin)

今後は、シロイヌナズナに内在する *coniferyl alcohol* 配糖化酵素の発現等も解析することにより、CaUGT2 高発現による二次代謝系への影響について、考察できるものと考えられる。

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。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

核磁気共鳴スペクトルによる多変量解析法を用いた組換え植物評価法の検討

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筑波研究部 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の成分評価の方法として、ごく最近開発された手法でありまだ応用例が少ないプロトン核磁気共鳴スペクトルを用いた多変量解析が採用可能であるかを検討した。種々の系統のショウガ科 *Curcuma* 属植物をモデルとして解析を行った結果、NMR で検出できる成分を全体として捉えたデータの主成分分析により、系統毎の成分の差異の情報を抽出することができることが明らかになった。

A. 研究目的

多変量解析とは本来多変量データを解析して有効な情報を見つける統計的な手法であるが、近年は質量分析装置など分光手法を用いた結果を解析する例も多い。植物は生育条件等のさまざまな要因によりその成分が異なってくる。また種が異なれば当然その差は成分に現れてくる。そのような成分の違いに着目して、多くの植物サンプルの各種成分データ（多変量データ）を多変量解析する事により、それら植物の種、産地あるいは生育条件等による成分の変化を解析することが可能となると考えられる。

遺伝子組換え植物の成分評価においては、その成分が組換え前の植物と比較してどう変化したかを評価する必要がある。特に植物体をそのまま生薬として用いる薬用植物に関しては、ある特定の成分のみに着目するだけでは不十分であり、成分全体の変化を総合的に解析する必要がある。そのためには多くの化合物の含量に関するデータを取り扱う必要があり、多変量解析の手法を用いることが有効であると考えられる。

核磁気共鳴スペクトル装置（NMR）を用いた多変量解析は最近行われるようになったが、主な応用例は代謝物の解析であり、植物を例にとった解析例は少ないのが現状である。この手法はNMRにおいて得られた個々のスペクトルを一定間隔でバケット積分して数値化することでヒストグラムに変換し、こ

のデータについて多変量解析の1つである主成分分析(PCA)を用いてクラス分けを行うものである。プロトンNMRは、水素原子を持つ広範な化合物を高感度で検出できることから、複雑な混合物の構成成分の変化をシグナルパターンの変化として検出することができ、遺伝子組換え植物における成分変化を評価する際、ある特定の成分のみに着目するのではなく、全体的な成分を考慮に入れて解析するための手法として有効であると考えられる。

そこで、今回NMRを用いた多変量解析を*Curcuma*属植物について行い、遺伝子組換え植物などの成分評価法としての可能性を検討した。

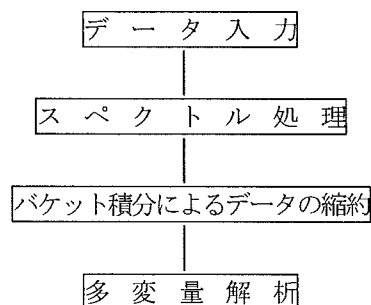


図1. NMRによる多変量解析の概略

ウコンをはじめとする*Curcuma*属植物は、ショウガ科に分類され、現在までに50種を超える品種（学名）が報告されている。従来の分類では、葉茎部・根茎部・花など、主として形態的な特徴をもつ

て種を特定してきたが、*Curcuma*属植物にはいまだに決定的な分類法がなく、混乱している。近年遺伝子レベルによる分類、鑑定なども試みられているが、未だ確定的ではない。

B. 研究方法

(試料および機器、ソフトウェア)

試料として表1に示す*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、多変量解析は、ALICE Version 5 (日本電子) を用いた。

(実験方法)

試料の抽出および後処理

試料をすりおろし、その後その試料をはかり取り、溶媒を加え、10分間震盪した。その後遠心分離を行って、上層を取り適宜後処理を行った後、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。

(試料前処理条件の検討)

抽出溶媒および抽出後の処理条件を検討した。今回使用した試料はいずれも生の栽培品を乾燥させることなくすりおろし検体として用いている。よって試料中には水分が多く含まれているため、抽出溶媒は一般に良く用いられるメタノールなどの水溶性溶媒では水分をも多く溶出してしまい、NMRを測定するためには何らかの脱水処理が必要であると考えられた。そこでクロロホルムなどの低極性溶媒であれば、水分の溶出は最低限に抑えられ、また今回の指標になると考えられた精油成分などが良く抽出されると考えられたため、クロロホルムを抽出溶媒とした。また抽出後に溶媒留去などの操作を省くために重クロロホルムで直接抽出することとした。

上記抽出条件で抽出後、試料のプロトンNMRを測定した結果、図2下段のようなチャートが得られた。しかしながら、水のシグナルが大きく出てしまい、そのため積算回数を増やしてもSN比が上がらないものと考えられた。そこで、抽出後の重クロロホルムにモレキュラーシーブス4Aを

No.	系統名	学名	和名	導入先
1	ガジュツ (春日部)	<i>C. zedoaria</i>	ガジュツ	伊豆試
2	クスリウコン (春日部)	<i>C. xanthorrhiza</i>	クスリウコン	伊豆試
3	ウコン (春日部)	<i>C. longa</i>	ウコン	伊豆試
4	ハルウコン (春日部)	<i>C. aromatica</i>	ハルウコン	伊豆試
8	ガジュツ (種子島系)	<i>C. zedoaria</i>	ガジュツ	種子島試
9	ガジュツ (ライオン系)	<i>C. zedoaria</i>	ガジュツ	伊豆試在来選抜
10	ガジュツ (ジャワ系)	<i>C. zedoaria</i>	ガジュツ	不明
11	ガジュツ (新信御苑系)	<i>C. zedoaria</i>	ガジュツ	新信御苑
13	ウコン (武田系)	<i>C. longa</i>	ウコン	武田薬品工業 (台湾系)
14	ウコン (ジャワ系1)	<i>C. longa</i>	ウコン	ジャカルタ市場品
15	ウコン (ジャワ系2)	<i>C. longa</i>	ウコン	ジャカルタ市場品
16	ウコン (インド系)	<i>C. longa</i>	ウコン	インド
17	ウコン (スマトラ系)	<i>C. longa</i>	ウコン	スマトラ (自生品)
18	キョウオウ (ハルウコン)	<i>C. aromatica</i>	ハルウコン	武田薬品工業
19	キョウオウ (ハルウコン)	<i>C. aromatica</i>	ハルウコン	武田薬品工業
20	No.1	<i>C. xanthorrhiza</i>	クスリウコン	大阪市立大学
21	No.2	<i>C. xanthorrhiza</i>	クスリウコン	大阪市立大学
28	種子島A1	<i>Curcuma</i> sp.		富山医大植物園
30	種子島A3	<i>Curcuma</i> sp.	ガジュツ状	富山医大植物園
33	種子島A6	<i>Curcuma</i> sp.		富山医大植物園
34	種子島A7	<i>Curcuma</i> sp.	ガジュツ状	富山医大植物園
35	種子島A8	<i>Curcuma</i> sp.		富山医大植物園
38	種子島A11	<i>Curcuma</i> sp.	ハルウコン状	富山医大植物園
43	種子島A16	<i>Curcuma</i> sp.	ガジュツ状	富山医大植物園
45	種子島A18	<i>Curcuma</i> sp.	ウコン状	富山医大植物園
52	種子島A25	<i>Curcuma</i> sp.	ガジュツ状	富山医大植物園
54	種子島A27	<i>Curcuma</i> sp.	ショウガ類	富山医大植物園
56	種子島A30	<i>Curcuma</i> sp.		富山医大植物園
58	種子島A33	<i>C. petiolata</i>		鹿兒島県市場品
62	種子島C39	<i>C. xanthorrhiza</i>	クスリウコン	内藤記念くすり博
65	種子島C153	<i>C. Galanga</i> 学名未確認		茨城県インドネシア産

表1 使用した*Curcuma*属植物試料

適宜加え、30分以上放置後に再度測定を行った。その結果図2上段のように、水のピークは大きく消失した。またその際、3.0~4.0 ppm付近の小さなシグナルも同時に消失した。これらのシグナルはそのケミカルシフト値から考えると、高極性化合物の糖類であると推定されたが、糖類は今回の指標物質にはあまりなり得ないと考えられ、低極性の精油成分などを今回は指標としているため、消失しても特に解析結果には問題ないと考え、試料の測定前の前処理条件として、モレキュラーシーブスによる乾燥を入れることとした(図2, 3)。これらの測定データを用い、ALICE v. 5にて多変量解析の主成分分析(PCA)を行った。クロロホルムのシグナルがピークとして認識されてしまうため、解析ピークから削除した。また、一部のサンプルのチャートにおいて、ヘテロ原子由来すると考えられるブロードなピークが現れ、それもやはり解析ピークとして認識されていたが、一部のチャートにはこれらのブロードピーク上に他のシグナルが重なって現れているため(図4下段)、それらの重なりピークが解析ピークとして認識されていない事がわかった。ヘテロピークは本来重要でないと考え、Baseline補正において、ブロードピークを消去し(図4上段)、その上に重なっていたシグナルを解析ピークとして認識させた。また、水のシグナルおよびそのサイドバンドも認識

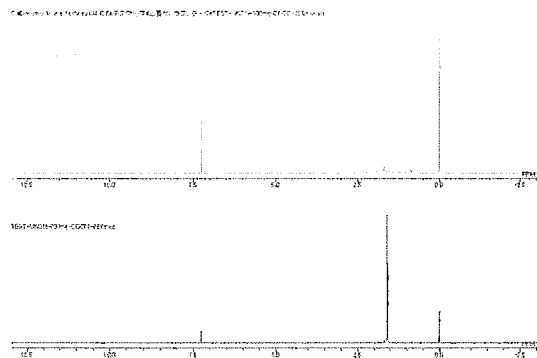


図2 ¹H-NMR (上段：モレキュラーシーブス処理後、
下段：処理なし)

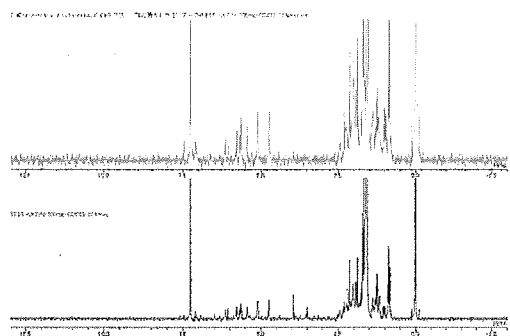


図3 ¹H-NMR 拡大図 (上段：モレキュラーシーブス処理
後、下段：処理なし)

から削除した。その結果、PCA (主成分解析) 結果は図7のようになった。

(倫理面への配慮) 本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用しない。

C. 研究結果

PCA 解析を行った結果、図5に示すように、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。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と考えられる。特にウコン類を特徴づける低極性成分である curcumine 類は、その化学構造の中に芳香環やオレフィン有するため、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。今回のパターン認識では、各群における ¹H-NMR の重

ね書きチャートを見る上では低磁場側にそれぞれ特徴が現れているように思われた (例、図12)。

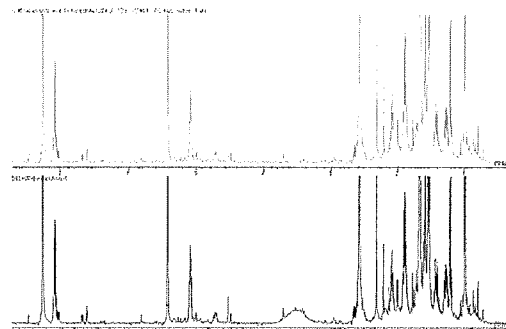


図4

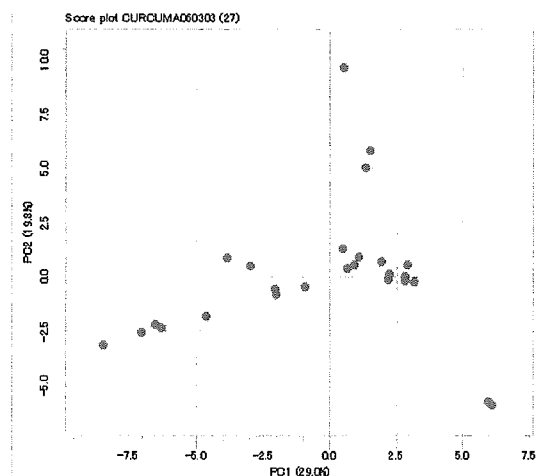


図5 PCA 結果

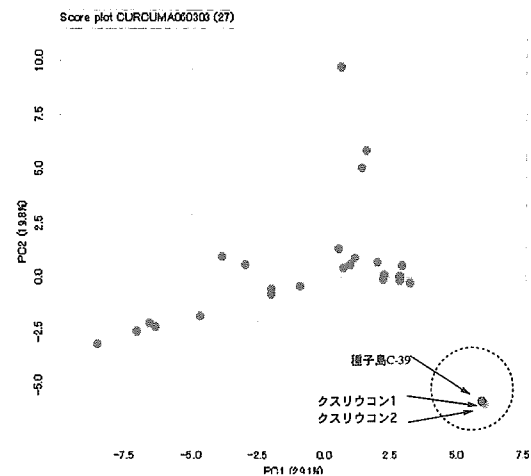


図6 クスリウコン類および種子島 C-39 サンプルの PCA
における分布位置

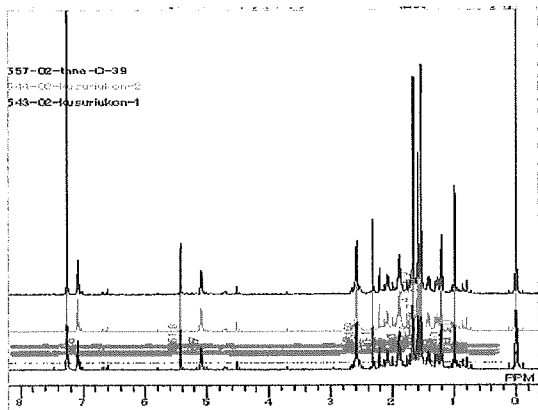


図7 クスリウコン類および種子島C-39 サンプルの¹H-NMR チャートの重ね図

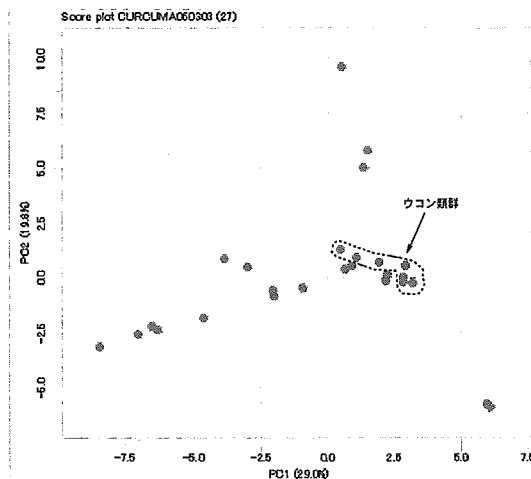


図10 ウコンのPCAにおける分布位置

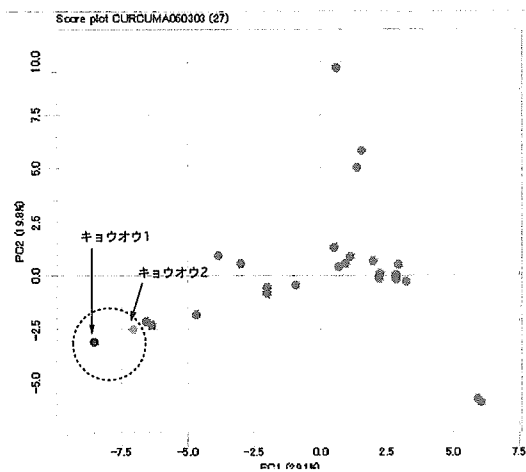


図8 キョウオウのPCAにおける分布位置

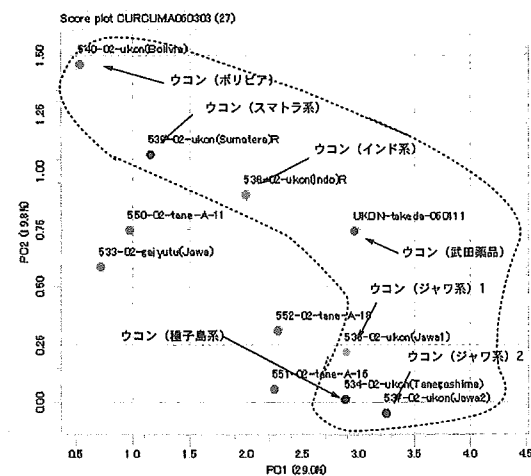


図11 ウコンの分布位置拡大図

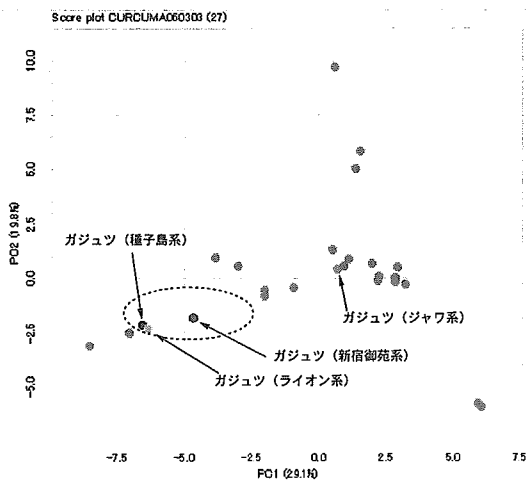


図9 ガジュツのPCAにおける分布位置

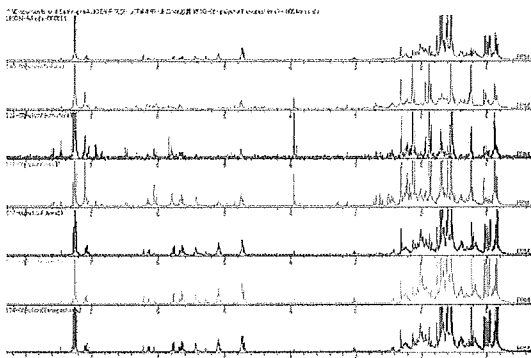


図12 各ウコンの¹H-NMR の重ね書きチャート

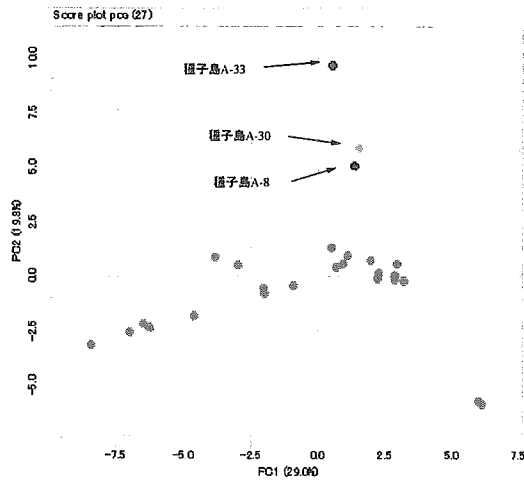


図 13 種子島サンプル A-33,30,8 の分布位置

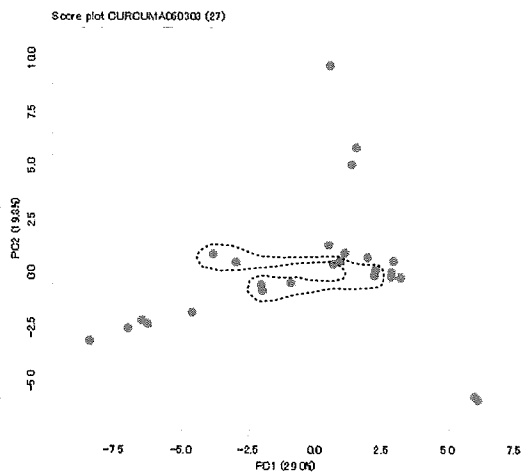


図 14 種子島 A-シリーズの PCA における分布位置

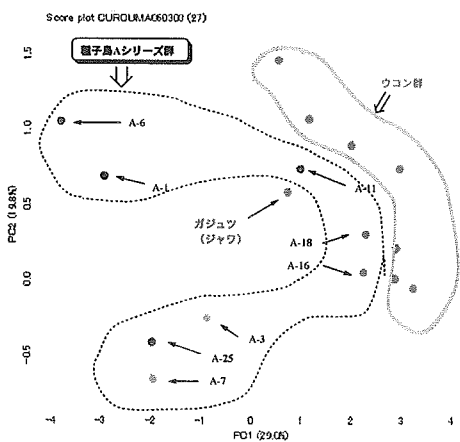


図 15 種子島 A-シリーズの PCA における分布位置

(拡大図)

D. 考察および結論

今回試料として用いたサンプルのうち、種子島系サンプル (A, C シリーズ) は種が不明であるが、今回の結果からは、C-39 はクスリウコンのパターンに極めて近く、成分的にはほとんどクスリウコンとかわらなかった。

ガジュツは、ほとんどが近い分布域にまとまっていたが、ジャワ系の試料のみがウコン群の近傍まで外れていた。

A-33, 30, 8 は、いずれの群にも属さず、独立したグループを形成しているように思われた。

種子島サンプルで基原種不明の他の A シリーズは、いずれもウコン群とガジュツ群の中間に位置していた。

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。

今回はサンプル数が少数に限られているため、データとしての信頼性は低いが、サンプルの調製法などにも改良の余地があり、今後も検討していく。

今回のような NMR を用いた多変量解析法を用いた植物種の解析は過去に例が少なく、今後この手法を用いて様々な植物の解析が行われていくものと考えられる。今回は、様々な系統の *Curcuma* 属植物について解析を行ったが、PCA によって植物種のグループ分けが可能であることが明らかになったことから、成分改変を目的とした遺伝子組換え薬用植物の評価にも利用できるものと考えられた。今後、さらに測定サンプルを増やし、集計数を多くして信頼性を高めることにより、集団としての成分の変異の範囲を把握するとともに、SIMCA 解析などの手法を用いてどのような成分の寄与が大きいかな等を検討し、遺伝子組換え薬用植物の成分評価への利用法を確立していく予定である。

F. 健康危機情報

特に問題はなし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし
- 3.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

マオウアルカロイド生合成に関する分子生物学的・生化学的研究

分担研究者 関田 節子 徳島文理大学香川薬学部 教授

Ephedra 属植物の含有成分である *Ephedrine* 系アルカロイドは顕著な薬効を示し、化学構造解明から 110 年以上を経過しているが生合成経路の全貌が明らかにされたのは数年前である。未解明である *Ephedrine* 系アルカロイド生合成に関与する遺伝子群のクローニングと機能解析を目的として、上流遺伝子である *pal* 遺伝子のクローニングと機能解析を行った。

A. 研究目的

天然医薬品成分は、細胞内における遺伝子・タンパク質レベルでの厳密な制御のもとで二次代謝産物として生合成されている。生体内での代謝物生合成に関する分子生物学的・生化学的、あるいは、ポストゲノム研究は数多く行われているものの、有用な薬効成分の生合成遺伝子に関しては未解明な系が多い。生合成遺伝子を明らかにすることは、組換えタンパク質を利用した *in vitro* における薬効成分の酵素的全合成、あるいは、遺伝子改変による薬効成分高生産植物の作出が可能となり、化学的合成や植物体からの抽出のみに依存しない新規医薬品生産方法の創出、および、その低コスト生産を実現できる。

マオウは裸子植物マオウ科に属し、第 14 改正日本薬局方においては *Ephedra sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* の 3 種が生薬「麻黄」として規定されている。これらのマオウは代表的な薬効アルカロイド成分として *Ephedrine* を産生する。

現在まで、マオウアルカロイド生合成に関する分子生物学的・生化学的研究は報告されていない。そこで、*Ephedrine* 系アルカロイド生

合成に関与する遺伝子群のクローニングと機能解析を目的として研究を行った。*Ephedrine* 系アルカロイドは、*L-Phenylalanine* 由来の C_6-C_1 unit と *Pyruvic acid* 由来の C_2 unit との縮合反応に基づいて生合成される。この生合成初期前駆物質であるアミノ酸 *L-Phenylalanine* は *PAL* (*Phenylalanine Ammonia-Lyase*) の触媒下、*trans-Cinnamic acid* へと変換される。*PAL* はフェニルプロパノイド経路（シキミ酸経路）の律速酵素としても重要であり、一次代謝系から二次代謝系への導入酵素と考えられている。このような重要性から *pal* 遺伝子を標的として、遺伝子改変やストレス応答によってもたらされる代謝物変化や遺伝子の発現変動に関するプロファイリング研究が、主としてシロイヌナズナを対象に行われている。

そこで、本研究では、*Ephedrine* 系アルカロイド生合成の上流遺伝子である *pal* 遺伝子のクローニングと機能解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

E. sinica の種子をバーミキュライト・川砂混合土に播種後、地上茎が第 4 節まで分化した植物体の地上茎と根を別に用いた。*E. sinica* の種

子は金沢大学大学院自然科学研究科・御影雅幸教授より御供与頂いた。

2. PAL 活性の測定

タンパク質抽出バッファー(200 mM Bis-Tris Propane/HCl [pH 8.5]、1 mM DTT、0.5 mM EDTA [pH 8.0]、0.1 g/g [fresh weight] PVPP)を 3 ml/g (fresh weight)の割合で植物体に加えた後、乳鉢を用いて破碎する。10 k x g で遠心後、上清を粗タンパク質溶液として用いる。タンパク質の定量には Bradford 法を用いた。

酵素反応バッファー(100 mM Bis-Tris Propane/HCl [pH 8.5]、1 mM DTT、0.5 mM EDTA [pH 8.0])に対し、基質として 1 mM L-Phe または L-Tyr、および、粗タンパク質溶液を加えた後、37°C にて 30 分間反応を行なった。各酵素反応は、それぞれ 3 個体につき別々に行なった。

酵素反応により生成する L-Phe 由来 *trans*-Cinnamic acid および L-Tyr 由来 *p*-Coumaric acid を酵素活性の指標とし、これを HPLC-UV により測定した。分離カラムには COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 150 mm, 5 mm) (nacalai tesque)を用い、溶離液 A: 3% AcOH/H₂O および溶離液 B: CH₃CN のグラジエント送液(0→100%B)により化合物を分離した。*trans*-Cinnamic acid は 278 nm、*p*-Coumaric acid は 310 nm の波長にて検出した。

酵素の活性強度は、生成化合物のモル数をタンパク質量と反応時間で除した比活性として表した。

3. *pal* 遺伝子のクローニング

(1) 縮重型プライマーを用いた RT-PCR

植物体より total RNA を抽出後、アダプター領域結合型オリゴ dT プライマー(Oligo dT-3sites Adaptor Primer, TaKaRa)を用いて mRNA の逆転写反応を行ない、cDNA を合成した。

このアダプター領域と相補的なプライマー

(Adp)

5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'

と、既知の植物由来 *pal* 遺伝子のホモロジーよりデザインした縮重型プライマー(*pal*-dg-F):

5'-GAYCTBGTYCCBYTVCYTA-3'

との組み合わせにより PCR を行なった。

これを鋳型として、*pal*-dg-F と、同様にしてホモロジーよりデザインした縮重型プライマー(*pal*-dg-R):

5'-AGYTCNGWRAAYTGVGCRAACAT-3'

との組み合わせにより nested PCR を行なった。

(2) 3'-RACE

(1)より得られた特異的増幅産物の塩基配列より、3'-RACE のためのプライマーを 2 種類デザインした。

pal-3RC-F1:

5'-TGACAATCCTATGATCGATGTAGC-3'

pal-3RC-F2:

5'-CTATCGGTGCTCCATGGATAATC-3'

(1)と同様の方法により合成した cDNA に対して、プライマー Adp と *pal*-3RC-F1 との組み合わせにより PCR を行なった。次に、これを鋳型としてプライマー Adp と *pal*-3RC-F2 の組み合わせにより nested PCR を行なった。

(3) 塩基配列の解析

塩基配列のシーケンシングは、Dideoxy-Chain Termination 法により行った。得られた塩基配列の相同性検索は、BLAST2により行った。また、分子進化系統解析には DNASIS Pro Ver. 2.06 (HITACHI Software)を用い、CLUSTAL W アルゴリズムを利用して行った。

C. 研究結果

1. 地上茎と根における PAL 活性強度

3 個体を用いた地上茎における PAL 比活性

は 41.3 ± 5.5 nmol/mg protein/hr、根では 282 ± 42 nmol/mg protein/hr であり、*E. sinica* における PAL 比活性は地上部に比して根で約 7 倍強いという結果を得た。

2. *pal* 遺伝子のクローニング

1 の結果より、地上部のみならず根を含めた植物体全体を対象として *pal* 遺伝子のクローニングを行った。*pal* 遺伝子は異種生物間においても相同性の高い遺伝子であり、既知の植物由来 *pal* 遺伝子の相同性に基づいてデザインした縮重型プライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、既知の *pal* 遺伝子と極めて高い相同性を有する 674 bp の特異的増幅断片を得た。

得られた 674 bp 断片の塩基配列を利用して、*pal* 遺伝子の 3'末端塩基配列を明らかにするために 3'-RACE を行ない、塩基配列を解析した。その結果、新規領域として、ストップコドンを含む 3'末端 ORF 領域、3'-UTR、mRNA 末端領域と考えられるポリ A 部分を含む約 1200 bp の特異的増幅断片を得た。

また、5'末端塩基配列を明らかにするため、5'-RACE を現在行なっているところである。

D. 考察

麻黄は北半球と南アメリカのやや乾燥した地域に分布し、1 属約 35 種とも 60 種とも言われている。これは分類形質の一つである外部形態が簡素で類似しているため分類に混乱が見られることによる。また、代表的な成分である Ephedrine 系アルカロイド類の含有量も種間あるいは同種であっても環境条件などにより差があることが知られていて、生薬の基原植物としては中国産の *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* に限定されている。近年、中国は麻黄の産地の砂漠化を防止する目的で採取を制限

したことから野生植物のみに依存せず、栽培化が勧められている。そこで栽培時の種株の選択あるいは分子生物学的生産を目的に、植物体における Ephedrine 系アルカロイド生合成遺伝子の解明を開始した。

E. sinica より *pal* 遺伝子のクローニングを行い、縮重型プライマーを用いた RT-PCR により、*pal* 遺伝子 ORF の 674 bp を同定した。更に、3'-RACE により、その 3'末端塩基配列を同定した。既知の植物由来 *pal* 遺伝子との比較により、未同定の部分は 5'末端の約 500-700 bp であるものと考えられる。これを同定するため、現在 5'-RACE を行なっているところである。今後、ORF クローニング、組換えタンパク質を用いた機能解析、リアルタイム PCR やノーザン解析による組織別遺伝子発現パターン解析、細胞内局在性研究、サザン解析等を行う。これらの研究により *Ephedra* 属植物由来 *pal* 遺伝子の機能を明らかにすることで、Ephedrine 系アルカロイド生合成初期過程の分子レベルでの解明を目指す。

Ephedrine 系アルカロイドの多くは地上部に蓄積するにも関わらず、PAL 比活性は地上部より根において強く検出された。このことより、植物体内における Ephedrine 系アルカロイド生合成の初期過程は、地上部以外においても進行している可能性が考えられた。このことは、今後、遺伝子組換えの技術を応用して Ephedrine 系アルカロイド高生産細胞培養系あるいはカルス誘導系等を確立する上で有用な知見である。

組換えタンパク質を利用した *in vitro* における Ephedrine 系アルカロイドの酵素的全合成、あるいは、遺伝子改変によるアルカロイド高生産植物の作出を行なうためには、*pal* を含めた生

合成反応触媒酵素遺伝子のクローニングと機能解析が必要不可欠である。今後、それら遺伝子を明らかにしていくとともに、同定した遺伝子については上述の応用研究を進めていく予定である。

E. 結論

E. sinica の地上部と根における PAL 比活性を測定した結果、根は地上部に比して約 7 倍強いことが明らかになった。そこで、全草における *pal* 遺伝子のクローニングを行い、*pal* 遺伝子 ORF の 674 bp を同定した後その 3'末端塩基配列を同定した。現在、5'末端塩基配列解

明を行っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

Ephedrine 系アルカロイド生合成に関与する *pal* 遺伝子のクローニング：岡田岳人、山崎真巳、御影雅幸、関田節子，日本薬学会第 126 年会、仙台（2006 年 3 月）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし