

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

生合成解析と遺伝子組換え技術を基盤とする

薬用植物の活用に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

(H18-ゲノム-指定-001)

主任研究者 木内 文之

平成19(2007)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

生合成解析と遺伝子組換え技術を基盤とする

薬用植物の活用に関する研究 ----- 1

木内文之

### II. 分担・協力研究報告

#### 1. カンゾウのグリチルリチン生合成及び

植物体内集積への応答特性に関する総合的研究 ----- 13

柴田敏郎, 村中俊哉, 巽 二郎, 高上馬希重

#### 2. 生合成解析と遺伝子組換え技術を基盤とする

薬用植物の活用に関する研究 ----- 23

関田節子

#### 3. 沈香成分の生合成解析 ----- 29

木内文之, 本多義昭, 伊藤美千穂, 矢倉 徹

#### 4. 薬用植物の遺伝子解析に関する研究 ----- 37

野口博司

#### 5. 薬用植物の遺伝子組換え技術の開発と

有用成分の生合成遺伝子解析 ----- 41

吉松嘉代, 河野徳昭

#### 6. 遺伝子組換え薬用植物の成分の解析手法に関する研究 ----- 59

淵野裕之, 河野徳昭

#### 7. 遺伝子組換え薬用植物におけるアレロパシー物質の解析 ----- 67

鎌田 博

#### 8. 薬用植物種子の発芽条件及び長期保存法に関する研究 ----- 71

飯田 修, 香月茂樹, 木内文之

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 81

生合成解析と遺伝子組換え技術を基盤とする薬用植物の活用に関する研究

主任研究者 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

薬用植物成分を創薬に有効に利用するための基盤作りを目的として、薬用植物の有効成分の生合成過程やそれに関与する遺伝子を解明し、近年著しい進歩を遂げている遺伝子操作技術等を用いて薬用植物成分を効率的に生産するための基礎研究を行うとともに、遺伝子組換え技術を用いて自然界には存在しない新たな有用化合物を作り出すために必要な基礎的研究を行なった。更に、自然破壊等で急速に野生種が減少している状況下で薬用植物を創薬資源として将来にわたって確保するために、薬用植物種子の長期保存条件を確立するための基礎研究を行った。

薬用植物有効成分の生合成解析では、カンゾウにおけるグリチルリチン生合成の予想される中間体を合成し、これらを標品としてカンゾウの各組織の分析を行い、 $\beta$ -アミリンの11位が先に水酸化される経路と30位が先に水酸化される経路がともに存在していることを明らかにするとともに、ジンコウノキの樹脂の生成過程における化合物の時間的変化を明らかにした。また、ポリケタイド合成酵素に本来とは異なる基質を作用させることにより、キノリノンアルカロイドが生成することを見出すとともに、部位特異的のアミノ酸変異により、非天然型のナフタレン誘導体を作り出すことに成功した。

薬用植物への遺伝子導入法に関しては、幼植物を材料とした形質転換では、ニチニチソウの子葉で高い形質転換効率が得られたが、種子への遺伝子導入は効率が悪く、各種パラメータの最適化が必要であった。薬用植物からクローニングした外来遺伝子を導入したシロイヌナズナでは、目立った成分変化は認められなかったが、わずかな成分変化の検出には、LC-MSを用いた代謝物解析用のソフトウェアの利用が有効であった。また、ベラドンナ形質転換体を用い、サンドイッチ法、ディッシュパック法、抽出アッセイ法によるアレロパシー試験を行い、これらの方法が遺伝子組換え薬用植物の環境影響評価に有効であることを示した。

薬用植物種子については、発芽適温並びに低温での貯蔵における発芽率の変化を調べるとともに、種子寿命の短いトウキについて、発芽抑制物質の関与を検討した。

分担研究者

飯田 修

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究

センター 室長

鎌田 博

筑波大学大学院生命環境科学研究科 教授

柴田 敏郎

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究

センター 北海道研究リーダー

関田 節子

徳島文理大学香川薬学部 教授

野口 博司

静岡県立大学 教授  
淵野 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  
吉松 嘉代  
(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 室長  
協力研究者  
村中 俊哉  
(独) 理化学研究所植物科学研究センター  
チームリーダー  
巽 二郎  
京都工芸繊維大学繊維学部 教授  
高上馬 希重  
東京大学大学院農学生命科学研究科  
助手  
香月 茂樹  
(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 種子島研究リーダー  
河野 徳昭  
(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究員  
本多 義昭  
京都大学大学院薬学研究科 教授  
伊藤 美千穂  
京都大学大学院薬学研究科 助教授  
矢倉 徹  
京都大学大学院薬学研究科 助手

## A. 研究目的

ヒトゲノム研究の進展等に伴い、疾患に関連したリセプターや酵素が新たに同定され、これらをターゲットとした新たな創薬が可能となっている。このようなタンパク質をターゲットとする創薬には、化合物ライブラリを対象としたハイスループットスクリーニングが大きな役割を担っているが、このようなスクリーニングでは、利用できる化合物ライブラリの質が、新薬開発の成否を決定するといっても過言ではなく、化合物ライブラリ

の充実が、効率的な医薬品開発における重要な課題である。薬用植物は、古くから薬そのものとして、さらにはその有効成分が医薬品として利用されており、我が国の主要疾患となっている生活習慣病に対しても漢方処方として適用され、人々の健康に重要な役割を果たしてきている。また、薬用植物は生理活性を有する様々な骨格の化合物を生合成する能力を持っており、その成分は創薬のためのリード化合物としても重要な役割を果たしてきた。しかし、薬用植物成分の中には微量しか生産されないために創薬に利用できていない化合物も非常に多い。

本研究では、薬用植物成分を創薬に有効に利用するための基盤作りを目的として、薬用植物の有効成分の生合成過程とそれに関与する遺伝子を解明し、近年著しい進歩を遂げている遺伝子操作技術等を用いて薬用植物成分を効率的に生産するための基礎研究を行うとともに、遺伝子組換え技術を用いて自然界には存在しない新たな有用化合物を作り出すために必要な基礎的研究を行った。更に、自然破壊等で急速に野生種が減少している状況下で薬用植物を創薬資源として将来にわたって確保するために、薬用植物種子の保存条件等についての検討を行った。

## B. 研究方法

### 【薬用植物有効成分の生合成解析】

#### (1) カンゾウにおけるグリチルリチンの生合成

グリチルリチン (GL) 生合成経路を明らかにするために、予想される中間体の化学合成を行い、それらの物質及び市販物質を用いて、網目状の代謝経路のうちどの経路を経由するかを推定するとともに、植物体の各部位の分析から各植物組織において、 $\beta$ -アミリン以降のどのステップまでの生合成が進行しているのかを検討した。(柴田, 中村, 巽.

高上馬)

#### (2) マオウにおけるエフェドリン生合成

マオウにおけるエフェドリンの生合成の初期段階の反応を触媒すると考えられる酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) をコードする遺伝子 (*pal* 遺伝子) を、生薬マオウの基原植物の一つである *Ephedra sinica* からクローニングし、組換えタンパク質の誘導と精製、並びにその機能解析を行った。(関田)

#### (3) ジンコウノキにおける樹脂成分蓄積過程の解析

生薬沈香の基原植物の一つであるジンコウノキに人為的に障害を与えることにより、その材中に蓄積する成分を詳細に分析するとともに、健全なジンコウノキの材の成分を分析し、それらの樹脂成分の生合成への関与について考察した。また、ジンコウノキから誘導した培養細胞を用い、各種エリシターを添加することにより誘導される2次代謝成分を解析するとともに、メチルジャスモン酸投与によって特異的に発現する遺伝子の中からテルペンの生合成に関与する遺伝子をターゲットとしてクローニングを行い、その機能を解析した。(本多, 伊藤, 矢倉, 木内)

#### (4) ポリケタイド合成酵素による新規化合物の生成

これまで薬用植物から単離されたポリケタイド合成酵素遺伝子クローンのコードする酵素タンパクに、多様なCoAエステルを作用させ、生成した化合物を単離・構造決定した。また、アロエ由来のIII型ポリケタイド合成酵素 (PKS) 等について、X線解析の結果から、キャビティ構造に関わり、ポリケタイド鎖の伸長に関わると考えられるアミノ酸残基を部位特異的変異により別のアミノ酸残基に入れ替えることで、ポリケタイド鎖の進展数を制御して新規化合物を生成させることが可能であるかを検討した。(野口)。

#### 【薬用植物遺伝子組換え体作出技術の確立と成分評価】

#### (1) 薬用植物への外来遺伝子の導入法の検討

ニチニチソウ等の薬用植物を材料とし、それらの幼植物へのリゾビウム菌体の接種による外来遺伝子導入法の適用の可否を検討するとともに、ケシ種子を材料として、(独)農業生物資源研究所 新生物資源創出研究グループが開発した種子への遺伝子導入法を薬用植物へ適用する際の各種条件の検討を行った。

また、ナス科の薬用植物であるベラドンナを材料に、レポーター遺伝子として頻用されるβ-グルクロニダーゼ遺伝子(GUS)およびオワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質(GFP)の、遺伝子導入個体選抜への応用の可否を確認した。(吉松, 河野)

#### (2) 遺伝子組換えによる成分変化の評価

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) にダイオウからクローニングしたベンザルアセトン合成酵素 (BAS) 遺伝子を導入した植物体と、その元となった野生株との成分を、GC-MSおよびLC-MSにて比較し、これらの成分分析手法を検討した。(淵野, 河野)

#### (3) 遺伝子組換え薬用植物におけるアレロパシー物質の解析

ベラドンナの形質転換体をモデル材料として、試料から滲出する物質の活性を測定するサンドイッチ法 (Y. Fujii, et al., *Weed Biology Management*, **3**; 233-241, 2003), 生組織からの揮発性物質の効果を直接検定するためのディッシュパック法 (M. Matsuyama, et al., *Weed Research Japan*, **45**; 80-81, 2000), メタノール抽出液を染み込ませた濾紙の上に検定植物の種子を直接播種して効果を検定する抽出アッセイ法を用いて、遺伝子組換え薬用植物のアレロパシー活性を評価する

方法を検討した。(鎌田)

#### 【薬用植物種子保存条件等の検討】

薬用植物資源研究センターで、5°Cで貯蔵している種子について、15, 20, 25, 30, 35°Cの各温度にて発芽試験を行い、植物種毎の発芽適温と貯蔵による発芽率の変化を検討した。また、種子寿命が短く、種子に発芽抑制物質が含まれていると考えられているトウキについて、種子洗浄による発芽率の変化を検討した。(飯田, 香月, 木内)

### C. 研究結果

#### 【薬用植物有効成分の生合成解析】

##### (1) カンゾウにおけるグリチルリチンの生合成

$\beta$ -アミリンからグリチルリチン (GL) に至る予想中間体のうち、市販されていない 11-オキシ- $\beta$ -アミリンをオレアノール酸から合成するとともに、グリチルレチン酸を出発物質として 11-デオキシグリチルレチン酸、30-ヒドロキシ- $\beta$ -アミリン、30-ヒドロキシ-11-オキシ- $\beta$ -アミリンを化学合成し、これらの化合物の GC-MS による分析条件を確立した。

$\beta$ -アミリンからグリチルレチン酸に至る経路には、11 位が先に水酸化される経路、及び 30 位が先に水酸化される経路の二つが考えられるが、圃場栽培中の植物体を材料にして、植物体各部位において生合成がどのステップまで進行しているのかを調べた結果、ストロン中には、最終産物であるグリチルリチンが 3-4%含まれていたのに加え、中間体として、 $\beta$ -アミリン、11-オキシ- $\beta$ -アミリン、30-ヒドロキシ-11-オキシ- $\beta$ -アミリン、11-デオキシグリチルレチン酸、グリチルレチン酸、グリチルレチン酸モノグルクロニドが検出されたが、地上部(葉, 茎, 花)から検出されたのは  $\beta$ -アミリンのみであった。一方、

花組織からは、グリチルリチンと類似の MS スペクトルを示すピークが多数得られた。

カンゾウの根における  $^{15}\text{N}$  自然存在比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) は、主根と分枝根ともに根の土壤深度が深くなるほど高くなる傾向を示した。また、地上部では果実が最も高く、次いで、茎の順であり、ストロンでは最も低かった。一方、 $^{13}\text{C}$  自然存在比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) は植物体内での変異は少なかったが、根系よりも地上部がやや低い傾向を示し、根系では浅い部位が深い部位よりもやや高い傾向であった。

4年生根における GL 含有率は、主根では土壤深度が深くなるほど増加し (2.25→2.77%DW)、分枝根は主根よりも含有率が高い傾向にあったが、土壤深度がより深くなるほど GL 含有率が低下することが示された (3.07→2.79%DW)。主根の下層部のもの、分枝根のすべての層のものが JP15 の規定を上回るものであった。また、GL 含有率と  $\delta^{15}\text{N}$  及び  $\delta^{13}\text{C}$  との関係では、ともに主根に対して正の相関 (それぞれ  $r^2=0.554$ ,  $r^2=0.522$ ) が、分枝根に対しては負の相関 (それぞれ  $r^2=0.774$ ,  $r^2=0.670$ ) が認められた。

##### (2) マオウにおけるエフェドリン生合成

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を用いて *Ephedra sinica* の cDNA を鋳型とした PCR を行い、得られた特異的増幅産物からプライミング領域を除いた 638 bp について塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、全体として既知の植物由来 *pal* 遺伝子と高い相同性を有したため、引き続き 3'-RACE および 5'-RACE を行い、それぞれ 874 bp, 654 bp の ORF 末端領域を決定した。こうして得られた *Espal* の ORF 長は 2166 bp であり、722 アミノ酸をコードすることが明らかとなった。更に、複数クローンの塩基配列解析より、9 アミノ酸部位に多様性を有する、少なくとも 4 種類以上の

EsPAL が存在することを明らかにした (EsPAL1-4). また, 分子進化系統解析より EsPAL は同じ裸子植物であるテーダマツ (*Pinus taeda*)由来 PAL と最も高い相同性を有しており, EsPAL1 との同一性は 77%であった. また, 大腸菌で発現させた EsPAL4 を用いて PAL 反応を行い, フェニルアラニンから *trans*-ケイヒ酸の生成を確認したが, チロシンを基質とした場合, 反応(TAL 反応)は進行しなかった.

### (3) ジンコウノキにおける樹脂成分蓄積過程の解析

人為的に傷害を加えたジンコウノキの材からは, 生薬沈香に含まれる agarotetrol等のクロモン類や,  $\alpha$ -guaiene等のテルペン類が確認された. これらの成分は一樣に生成するのではなく, 傷害を加えて1週間以内の早い時期に現れる成分と, その後数週間から数ヶ月程度の期間に蓄積すると思われる成分, またそれ以上の時間が十分経過した後に検出される成分に大別された. 即ち, リグナンの1つである syringaresinol と  $\alpha$ -guaiene,  $\delta$ -guaiene,  $\alpha$ -humuleneの3種のセスキテルペン類は, 傷害を加えた直後から1週間程度の間によく検出され, その後, 特徴的なエポキシクロモン類 (oxidoagarochromone類)が増加した後, 1~数ヶ月後には, テトラヒドロクロモンやエポキシ基を含まないクロモン類, 酸化型セスキテルペン類が蓄積することが明らかとなった.

ジンコウノキの培養細胞にメチルジャスモン酸を投与すると,  $\alpha$ -guaiene,  $\delta$ -guaiene,  $\alpha$ -humuleneが生成されることから, これらセスキテルペンの生合成に関与する酵素の遺伝子の単離を試みた. サブトラクションライブラリに含まれる配列から, テルペン合成酵素に特徴的な配列を含むものを探索した結果, セスキテルペン合成酵素と予測される配列が得られ, この遺伝子がコードするタン

パク質を大腸菌で過剰発現させて機能解析を行ったところ, ファルネシルジフォスフェイトを基質として加えた酵素反応で, 生成物を与えた. この反応生成物は, SPM-GC-MSのパターンからセスキテルペンと予想されたが, 化合物の同定には至らなかった.

### (4) ポリケタイド合成酵素による新規化合物の生成

ダイオウ由来III型ポリケタイド合成酵素 (PKS) の一つで, ベンザルアセトンを生成するベンザルアセトン合成酵素 (BAS) に各種アシル CoA エステルを適用したところ, アントラニルCoAを開始基質として受容し, 86%の収率で生理活性キノリノンアルカロイド (4-ヒドロキシ-2-キノリノン) が生成した. さらにポリケタイド鎖伸長単位として一般的には効率の悪いメチルマロニル CoA を基質としたところ, 更に収率が高かった. また, 本酵素にメチルマロニル CoA のみを作用させた場合には, メチルマロニル CoA の3分子縮合による非天然型ラクトン化合物を与えることも見出した.

また, アロエ由来で, マロニルCoAを受容し, 2-メチルクロモンを生成するペンタケタイド合成酵素であるIII型PKSについて, その活性中心キャビティを構成しているアミノ酸残基のうち, アルファアルファのCHSIIのアミノ酸配列番号で, 207番目のメチオニン (M) をより高高さの少ないグリシン(G)に置換すると, ポリケタイド鎖2単位分の伸長が進み, オクタケタイド化合物を生成することが明らかとなった. さらに82番目のチロシンと80番目のフェニルアラニンをともにアラニンとすることで, これまで植物由来III型PKSでは得られたことのない, 縮合環系であるナフタレンが得られた.

【薬用植物遺伝子組換え体作出技術の確立と成分評価】

## (1) 薬用植物への外来遺伝子の導入法の検討

### 1) 幼植物を材料とした遺伝子導入法

ケシおよびオニゲシは、除菌操作後のカルスの生育が不良で、選択培地 (G418含有) で良好に生育するカルスは得られなかった。一方、マルバダイオウ (Rr) およびニチニチソウ (CrI) では、除菌操作後の選択培地で良好に生育するカルスが得られ、Rr胚軸からは、選択培地で良好に生育するシュートが得られた。これらのうち、CrIカルスでは形質転換体を得られたが、Rrについてはカルス、シュートともに形質転換は確認できなかった。また、ニチニチソウについては、無菌発芽させた実生から調製した切片を材料にすると、100%の効率で形質転換細胞が得られることが明らかとなった。

### 2) 種子への遺伝子導入法の検討

sGFP遺伝子を組込んだpWI-sGFPを作成し、ケシ種子への遺伝子導入を試みたが、ケシ種子において、一過的なsGFPの発現は確認できていない。現在、エレクトロポレーション条件をはじめとする諸条件について検討中である。

### 3) sGFP遺伝子の組換え体作出への利用

選択培地上のsGFP遺伝子導入組換え体(候補)カルスを蛍光顕微鏡下観察すると、組換えが起こった蛍光を発する部分と、組換えの起きていない蛍光を発しない部分に分かれる。そこで、実体顕微鏡で励起光照射下、蛍光を発するカルスまたはシュートのみを選抜し、以後の選択培地または植物体再生用培地に移植することにより、高効率に組換え体の再生植物が得られることになり、選抜レポーター(マーカー)としてのsGFPの有用性が確認された。

## (2) 遺伝子組換えによる成分変化の評価

GC-MSによるTICの比較では、野生株とBAS導入体との間にはほとんど差が見られ

なかった。尚、BAS導入体のみで見られるピークが現れたが、そのMSから5-dodecenolと考えられ、今回の組換えによる成分の変化とは直接関係ないものと思われた。

LC-MSを用いた比較では、まず、BASの反応並びにその後の変換により生成することが予想されるbenzalacetone ( $m/z$  146), 4-methoxybenzalacetone ( $m/z$  192), 4-hydroxybenzalacetone ( $m/z$  176)について標準品とのRt比較およびXICにて検索を行ったが、これらの化合物の明確な存在は確認できなかった。次に、代謝物解析用のソフトであるMetabolite IDを用い、代謝物測定におけるコントロールに野生株、サンプルにBAS導入体を置き換えて、両者の成分の相違の検索を行った。LC並びにMSの条件を種々検討した結果、保持時間35.6分 ( $m/z$  346) および60.9分 ( $m/z$  399) にBAS導入体では観測されるが、野生株ではほとんど観測されていないピークを見出し、現在これらの化合物の構造を解析中である。

## (3) 遺伝子組換え薬用植物におけるアレロパシー物質の解析

サンドイッチ法の標準プロトコルでは、乾燥した検定試料を用いることとなっているが、今回用いたベラドンナでは、乾燥試料を用いるとバクテリアの発生が著しく、検定が不可能であったことから、新鮮試料を用いることとした。バイオアッセイの結果、検定試料無添加の対照区に比べ、葉および根の試料ともに、強い幼根伸長阻害活性(アレロパシー活性)が認められ、阻害活性は根よりも葉の方が2倍程度高かった。しかし、形質転換体と非形質転換体の間で葉および根ともに阻害活性の有意な差は認められなかった。このことから、ベラドンナは葉および根の両方でアレロパシー物質を生産する植物であることが判明したが、本実験で行った形質転換(毛根病菌のT-DNA導入)ではアレロパシー



活性の増大は引き起こされないことが明らかとなった。

ディッシュパック法では、形質転換体および非形質転換体の葉および根の試料ともに、対照区と比べ検定植物の根の伸長は全く阻害されなかった。したがって、ベラドンナにおいては、揮発性のアレロパシー物質は根においても葉においても生産されておらず、毛根菌の T-DNA 導入（形質転換）によっても新規なアレロパシー物質は生産されないことが明らかとなった。

抽出アッセイ法では、葉および根の抽出液ともに、濃度依存的に幼根伸長阻害活性が上昇したが、形質転換体と非形質転換体の間で有意な差は認められなかった。

#### 【薬用植物種子保存条件等の検討】

##### （1）発芽適温と発芽率の経年変化

種子の発芽適温は植物種によって様々であり、今回調べたものの中で15℃～20℃の比較的低い温度で最も高い発芽率を示したものは、ゲンノショウコ、ウツボグサ、アサガオ、オオバコ、クララ、メハジキ、ミシマサイコ、ハマボウフウ等であり、30℃～35℃という高温で最も良い結果を与えたのは、エビスグサ、カワラケツメイ、ハトムギ、ホソバセンナ等であった。

発芽率の経年変化を見ると、アカメガシワでは低温下でも貯蔵期間1年目から2年目の1年間に発芽率が半減した。尚、紙袋に入れ室内に放置した場合、採種後3ヶ月で急激に発芽力を消失した。また、ホソバセンナは16年の貯蔵でも高い発芽率を有する一方、平成17年産種子の出葉率が8%と低く、種子の状態によって発芽率が異なる場合が見られた。

##### （2）トウキ種子の洗浄処理

洗浄処理直後の発芽試験では、発根率は無処理>蒸留水24時間>1%洗剤液24時間>1%洗剤液8時間>蒸留水8時間の順で高く、

その差は小さかった。しかし、1%洗剤液24時間及び無処理を除き、根は発根後褐変し、出葉率が著しく低下した。1%洗剤液24時間においてはわずかに褐変が見られたが、無処理では全く見られなかった。根の褐変は処理中の洗剤あるいは発芽抑制物質の吸収による影響と推察された。洗浄処理により上記障害が見られたものの、発芽が促進される傾向が見られた。また、トウキ種子の洗浄液は、キビやゴマの種子の発芽を抑制した。

#### D. 考察

カンゾウの植物体各部位において生合成がどのステップまで進行しているのかを検討した結果、グリチルリチン生合成において、これまでブラックボックスであったβ-アミリンからグリチルリチンに至る経路における中間体が明らかになった。即ち、予想された11位が先に水酸化される経路及び30位が先に水酸化される経路、ならびに酸化酵素の一連の反応の結果生じることが予測される物質が蓄積していることが判明したことから、グリチルリチンは、2ないし3ステップの酸化反応、2ステップの糖転移反応によって生合成されると考えられる。本研究により、各中間体の一斉分析法が確立できたことから、今後、候補となる遺伝子の機能評価に強力なツールとなることが期待される。

ジンコウノキにおいて、傷害がきっかけで樹脂成分の生合成が開始される場合には、生成する化合物が経時的に変化することが明らかとなった。特に、クロモン類については、新たな成分としてエポキシクロモン類を見出し、その構造を決定した。これらのエポキシクロモン類は、沈香特有のクロモン類の生合成中間体である可能性が考えられるが、現段階ではこれを決定付ける実験的証拠は得られていない。今後、トレーサー実験や生合成関連遺伝子の解明などにより、クロモン類

の生合成経路を明らかにしていく必要がある。

ジンコウノキの培養細胞を用いた実験では、エリシターの添加により沈香と同じ成分の生成が観察され、沈香成分の生合成研究に培養細胞系が利用できることが明らかとなった。また、沈香に特有なクロモン関連成分の生合成中間体の可能性がある化合物を単離できたことから、沈香の人工的な生成に向けた研究の進展が期待される。更に、エリシターを加えた細胞で特異的に発現している遺伝子の中からセスキテルペン合成酵素遺伝子をクローニングし、この遺伝子がコードするタンパク質がファルネシルジフオスフェイトを基質とすることを明らかにしたが、酵素反応生成物の同定には至らなかった。

今回、ダイオウ由来の III 型 PKS にアントラニル CoA とマロニル CoA を作用させることにより、キノリノンアルカロイド (4-ヒドロキシ-2-キノリノン) が高い収率で得られることを明らかにした。天然には *N*-メチルアントラニル CoA と 3 分子のマロニル CoA の縮合によりアクリドンを生合成するヘンルーダ (*Ruta graveolens*) 由来 III 型 PKS が知られているが、マロニル CoA 1 分子の縮合によるキノリノンアルカロイドの酵素合成はこれが最初である。4-ヒドロキシ-2-キノリノンには、NMDA やセロトニンレセプターに対するアンタゴニスト作用などが知られており、医薬品開発の見地からも注目される。

また、アロエのクロモン合成酵素 (PCS) を基本にして組換え酵素を作り、縮合環系の生成に成功した。これらの結果は、酵素の新しい利用法や酵素のエンジニアリングによって、化合物ライブラリの多様性を拡張する道を拓くことができることを示したものであり、創薬のリード化合物ライブラリの充実に貢献するものである。

薬用植物への外来遺伝子の導入法として、

幼植物を感染対象とした共存培養法によるケシ、オニゲシ、マルバダイオウ及びニチニチソウ形質転換法を検討した。除菌用クラフオラン濃度を従来の 2 倍とし、除菌培地を 2 回交換する方法を試みたところ、マルバダイオウ及びニチニチソウでは除菌後も選択培地で良好に生育するカルス・組織が得られたが、ケシ及びオニゲシでは得られなかった。ケシ及びオニゲシは、除菌用クラフオランや選択用 G418 への感受性が強く、これらにより障害を受けたものと推察される。

マルバダイオウカルス、シュート及び不定根は、選択培地で良好に生育したが、レポーター遺伝子の発現は確認できなかった。マルバダイオウは、抗生物質への耐性が強く、今回用いた選択条件では形質転換細胞を選抜できないものと思われる。

ニチニチソウからは形質転換細胞が得られ、特に子葉を材料とした場合の形質転換効率は 100%であった。しかし、カルスは植物体への再分化を必要とするため、今後、分化組織における形質転換法の確立が課題となる。

ケシの種子への遺伝子導入法として、生物研のプロトコールを試みたが、現在のところ導入遺伝子の発現は確認できていない。この遺伝子導入法による形質転換効率は比較的低い (ダイズで 1%程度) とされていることから、更に多数の種子を用い実験を継続する必要があると考えられる。また、催芽、冷却・減圧処理、エレクトロポレーション条件など種々のパラメーターについて検討する必要がある。また、本実験系では多量 (高濃度) のプラスミド DNA を必要とするが、今回用いた pWI 系ベクターは複製起点 (p15A) が低コピーベクター (pACYC) に由来するため、コピー数が少なく、多量のプラスミド DNA の調製がネックとなっている。本ベクターの高コピー化などの改良も今後の課題のひとつ

である。

sGFP の蛍光を組換え体の選抜マーカーとして使用するにあたり、透過波長域の狭いバンドパスフィルターの使用により、510 nm の蛍光を選択的に観察することができた。クロロフィルの自家蛍光に限らず、種々の有機化合物を生産する薬用植物に特有の問題として、550 nm の蛍光を発するベルベリンを生産するオウレンなどのように、それらの蛍光が影響するケースも多く、sGFP の蛍光波長特異的な観察条件が必須と考えられる。

ダイオウ由来 BAS 遺伝子を導入したシロイヌナズナの成分分析においては、GC-MS の TIC では、野生株と BAS 導入体の間に明確な差は見られなかった。これは、抽出の問題や遺伝子発現の有無にあるのではなく、GC-MS の検出感度の限界にあると考えられる。微量の二次代謝物を測定するためには、抽出効率を考え、ターゲットとする化合物に適した抽出・濃縮法を用いる必要がある。GC-MS は基本的に EIMS のライブラリー検索が可能であるため、目的とするピークが見つかった場合にその構造を類推することは容易であるが、組換え体の成分変化を幅広く検索する手段としては適当ではないものと考えられる。

LC-MS 分析においては、代謝物評価用ソフトウェアである Metabolite ID を用いることで、野生株には見られず BAS 導入体のみ検出されるピークを検出することが可能であった。しかし、本ソフトウェアは、コントロール（野生株）とサンプル（BAS 導入体）の TIC における retention time が 0.1 min 異なると別のピークと見なすため、グラジエント条件で検討する場合、十分な溶媒置換が必要となり、注意が必要である。基本的にイオン源として ESI (TIS)を用いた場合、目的とする化合物のピークが  $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$  の他、 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ などのピークも

検出されてしまうため、構造が未知の場合解析を困難にしてしまうので、 $[M-H]^-$ のみが観測される negative mode や、 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ のみを生じる APCI が適していると考えられた。また APCI は低極性物質に適用されるため、今回のような目的物が低分子化合物の場合最適なイオン源であると考えられた。

アレロパシー物質の解析のために今回用いたさまざまなバイオアッセイ法は、生態学的に問題となる多様な雑草のアレロパシー活性を測定するために開発された手法であり、その標準プロトコールに従って検定を始めた。しかし、サンドイッチ法において、ベラドンナの乾燥材料ではバクテリアのコンタミが多く、検定は不可能であり、新鮮な材料をそのまま使うことで良好な結果が得られた。今後、多様な薬用植物でアレロパシー活性を検定する際には、その検定試料の調整や検定植物の培養期間等を予め検討する必要がある。また、検定に使う試料の最適重量についても実験材料による違いが大きく、被検材料毎に事前に検討する必要がある。

今回実験に用いたベラドンナでは、サンドイッチ法および抽出アッセイ法の両者において、葉および根でアレロパシー物質が生産されていることがはじめて明らかとなり、葉における活性は根の 2 倍程度であることも明らかとなった。これまで、遺伝子組換え作物のアレロパシー検定では、サンドイッチ法か抽出アッセイ法のいずれかが用いられてきたが、今回の実験により、いずれの方法を用いてもほぼ同じ結果が得られたことから、より簡便なサンドイッチ法を用いることで外来遺伝子導入（形質転換）によるアレロパシー活性への影響の概略を評価できるものと考えられる。

ディッシュパック法は、新鮮試料から揮発・拡散する物質が、少し離して置いた検定植物の成長に及ぼす影響を調査する方法で

あり、今回の実験に用いたベラドンナでは、揮発性物質としてのアレロパシー活性は認められなかった。実際、GC-MS 分析の結果でも、既知の揮発性生理活性物質は全く検出できなかったことから、ベラドンナにおいては揮発性物質の検討は省略できるものと考えられる。しかし、揮発性のアレロパシー物質を生産する植物も多数知られていることから、今後さまざまな薬用植物について、揮発性アレロパシー活性を今回用いたディッシュパック法で測定し、基礎データとして蓄積しておくことが重要であろう。

貯蔵種子は年々発芽活性を消失し、出根するものの出葉や展葉に至らず枯死し、その程度は貯蔵条件や貯蔵期間に大きく左右される。そのため、種子の活力を確認するためには、出根のみならず異常のない健全葉の程度まで確認する必要がある。発芽は一般に高温状態で発根、出葉が短期間で行われるが、カビや蒸れ等により展葉前に枯死することが多い。一方低温ではカビ等の発生が少ないものの、発根までに時間を要し、また展葉まで至らない場合がある。種子の活力状態を的確に把握するため、発芽試験における発芽適温は、上記のことを考慮し、できるだけ短時間に最高の発芽率が得られるよう設定する必要がある。

貯蔵期間中の発芽率の低下は明らかに植物の種類により異なり、10年以上も高い発芽率を有するものや急速に低下するものがある。薬用植物の種子の貯蔵条件と寿命に関しては、現在ほとんど不明であり、植物種毎にさらに検討が必要である。

## E. 結論

薬用植物有効成分の生合成解析では、これまで不明であったカンゾウにおけるグリチルリチンの生合成中間体並びに沈香の樹脂生成過程における化合物変化を明らかにし

た。これらの結果を基に、これらの過程に関与する遺伝子の解明等を進めることにより、グリチルリチン高含有カンゾウや人工沈香の開発が可能になるものと期待される。また、ポリケタイド合成酵素への非天然型の基質の適用や、部位特異的アミノ酸変異の導入により、非天然型の酵素反応生成物が得られたことは、酵素の新しい利用法や酵素のエンジニアリングによって、化合物ライブラリの多様性を拡張する道を拓くことができることを示したものであり、創薬のリード化合物ライブラリの充実に貢献するものである。

薬用植物種子への遺伝子導入法の検討は、まだ始まったばかりの段階であり、実用化までには各種パラメータの最適化などが必要である。ダイオウ由来のベンザルアセトン合成酵素遺伝子を導入したシロイヌナズナでは、遺伝子は発現しているにもかかわらず、顕著な成分変化は見られず、わずかな変化を検出するには、LC-MSを用いた代謝物解析の手法が有効であった。

遺伝子組換え薬用植物の環境への影響評価の手法として、3つの方法によるアレロパシー試験を検討し、良好な結果を得た。また、薬用植物遺伝資源を将来にわたって安定して確保するための基礎データの収集を行った。

以上のように本研究では、薬用植物有効成分の生合成過程の解明並びに生合成酵素を用いた新規化合物の生成、薬用植物への外来遺伝子の導入並びにそれによる成分変化の評価、環境への影響評価に付いての成果を上げるとともに、問題点を明らかにすることができた。これらの成果を実用化に結びつけるためには、多くの問題を解決する必要があるが、本研究の成果に基づいて着実に問題点を解決していくことにより、実用化への道が拓かれるものと期待される。

## F. 健康危機管理情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) I. Abe, T. Abe, K. Wanibuchi, and H. Noguchi; Enzymatic Formation of Quinolone Alkaloids by a Plant Type III Polyketide Synthase, *Org. Lett.*, **8** (26), 6063-6065 (2006).
  - 2) T. Abe, H. Noma, H. Noguchi and I. Abe, Enzymatic formation of an unnatural methylated triketide by plant type III polyketide synthases, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 8727-8730 (2006).
  - 3) H. Morita, S. Kondo, T. Abe, H. Noguchi, S. Sugio I. Abe and T. Kohno; Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a novel plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone Part 9; *Acta Crystallographica Section F COMMUN.* **62**, 899-901 (2006).
  - 4) 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).
  - 5) I. Abe, T. Watanabe, W. Lou, H. Noguchi; Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase, *FEBS Journal*, **273**, 208-218 (2006).
  - 6) H. Takemoto, M. Ito, T. Shiraki, T. Yagura, G. Honda, Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components, *J. Natural Medicines*, submitted.
- ### 2. 学会発表
- 1) 關光, 大山清, 須藤浩, 高上馬希重, 櫻井望, 豊田敦, 十時泰, 林宏明, 水谷正治, 大西利幸, 柴田敏郎, 斉藤和季, 村中俊哉, 薬用植物カンゾウのトリテルペンサポニン生合成関連遺伝子の単離に向けたEST解析, 第24回日本植物細胞分子生物学大会 (2006年7月, つくば)
  - 2) 岡田岳人, 中村由紀子, 金谷重彦, 高野昭人, 中根孝久, 御影雅幸, 代田修, 柴田大輔, 山崎真巳, 関田節子: ephedrine系アルカロイド生合成に関する分子生物学的研究, および, マオウ代謝物のメタボローム, 第7回長井長義記念シンポジウム, 平成18年9月6-7日, 徳島.
  - 3) Okada, T., Nakamura, Y., Kanaya, S., Takano, A., Nakane, T., Mikage, M., Shirota, O., Yamazaki, M., and Sekita, S. : Molecular biological study on ephedrine alkaloid biosynthesis and total metabolite analysis by metabolomic approach in *Ephedra* plants : ICOB-5 and ISCNP-25 IUPAC, International Conference on Biodiversity and Natural Products, July 23-28, Kyoto, Japan.
  - 4) 岡田岳人, 山崎真巳, 御影雅幸, 関田節子: ephedrine系アルカロイド生合成に関与するマオウ由来 *pal* 遺伝子のクローニングと機能解析, 日本薬学会第127年会, 平成19年3月28-30日, 富山.
  - 5) ゴハリ・アフマッド, セイドニア・スーダベー, 矢倉徹, 伊藤美千穂, 本多義昭, 沈香木 (*Aquilaria sinensis*) 非樹脂部より得られた新規ベンゾフェノン配糖体 (日本生薬学会第53回年会, 埼玉, 2006).
  - 6) 矢倉徹, 伊藤美千穂, 本多義昭, 傷害を加えた *Aquilaria* 属植物および沈香に含まれる香氣成分 (日本薬学会第127年会, 富山, 2007).
  - 7) 河野徳昭, 吉松嘉代, 木内文之: ケシ形質転換体におけるアルカロイド変異原因遺伝子の探索, 第24回日本植物細胞分子生物学 (つくば) (2006.7)
  - 8) 笹本裕美, 菅野真実, 平舘俊太郎, 藤井義晴, 吉松嘉代, 鎌田博: 薬用植物ベラドンナの形質転換体および非形質転換体におけるアレロパシー活性. 日本植物学会第70回大会 (熊本), 2006年9月15日.

## H. 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

カンゾウのグリチルリチン生合成及び植物体内集積への応答特性に関する総合的研究

分担研究者 柴田 敏郎 （独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター北海道研究リーダー

協力研究者 村中 俊哉 （独）理化学研究所 植物科学研究センター チームリーダー

協力研究者 巽 二郎 京都工芸繊維大学 繊維学部 教授

協力研究者 高上馬 希重 東京大学大学院農学生命科学研究科 助手

要旨： $\beta$ -アミリンからグリチルリチン（GL）に至る生合成の制御機構を植物体の各部位との関連を含めて検討し、また、培養ストロンの作出、再生条件について検討した。さらに、水耕栽培や圃場栽培により、乾燥ストレス、土壌pH、土壌の塩類濃度、無機成分施用量などの土壌環境因子や根の土壌深度別のGL集積への応答特性について総合的に検討した。

その結果、（1）GL生合成において $\beta$ -アミリンからGLに至る予想された二つの経路における中間体や、酸化酵素の一連の反応の結果生じることが予測された物質の蓄積が明らかとなり、2ないし3ステップの酸化反応、2ステップの糖転移反応によって生合成されると考えられた。また、植物体各部位の分析の結果、地上部では中間体として $\beta$ -アミリンまで生合成されること、花では茎、葉及び地下部とは異なるGL類似の多種類の配糖体を蓄積すること、培養ストロンでは $\beta$ -アミリンとともに微量ながらGLの蓄積が認められることが判明した。（2）実生苗の腋芽組織から、高い増殖能力を有し容易に植物体へと再生可能な培養ストロンを作出する条件を確立した。（3）圃場試験及び水耕栽培試験により、カンゾウは相当な高塩類濃度の環境下で良好な生育を示し、高pH条件下で窒素吸収能は活発化することが明らかとなり、自生地の厳しい環境下（半砂漠）に適応した生理機能を有していることが実験的に確認できたが、土壌中の無機分量、土壌pH、土壌塩類濃度等の土壌環境要因は、根中のGL集積に直接的に及ぼす影響は少ないと考えられた。また、GL集積は主根と分枝根では異なるメカニズムで行われていることが推察された。さらに、3、4年生株間で認められたGL集積能の違いや、花にのみGL類似の多種類の配糖体の蓄積が認められた結果から、開花・結実が地下部のGL集積に何らかの関与をしているとの仮説に至った。

### A. 研究目的

薬用植物資源の中でも需要の最も多い生薬カンゾウ（甘草）は、医薬品原料や食品添加物として不可欠な生薬であるが、中国や周辺諸国からの輸入に100%依存している。それらは野生品の採取に依存しており、2000年には中国の砂漠化防止政策により野生植

物の採取が禁止され、栽培化への取組みが行われているが、活性成分であるグリチルリチン（GL）の含量が低く医薬品原料として使用可能な生薬は未だ作出できていない。野生カンゾウは塩類が集積したアルカリ性の半砂漠地帯に自生しているが、その生育生理や土壌環境への応答、GL含量の変動要因につ

いては明らかになっていない。

また、GLは炭素数30の直鎖状のスクワレンから生合成される $\beta$ -アミリンから、多段階の過程を経て生合成される(図1)が、植物体内におけるGL生合成に関与する酵素遺伝子や植物の各組織における中間体の存在についても全く不明である。さらに、外来遺伝子導入細胞は毛状根以外では作出されていない。

これまでの研究により、GL生合成に関与する植物体各組織の関係では、地上部から肥大根への何らかの因子の転流がGL生合成を制御している可能性を示唆することが報告されている(林ら、日本薬学会第126年会要旨集 P30[R]am-254, 仙台, 2006)。また、圃場での栽培研究の結果、断根ストレスや栽培年数の増加によりGL含量が増加することが報告されているが(Yamamoto et al., *J. Trad. Med.*, 2002), そのメカニズムは明らかになっていない。一方、ニュージーランドで行われた栽培試験の結果、同一根でも地表部に近い上側の根中のGL含量の方が地中深い部位よりも有意に高い含有量を示すことが報告され、また、イオウの施用量がGL含量のファクターとして示唆されている(J. A. Douglas et al., *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, **32**, 363, 2004)。

本研究では、 $\beta$ -アミリンからGLに至る生合成の制御機構を植物体の各部位との関連を含めて検討するとともに、培養ストロンの作出、再生条件について検討した。さらに、水耕栽培や圃場栽培により、土壤水分(乾燥ストレス)、土壤pH、土壤の塩類濃度、イオウ、カルシウム、窒素等の無機成分施用量などの土壤環境因子や根の土壤深度別のグリチルリチン集積への応答特性について総合的に検討した。

## B. 研究方法

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部の圃場にて栽培しているウラルカンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis*

Fisher.)の3, 4年生株及び種子を材料にして実施した。

(1) グリチルリチン生合成解明に向けた代謝中間体のメタボリックプロファイリング: グリチルリチン(GL)生合成経路を明らかにするために、予想される中間体物質の化学合成を行い(図2)、合成されたそれらの物質及び市販物質を用いて、網目状の代謝経路のうちどの経路を経由するかを推定するとともに、植物体の各部位の分析から各植物組織において、 $\beta$ -アミリン以降のどのステップまで生合成が進行しているのかを検討した。

(2) 培養ストロンの作出、再生条件の確立研究: 種子を実験材料として用い、ストロン形成に及ぼすGA<sub>3</sub>(0, 0.01, 0.1, 1, 10 mM)とNAA(0, 0.01, 0.1, 1, 10 mM)の影響、ストロン増殖に及ぼすNAA(0, 0.01, 0.1, 1, 10 mM)並びにショ糖濃度(1, 3, 6, 9%)の影響、ストロンからの植物体再生に及ぼすオーキシンの影響(2,4-D, IAA, IBA, NAAを0.01または0.1 mMでそれぞれ添加)について検討した。

(3) 根圏pHの違い及び乾燥ストレスが根の窒素吸収能に及ぼす影響: 実生苗を3種のpHの異なる培地(pH 4.5, 6.5, 8.5)に移植して水耕栽培し、それぞれの培養液に水分吸収抑制剤としてポリエチレングリコール(PEG)10%を加えた水ストレス(乾燥ストレス)区を設け1ヶ月栽培した後、pH指示薬と硫酸アンモニアまたは硝酸カリウムを混ぜた厚さ5 mmのアガーフィルム上に置き、地上部にのみ光をあてて24時間の経時的な培地pHの変化と窒素吸収能を観察した。

(4) 植物体における<sup>15</sup>N及び<sup>13</sup>C自然存在比の分布とグリチルリチン集積能の検討: 圃場にて栽培中の3, 4年生株を2006年9月20日になるべく傷つけないように採取し、葉、茎、果実および地下部に分け、地下部は主根、分枝根、ストロンをそれぞれ土壤深度別(0-15 cm, 16-30 cm, 31-45 cm, 46-60 cm, 60 cm以下)に切り分け、乾物重を測定した後、地下部のGL含有量を測定した。また、4年

生株については、 $^{15}\text{N}$ 自然存在比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) および $^{13}\text{C}$ 自然存在比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) を、同位体質量分析計を用いて分析した。

(5) カルシウム及びイオウ分の施用がGL含有率に及ぼす影響：圃場にて栽培中の3年生株について、2006年5月20日に窒素、リン酸、カリウム、それぞれ40, 20, 40 kg/10 aを共通肥料として施し、異なった量の炭酸カルシウム (0, 100, 300 kg/10 a) 及びイオウ分 (0, 31, 61 kg/10 a) を与えて栽培し (組み合わせた10試験区を設定)、2006年10月16日に一斉に株を採取して生育及び地下部のGL含有量を測定した。また、土壌深度5 cmから土壌を採取し、土壌pH、塩類濃度及び無機成分の分析を行った。

### C. 研究結果

(1) グリチルリチン生合成解明に向けた代謝中間体のメタボリックプロファイリング： $\beta$ -アミリンからグリチルリチン (GL) に至る予想中間体のうち、市販されていない 11-オキシ- $\beta$ -アミリン (11-oxo- $\beta$ -amyrin) をオレアノール酸を出発物質として化学合成するとともに、グリチルレチン酸を出発物質として 11-デオキシグリチルレチン酸 (11-deoxoglycyrrhetic acid)、30-ヒドロキシ- $\beta$ -アミリン (30-hydroxy- $\beta$ -amyrin)、30-ヒドロキシ-11-オキシ- $\beta$ -アミリン (30-hydroxy-11-oxo- $\beta$ -amyrin) を化学合成し、NMR で化学構造を確認した。

$\beta$ -アミリンからグリチルレチン酸に至る経路には、11 位が先に水酸化される経路、及び 30 位が先に水酸化される経路の二つが考えられる (図 1)。上述で化学合成した中間体標品を用いて、まずこれらの物質の分析条件を検討した後、圃場栽培中の植物体を材料にして、植物体各部位において生合成がどのステップまで進行しているのかを検討した。その結果、ストロン中には、最終産物であるグリチルリチンが 3-4% 含まれていたのに加え、中間体として、 $\beta$ -アミリン、11-オキシ- $\beta$ -アミリン、30-ヒドロキシ-11-オキシ- $\beta$ -アミリン、11-デオキシグリチルレチン酸、

グリチルレチン酸、グリチルレチン酸モノグルクロニドが検出された。一方、地上部 (葉、茎、花) からグリチルレチン酸までの中間体として検出されたのは  $\beta$ -アミリンのみであった。花組織からは、グリチルリチンと類似の MS スペクトルを示す、即ち、グリチルリチンアナログと思われるピークが多数得られた (図 3)。また、組織培養により得られたストロンからは  $\beta$ -アミリンとともに圃場栽培のストロンの約 1/1000 の量のグリチルリチンが検出された。

(2) 培養ストロンの作出、再生条件の確立研究：ストロン形成に及ぼすGA<sub>3</sub>とNAAの影響を検討した結果、0.01 mM NAAにおいて最も高い (40.0%) ストロン形成が認められた。同条件でストロン伸長においても最も良好な結果が得られた (10.31±3.33 cm / 4 週間培養) が、GA<sub>3</sub>を処理した場合にはストロン形成誘導率および伸長量が低下した。さらにGA<sub>3</sub>処理下では形成されたストロンが異常な形態を示した。

ストロン増殖に及ぼすNAA及びショ糖の影響を検討した結果、0.01 mM NAA添加において最も高い増殖結果が認められ (12.9±0.40 g FW)、その増殖率は6.58倍 (4 週間培養) であった。また、6% シュークローズ添加において最も高い増殖結果が認められ (12.8±0.17 g FW)、その増殖率は6.34倍 (4 週間培養) であった。

ストロンからの不定根誘導とシュートの成長に及ぼすオーキシンの影響を検討した結果、NAA (0.01, 0.1 mM)、IBA (0.01, 0.1 mM) およびオーキシンプリー培地において高い (>87%) 不定根形成が認められた。これらの条件下において、不定根伸長およびシュート伸長も各々旺盛であった。一方、2,4-D (0.01, 0.1 mM) 添加培地においてはカルスの形成が顕著に認められ、特に0.1 mM 2,4-D培地では不定根の形成およびシュート成長は認められなかった。

(3) 根圏 pH の違い及び乾燥ストレスが根の窒素吸収能に及ぼす影響：硝酸培地では培地の pH が高いほど根圏のアルカリ



化が顕著であり、硝酸吸収が活発であることが示された。アンモニア吸収は各 pH 区ともに根端部に限りスポット状に認められ、特に、高 pH 栽培では酸性化スポットが顕著に見られ、吸収が活発であることが示された（図 4）。一方、PEG 処理による水ストレス区（乾燥ストレス区）では、給水制限により激しく落葉が観察された。各 pH 区において硝酸吸収が抑制され、一方、アンモニア吸収は水ストレスにより高まり、吸収帯が根端部を中心に分枝根全体に拡大した（図 4）。

（4）植物体における  $^{15}\text{N}$  及び  $^{13}\text{C}$  自然存在比の分布とグリチルリチン集積能の検討：根における  $\delta^{15}\text{N}$  自然存在比（ $\delta^{15}\text{N}$ ）の分布パターンは、主根と分枝根ともに根の土壤深度が深くなるほど高くなる傾向を示した。地上部では果実が最も高く、次いで、茎の順であり、ストロンでは最も低かった。また、 $\delta^{13}\text{C}$  自然存在比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）の分布パターンは植物体内の変異は少なかったが、根系よりも地上部の方がやや低い傾向を示し、また、根系では浅い部位において深い部位よりもやや高い傾向であった。

4 年生根における GL 含有率は（図 5）、主根では土壤深度が深くなるほど増加し（2.25→2.77%DW）、一方、分枝根は主根よりも含有率が高い傾向にあったが、土壤深度がより深くなるほど GL 含有率が低下することが示された（3.07→2.79%DW）。主根の下層部のもの、分枝根のすべての層のものが JP15 の規定を上回るものであった。ストロンは表層部（0～15 cm）にのみ分布し、GL 含有率は低かった（2.17%DW）。3 年生根における GL 含有率は（図 5）、いずれの部位でも JP15 の規定を満たさなかったが、分枝根の GL 含有率は 4 年生株同様、土壤深度がより深くなるほど低下する傾向がみられた（1.42→1.24%DW）。

GL 含有率と  $\delta^{15}\text{N}$  及び  $\delta^{13}\text{C}$  との関係では、ともに主根に対して正の相関（それぞれ  $r^2=0.554$ ,  $r^2=0.522$ ）が、分枝根に対しては負の相関（それぞれ  $r^2=0.774$ ,  $r^2=0.670$ ）が認められた。

（5）カルシウム及びイオウ分の施用がグリチルリチン含有率に及ぼす影響：土壤分析の結果、土壤 pH はイオウ施用量が増すほど低下し、炭酸カルシウム施用量が増すほど高くなった（pH 5.2～7.3）。また、塩類濃度を示す土壤 EC 値（電気伝導度）はイオウと炭酸カルシウムを施用するほど高くなる傾向にあった（1.7～9.0 dS/m）。

GL 含有率は分枝根が主根やストロンに比べて高い傾向が認められ、一部の区に分枝根の GL 含有率は JP15 の規定を上回る値であったが、カルシウム及びイオウ分の施用との相関は認められなかった。土壤 pH と GL 含有率の関係については、pH 6.1 付近をピークにした 2 次曲線を描く傾向にあった。土壤 EC と GL 含有率の関係についてみると、4 dS/m 付近をピークにした 2 次曲線を描く傾向にあることが明らかとなった。無機成分の吸収量と GL 含有率の相関性について、窒素およびリン酸の地上部への分配率と地下部の GL 含有率の間には有意な負の相関関係が認められ、窒素において顕著であった。

#### D. 考察

（1）植物体各部位において生合成がどのステップまで進行しているのかを検討した結果、地上部では中間体として -アミリンまで生合成されること、花では地下部とは異なる多種類の配糖体を蓄積すること、培養ストロンでは -アミリンとともに微量ながらグリチルリチン（GL）の蓄積が認められたことから、想定された二つの経路で GL 生合成系が完結していることが判明した。

（2）茎の節組織からのストロン誘導には 0.01 mM の NAA 添加 MS 培地 が最も効果的であった。さらに同濃度の NAA 条件および 6% のシュークロース添加がストロン増殖に効果的であった。ストロンからの不定根形成およびシュート成長による植物体再生には、光照明下、0.01 mM NAA 添加 MS 培地（0.2% ゲルライト）が最も適していると考えられた。再生植物体が成長する過程においてシュート形成に用いたストロン組織は黄白色また

は明褐色を呈したままであり、それ以降の形態的变化は認められなかった。これは圃場における通常のストロンでの繁殖状況と同様であった。本研究成果により、今後、外来遺伝子導入細胞作出における材料として培養ストロンの利用が可能となる。

(3) アンモニア培地では、一般的に、アンモニアの吸収とともに根から  $H^+$  イオンが放出され根圏が酸性化し、硝酸培地では硝酸の吸収とともに  $OH^-$  イオンが放出されアルカリ化が進行することが知られている。カンゾウの根は、高 pH 培地区で硝酸、アンモニア吸収ともに活発であるが、水ストレス（乾燥ストレス）が付与されることにより、硝酸吸収が抑制され、アンモニア吸収が増加することが示された。そして、アンモニア吸収機能は基本的に根端部に局在しているが、乾燥ストレスにより、特に低 pH 区においては吸収帯が根端部を中心に分枝根全体に拡大することが観察された。また、各 pH 区を通じて硝酸培地で根圏の酸性化が観察されなかったことから、酸性物質の放出によるカンゾウ根の根圏 pH 制御作用は比較的弱いと推察された。

(4) GL の集積と  $\delta^{15}N$  および  $\delta^{13}C$  の間に密接な関係が存在することが示唆され、また、主根と分枝根においてそれらの相関関係が異なっていたことは、同じ根系内であっても主根と分枝根との間で GL 集積のメカニズムが異なっている可能性を示している。

4年生株の下層部の主根及び全層の分枝根の GL 含有率は 2.5% を上回ったが、3年生株ではいずれ層の各部位ともに 1.5% 以下であった。4年生株では結実がみられていたが3年生株では認められておらず、開花・結実が GL 含有率に影響を及ぼした可能性が考えられ、今後の検討課題である。

(5) カルシウム及びイオウ分の施用が生育や GL 含有率へ直接的に及ぼす影響は認められなかったが、土壌 pH との関係について、pH 6.2 以上でより旺盛な生育を示し、高い GL 含有率を目指すための適正 pH は 6.0~6.5 と考えられた。また、土壌 EC との関係では、

4 dS/m を超えると塩類土壌と分類され、通常の作物では土壌 EC が 1~2 dS/m を超えると生育障害が生じるが、本実験において一部の区で 9 dS/m であったにもかかわらず、吸水障害をはじめとした顕著な塩類障害は観察されず、高い GL 含有率を持つカンゾウを栽培するための適正な土壌 EC は 3~6 dS/m の範囲と考えられた。

しかし、本実験において、炭酸カルシウムを 0~300 kg/10 a、イオウ分として 0~61 kg/10 a、土壌 pH を 5~7、土壌 EC を 1~9 dS/m という広範囲な試験区を設定したにもかかわらず、GL 含有率が JP15 規定値 (2.5%) を満たしたのは一部の分枝根のみにとどまり、主根やストロンでは低い値であったことから、土壌中のカルシウム及びイオウ分等の無機成分量、土壌 pH、土壌 EC 等の土壌環境因子は、カンゾウ根中の GL 集積に直接的に及ぼす影響は少ないと考えられた。

## E. 結論

(1) グリチルリチン生合成において、これまでブラックボックスであった  $\beta$ -アミリンからグリチルリチンに至る経路における中間体が明らかになった。即ち、予想された二つの経路、ならびに酸化酵素の一連の反応の結果生じることが予測された物質が蓄積していたことが判明したことから、2ないし3ステップの酸化反応、2ステップの糖転移反応によって生合成されると考えられる。本研究によって各中間体を化学合成でき、また、これらの一斉分析法が確立できたことから、今後、候補となる遺伝子の機能評価に強力なツールとなると期待できる。

(2) 実生苗の腋芽組織から高い増殖能力を有し、容易に植物体へと再生可能な培養ストロンを作出する条件を確立した。本実験で得られた知見は、外来遺伝子導入法開発への応用にも期待される。

(3) 圃場試験、水耕栽培試験により、カンゾウは相当な高塩類濃度の環境下で良好な生育を示し、窒素吸収能は活発化することが明らかとなり、自生地におけるような厳し

い環境下（半砂漠）に適応した生理機能を有していることが実験的に確認できたが、土壌中の無機成分量、土壌 pH、土壌 EC 等の土壌環境要因は、カンゾウ根中の GL 蓄積に直接的に及ぼす影響は少ないと考えられた。また、主根では土壌深度が深くなるほど増加し、一方、分枝根では土壌深度がより浅くなるほど増加する傾向が認められ、GL 集積は主根と分枝根では異なるメカニズムで行われていることが推察された。

(4) 3, 4 年生株間の GL 集積能には顕著な差が認められ、その生育状態の大きな差は結実の有無にあり、従って、開花・結実が何らかの影響を及ぼしている可能性が圃場試験から推測された。一方、植物体各部位の分析の結果、花からは茎、葉や地下部にはみられない GL と類似の多種類の配糖体が検出されたことから、GL 生合成において花は葉や茎とは異なった機能を有していることが示唆された。これまでに、地上部から肥大根への何らかの因子の転流が GL 生合成を制御し

ている可能性を示唆することが林らにより報告されているが、今回得られた結果から、開花・結実が地下部の GL 集積に何らかの関与をしているとの仮説に至った。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

1. 關光, 大山清, 須藤浩, 高上馬希重, 櫻井望, 豊田敦, 十時泰, 林宏明, 水谷正治, 大西利幸, 柴田敏郎, 斉藤和季, 村中俊哉, 薬用植物カンゾウのトリテルペンサポニン生合成関連遺伝子の単離に向けた EST 解析, 第 24 回日本植物細胞分子生物学会大会 (2006 年 7 月, 筑波)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

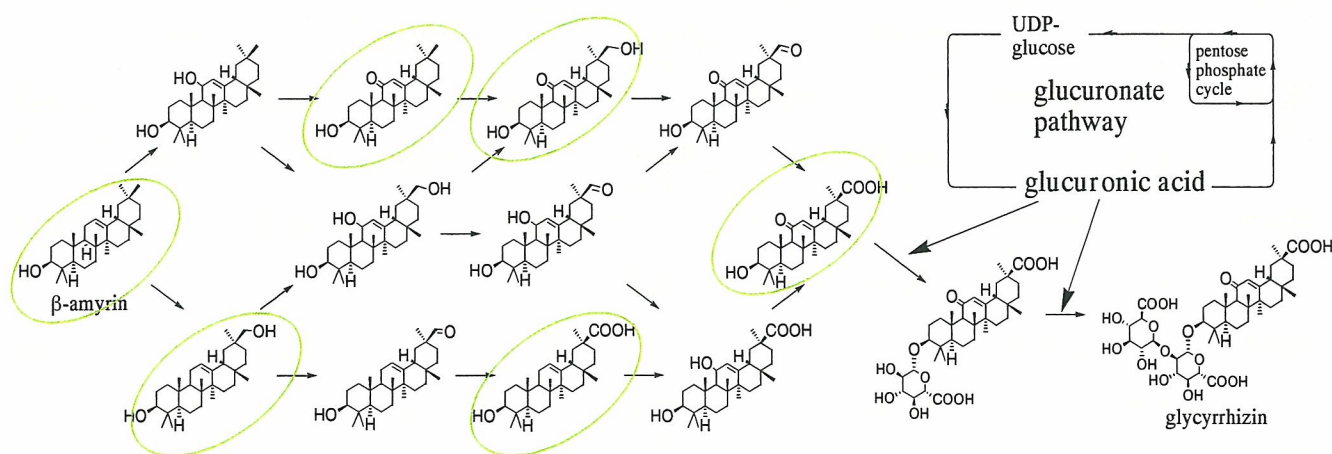
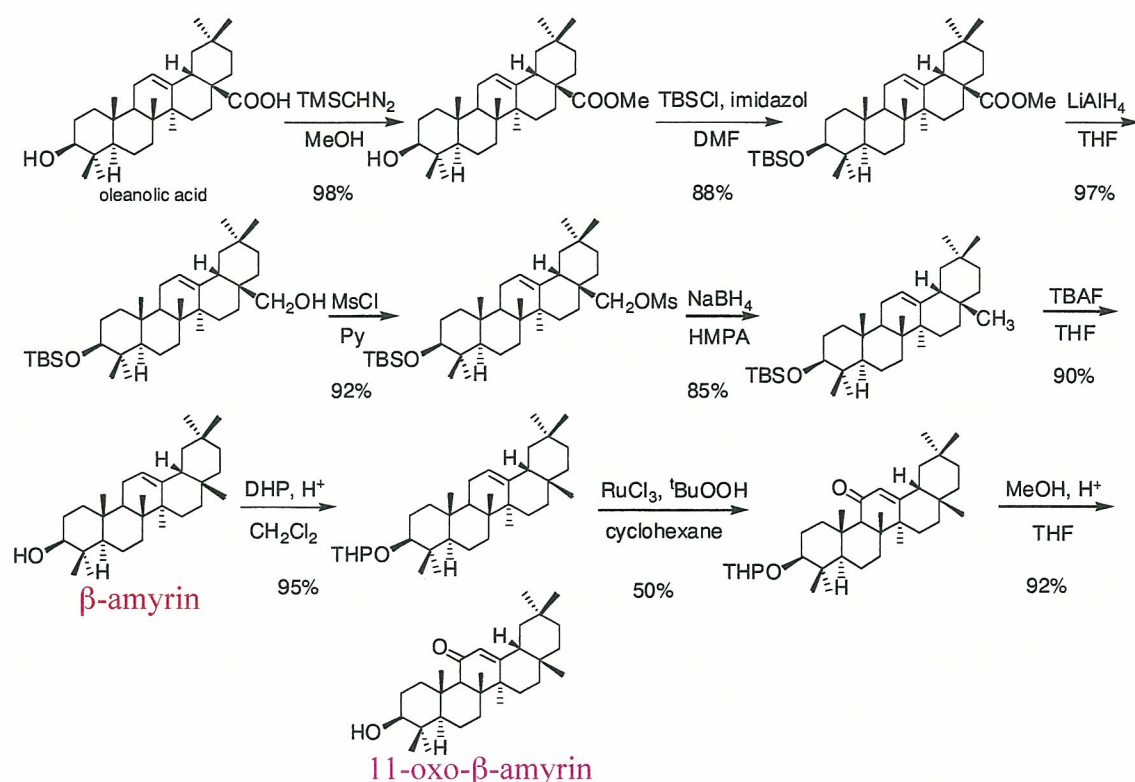


図1 グリチルリチン予想生合成経路

## Synthesis of the putative biosynthetic intermediate-1



## Synthesis of the putative biosynthetic intermediate-2

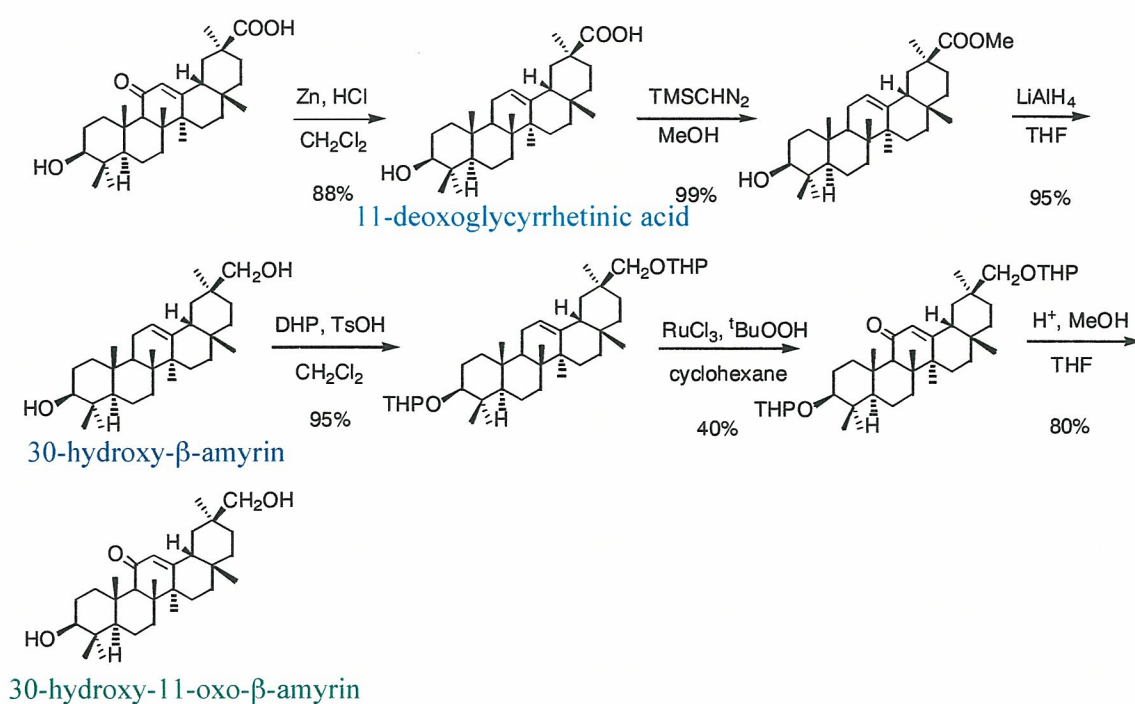


図2 予想中間体の合成