

図 18. 種々光源（蛍光管／白色LED管）下で養液栽培した GuIV1 及び GuIV2 の根の収量と二次代謝物含量（処理期間：124 日間及び 362 日間）
栽培条件は図 17 と同様

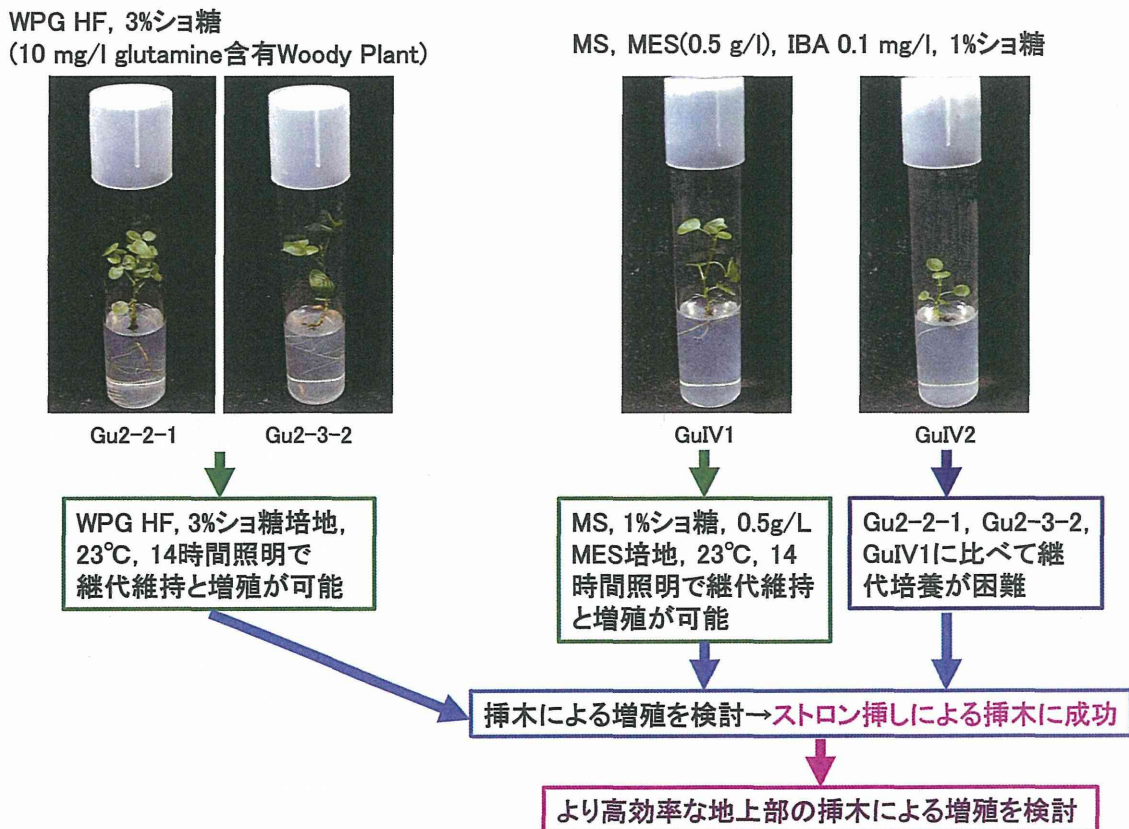


図19. ウラルカンゾウ優良株の大量増殖法の確立

一般的な挿木方法 (<http://a.know-how.fc2.com/111/>)

- 挿し穂の調製:健康で元気の良さそうな茎や枝(草本:5~6cm長、木本:8~10m長、葉3~5枚)。よく切れる"カッター"で切る。葉からの蒸散を抑えるため、挿し穂の一番下の葉は切り落とす。葉の大きい植物の場合、上部の葉を半分に切る。
- コップに100倍くらいに薄めた植物の活力剤(メネデル)をいれて、その中に挿し穂をしばらく浸けておく(草本:約5分間、木本:約2時間)。
- 挿し穂を挿す土(できるだけ粒が細かいもの:粒の小さい赤玉土や鹿沼土、水ゴケ、パーミキュライトなど)をメネデルなどの万能活力剤を薄めた水で湿らせてから、挿し穂のおよそ1/3くらいの深さの穴を開ける。
- 挿し穂を土に挿す。
- 挿し穂を土に挿したら、土を湿らせるときに使ったメネデルを薄めた水をもういちど与えてから半日陰で管理。

ウラルカンゾウ優良株ストロン挿しには有効

しかし、地上茎の挿し木には無効

ウラルカンゾウ優良株挿し木予試験結果

- ルチエース(発根剤)、ハイフレッシュ(ケイ酸塩白土)の挿し穂への塗布は発根苗が得られない(対照のラベンダーは発根率86%以上、閉鎖温室:20°C、明期14時間)
- イノシン10000倍液(植物根生育促進剤)処理では発根を誘導できない[グロースチャンパー(GC)室:25°C、明期12時間]
- 挿し穂をインドール酪酸(IBA 20mg/L)溶液で処理したが発根苗は得られなかった。
- メネデル100倍液への挿し穂の浸漬で頂芽切片:2.9%、茎切片:5.9%で発根苗が得られた(GC室:25°C、明期12時間)が、再現性に乏しい
- 頂芽をFe-EDTA 10ppm処理すると発根苗が得られるが、発根率が0~100%と安定しない(植物インキュベーター:25°C、明期16時間)
- 1%グルタチオン製剤をパーミキュライトに混合した苗床で発根促進効果が認められたが(GC室:25°C、明期16時間)、植物インキュベーター(GC室:25°C、明期16時間)ではむしろない方が発根が良好
- 流水処理した挿し穂をスポンジに挿し、養液と水で育成するとシュート再生は水の方が良好
- 流水処理した挿し穂(1節茎、腋芽付き1節茎、腋芽あり2節茎、腋芽無し2節茎)をスポンジに挿し水で育成するとシュート再生は2節茎及び腋芽無し2節茎が良好

地上茎挿し木に有効な条件

挿し穂材料:植物インキュベーター内の小株よりGC室で育成した大株の腋芽が伸びていない2節茎

前処理:全葉の切除と挿し穂の流水処理

苗床:培養土(赤玉土:クレハ培養土:堆肥=3:1:1)、オアシス又はパーミキュライト(粒径1-3mm)

栽培条件:25°C、明期16時間、照度10,000-30,000ルクス、光合成有効放射200-550 μmol/m²S、相対湿度40-60%、毎日の灌水(水の交換)、遮光・加湿・肥料不要(但し、発根後又はカルス形成後は追肥が望ましい)

図 20. 一般的な挿し木方法及びウラルカンゾウ優良株挿し木予試験結果

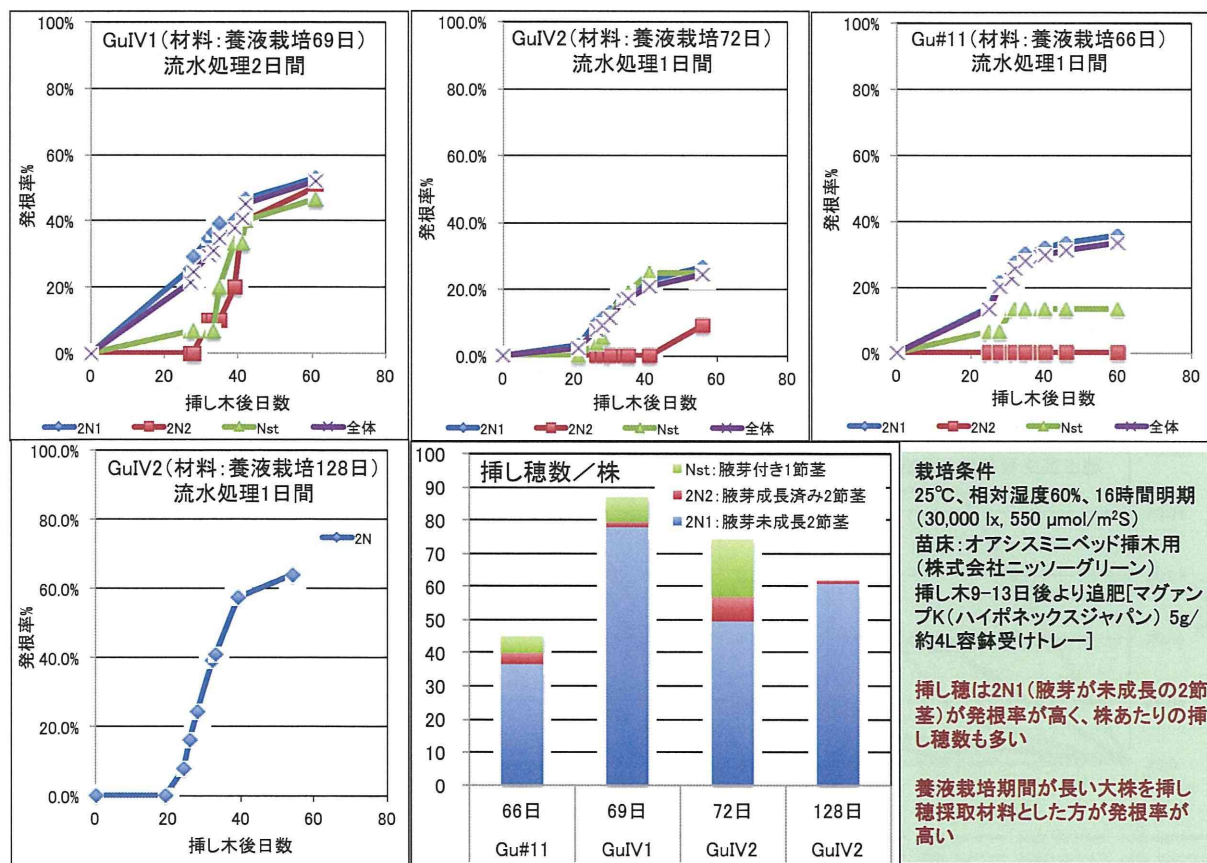


図 21. ウラルカンゾウ優良株の養液栽培期間、挿し穂の種類と発根率

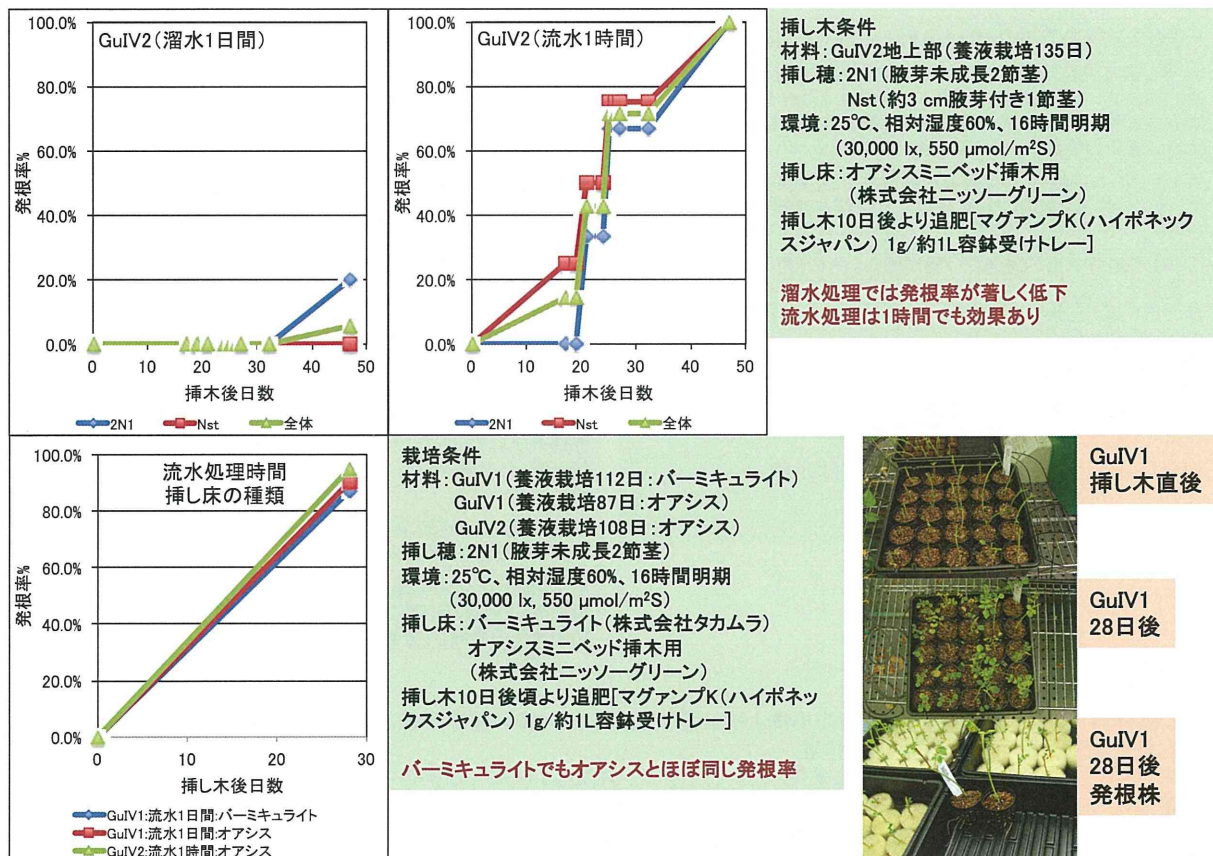


図 22. ウラルカンゾウ優良株の挿し穂の種類、流水処理条件、挿し床種類と発根率

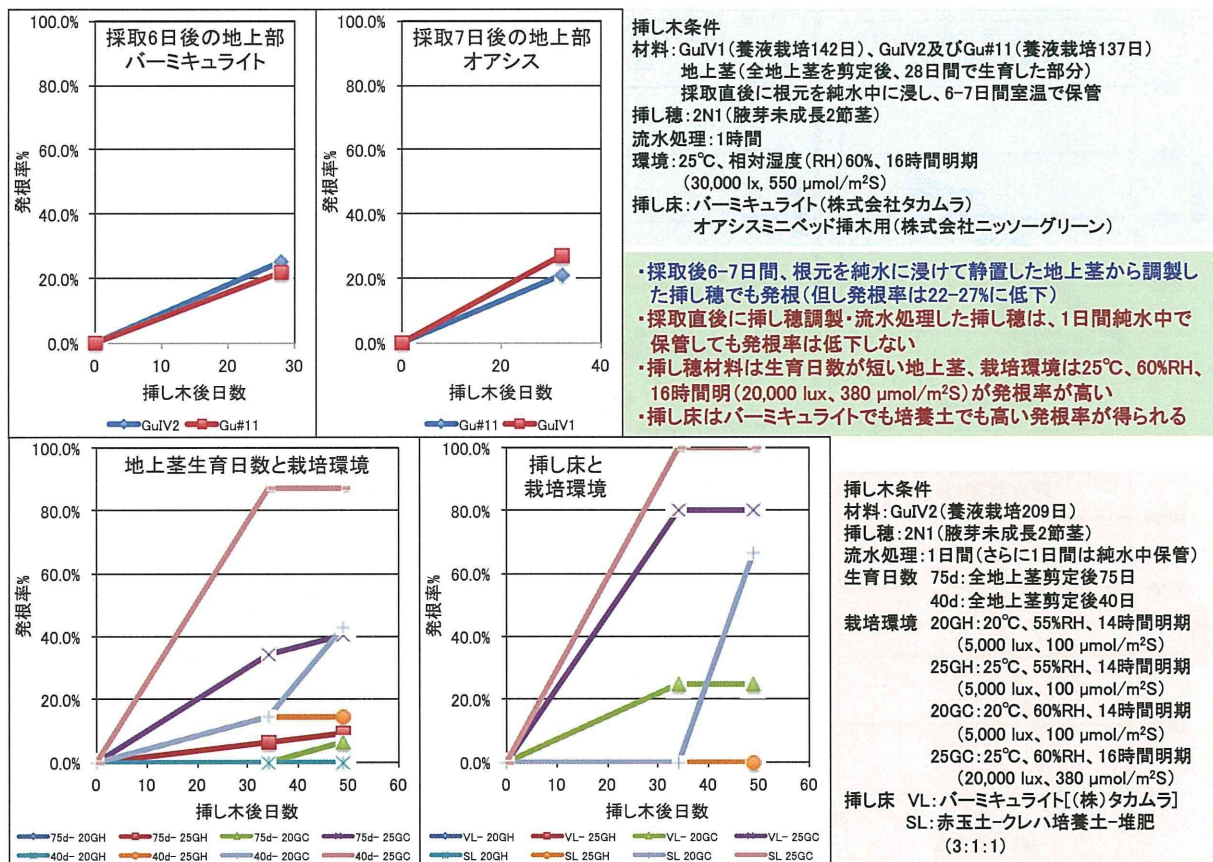
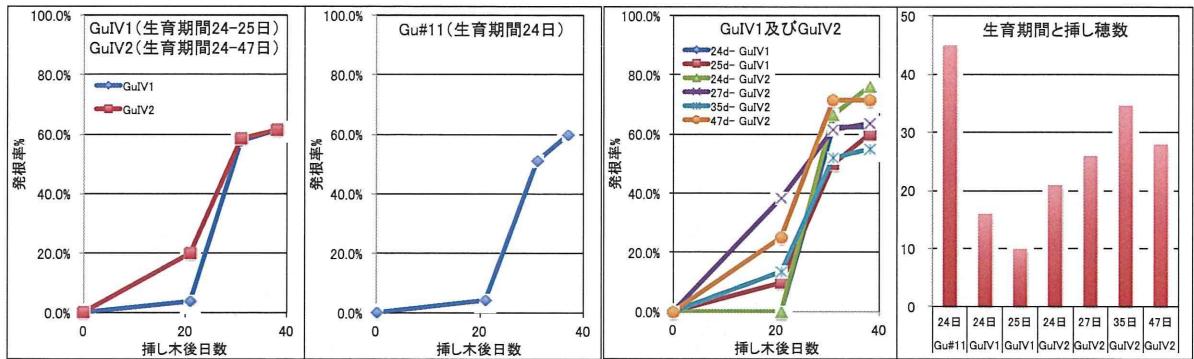


図 23. ウラルカンゾウ優良株の材料、流水処理条件、挿し床種類、栽培環境と発根率



優良株クローン	地上茎生育日数	挿し木後日数	株数	挿し穂数(平均)	発根本数(平均)	発根率(平均)	年間増殖数* (1親株のみから増殖)	年間増殖数** (ネズミ算式)
GuIv1	24-25日	38日	2	13.0	8.0	61.5%	108.8	16,209
GuIv2	24-35日	38日	6	29.5	17.7	59.9%	166.9	218,005
Gu#11	24日	37日	1	45.0	27.0	60.0%	383.6	945,784

挿し木条件

材料: GuIv1(養液栽培228日)、GuIv2(養液栽培236-237日)、Gu#11(養液栽培236日)
 挿し穂: 2N1(腋芽未成長2節茎)
 流水処理: 1日間(さらに1日間は純水中保管)
 生育日数: 全地上茎剪定後の日数 24d: 24日、25d: 25日、27d: 27日、35d: 35日、47d: 47日
 栽培環境 25GC: 25℃、60%RH、16時間明期(20,000 lux、380 μmol/m²S)
 挿し床: パーミキュライト[(株)タカムラ]

*: 親株のみから挿し穂採取

** : 1親株を材料、挿し木から発根苗までは35日(発根苗数は37日及び38日と同じと仮定)、増殖苗は70日間で親株と同じ大きさに生育すると仮定

1本の親株から、GuIv1: 16,209本、GuIv2: 218,005本、Gu#11: 945,784本の苗が増殖可能！！！！

図 24. ウラルカンゾウ優良株の発根率、挿し穂数及び年間増殖数

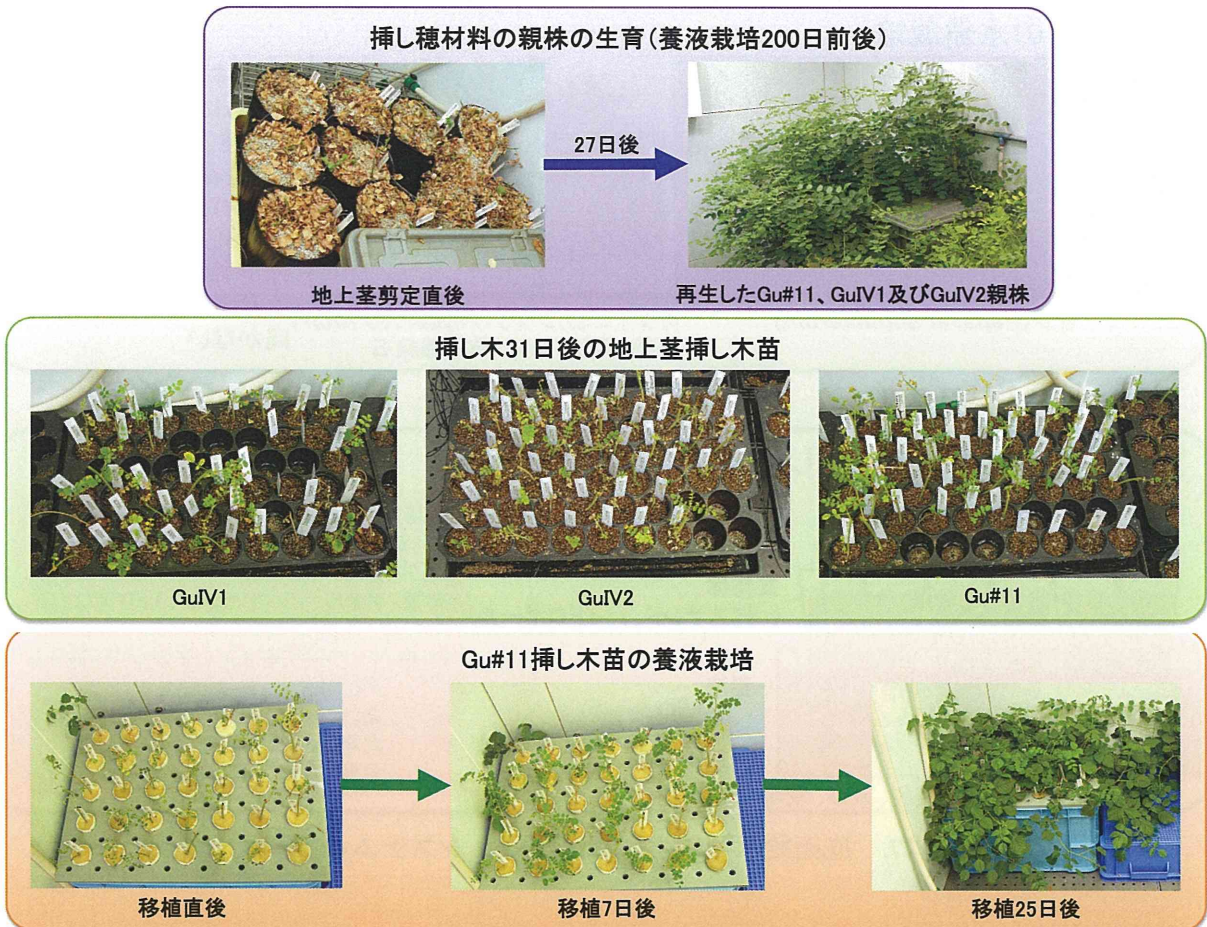


図25. ウラルカンゾウ優良株の地上茎挿し木による大量増殖と挿し木苗の生育

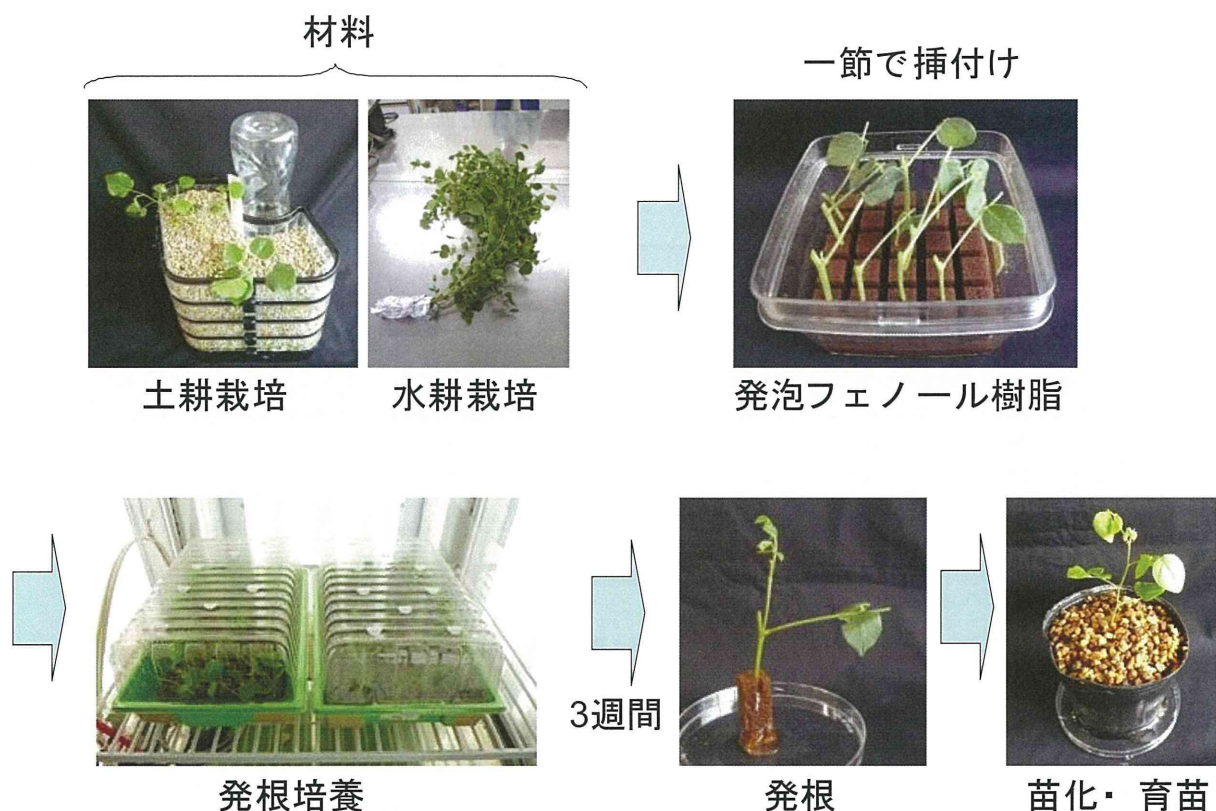




図26. 光独立栄養培養によるウラルカンゾウ優良株の地上茎挿し木による大量増殖

薬用植物の水耕栽培



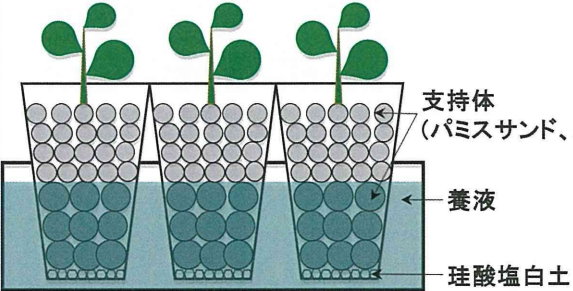
ケシ (*Papaver somniferum*)



キダチコミカンソウ (*Phyllanthus niruri*)
薬効: 抗ウイルス, 抗尿路結石

根全体が水耕液(肥料養液)に浸る水耕栽培は、地上部を薬用部位とする薬用植物の生産には有効
しかし、根は肥大せず、地下部を薬用部位とする薬用植物の生産には向かない

支持体と底面吸水を利用した水耕栽培システム

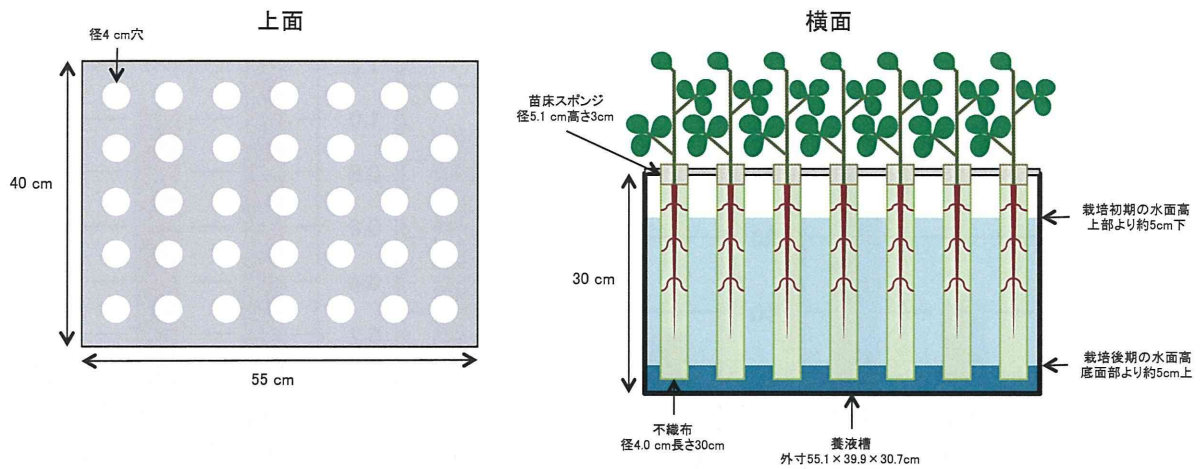


支持体 (パミスサンド、ハイドロボール)
養液
珪酸塩白土

特願2009-131442「栽培装置、及び、栽培方法」

栽培条件(閉鎖型植物生産施設)
20-25°C、相対湿度50-60%、14-16時間明期[太陽光+補光照明又は人工照明(蛍光管、メタルハライドランプ、LED管など)]
水耕液: 推奨濃度の25%~50%
100%=マツザキ1号 6g + マツザキ2号 4g / 8L、
又は、
大塚ハウス1号 12g +
大塚ハウス2号 8g / 8L

図27. 底面給水型の水耕栽培装置・システムの開発



栽培方法

1. 養液槽の上面より5cm下まで養液肥料(大塚ハウス1号6g+大塚ハウス2号4g/8L:規定濃度の50%)を入れる
2. 挿し木苗の茎の根元を苗床スポンジ(径5.1cm高さ3cm)に入れて不織布の筒(径4cm長さ30cm)に入れ栽培装置の穴に設置する(根が不織布に達し、毛細管現象により根に養液が供給されていることを確認)
3. 根の先端が養液槽の下半分に達するまで(約1ヶ月間)、養液面が養液槽の上部より約5cm下になるように、養液を管理しながら栽培(25℃, 16時間明期, 相対湿度60%)
4. 栽培開始約1ヶ月後からは、養液面が養液槽の底面より約5cmになるように養液を管理しながら栽培

図28. 新規養液栽培装置・栽培方法の開発

新規水耕栽培装置(浅型)でのGuIV2、Gu#11挿し木苗の栽培

移植後1週間 移植後5週間

新規水耕栽培装置(浅型)での栽培71日

GuIV2 Gu#11
最大根幅: 0.59±0.11 cm 最大根幅: 0.85±0.21 cm

新規水耕栽培装置(深型)での栽培66日(通算137日)

GuIV2 Gu#11

新規水耕栽培装置(深型)への移植と栽培(移植前に地上茎と細根を切除)

移植13日後 移植直後

植物	苗材料	栽培日数(通算日数)	最大根幅 cm	根長cm (径2 mm≤)	草丈cm	葉数
GuIV1	ストロン	64日(142日)	0.49±0.12	11.5±1.3	35.9±9.1	37.0±29.7
GuIV2	地上茎	66日(137日)	0.71±0.13	13.4±1.5	53.2±7.8	23.6±6.9
Gu#11	地上茎	66日(137日)	1.01±0.13	21.3±5.0	71.9±6.2	57.4±14.1

図29. 新規養液栽培装置でのウラルカンゾウ優良株の栽培

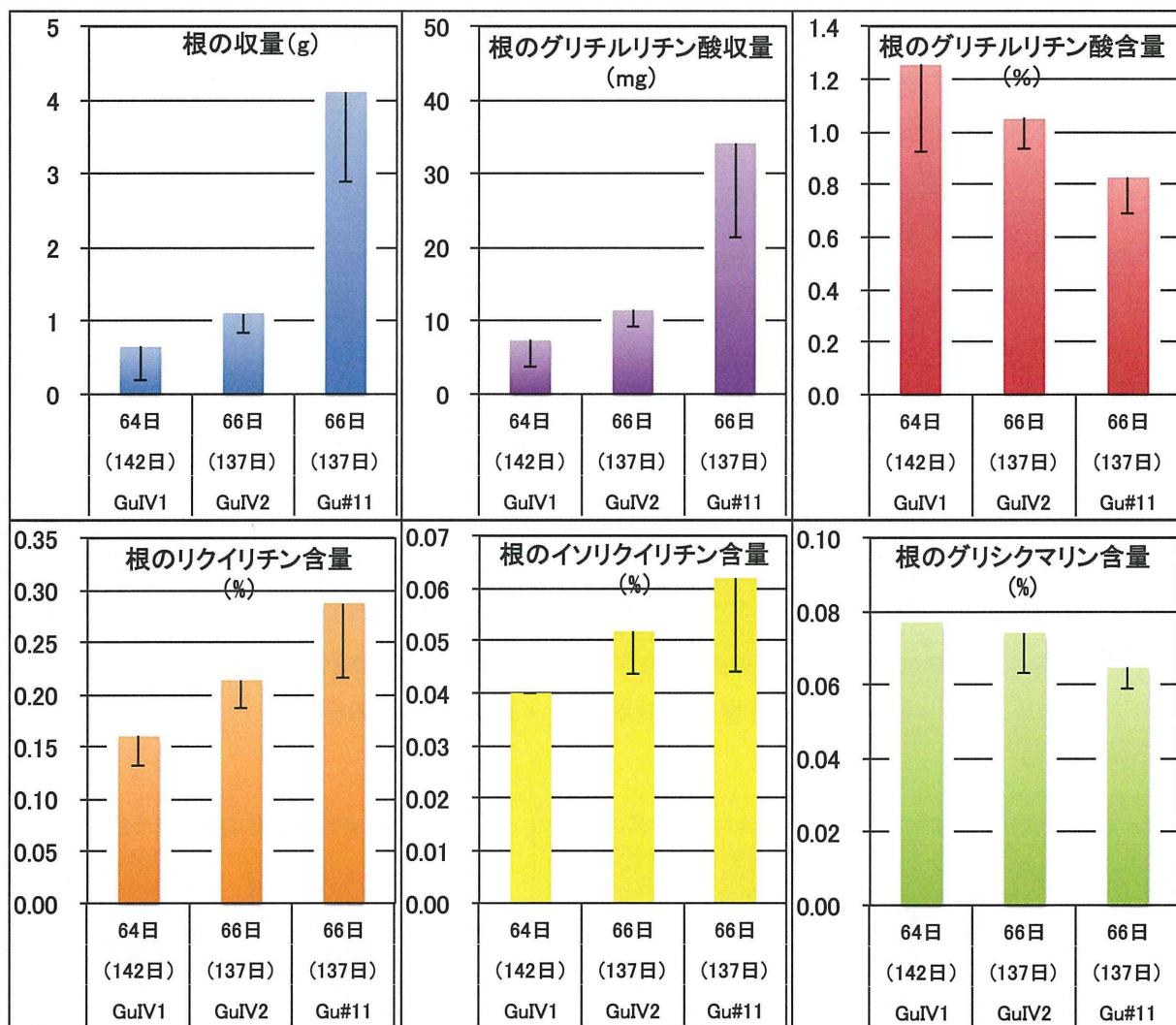


図30. 新規養液栽培装置で栽培したウラルカンゾウ優良株の根（径2 mm≦）の収量、グリチルリチン酸収量と二次代謝物含量（乾燥重量%）

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）
分担研究報告書

分担研究課題：遺伝子情報を活用した薬用植物の形質の安定性評価ならびに
有用物質生産性向上に関する研究 ―ウラルカンゾウ EST ライブラリーの解析―

研究分担者 河野徳昭 （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

要旨 人工水耕栽培等の栽培法に適した形質等を有する薬用植物の有用・優良系統について、有用成分の高生産株や、生育の旺盛な株を選抜する遺伝子マーカーの構築を目的に、水耕栽培したウラルカンゾウ優良株より構築したリファレンスESTライブラリーに含まれる二次代謝関連遺伝子の解析を行った。その結果、グリチルリチン酸生合成酵素遺伝子が含まれていること、また、P450や糖転移酵素等の二次代謝関連酵素遺伝子が多数含まれていることが確認された。これらの情報は、遺伝子マーカーの構築の基盤情報となるものである。

A. 研究目的

本分担研究においては、「人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた実証的研究」で選抜または育成する、人工水耕栽培等の栽培法に適した形質等を有する薬用植物の有用・優良系統について、遺伝子情報による資源保護、とくに知的財産権保護に向けた遺伝子情報の集積を行う（文献1）。さらに、人工水耕栽培等に供試する植物について、変異の発生等の遺伝的安定性に関する検討を行い、水耕栽培等の環境下における遺伝子レベルでの同等性を評価し、品質、安全性を担保する情報を整備することを目的とする。

また、近年、ポストモデル植物、ポストゲノムを指向する流れの中で、発現遺伝子の網羅的情報である EST ライブラリーの重要性が高まっている（文献2, 3, 4）ことを鑑み、本研究においては、EST ライブラリーの情報を活用し、ウラルカンゾウの各種栽培、生育環境下、並びに生育段階や部位別の二次代謝関連遺伝子群の発現変動を、グリチルリチン酸等の二次代謝物の生産性と共に解析する。以上に加え、これらの遺伝子群の上流に存在する発現調節に関

わる遺伝子群についても解析を行う。これらの解析により、二次代謝物の高生産性に寄与する遺伝子、いわゆるマーカーを見出し、水耕栽培環境下をはじめとするウラルカンゾウの栽培の各種条件の最適化に寄与することを目的とする。

本年度は、（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターで構築したウラルカンゾウ優良株の水耕栽培株の EST ライブラリーについて、グリチルリチン酸生合成関連遺伝子群の探索、並びに二次代謝関連遺伝子群の探索を行った。

B. 研究方法

ウラルカンゾウ EST ライブラリー

以下に、本研究に使用したウラルカンゾウ優良系統水耕栽培株 EST ライブラリーの構築について概要を記す。

ウラルカンゾウ優良株である GuTS71-08 IV1（GuIV1）の水耕栽培株の根（図1）からの total RNA 調製には RNeasy Plant Mini Kit（Qiagen）を使用した。

EST ライブラリーの構築はダナフォーム社

(横浜市鶴見区)に委託した。ウラルカンゾウ GuIV1 水耕栽培株の根より調製した高品質 total RNA 約 100 µg(表 1 及び図 2)より、完全長 cDNA 合成技術 (Cap-Trapping 法) 及びポリ A 鎖除去技術を用い、完全長 cDNA ライブラリーを作成した。均一化処理はハイブリダイゼーション及び 2 本鎖特異的 DNA ヌクレアーゼ処理により行った。作成した均一化 cDNA ライブラリーを断片化し、シーケンス用アダプターを付加し、次世代型シーケンサー Roche454 GS-FLX-Titanium 解析用試料 (RNA-seq ライブラリー) として調製したのち、Japan Bioinformatics KK において 1 run のシーケンシング (1 リード長 : 52-1201 bp, 1,032,634 reads/run) を行った。得られた RNA-seq ドラフトシーケンスは Whole Genome Assembler (WGS) 7.0 でアセンブルしたのち、cDNA 配列としてプロセッシングに供した。

得られた cDNA 配列について、NCBI Non redundant protein database (NR) (dated 21-March 2012)に対し、NCBI Blast 2.2.26+ (e-value cutoff 0.001、上位 10 ヒットを抽出) でアノテーション解析を行い、さらに UniprotKB で解析を行い、対応する GO-annotation、KEGG gene IDs、EC numbers、UniprotKB gene names、eggNOG ID、そして Interpro ID のデータを取得した。これらのバイオインフォマティクス解析データを収載したものを EST ライブラリーとした。得られた、cDNA 配列、推定機能等のデータは FASTAQ 形式、エクセル形式で受領した。

ウラルカンゾウ EST ライブラリーの解析

1. グリチルリチン酸生合成遺伝子の探索

人工水耕栽培環境下で栽培したウラルカンゾウ優良株の根において発現している遺伝子のリファレンスとするために構築した、ウラルカンゾウ GuIV1 株の EST ライブラリーについて、グリチルリチン酸生合成酵素遺伝子 (文献 5, 6, 7) が含まれているか確認するため、EST ライブラリーの fasta データ (G.uralensis.deg.fasta, G.uralensis.scf.fasta, G.uralensis.singleton.fasta) について BioEdit (文献 8) の local blast 機能を使用し、相同遺伝子を探索した。

2. 二次代謝関連遺伝子群の探索

EST ライブラリー (エクセルデータ) を二次代謝等に関連するキーワードにより検索した。使用したキーワードは表 3 のとおりである。これらについて EST ライブラリーのアノテーションリスト (annotated_transcripts_wgs_top_hit) 29,624 件中の "hit_title" の項目を検索した結果 (ヒット数) を集計した。さらに、二次代謝関連と考えられる遺伝子群のうち、ステロール代謝、糖転移酵素、メチル基転移酵素、チトクローム P450、そして転写調節因子群のそれぞれについて EST ライブラリーを検索し、関連遺伝子の抽出を行い、出現頻度を解析した。

C. 研究結果

ウラルカンゾウ優良株 EST ライブラリーの概要

本研究に供したウラルカンゾウ優良株水耕栽培株由来の EST ライブラリーの概要は下記の通り (表 2)。総遺伝子数 : 42,280、クラスター数 : 40,278、アノテーションのついた遺伝子数 : 29,624、GO アノテーションのついた遺伝子数 : 11,540、Interpro アノテーションのついた遺伝子数 : 14,669、KEGG ID がアノテーションされた遺伝子数 : 2,214、EC number がアノテーションされた遺伝子数 : 903。

グリチルリチン酸生合成遺伝子の探索

人工水耕栽培環境下で栽培したウラルカンゾウ GuIV1 株の EST ライブラリーについて、グリチルリチン酸生合成酵素遺伝子の探索を行ったところ、表 3 に示すように、既報 (文献 5, 6, 7) のグリチルリチン酸生合成酵素遺伝子含有されていることが示された。

二次代謝関連遺伝子群の探索

EST ライブラリー (エクセルデータ) を二次代謝等に関連するキーワードにより検索したヒット数を表 4 に示す。

二次代謝関連遺伝子群の解析

さらに、二次代謝に関連するキーワードで

EST ライブラリーを検索したところ、下記のように、ヒット件数が集計された。

Cytochrome P450 関連

EST ライブラリー(アノテーション結果)を "P450"で検索した結果、152 件のヒットがあった。これらのうち、相同性の高い CYP のファミリー番号のアノテーションがついているものが、51%、ついていないものが 44%であり、残りの 4%が、transcinnamate 4-monooxygenase、1%が brassinosteroid 代謝系、そして 1%が P450 reductase と機能推定された (図 4)。なお、11 位の酸化酵素である CYP88D6 はファミリー番号のアノテーションがついたグループに見いだされたが、30 位の酸化酵素である CYP72A154 は、ファミリー番号のアノテーションが付かないグループに分類されていた。これは、アノテーションの際に使用したデータベースに、CYP72A154 が登録されていなかったためと推定される。

ステロール関連

EST ライブラリー(アノテーション結果)を "sterol"で検索すると 24 件、また"squalene"で検索すると 12 件のヒットがあった。これら合計 36 件のうち、sterol または triterpene の骨格形成に至る生合成経路の酵素遺伝子のホモログは、squalene synthase (SQS)が 17%、dehydro squalene deaturase が 8%、そして oxidosqualene の生合成に関わると考えられる squalene monooxygenase のホモログが 6%、presqualene diphosphate phosphatase が 3%の合計 34%を占めた。

また、植物ステロール生合成に関わると推定される sterol 24 位の methyl transferase (C24 SMT) は 14%、3 位の糖転移酵素 3 β -SGT のホモログが 8%、oxidase または reductase が 11%、oxysterol binding protein のホモログが 22%、acyl transferase と機能推定されるものが 5%であった (図 5)。

フラボノイド関連

EST ライブラリー(アノテーション結果)を "flav"で検索した結果を精査したところ、

flavonoid の代謝に関連すると考えられるヒットは 108 件であった。

これらのうち、糖転移酵素のホモログは 15%、そのうち、1%は UDP-glucose flavonoid 7-O-glucosyltransferase のホモログであった。また、メチル基転移酵素も isoflavone-4'OMT が 2%アノテートされていた。とくにアノテートされた割合が多かったものは isoflavone reductase 26%、dihydroflavonol 4-reductase 16%、dihydroflavonol reductase 8%と reductase が多く、flavonoid 3'-hydroxylase 7%、flavanone hydroxylase 6%、isoflavone 2'-hydroxylase 4%、flavonoid 3',5'-hydroxylase 1%、flavonoid 3'-monooxygenase 5%と、酸化還元に関する酵素の頻度が高いことが判明した (図 6)。

糖転移酵素関連

EST ライブラリー(アノテーション結果)を "glycosyl"で検索した結果を精査したところ、糖転移酵素に関連すると考えられるヒットは 79 件であった。そのうち、アントシアニン生合成関連等のフラボノイド代謝に関係すると推定されるものは、anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 18%、anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase 6%、anthocyanin 3'-O- β -glucosyltransferase 5%、isoflavonoid glucosyltransferase 6%、glycosyltransferase 71D1 (quercetin 3-O-glucosyltransferase) 3%、7-O-glucosyltransferase 1%、の合計 39%を占めた。

一方、ステロール骨格への糖付加を行う、sterol glucosyltransferase は 5%であり、abscisate β -glucosyltransferase のホモログも 4%存在した。なお、糖転移酵素については、詳細な機能推定ができないものがヒットの 52%にのぼった (図 7)。

転写調節因子関連

EST ライブラリー(アノテーション結果)について各種転写調節因子名で検索を行い、結果を精査したところ、MYB/MYC、WRKY、bHLH、DREB に対するヒット数はそれぞれ、88、79、76、3 であった。

D. 考察

人工水耕栽培ウラルカンゾウ優良株 GuIV1より構築した EST ライブラリーは、これまでに報告されているグリチルリチン酸生合成関連遺伝子群を含有していることが確認された。これは、本ライブラリーがウラルカンゾウの発現遺伝子解析において、リファレンスとなるライブラリーであることを示すものである。

今回の EST ライブラリーに含まれる二次代謝関連遺伝子群、そして転写調節因子遺伝子群の検索を行ったが、アノテーションのついたものはライブラリー中の遺伝子の一部に過ぎない。また、アノテーションのついたものも、ここで示された機能は推定にすぎず、それぞれの機能の確定には酵母等の異種発現系での解析が必要である。

今後、これまでモデル植物において精力的に解析されてきた、乾燥ストレス等への応答の研究結果をふまえ、本 EST ライブラリーの情報を基盤情報として、乾燥、水浸等（文献 9）の各種ストレス条件下、また、生育ステージにおける、二次代謝関連遺伝子の発現変動の解析を進めることにより、有用物質生能を有する、非モデル植物のそれらの物質生産に関連するマーカー遺伝子群を見出すことができると考えている。

E. 結論

人工水耕栽培ウラルカンゾウ優良株 GuIV1より構築した EST ライブラリーについて、グリチルリチン酸生合成関連遺伝子群及び、二次代謝関連遺伝子群の探索を行ったところ、グリチルリチン酸生合成酵素遺伝子群の含有が確認された。また、P450、糖転移酵素等の二次代謝関連遺伝子群も多数含まれていることが判明し、本ライブラリーがウラルカンゾウの発現遺伝子解析において、リファレンスライブラリーとして利用できることが確認された。

F. 文献

1) Yamazaki, M., Sato, A., Shimomura, K., Saito, K., & Murakoshi, I. (1994). Genetic relationships among *Glycyrrhiza* plants determined by RAPD and RFLP

analyses. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**(11), 1529-1531.

- 2) Sudo, H., Seki, H., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Toyoda, A., Totoki, Y., Sakaki, Y., Iida, O., Shibata, T., Kojoma, M., Muranaka, T. & Saito, K. (2009). Expressed sequence tags from rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant biotechnol.*, **26**(1), 105-107.
- 3) Li, Y., Luo, H. M., Sun, C., Song, J. Y., Sun, Y. Z., Wu, Q., Wang, N., Yao, H., Steinmetz, A., & Chen, S. L. (2010). EST analysis reveals putative genes involved in glycyrrhizin biosynthesis. *BMC genomics*, **11**(1), 268.
- 4) Kim, D. W., Kim, R. N., Choi, S. H., Kim, D. W., Nam, S. H., Choi, H. S., Koh, H. D., Kim, A., Chae, S. H., Ahn J. C., Kang, A., & Park, H. S. (2011). EST Analysis Predicts Putatively Causative Genes Underlying the Pharmaceutical Application of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **29**(4), 814-824.
- 5) Hayashi, H., Huang, P., Kirakosyan, A., Inoue, K., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Kushiro, T., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (2001). Cloning and Characterization of a cDNA Encoding β -Amyrin Synthase Involved in Glycyrrhizin and Soyasaponin Biosyntheses in Licorice. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**(8), 912-916.
- 6) Seki, H., Ohyama, K., Sawai, S., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., & Muranaka, T. (2008). Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **105**(37), 14204-14209.
- 7) Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Fukushima, E. O., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., & Muranaka, T. (2011). Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *Plant Cell*, **23**(11), 4112-4123.
- 8) Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- 9) Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Gene networks involved in drought stress response

and tolerance. *J. Exp. Bot.*, **58**, 221-227.

無し

G. 研究発表

I. 健康危機情報

1. 論文発表

無し

無し

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願，登録状況

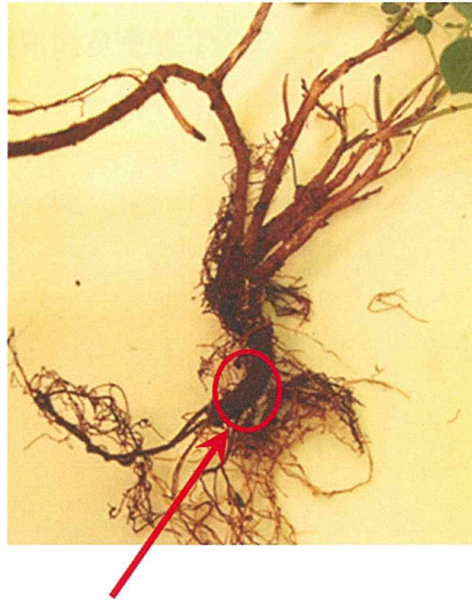
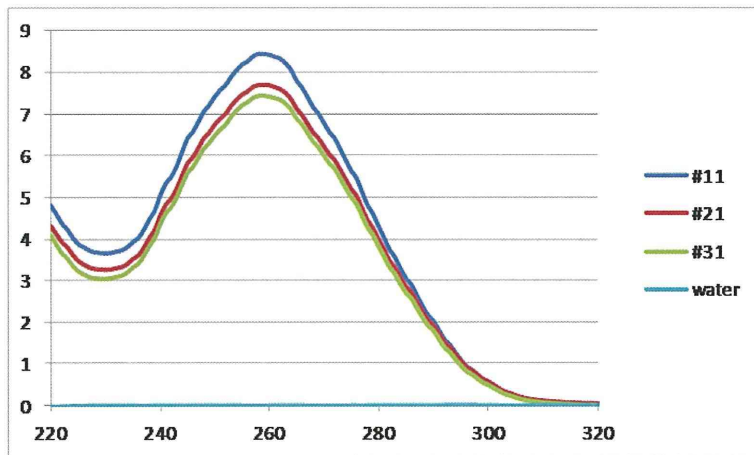


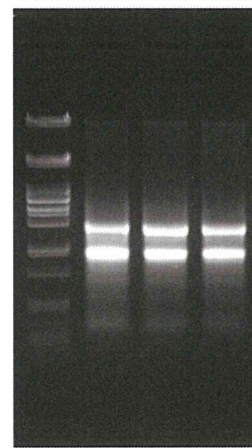
図1. ESTライブラリー構築に使用したウラルカンゾウの部位 (赤矢印)

表1. ESTライブラリー構築に供したtotal RNAの品質情報

1回目			tube #11	1/10 diluted	1/10 diluted	1/10 diluted	1/10 diluted
tube ID	conc. (ug/uL)	volume (uL)	yield (ug)	A260	A230	A260/A280	A260/A230
#11	3.37	15	50.5	8.424	4.313	1.95	2.3
2回目			tube #21	1/10 diluted	1/10 diluted	1/10 diluted	1/10 diluted
tube ID	conc. (ug/uL)	volume (uL)	yield (ug)	A260	A230	A260/A280	A260/A230
#21	3.07	15	46.0	7.67	3.974	1.93	2.37
3回目			tube #31	1/10 diluted	1/10 diluted	1/10 diluted	1/10 diluted
tube ID	conc. (ug/uL)	volume (uL)	yield (ug)	A260	A230	A260/A280	A260/A230
#31	2.96	15	44.4	7.397	3.812	1.94	2.43



NPstI #11 #21 #31

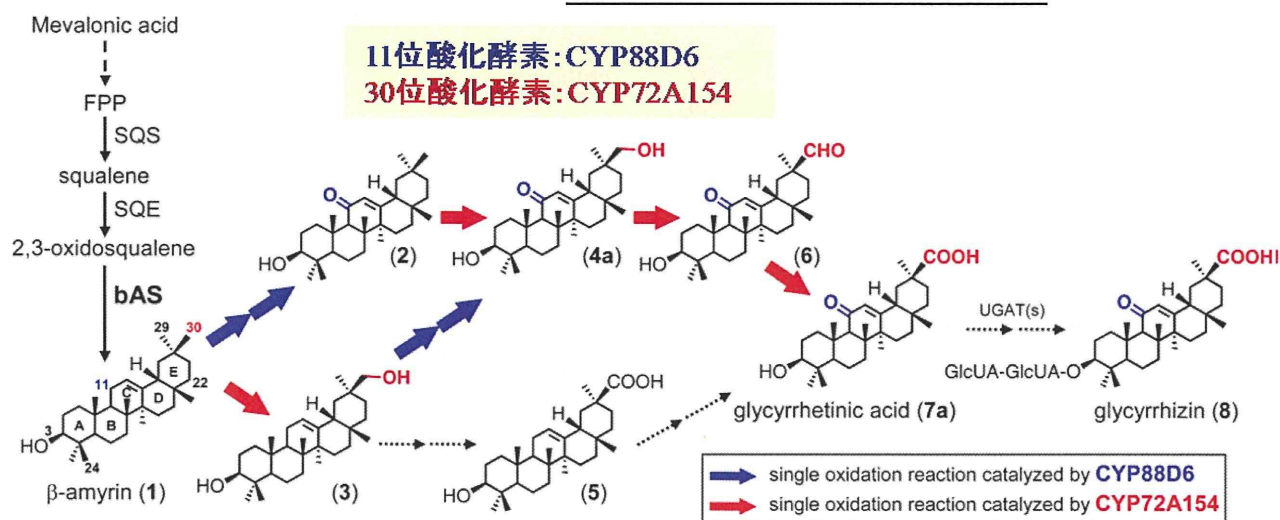


1.0% AGE

図2. ESTライブラリー構築に供したtotal RNAの品質情報
吸光スペクトル (左)、電気泳動像 (右)

表 2. ウラルカンゾウ EST ライブラリーの概要

WGS 7.0 assembly			
Protein coding sequence	42280	GO annotated	11540
Clusters	40278	Interpro annotated	14669
Annotated	29624	KEGG ID similarity	2214
		EC number annotated	903



The structures of possible biosynthetic intermediates between β -amyrin (1) and glycyrrhizic acid (8) are shown: (2), 11-oxo- β -amyrin; (3), 30-hydroxy- β -amyrin; (4a), 30-hydroxy-11-oxo- β -amyrin; (5), 11-deoxyglycyrrhetic acid; (6), glycyrrhetaldehyde; and (7a), glycyrrhetic acid. Solid black arrows indicate a dimerization reaction of two farnesyl diphosphate (FPP) molecules catalyzed by squalene synthase (SQS) originating squalene, oxidation by squalene epoxidase (SQE) to 2,3-oxidosqualene, or cyclization catalyzed by bAS. UGATs, UDP-glucuronosyl transferases.

図3. ウラルカンゾウにおけるグリチルリチン酸生合成経路

Seki *et al.*, *Plant Cell* 23, 4112-4123 (2011)より引用、改変

表 3. 構築した EST ライブラリーに対するグリチルリチン酸生合成経路遺伝子の検索結果

Query	Accession no.	Sequences producing significant alignments	Score (bits)	E Value
GuBAS	FJ627179	deg7180000088584	666	0.0
CYP72A154	AB558153	scf7180000096824	1832	0.0
CYP88D6	AB433179	deg7180000090525	2022	0.0
		deg7180000090524	1360	0.0
		deg7180000051675	718	0.0
GuSQS1	AM182329	deg7180000057903	993	0.0
		deg7180000072986	928	0.0
GuSQS2	AM182330	HKCH10F02JJVLX	870	0.0
		HKCH10F01COEGY	825	0.0
		HKCH10F02G13ZI	726	0.0
		HKCH10F02J099E	710	0.0
		HKCH10F02IAFE2	648	0.0

Database: G.uralensis.scf.fasta 1535 sequences; 1,957,822 total letters
 Database: G.uralensis.deg.fasta 46,215 sequences; 19,679,099 total letters
 Database: MP002R01.fasta 1,032,634 sequences; 338,541,518 total letters

表 4. エクセル形式データに対するキーワード検索結果

	Keyword	hits		hits	
トリテルペン 関連	sterol	24	synthase	436	
	squalene	12	flavono	70	
	triterpene	1	isoflavo	44	イソフラボン 関連
	amyrin	5	isoflavone	39	
P450 関連	cytochrome	227	anthocyan	34	
	P450	152	chalcone	22	
	oxygenase	140	transcription	696	転写因子 関連
	monooxygenase	65	MYB	90	
hydroxylase	55	WRKY	79		
		bHLH	76		
転移酵素 関連	transferase	946	transport	427	輸送 関連
	glucosyltransferase	73	ABC transporter	57	
	prenyltransferase	42			
	acyltransferase	64			

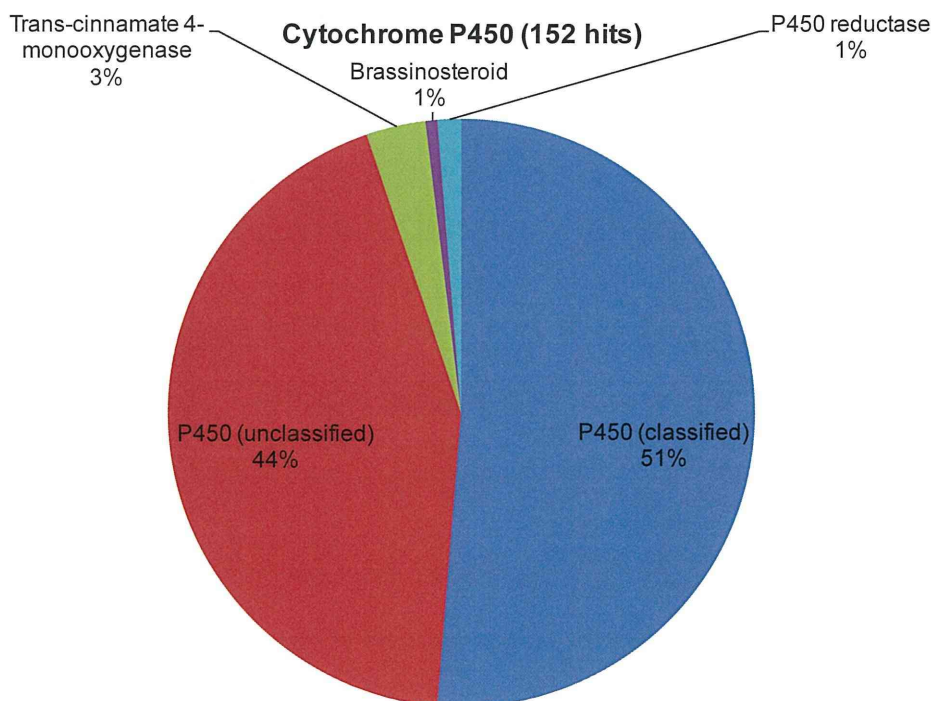


図 4. ウラルカンゾウ EST ライブラリーに含まれる Cytochrome P450 遺伝子

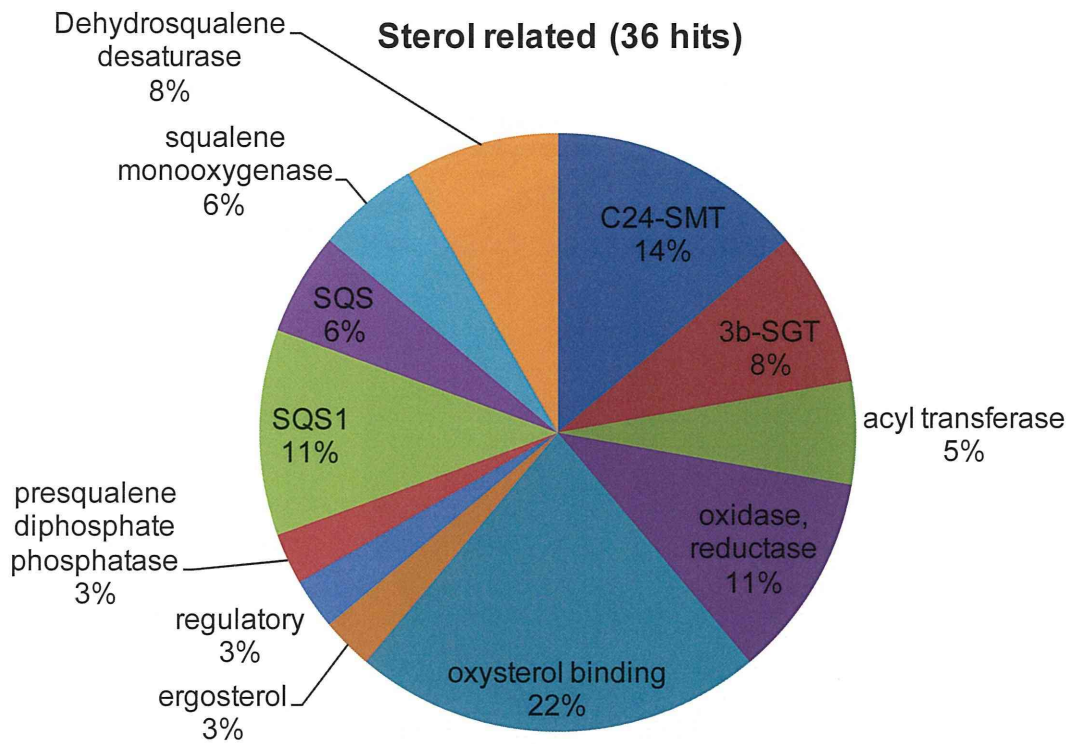


図 5. ウラルカンゾウ EST ライブラリーに含まれるステロール関連遺伝子

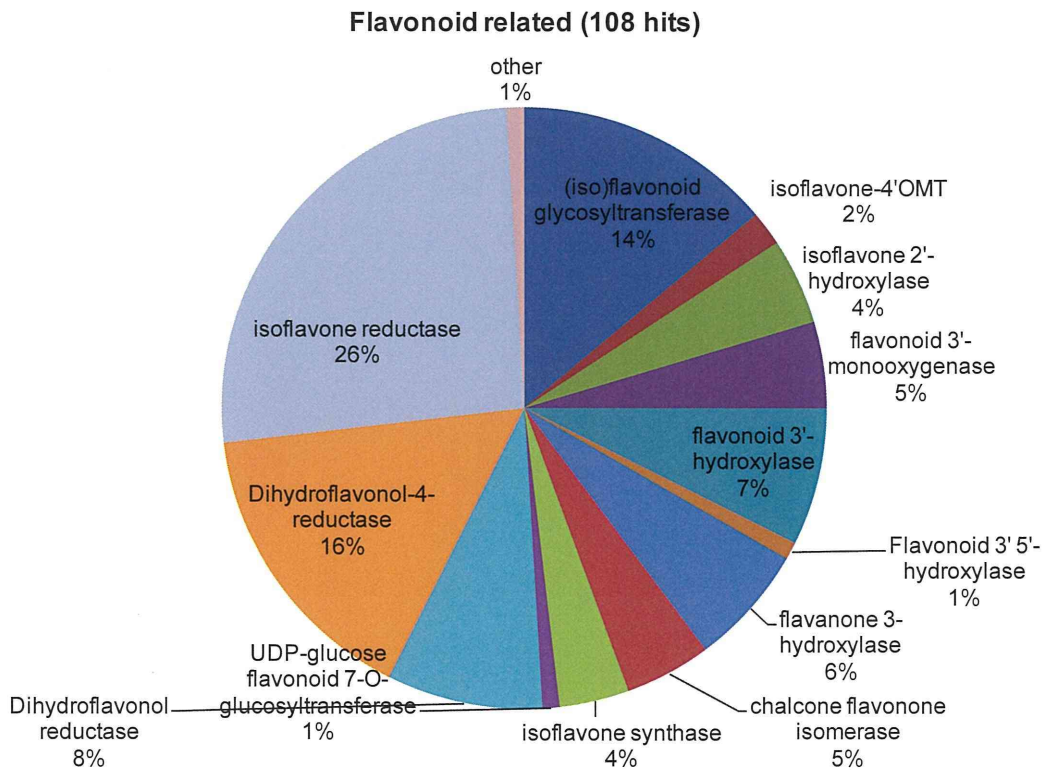


図 6. ウラルカンゾウ EST ライブラリーに含まれるフラボノイド関連遺伝子

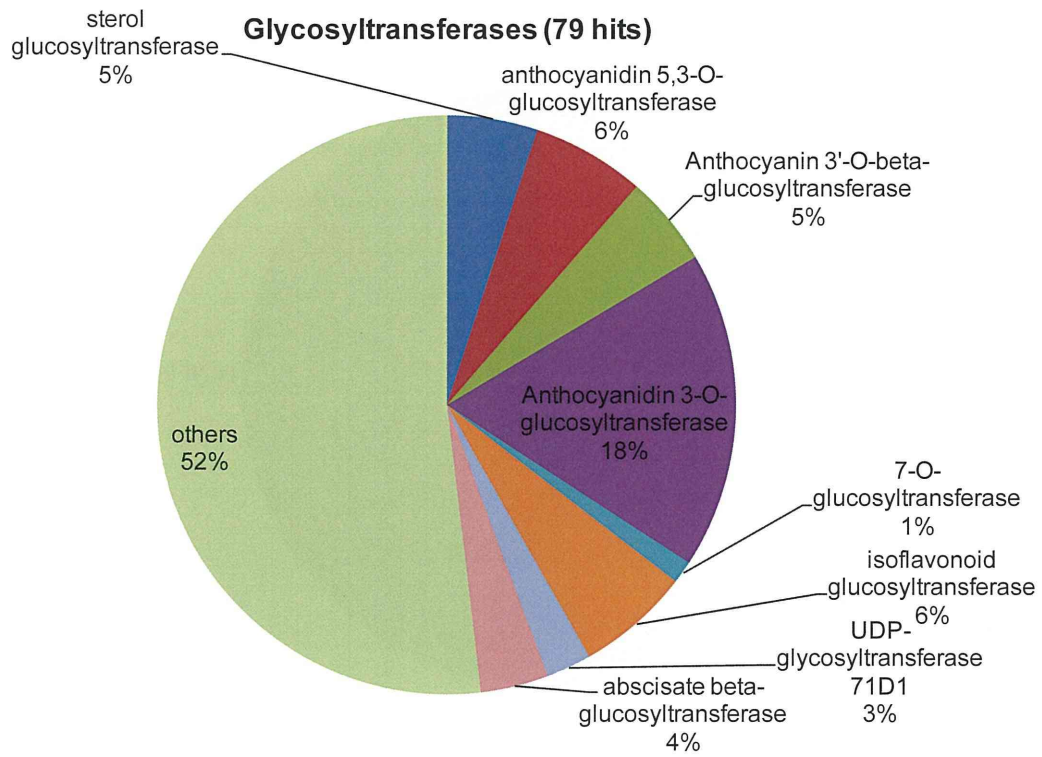


図 7. ウラルカンゾウ EST ライブラリーに含まれる糖転移酵素関連遺伝子

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）
分担研究報告書

分担研究課題：ハイテク生薬生産システム構築

研究分担者 工藤 善 鹿島建設株式会社 上席研究員

要旨 生育速度と薬用成分含量を高め、生産効率を向上させることを目的として、以下の試験を実施した。ウラルカンゾウ（GuIV1 および GuIV2）苗を温室環境（太陽光）下で栽培し、収穫適期が7月頃から12月までであることを明らかとした。次いで、人工環境（人工光）下で栽培し、地上部および地下部の生育に適した光環境（例：明期 16 h d⁻¹、PPF 230-350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）および培養液温度（25℃）を明らかとした。また、収穫前のUV-B照射や低培養液温度（15℃）、収穫後の貯蔵温度[グリチルリチン酸（GL）とリクイリチン（LQ）は-30~-13℃、リクイリチゲニン（LG）とイソリクイリチゲニン（ISLG）は4~25℃]、乾燥温度（30~40℃）によって、根の主要な薬用成分濃度を高められることを明らかとした。さらに、循環水量を変化させた水耕栽培試験を行い、循環水量 16 L min⁻¹が生育には適していることが判明したが、収穫量や薬効成分濃度も含めた総合的な判断が必要である。

研究協力者

後藤英司 千葉大学大学院園芸学研究科
教授

彦坂晶子 同 准教授

A. 研究目的

生育速度及び薬用成分含量向上の検討

ウラルカンゾウの生育速度と薬用成分含量を高め、生産効率を向上させることを目的として、ウラルカンゾウ（GuIV1 および GuIV2、以下 IV-1 および IV-2）苗の温室環境下での収穫適期（試験①）、人工環境下での地上部および地下部の生育・薬用成分濃度を高めるのに適した光環境（試験②）および培養液温度（試験③）を探索した。また、収穫前の紫外線（UV）照射（試験④）および収穫後の貯蔵および乾燥温度が根の主要な薬用成分濃度に及ぼす影響（試験⑤）について調査した。

水耕栽培における水耕液循環量の検討（試験⑥）

ウラルカンゾウの水耕栽培では、根を肥大成長させるために深い水槽を用い、水耕液をポンプにて循環させて栽培を行っている。水耕液の循環は水耕液中に酸素を供給する役目があり、トマトでは循環水量が多いほど生育が旺盛になることが知られている¹⁾。ウラルカンゾウの水耕栽培においても生育の促進が期待できるが、循環水量が大きすぎると流速が早くなり、根にストレスが掛かり、生育が抑制されることも考えられる。一方でグリチルリチン酸などの二次代謝産物産生のためには、ストレスを与えることが優位に働く可能性もある。そこで、水耕栽培液の循環水量を変えることにより、生育や二次代謝産物産生に最適な循環水量を検討した。

B. 研究方法

試験① 自然光下での収穫適期の探索

温室でみられるウラルカンゾウの冬枯れに着目し、12月から翌年7月のウラルカンゾウ (IV-1またはIV-2) 苗の生育および薬用成分濃度の季節変動を調査した。挿し木苗を閉鎖型植物生産施設 (人工環境条下; 光源に白色蛍光灯、明期 16 h d^{-1} 、植物群落面上の光合成有効光量子束 (PPF) $350 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、気温 (明期/暗期) $25/20^\circ\text{C}$ 、相対湿度30–70%、 CO_2 濃度 $1000 \mu \text{ mol mol}^{-1}$) で8ヶ月間、湛液水耕で育苗し、ロングポットに移植して温室で栽培し、毎月収穫調査を実施した。

試験② 明期および光強度の影響

人工環境条下において、試験①と同様の環境条件で9ヶ月間育苗したウラルカンゾウ (IV-2) 苗を明期16または明期 24 h d^{-1} 、および日積算光量 (DLI; 明期 \times PPF) を2水準 (DLI 20または $26 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) 組み合わせた4区で50日間栽培した。

試験③ 培養液の温度 (液温) の影響

人工環境条下において、試験①と同様の環境条件で4ヶ月間育苗したウラルカンゾウ (IV-2) 苗を供試した。試験区は試験期間中の液温をそれぞれ15、20、25および 30°C とした T15、T20、T25 および T30 区とした。液温以外の環境条件は育苗時と同様とした。試験期間は30日間とした。

試験④ 収穫前のUV照射の影響

人工環境下において、試験①と同様の環境条件で3または8ヶ月育苗したウラルカンゾウ (IV-2) 苗の地上部に蛍光灯に加え明期中に紫外線 (UV-A および UV-B) を照射した。対照区は蛍光灯のみ照射した。UV 単独照射では、UV-A を3または 6 W m^{-2} で12または6日間照射した AL および AH 区、UV-B を0.4 または 0.8 W m^{-2} で12または6日間照射した BL または BH 区とした。UV-A と B の混合照射では、上記の照射強度の組合せで、ALBL 区 (20日間)、ALBH 区 (10日間)、AHBL 区 (10日間)、AHBH 区 (5日間) とした。

試験⑤ 収穫後の貯蔵・乾燥温度の影響

ウラルカンゾウ (IV-2) 苗の根の収穫後の貯蔵温度 (-80 、 -30 、 -13 、 4 、 25°C) と貯蔵期間 (1~4週間)、ならびに乾燥温度 (30 、 40 、 50 、 60°C 、すべて5日間) を変え、根中の薬用成分濃度を調査した。

試験⑥ 水耕栽培における水耕液循環量の検討

供試苗 (IV-1) はパーミキュライトにて挿し木、発根した個体を水耕栽培に移行後、約2ヶ月養生した苗を用い、1試験区あたり4個体とした。栽培は温室内で、最低気温が 15°C 以下にならないように制御した。また、短日条件下にならないように10~3月は補光 (植物上部で $100\text{--}120 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) を行い、明期時間を12時間以上に維持した。

栽培装置は $150\text{mm} \times 720\text{mm} \times 500\text{mmH}$ の栽培槽と $270\text{mm} \times 750\text{mm} \times 300\text{mmH}$ の貯水槽からなり、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプにて水を循環した (図10、11)。

ポンプは60分稼働した後、5分間停止することにより栽培槽の水位を下げ、根が空気に暴露する時間を設けた。

塩ビパイプの栽培槽供給口にディヒューザー (空気混入器) を取り付けることにより、エアレーションを行った。このエアレーションにより、全ての試験区で酸素飽和度が90%以上となった (表1)。

循環ポンプは観賞魚用の水中ポンプ (カミハタ製・リオプラスパワーヘッド1400、1700、2100、2500、3100) を用いた。この水中ポンプの機種 (能力) を変えることにより循環流量を5試験区 (13、14、16、17、 20 L min^{-1}) 設定した。

水耕液条件は表2の条件で行い、供試苗は8月に定植した。

C. 研究結果

試験① 自然光下での収穫適期の探索 (図1、図2)

12–2月に生育および薬用成分濃度 (グリチルリチン酸 (GL)、リクイリチン (LQ)、

リクイリチゲニン (LG)、イソリクイリチゲニン (ISLG) が低下し、3月から出葉を開始して7月に生育および薬用成分濃度が大きくなった。よって、温室栽培(太陽光)で冬季の生育の低下に伴い薬用成分濃度が低下することが明らかとなり、生育が低下する直前の12月または生育が旺盛となる翌年の7月以降に収穫するのが良いと考えられた。

試験② 明期および光強度の影響(図3、図4)

地上部の生育を高めるためには明期16 h d⁻¹ (L16-350区、L16-450区) が好適であること、LGおよびISLG濃度を高めるためには明期24 h d⁻¹ (L24-230区、L24-300区) が好適であること、GLおよびLG濃度を高めるためにはDLIの増加は不適であることが示唆された。

試験③ 培養液の温度(液温)の影響(図5、図6)

液温15–30°C、35日間の試験で、15°Cで他の液温条件より生育は小となったが、薬用成分濃度は大となった。そのため、液温の低温処理は長期の栽培には不適で、収穫前の30日程度の処理として行うことが良いと考えられた。

試験④ 収穫前のUV照射の影響(図7)

UV-BまたはUV-A・UV-B混合光を5~10日間照射することで、根の成長は抑制されないが、薬用成分GL、LQ、LG、ISLGが対照区より約50–350%高まった。

試験⑤ 収穫後の貯蔵・乾燥温度の影響(図8、図9)

GLとLQ濃度は-30°Cまたは-13°Cで1-2週間貯蔵すると、貯蔵せずに凍結乾燥させた対照区より4%~13%高まった。LG濃度は4°Cで2週間貯蔵すると対照区より約60倍近く高まり、ISLG濃度は25°Cで1週間貯蔵すると対照区より10倍高まった。

乾燥温度は30°Cまたは40°Cとすることで、凍結乾燥させた対照区よりもGLおよびLQ濃度を低下させずにLGおよびISLG濃度を

高められた。収穫後の貯蔵や乾燥温度を制御することで、目的や用途に合わせて成分濃度を変化させられることが示唆された。

試験⑥ 水耕栽培における水耕液循環量の検討

薬用成分含量を高める試験結果①より、十分な葉量がある状態で収穫するのが適切であることから、4月以降に収穫することとして、今年度の報告では非破壊にて測定を行うこととした。生育量の推移を調査するために根頭部根径の月1回の測定と根頭部根径、生重量、根長の測定を3月に行った。

供試苗の開始時の大きさがばらついているために、これらの実測値では生育比較ができないので、試験開始時の測定値との増加割合による成長率にて比較することとした。

(1)栽培経過：9月より旺盛に生育したが、11月上旬より落葉が始まり、1月中旬には10月までの茎葉が全て脱落した。新芽は12月より出芽し、2月には地上部の回復がみられたが、3月の測定時点では旺盛な生育には至っていなかった。

(2)生育量の推移(図12)：旺盛に生育した9、10月は根径の成長率も高かったが、落葉の始まった11月より成長率は鈍化し、2月まで継続している。

(3)試験開始8ヶ月後の生育量の比較(図13~15)：根頭部根径、生重量、根長のいずれも有意な差は見られなかった。根頭部根径では、16 L min⁻¹が最大となり、生重量でも同様な傾向を示した。根長は14-16 L min⁻¹では大きな差はないが、17 L min⁻¹が以上は、成長率が低くなった。

D. 考察

試験① 自然光下での収穫適期の探索

調査した全ての薬用成分濃度は5月以降に他の月と比べ上昇する傾向を示し、これは地上部の生育が旺盛となり、光合成産物の地下部への転流量が増加するためと考えられ