

月 30 日現在で Gu1V1 が 3 個体、Gu1V2 が 2 個体、Gu#11 が 3 個体、Gu71#1 が 3 個体、Gu71#12 が 3 個体、Gu71#31 が 3 個体合計 17 個体の生存株を認めた（表 2）。

D. 考察

今回、養液栽培で育成したウラルカンゾウ優良株から得た地上茎挿し木苗の移植試験の結果、18 個体の内 17 個体の生存が認められ、露地栽培への移行が可能と思われた。しかし、今後、養液栽培から露地栽培への移行際、馴化の過程を経ることで、より効率的な移行ができると思われた。

E. 結論

養液栽培で得られたウラルカンゾウ優良株の地上茎挿し木苗が、露地栽培で利用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

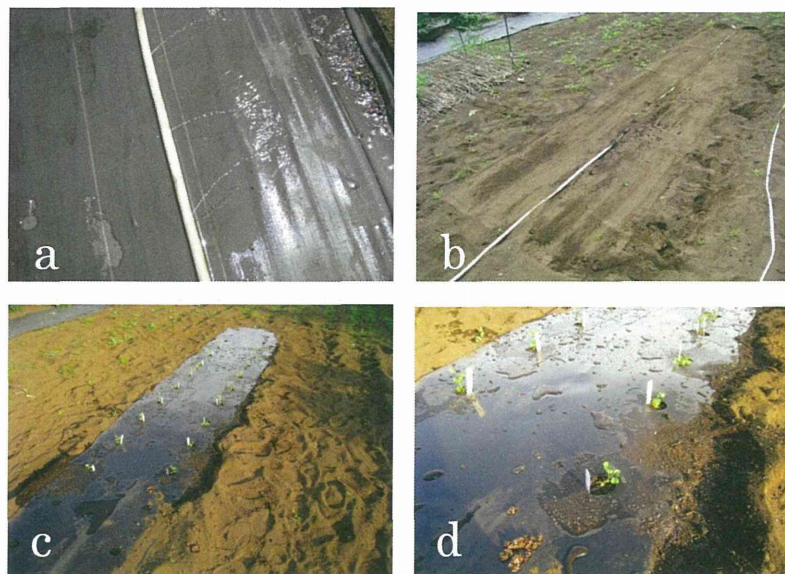


図 1. 養液栽培で育成したウラルカンゾウ優良株の地上茎挿し木苗を用いた露地への定植試験

a 灌水用ホース, b 灌水用ホースを畝の中央に設置, 灌水は基本的に朝夕 2 回 20 分とした. c マルチの被覆, d 6 系統各 3 個体総数 18 個体の地上茎挿し木苗を定植. 条間 45cm, 株間 30cm, ちどり状に定植(2013 年 7 月 19 日).

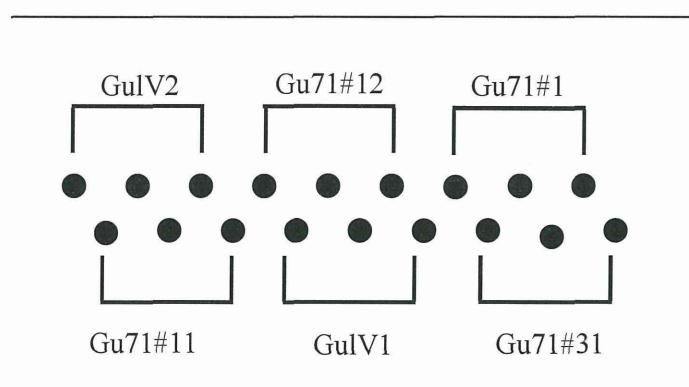


図 2. ウラルカンゾウ優良株 6 クローン各 3 個体の定植位置

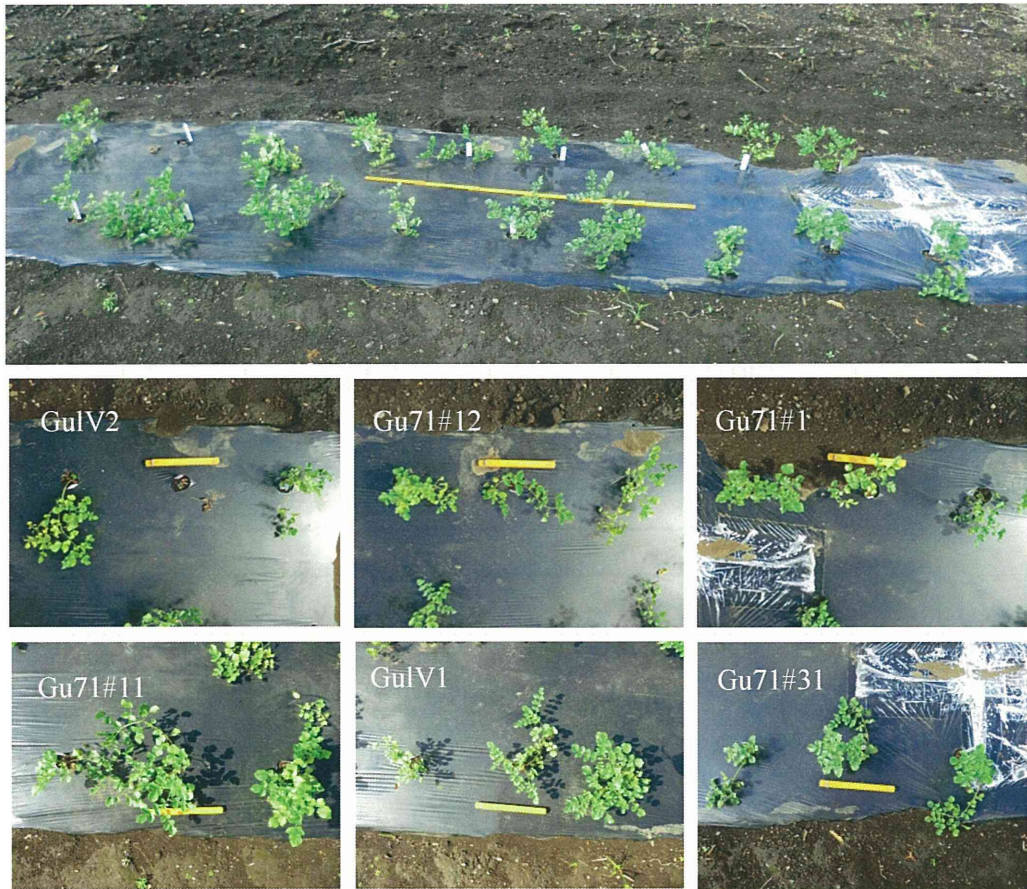


図3. ウラルカンゾウ優良株6クローン各3個体の移植後の生育状況
(2013年10月3日時点)

表 1. ウラルカンゾウ優良株挿し木苗のクローンと苗数

クローン	苗 数
GuIV1	3
GuIV2	3
Gu#11	3
Gu71#1	3
Gu71#12	3
Gu71#31	3
計	18

表 2. ウラルカンゾウ優良株移植個体の生存個体数*

クローン	苗 数	生存個体数
GuIV1	3	3
GuIV2	3	2
Gu#11	3	3
Gu71#1	3	3
Gu71#12	3	3
Gu71#31	3	3
計	18	17

* 2013年12月30日現在

平成25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：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

—「甘草」等の種苗生産システム構築—

研究分担者 吉松嘉代 （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 育種生理研究室長

要旨 重要な漢方薬原料生薬である甘草（特にグリチルリチン含量が多いウラルカンゾウ4クローン）及び、麻黄（組織培養物由来のシナマオウ1クローン）について、光独立栄養培養による効率的な挿し木増殖法について検討を行った。炭酸ガス濃度と光強度条件が発根に及ぼす影響について調査した結果、炭酸ガス1,000ppm、光強度10,000 lux条件において、4クローン全ての甘草で発根率78%以上、麻黄では50%の発根率を達成した。さらに、麻黄においては、培養時の培地に酸化型グルタチオン50 mg/Lを添加することにより、68%の発根率が得られた。

研究協力者

根岸直希 日本製紙株式会社研究開発本部
アグリ・バイオ研究所 主査
小川健一 岡山県農林水産総合センター
生物科学研究所植物レドックス
制御研究グループ グループ長

A. 研究目的

グリチルリチン含量が多い4クローンの甘草（ウラルカンゾウ）GuTS71-08IV2、GuTS71-08IV1、Gu2-2-1、Gu2-3-2、及び、組織培養物由来の麻黄（シナマオウ:Es611L1）において、育成と経済性・汎用性を考慮した挿し木増殖技術について検討した。

B. 研究方法

4クローンのウラルカンゾウ及び、シナマオウの組織培養物（培養シュート）は独立行政法人 医薬基盤研究所より譲渡を受けた。

それらより挿し穂を採取し、発根培養を行った。培養条件は25℃、16時間明期、IBA 2 mg/L添加、1/5B5液体培地（無糖）をオアシスに湿潤したものを培地として使用し、炭酸ガス濃度を1,000ppmに制御し、光強度350 luxもしくは、10,000 lux条件下における発根率の違いを調査した。また、シナマオウでは、酸化型グルタチオン（興人）50 mg/Lを培地に添加し、同様に発根率の違いを調査した。発根率の調査は、ウラルカンゾウは3週間後、シナマオウは2ヶ月後に行った。

C. 研究結果

炭酸ガス1,000ppm、光強度10,000 lux条件下において、各ウラルカンゾウクローンで高い発根率を示した（GuTS71-08IV2:80.0%、GuTS71-08IV1:78.2%、Gu2-2-1:85.0%、Gu2-3-2:91.5%、図1）。また、シナマオウにおいても50%の発根率となった（図2）。さ

らにシナマオウについて、酸化型グルタチオン 50 mg/L 添加の効果を調べた結果、68%の発根率となった（図 3）。

D. 考察

発根には光合成活性の増加が重要であることが、日本製紙のこれまでの研究により明らかとなっている。今回、炭酸ガス濃度 1,000ppm、光強度 10,000 lux 条件において、ウラルカンゾウ及びシナマオウで高い発根率を示したことから、これら植物の光合成能力が増加したことによって、発根が促進された可能性が示唆された。さらにシナマオウにおいて、酸化型グルタチオン添加により顕著な発根率上昇が認められたことは興味深い。今後、各条件下の光合成活性を測定し、検証することになっている。

E. 結論

ウラルカンゾウ及びシナマオウ（培養シュート）の挿し木増殖に取り組んだ結果、炭酸

ガス濃度 1,000ppm と光強度 10,000 lux が挿し木増殖の条件に適していることを見出した。また、酸化型グルタチオン 50 mg/L 添加は、シナマオウ挿し木に有効であることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し。

2. 学会発表

無し。

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：2013-109139

発明者：根岸直希、浦田信明、大島玲子、河岡明義

特許出願人：日本製紙株式会社

発明の名称：挿し木苗の生産方法

出願日：2013 年 5 月 23 日

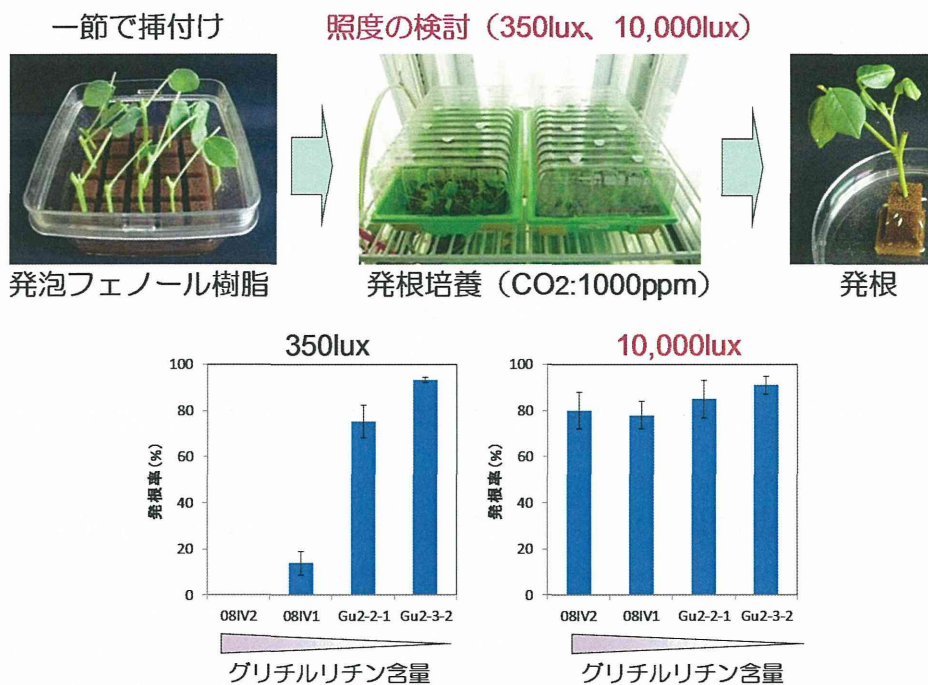


図1 甘草の挿し木試験結果

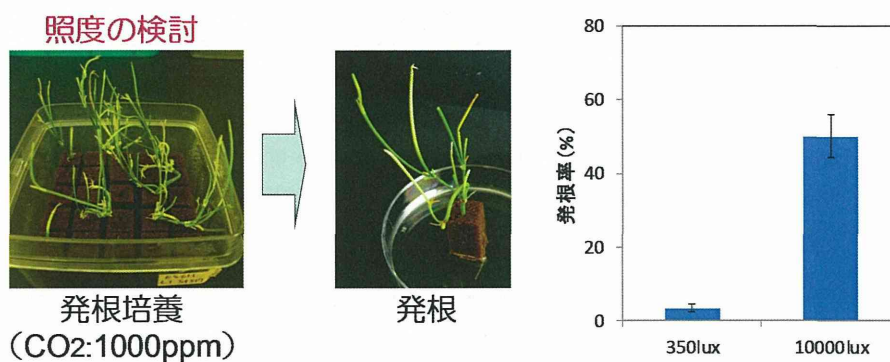


図2 麻黄の挿し木試験結果

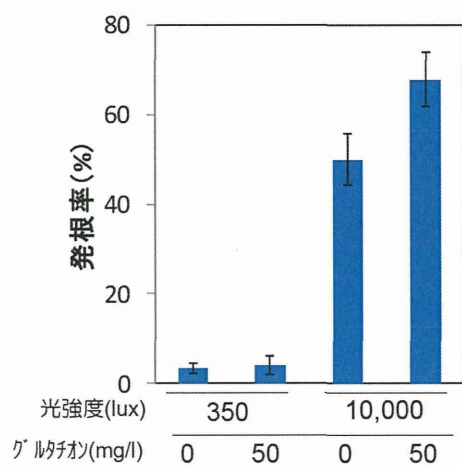


図3 麻黄の挿し木に対するグルタチオンの効果

平成25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：人工水耕栽培システムによる生薬の生産と化学的・遺伝的安定性
に関する研究

—遺伝子情報を活用した薬用植物の有用物質生産性向上に関する研究—

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 人工水耕栽培システムによる生薬原料植物の生産のためには、人工水耕栽培に適した形質や、有用物質の高生産能を有する優良系統の選抜、並びに、栽培条件やコストといった各種制限下における有用物質生産の高効率化が重要な課題となる。本研究では、効率的なグリチルリチン酸 (GL) 生産に寄与する基盤情報を整備することを目的とし、GL 生合成酵素遺伝子の配列多型を利用した優良系統等の遺伝子識別法の開発、並びに、ウラルカンゾウ挿し木苗の根を材料とした GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析を行った。遺伝子識別については、これまでにカンゾウ属植物間及びウラルカンゾウ優良系統株間の識別法を開発していたが、本年度は、*CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン7の塩基配列情報を用いた、より高精度なカンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発に成功した。また、ウラルカンゾウ優良株挿し木苗における GL 生合成遺伝子群の発現解析では、根の径が太い根基部の方が、径の細い根端部と比較して各遺伝子の発現量が高い傾向があることが明らかになった。

研究協力者

吉松嘉代 （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 育種生理研究室長
乾 貴幸 同 特任研究員
寺岡秀興 同 特任研究員
田村幸吉 丸善製薬株式会社研究開発本部
甘草研究所 所長
新穂大介 同 甘草研究課 主任

あるグリチルリチン酸 (GL) は、抗炎症作用等に加え、強い甘みを有することから、医薬品、化粧品、甘味料など幅広い用途に用いられている。カンゾウの生産は、海外からの輸入、特に野生植物の採取に強く依存しているが、乱獲による環境破壊や資源の枯渇が顕在化しつつある。そのため、甘草を安定供給するための栽培法の開発や優良株の選抜などが精力的に行われており、厚生労働科学研究費「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」研究班においても、生薬甘草の安定供給に向けた資源確保のため、基原植物のひとつであるウラルカンゾウの水耕栽培法を確立し、その実用化に向けた実証的研究を進

A. 研究目的

ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (Gu)) の地下部の乾燥物は、緩和作用や止渴作用等を有することから、多数の漢方薬に配合されている。また、その主成分で

めている¹⁾。

人工水耕栽培システムによる生薬原料植物の生産において、重要な課題となっているのが、人工水耕栽培に適した形質や、有用物質の高生産能を有する優良系統の選抜、並びに、栽培条件やコストといった各種制限下における有用物質生産の高効率化である。そこで、本分担研究では、効率的なグリチルリチン酸(GL)生産に寄与する優良株の選抜、そしてGL生合成遺伝子群の発現情報に関わる基盤情報の整備を目的とし、GL生合成酵素遺伝子の配列多型を利用した優良系統等の遺伝子識別法の開発、並びに、ウラルカンゾウ挿し木苗の根を材料としたGL生合成酵素遺伝子群の発現解析を行った。

本研究の遺伝子識別法開発においては、優良株の識別・保護のため、水耕栽培に適し、高GL含有量を示すウラルカンゾウの優良株をモデルとして、GL生合成酵素遺伝子(図1)を用いた迅速かつ簡便なカンゾウ属植物(図2、表1)の遺伝子識別法の開発を行った。本遺伝子識別法開発研究では、一般によく用いられる生物全般に普遍的に存在する遺伝子(核リボソームDNAのITS領域、葉緑体DNAの*trnK*遺伝子、*matK*遺伝子、*rbcL*遺伝子等)の塩基配列の変異情報を利用する手法ではなく、有用物質生産に関わる二次代謝酵素遺伝子群のうち、特に鍵酵素と予想される酵素遺伝子に着目し、塩基配列の種間、系統間変異データを集積し、それらの多型情報による植物種、系統、さらには個体間の識別が可能か否かを検討する点を特徴とし、本研究過程で蓄積された生合成酵素遺伝子の多型情報は、有用物質の生産性とリンクした有用物質高生産株選抜のための育種マーカーとしての利用の可能性も期待される。

また、本研究ではGL生合成遺伝子群の発現解析に取り組むが、ウラルカンゾウのみならず、二次代謝物質を中心とする薬用植物の有用物質の生産制御に寄与する環境等の要因については知見が限られており、環境を人為的に操作し薬用植物を栽培するシステムを構築する上で、これらについて新たな知見を得ることの意義は大きい。

B. 研究方法

B1. カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発 分析甘草試料

表1および図2に示す *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (Gu)、*G. glabra* L. (Gg)、*G. inflata* Batalin (Gi) を含むカンゾウ属植物の乾燥根、もしくは、乾燥ストロン、22試料について、それぞれ、独立した3-4切片(この切片が独立した個体由来か、同一個体由来かは不明)より、75%エタノールで洗浄したメス、解剖鋏、ピンセット等を使って、それぞれ200-400 mgをサンプリングした。このうち、試料①に関しては、同一試料を分割し、一部は遺伝子解析に、残りの一部は、成分分析に用いた。

各甘草試料中のCYP88D6相同遺伝子ゲノム DNA配列(イントロン7部分配列)の増幅

各試料より20-50 mgを2.0 mL容滅菌凍結保存チューブ(ワトソン)に取り、ステンレスビーズ(φ4.8 mm、トミー精工)2個とともに、液体窒素で凍結後、ビーズ破碎装置Micro Smash MS-100(トミー精工)を用いて、3,000 rpm、60秒間の条件で1回破碎し、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いて、付属のマニュアルに従って、ゲノムDNAを抽出した。次いで、得られたゲノムDNAを鋳型とし、GoTaq Green Master Mix(Promega)を用いて、下記条件にてPCRを行い、増幅産物は1%アガロースゲル電気泳動により確認した。

(PCR条件)

- ・PCR機器：2720 Thermal Cycler (ABI)
- ・反応液組成：GoTaq Green Master Mix：7 μL、100 μM CYP88D6 intron7 Forward (Fw) primer：0.1 μL、100 μM CYP88D6 intron7 Reverse (Rv) primer：0.1 μL、genome DNA：1 μL、滅菌水：5.8 μL [total：14 μL]
- ・反応条件：94℃ 2 min → (94℃ 30 sec、60℃ 30 sec、72℃ 30 sec) × 35 cycle → 72℃ 5 min → 4℃∞

(プライマー配列)

・CYP88D6 intron7 Fw:

5'-tagtgcctttaagcacatgg-3'

・CYP88D6 intron7 Rv:

5'-tcacgcgtataattgtagcactc-3'

PCRダイレクトシーケンスを用いた各甘草試料中のCYP88D6相同遺伝子のイントロン7配列の遺伝子型の解析

PCR 産物 4.0 μ L に対して、illustra ExoStar (GE healthcare) の Exonuclease I 及び Alkaline phosphatase を、それぞれ、0.5 μ L ずつ加え、37°C で 30 分間、80°C で 15 分間反応し、未反応のプライマー等を除去した。ExoStar 反応液のうち 2 μ L を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてマニュアルに従い、CYP88D6 intron7 Fw、あるいは、Rv プライマーにより cycle sequence 反応を行った後、Fast gene Dye Terminator 除去キット (日本ジェネティクス) で精製し、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer (ABI) を用いて塩基配列を解析した。

甘草試料中の二次代謝物の HPLC 分析

甘草試料 (表 1 の①、22 サンプル) をビーズ破碎装置、あるいは、乳鉢・乳棒を用いて粉末にまで破碎し、そのうち約 50 mg を精密に秤量後、50% エタノール 7 mL を正確に加え、超音波洗浄機で 30 分間、ボルテックスミキサーで 1 分間抽出した。抽出液を 4,500 rpm で 3 分間、遠心分離した後、上清 300 μ L を ultrafree-MC (Millipore) に取り、15,000 rpm、20°C で 1 分間遠心濾過した。その上清 5-20 μ L を以下の条件で HPLC 分析に供し、グリチルリチン酸 (GL)、リクイリチン (LQ)、イソリクイリチン (IL)、グリシクマリン (GC)、グラブリジン (GB) の定量を行った。

(HPLC 条件)

装置: ALLIANCE HT (Waters)

カラム: TSKgel ODS-100V (TOSOH、径 4.6

mm×250 mm、5 μ m)

移動相: (溶媒 A) 1% 酢酸、(溶媒 B) アセトニトリル、0-21 min: 20-76% B, 21-22 min: 76-100% B, 22-24 min: 100% B, 24-25 min: 100-20% B

流速: 1.0 mL/min、カラム温度: 40°C

検出: 254 nm (定量)、200-400 nm (定性)

B2. GL 生合成遺伝子群 (図 8) の発現解析 ウラルカンゾウ無菌培養物 (ESTライブラリー構築用試料)

ウラルカンゾウ優良株 GuTS71-08#11 (枝番: 1-1、培地略号: MES(1)IB0.1、培養期間: シュート植え継ぎ後約2ヶ月、以下Gu#11) 及びGu2-3-2 (培地略号: WPG、培養期間: シュート植え継ぎ後約2ヶ月) の2クローン (図9) を材料とした。培養条件は、温度23°C、14時間明、10時間暗である。

ウラルカンゾウESTライブラリーの解析

ウラルカンゾウ無菌培養物2クローンより調製したtotal RNAについてそれぞれ、かずさDNA研究所において、*de novo*トランスクリプトーム解析を行った。以下にその概要を記す。

試料のtotal RNAより次世代シーケンサー用試料を調製し、Hiseq1000 (Illumina) を用いペアエンド (2×100 bp) の解析を行った。ここで得られた配列情報をQualityおよびlength (49 base cut) でtrimmingし、公開ESTデータとして整理するとともに、*de novo* アセンブリに供した。ここで、同一植物種・複数系統の場合はリードを混合してcontigを作製した。

作製されたcontigデータについて、150 bp 以下のもの及び公開ESTデータに含まれないものを除外し、得られたユニークな配列をunigeneとし、Blastxによる機能アノテーションを行った。

さらに、同一植物種・複数系統の試料の場合はcontig配列情報について発現量の目安となる Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads (RPKM) 値*の算出を行った。

*RPKM値：各遺伝子に対するシーケンス配列 (read) 数を遺伝子発現量として換算する際、総read 数が100万 (one million) かつ各遺伝子の配列長を1,000塩基 (one kilobase) として正規化した値。

ウラルカンゾウ挿し木苗 (遺伝子発現解析用)

GuIV1、GuIV2、Gu#11各クローン水耕栽培株の地上部よりバーミキュライトに挿し木したもの (図10) を材料とした。栽培条件は下記のとおり。

灌水：アラシステム底面灌水

施肥：マグアンプK中粒 (ハイポネックスジャパン) 5 g/ トレイ、月1回

閉鎖温室2にて栽培 (温度25℃、相対湿度60 %、照明明期16時間、補光照明使用)

栽培期間及びtotal RNA調製時の植物体の地上部高及び根長は表4のとおりである。

ウラルカンゾウからのtotal RNAの調製

ウラルカンゾウ挿し木苗の根はMilli-Q水で洗浄したのち、図10に示すように、上部 (地上部基底部直下) と中下部 (中央から下の部分) に分け、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) でtotal RNAを調製した。

根試料約100 mgをステンレスボール2個及び、buffer RLT 600 μ L、 β -ME 6 μ Lと共に2mLチューブに入れMS-100で3,000 rpm x 2回粉碎を行った。以後キットのプロトコルに従い調製を行い、最終的に60 μ Lのtotal RNA溶液を得た。このtotal RNA溶液の2 μ Lを使用し、分光光度計ND-1000 (Thermo) を用い、吸光スペクトルの測定を行い品質及び濃度の確認を行った。また、同溶液の3 μ Lをアガロースゲル電気泳動に供した。

得られたtotal RNAはTURBO DNA Free (Ambion) でDNase処理し、total RNAとして350 ngをRT-PCR及び定量real-time PCRに使用した。

GL生合成酵素遺伝子発現解析用プライマーセット (半定量RT-PCR)

半定量的RT-PCRにはSekiらの報告²⁾に記載

のプライマーセットを使用した。*CYP72A154*用のプライマーについてはgenome DNAのコンタミネーションの影響を受けないよう、*CYP72A154*のExon4とExon5のボーダー上でプライマーCYP72A154-1131Sを設計した。

[1] bAS RT-PCR primers

GubAS-sense: 5' -ATCAATGTTGCCTCCAGAGAT TGTGGG-3'

GubAS-antisense: 5' -GTGCTCACACAGCTTTT AAGTTAAAC-3'

[2] CYP88D6 RT-PCR primers

GuCYP88-sense: 5' -ACCCGTTGTGGATGAAAGG CGGTTGAT-3'

GuCYP88-antisense: 5' -CTAAGCACATGAAAC CTTTATCACCT-3'

[3] CYP72A154 RT-PCR primers

GuCYP72-sense: 5' -AAGCACCGATGACGACTTA T-3'

GuCYP72-antisense: 5' -TTACAGTTTATGCAG AATGATGGGTGCC-3'

CYP72A154-1131S primer (Exon4-5

border): 5' - AGGTCGCCTCAAAATTGTAAC-3'

[4] β -tubulin RT-PCR primers

GubTub-sense: 5' -CGTGGGTCACAGCAATACAG GGCT-3'

GubTub-antisense: 5' -CCTCCTGAACTTCTTC CTCGTCTTC-3'

GL生合成酵素遺伝子発現解析用プライマーセット (定量realtime-PCR)

GuIV1のESTライブラリーのグリチルリチン生合成酵素遺伝子相同遺伝子について定量real-time PCR用プライマーをPrimer Express Software (Life Technologies) を用い設計した。設計したプライマーの配列を表5に示す。

半定量的RT-PCR

各クローンの根試料より調製したDNase処理済みtotal RNAについて、逆転写酵素にSuperscript III (Invitrogen)、PCRにExTaq (TakaraBio) を使用し、RT-PCRを行った。

PCRサイクル数は*CYP88D6*のみ35 cycleで、

他は30 cycleで行った。なお、コントロールには恒常的に発現する β -tubulinを解析対象として設定した。PCR反応終了後、反応液はアガロース電気泳動に供し、増幅産物のバンドのサイズ及び強度を解析した。

定量realtime-PCR

各試料より調製したtotal RNA 350 ngを鋳型として、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio)を使用し、逆転写反応を行った。この反応液を5倍希釈したものを試料として、SYBR® Premix Ex Taq™II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio)を用い、定量real-time PCR (反復well数：3)を行った。なお、リアルタイムPCRの機器は ABI PRISM® 7000 (Life technologies)を使用した。各遺伝子の発現量は β -tubulinの発現量を基準とし、 $\Delta\Delta Ct$ 法により求めた。

C. 研究結果

C1. カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発

基原植物として、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi)を含む甘草試料より、ゲノムDNAを抽出し、抽出DNAを鋳型に *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン7部分配列の増幅を行った。その結果、これらPCR産物は、増幅の有無やサイズの違いから、(a) 約 300 bp の増幅が認められる Gu 由来の IV2 タイプ、(b) 約 450 bp の増幅が認められる IV1/g タイプ (増幅サイズだけでは、Gu 由来の IV1 タイプと Gg 由来の g タイプ配列の区別は困難)、(c) a、b 両方の増幅が認められる IV1/g + IV2 タイプ、(d) 増幅が認められないタイプの 4 タイプに分類可能であった (図 3、表 2)。なお、(d) タイプで増幅が認められなかった原因としては、ゲノムDNAの品質等によりPCRが機能しなかった可能性、プライマー設計部位に変異がある可能性 (例：Gu2 タイプ) 等が考えられる

また、基原植物情報が Gg の試料において、これまで Gu に特異的に認められていた IV2 タイプの配列と同サイズの増幅が認められたなど、一部試料で基原植物情報と矛盾する結果が得られた。このことから、異なる基原

植物の混入の可能性、あるいは、これまで得られていなかった新規配列の存在が示唆された。

次いで、得られた PCR 増幅産物について、PCR 産物の一部を精製し、配列解析を行った。PCR ダイレクトシーケンスの結果、図 4 の上段のように単一配列が増幅された試料も認められたが、下段に示すように複数配列が増幅された試料も多く認められた。このような場合、本来であれば、それぞれの増幅産物をクローニング後、シーケンスする必要があるが、これまでの配列解析結果をもとに含まれる配列を推定可能なため、推定配列を混合した際の予測波形と実際に得られたシーケンスの波形データに矛盾がないか検証することにより、含まれる配列を推定した。

塩基配列の解析の結果、*CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン7部分配列の遺伝子型は表 3 に示すように推定され、ほとんどのサンプルで基原植物情報と一致した。しかし、M06-② (基原植物情報：Gi $\leftrightarrow$ 遺伝子型：IV1+IV2)、M10-① (Gi $\leftrightarrow$ IV1+g)、M12-①、② (Gg $\leftrightarrow$ IV1+g)、M21-① (Gu $\leftrightarrow$ g) など、一部で基原植物情報と異なる遺伝子型が検出された

また、今回の分析試料からは、基原植物情報が Gg の試料の一部より新規配列として、従来得られていた Gg の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン7部分配列 (g1) と比較し、約 120 bp の欠失が認められた配列 (g2)、及び、3 bp の欠失が認められた配列 (g1-3) が得られた (図 5)。

成分分析の結果、すべての試料より、グリチルリチン酸が検出されたが、その含量は、0.7%~6.0% であり、日本薬局方の規格値 2.5% 以上を満たしているのは、22 試料中 12 試料であった。基原植物が Gu の試料に着目すると、規格値を満たす試料は、8 試料中 3 試料であり、そのうち遺伝子型を決定できた 2 試料 (M18-①、M19-①) の遺伝子型は、いずれも、IV1+IV2 タイプであった (図 6、表 3)。

Gu の一部は、特徴的にグリシクマリンを含有することが知られているが⁴⁾、今回分析した Gu 試料の中にグリシクマリンを含有す

る試料は認められなかった。一方で、Gi 試料のうち、2 試料 (M07-①、M10-①) でグリシマリンが検出された。このうち、M10-①の遺伝子型は、IV1+g であった (図 6、表 3)。

Gg は、特徴的にグラブリジン含有することが知られているが^{3,4)}、今回分析した Gg 試料からは、すべてグラブリジンが検出された。さらに、Gi 及び Gu 試料の一部 (M08-①、M09-①、M21-①) からグラブリジンが検出され、特に基原植物情報が Gu の M21-①の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列の遺伝子型は、Gu タイプ (IV1 or IV2) ではなく、Gg タイプ (g1) であった (図 6、表 3)。

C2. GL 生合成遺伝子群の発現解析

ウラルカンゾウ EST ライブラリーの解析

ウラルカンゾウ無菌培養物 2 クローンのリードを混合して得られた全 contig の発現量をプロットしたものを図 11 に示すが、発現量に差のある遺伝子が相当数あることが明らかになった。とくに、グリチルリチン生合成経路の酵素遺伝子の発現量について RPKM 値をもとに検討すると、 β -アミリン合成酵素、*CYP88D6*、*CYP72A154* の酸化酵素 2 種、そしてコントロールの β -tubulin の各クローンの RPKM 値は表 6 のようになり、11 位の酸化に関わる *CYP88D6* が Gu2-3-2 においては発現が検出されなかった。*CYP88D6* はこれらの酵素のなかでも発現量が低いと考えられ、とくに幼植物期における GL 生産量のボトルネックになっていることが示唆された。

ウラルカンゾウ挿し木苗における GL 生合成酵素遺伝子の発現解析

半定量 RT-PCR 解析の結果、*CYP88D6* は部位間での発現量の差が *bAS*、*CYP72A154* と比較して大きいことが判明した (図 12)。

CYP72A154 の約 1 kbp の位置のバンドは、sense primer を Exon4-Exon5 の境界に設定しても同様に増幅が認められるため、antisense primer による非特異的増幅と考えられる。

定量 real-time-PCR の結果 (図 13) も半定量

RT-PCR と同様の傾向を示し、各遺伝子の発現量は、根上部の方が根中下部と比較して高い傾向が認められた。すわなち、根の成長 (太さ) と関係するものと考えられる。とくに、*CYP88D6* は部位間での発現量の差が *bAS*、*CYP72A154* と比較して大きく、GL 生産のボトルネックとなっていると考えられる。

D. 考察

D1. カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発

本年度は、基原植物として、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草 22 ロット・66 試料よりゲノム DNA を抽出し、その多くより *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 の部分配列を取得した。これらの配列中には、Gg 由来の新規イントロン配列が 2 種含まれていた。このうち、一方の配列は、約 300 bp であり、IV2 タイプのイントロン配列と増幅サイズが近いことから、本領域では、PCR の増幅サイズのみで基原植物を判別できないことが判明した。したがって、今後、確実に *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の遺伝子型を IV2 タイプと判定するには、PCR 産物の制限酵素処理、あるいは、配列解析等が必要であると考えられた (図 7)。

Gi 試料 (M06-10) では、PCR の増幅が困難なものが多く、試料の状態からゲノム DNA の抽出が困難である可能性、プライマー設計部位に変異がある遺伝子を有している可能性等が考えられ、今後、*CYP88D6* 遺伝子の別部位、あるいは、*CYP72A154* 等、別遺伝子に対するプライマーを用いて検証する必要があると考えられた。また、以前、昭和大学の磯田先生より御供与いただいた Gi の葉のゲノム DNA からは、Gi 特異的な *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列として、Gg の g1 と 1 塩基異なる配列 (i1) を得ていたが、今回の Gi サンプルからは、i1 を得ることができなかった。従って i1 配列は、昭和大学の株に特徴的な変異であった可能性が考えられ、g1 を有し、i1 を持たない個体も Gg であるとは言えない可能性が明らかとなった (Gg と Gi 両方の可能性あり、図 7)。た

だし、成分分析結果から、Gi サンプルの一部からは、Gu 特徴的成分であるグリシクマリン、あるいは、Gg 特徴的成分であるグラブリジンが検出されており、今後、Gi に特徴的成分であるリコカルコン A^{3,4)} の分析を含め、より詳細な成分分析、あるいは、既に Gi の遺伝子識別において報告のある *matK* 領域⁴⁾ 等、他の遺伝子の配列情報と合わせて植物種を同定する必要があると考えられる。

配列情報を得ることができた 54 試料中 5 試料 (M06-②: Gi ⇔ IV1+IV2、M10-①: Gi ⇔ IV1+g1、MS12-①, ②: Gg ⇔ IV1+g1、M21-①: Gu ⇔ g1) で、基原植物情報と異なる *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列の遺伝子型が検出された。このうち、成分分析の結果から、M10-①では、Gu に特徴的成分グリシクマリンが、また、M12-①、M21-①では、Gg に特徴的成分グラブリジンが検出されるなど、特に、M10-①及び M21-①では、遺伝子型のデータを裏付ける結果が得られた。

以上より、今後、これら基原植物情報と遺伝子型が一致しなかった試料については、より詳細な成分分析や他の遺伝子領域の配列情報と合わせて総合的に基原植物を判断する必要はあるが、本遺伝子領域が、甘草試料中の基原植物の識別 (Gu と Gg) にも有用であることが示された。

D2. GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析

ウラルカンゾウにおける環境因子と GL 生産性の関係については、温度や土壤中の塩濃度等の GL 生産性に与える影響については研究例があるが、GL の生合成に関わる酵素遺伝子レベルでの環境因子との相関を解析した例はない。上記の結果は、ウラルカンゾウの挿し木苗が GL 生合成酵素遺伝子群の発現変動の解析モデルとして使用できることを示すもので、今後、栽培環境因子等と各種遺伝子の発現変動との相関を解析に用いることができると考えられる。

ウラルカンゾウ組織培養物 Gu#11 及び、Gu2-3-2 のトランスクリプトーム解析により Gu2-3-2 において、*CYP88D6* 遺伝子の発現が

検出されなかった。両者は、サンプリング個体の写真を見ると、Gu#11 においては、根の成長は認められるが細根の成長が芳しくないのに対し、Gu2-3-2 においては細根の成長が良い。この形態の差は、細根において *CYP88D6* の発現量が低いという realtime-PCR の解析の結果と矛盾しない。なお、両培養物は、使用する培地が異なっており、とくに植物ホルモンの添加が *CYP88D6* の発現レベルに影響した可能性もある。植物ホルモンの GL 生合成遺伝子群の発現調節に与える影響についても興味深い。

E. 結論

カンゾウ属植物の優良株等の遺伝子識別法開発を目的とし、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草 22 ロット・66 試料について、主成分の GL 生合成の鍵酵素の一つと考えられる *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列の解析を行った。その結果、Gg 由来の新規配列 2 種を含むカンゾウ属植物の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列情報を集積し、より精度の高いカンゾウ属植物の遺伝子識別が可能となった。一部試料では、基原植物情報と異なる遺伝子型が検出されたが、成分分析情報から判定遺伝子型が裏付けられ、本遺伝子領域が、甘草試料中の基原植物の識別 (Gu と Gg) にも有用であることが示された。

また、ウラルカンゾウの根における GL の高効率生産条件の探索を目的とし、ウラルカンゾウ優良株 3 種の挿し木苗の根における、β-アミリン合成酵素遺伝子 (*bAS*)、シトクロム P450 遺伝子 (*CYP88D6* および *CYP72A154*) の 3 種の遺伝子の発現量を、解析、比較した。その結果、根の径が太い根基部の方が、径の細い根端部と比較して、3 遺伝子共その発現量が高い傾向があることが明らかになった。これらの GL 生合成経路の酵素遺伝子の発現量は根の成長 (径) と関係があるものと考えられる。また、上記の結果は、ウラルカンゾウ挿し木苗の根が GL 生合成遺伝子群の環境因子等に因る発現変動の解析モデルとして使用できる可能性を示すものである。

参考文献

- 1) 研究代表者 吉松嘉代、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）総括・分担研究報告書（H24-創薬総合一般-007）「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」（2013）
- 2) Seki *et al.*, *Plant Cell* **23**, 4112-4123 (2011)
- 3) Kondo K., Shiba M., Morota T. and Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.* 30(7) 1271-1277 (2007)
- 4) Kondo K., Shiba M., Yamaji H., Morota T. Zhengmin C., Huixia P. and Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.* 30(8) 1497-1502 (2007)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉松嘉代、乾貴幸：植物工場における薬用植物の栽培・生産. 特産種苗、**16** (9)、35-41 (2013).

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、渕野裕之、川原信夫、工藤善、高橋豊、新穂大介、田村幸吉、大月典子、穂山浩：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. 第6回甘草に関するシンポジウム (2013. 7. 6、札幌)
- 2) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代：新規カンゾウ優良株選抜法. 日本生薬学会第60回年会 (2013. 9. 7-8、札幌)
- 3) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代：ウラルカンゾウ新規優良株の育成. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12、札幌)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

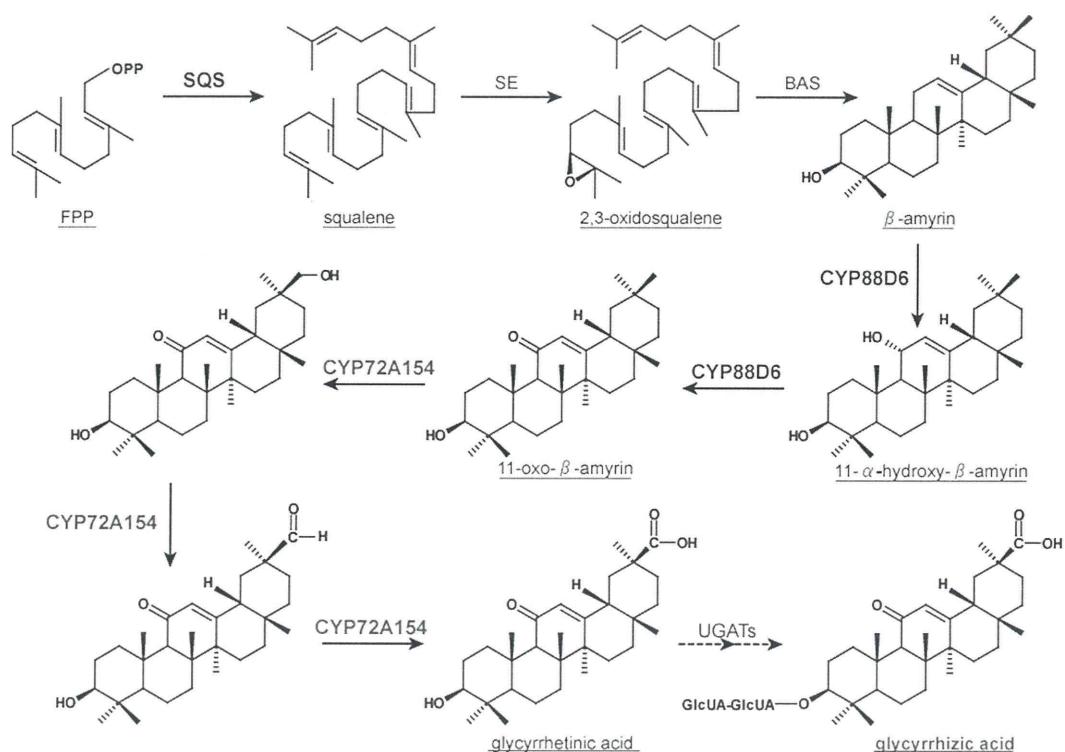


図 1. ウラルカンゾウのグリチルリチン生合成経路

FPP, farnesyl diphosphate; SQS, squalene synthase; SE, squalene epoxidase; BAS, β-amyrin synthase; CYP, cytochrome P450; UGATs, UDP-glucuronosyltransferases.



図 2-1. 分析甘草試料①

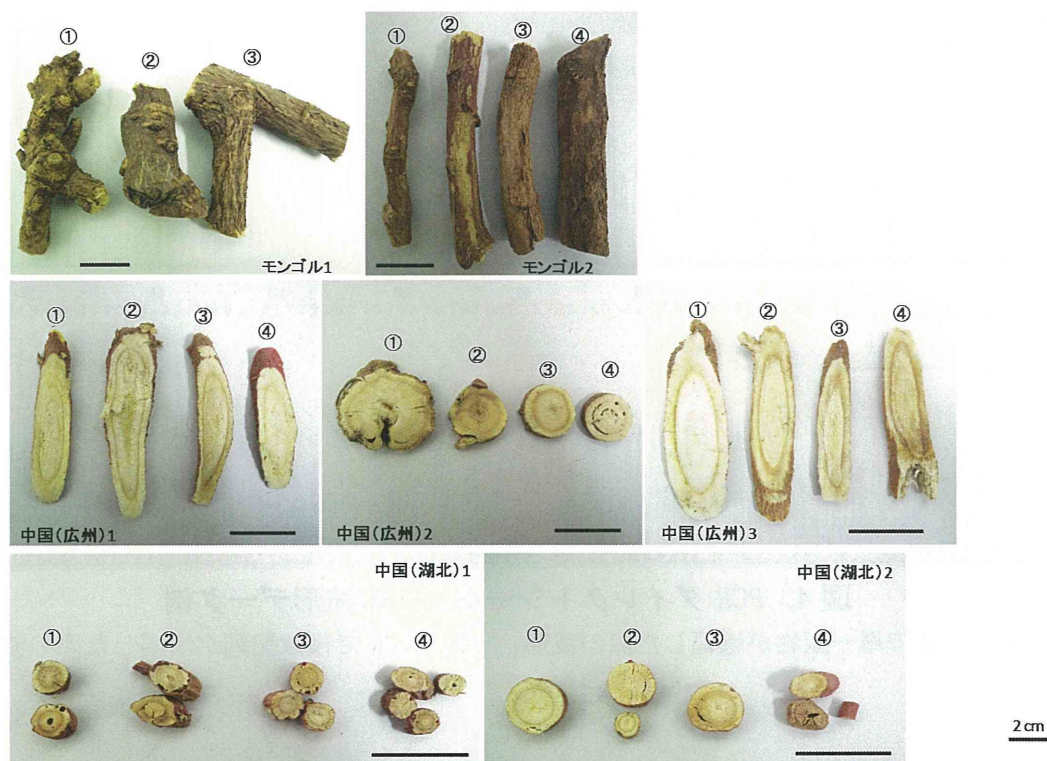


図 2-2. 分析甘草試料②

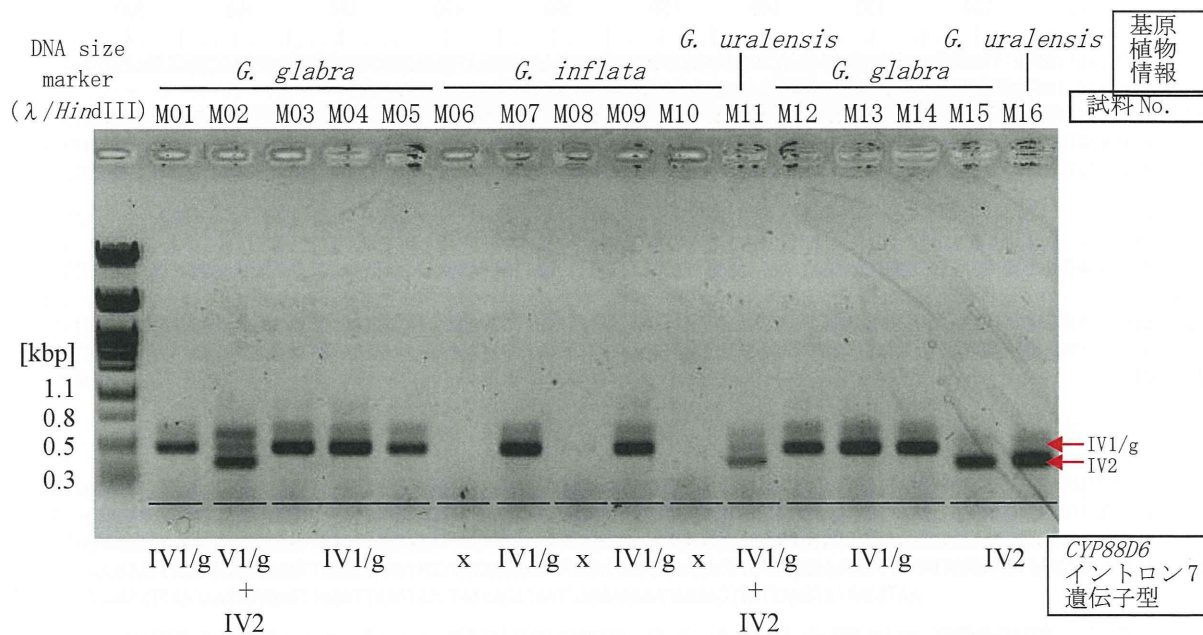


図 3. *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン7部分配列のPCR増幅産物の一例
(M01~16の試料③)

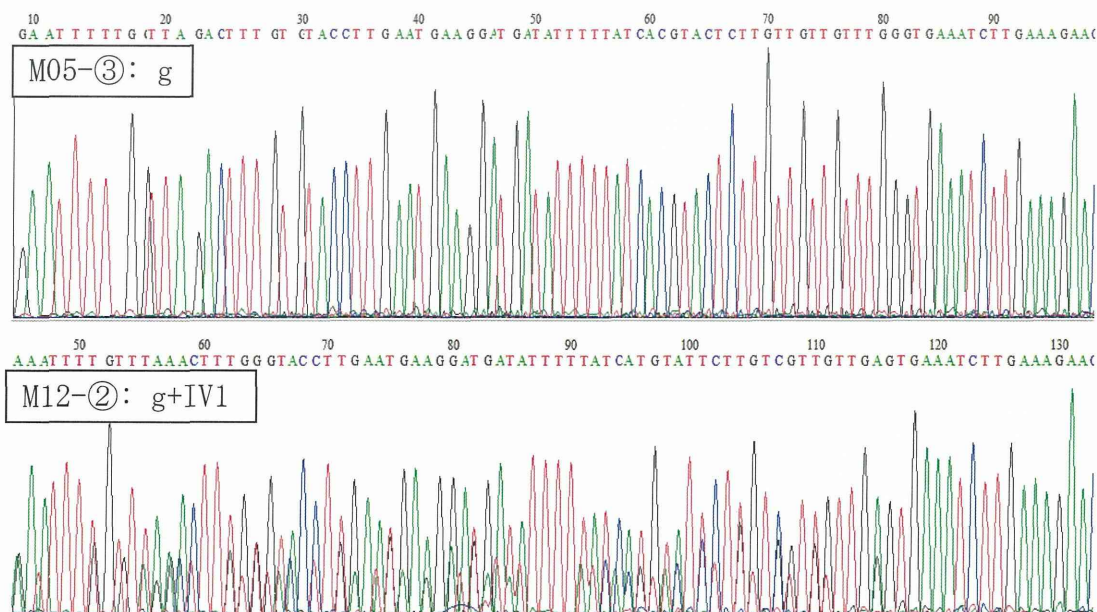


図 4. PCR ダイレクトシーケンスの波形データ例

上段：PCR で単一産物が増幅した際の波形、下段：PCR で複数配列が増幅した際の波形

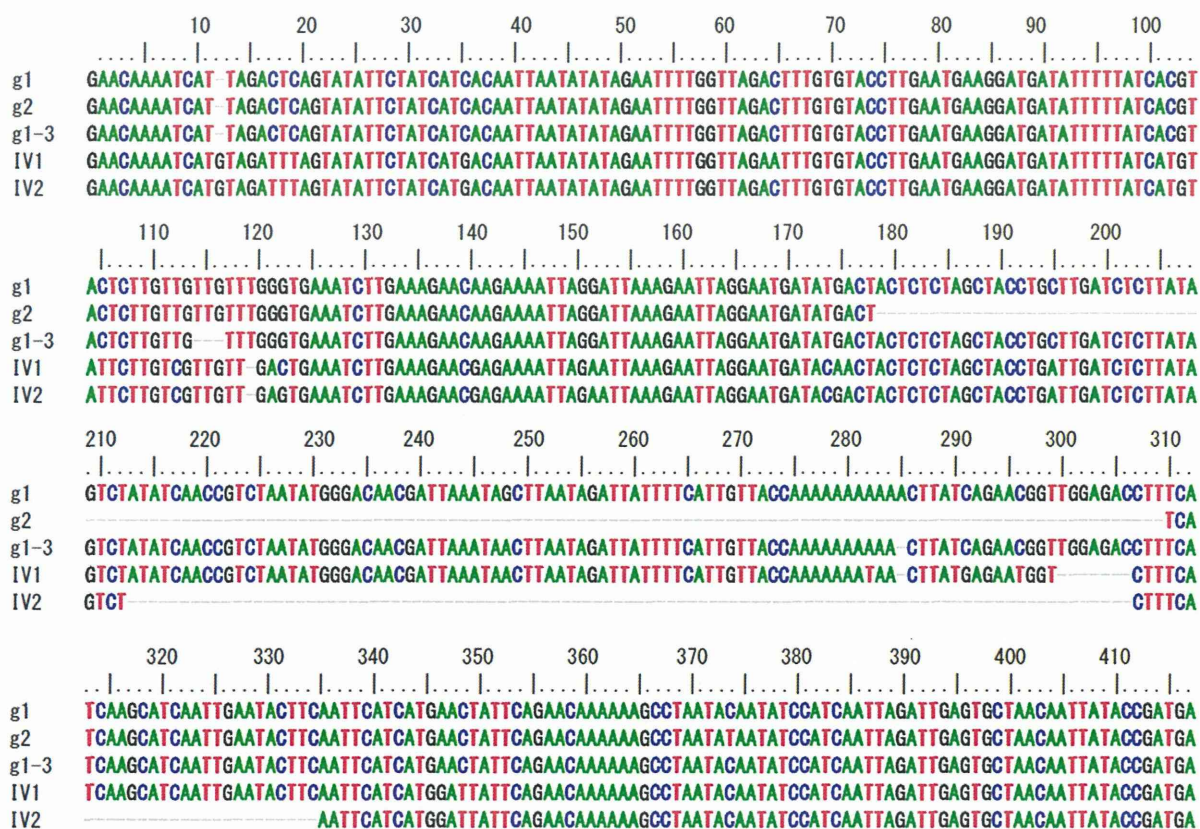


図 5. 解析試料中に認められた主な *CYP88D6* 相同イントロン 7 推定配列

(g1: Gg/Gi 由来、g2, g1-3: Gg 由来、IV1, IV2: Gu 由来配列、
このうち、g2, g1-3 は新規配列)

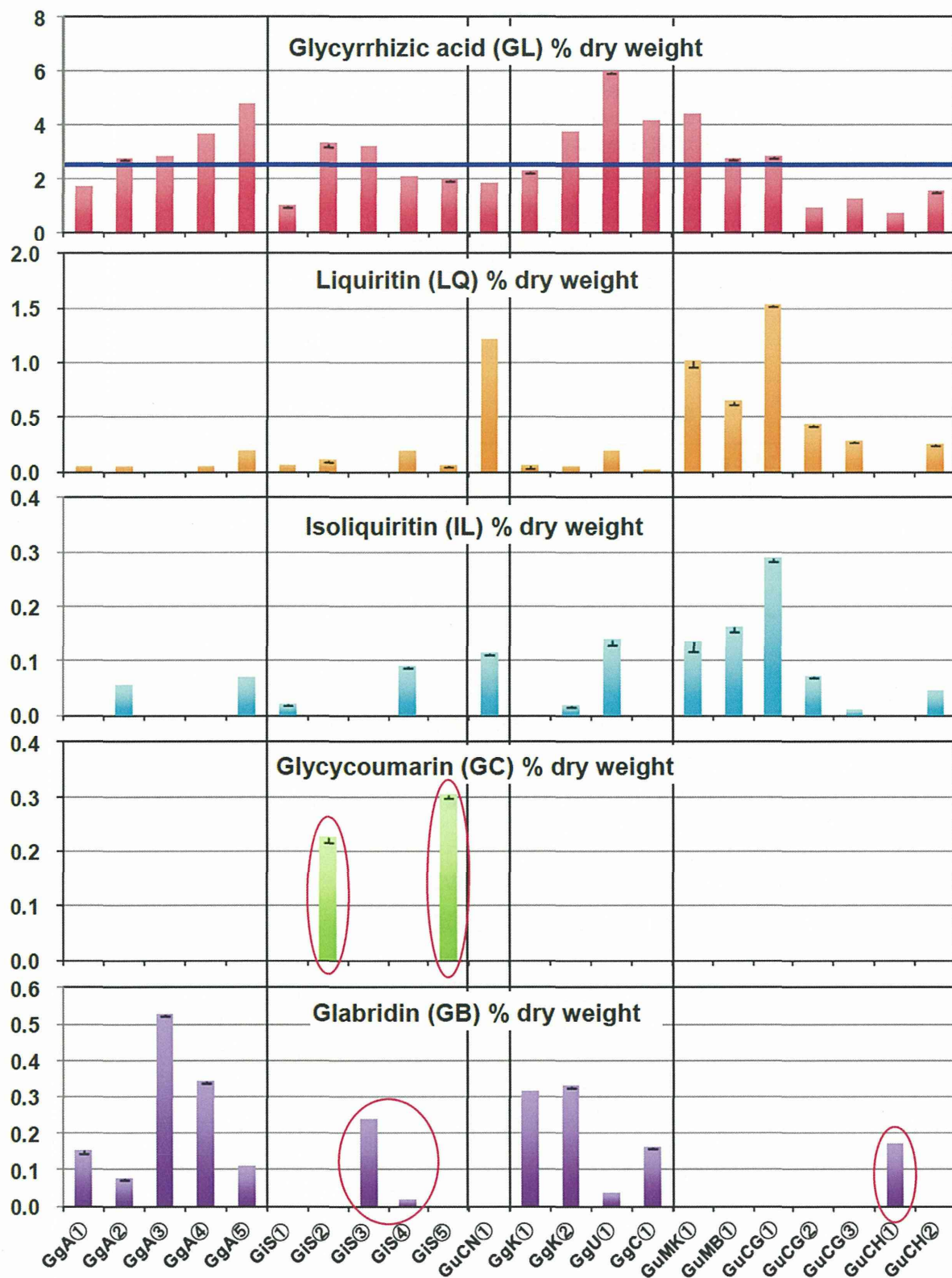


図 6. 甘草試料中の主要二次代謝産物含量 (グリチルリチン酸、リクイリチン、イソリクイリチン、グリシクマリン、グラブリジン)

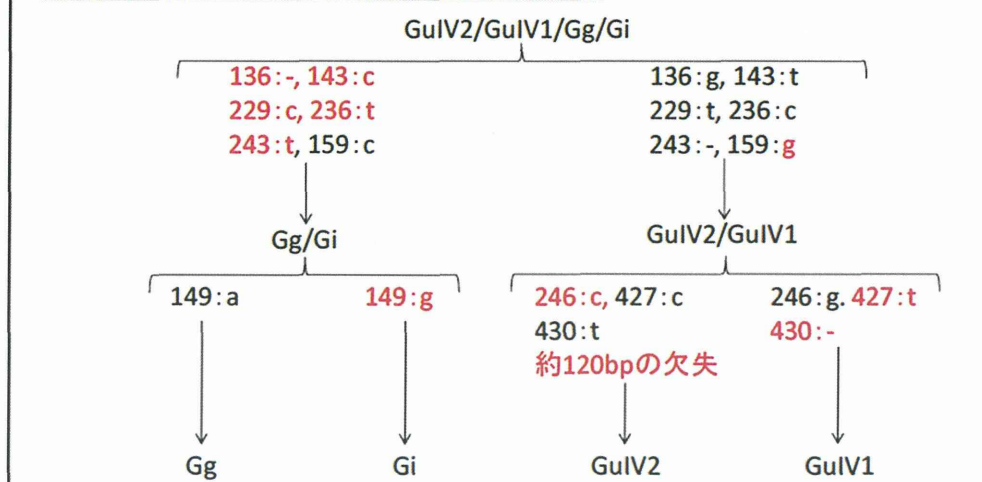
青線は、日本薬局方のグリチルリチン酸含量の規格値 2.5%を示す。

昨年度までの結果に基づく判定

・PCRによる遺伝子型の判定

1. 増幅なし → Gu2タイプ (IV1もIV2タイプの配列も持たない) もしくはPCRの問題
2. 約300bpの1本増幅 → IV2タイプ
3. 約450bpの1本増幅 → IV1タイプ/Gg/Gi
4. 約300bpと約450bpの2本の増幅 → IV1+IV2タイプ

・PCRダイレクトシーケンスによる遺伝子型の判定



本年度までの結果に基づく判定

・PCRによる遺伝子型の判定

1. 増幅なし → Gu2タイプ (IV1もIV2タイプの配列も持たない) もしくはPCRの問題
2. 約300bpの1本増幅 → IV2タイプ/Gg2
3. 約450bpの1本増幅 → IV1タイプ/Gg1/Gi
4. 約300bpと約450bpの2本の増幅 → IV1+IV2タイプ

・PCRダイレクトシーケンスによる遺伝子型の判定

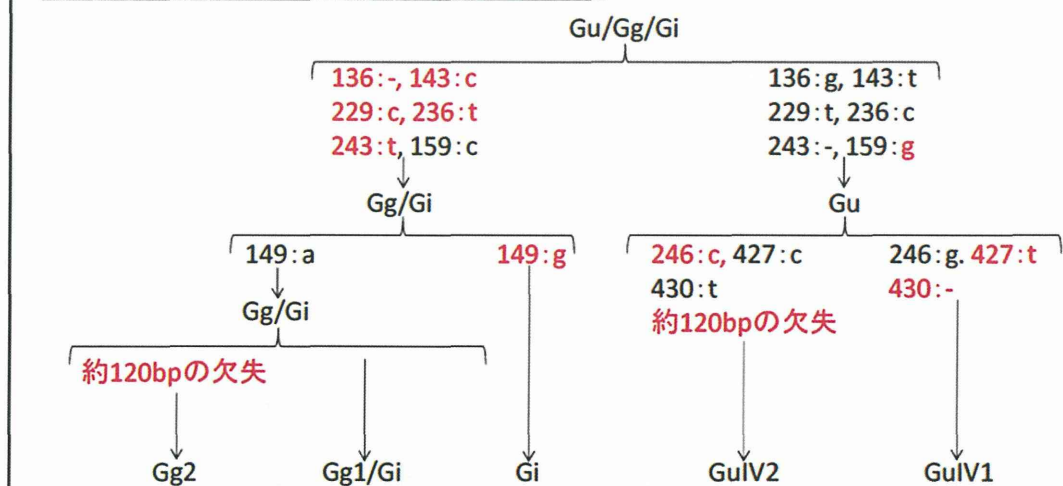


図7. カンゾウ属植物のゲノムDNAを鋳型としたCYP88D6 intron7 Fw/Rvプライマーを用いたPCR及びPCR産物のダイレクトシーケンスによる遺伝子型の判定