

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07999

研究課題名(和文)カンゾウ属植物の成分変異を基盤としたサポニン生産系の構築

研究課題名(英文) Saponin production based on chemical variation of Glycyrrhiza plants

研究代表者

林 宏明 (HAYASHI, HIROAKI)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50260998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多様なカンゾウ属系統からグリチルリチン酸(GL)高生産系統(T628)を選抜し、T628系統とその子系統のGL生産能を比較解析した。また、GL非生産系統(83-555系統)が生産するグルコグリチルリチン(GGL)等を単離するとともに、83-555系統の子孫系統の中から、成長がよくGGLを生産する優良系統(83-555-3-12)を選抜した。さらにタジキスタンの固有種である*G. bucharica*は、GLを生産しないが、葉緑体の*rbcl*遺伝子配列から*G. uralensis*等のGL生産種と非常に近縁であることを明らかとし、*G. bucharica*地下部の新規サポニンの構造決定を行なった。

研究成果の概要(英文)：A glycyrrhizin(GL)-high-producing *Glycyrrhiza uralensis* strain (T628) was selected from various strains of *Glycyrrhiza* plants, and characterizations of the T628 strain and its offspring were performed to obtain better GL-high-producing strains. In addition, chemical characterization of Glycyrrhizin-Deficient-*G. uralensis* strains (83-555) were performed to isolate glucoglycyrrhizin (GGL), a unique analogue of GL. Offspring of 83-555 were characterized to obtain a vigorously-growing and GGL-producing strain (83-555-3-12) derived from a hybrid (83-555-3) of 83-555. Furthermore, *Glycyrrhiza bucharica*, an endemic *Glycyrrhiza* plant in Tajikistan, was shown to be closely related to GL-producing *Glycyrrhiza* species, *G. uralensis*, *G. glabra* and *G. inflata*, based on their chloroplast *rbcl* sequences, whereas *G. bucharica* do not produce GL. Four new triterpene glycosides, bucharosides A, B, C, D, were isolated and characterized from the underground parts of *G. bucharica*.

研究分野：薬用植物学

キーワード：甘草 サポニン カンゾウ属植物 成分変異

1. 研究開始当初の背景

甘草は、医薬品であるグリチルリチン酸 (GL) の製造原料、漢方処方原料生薬、食品添加物 (甘味料) 原料、化粧品原料などとして多量に消費される重要な生薬である。現在、甘草の供給源は野生資源に依存しており、資源の乱獲、自生地の気候変動による砂漠化などにより資源の枯渇が心配されていることから、甘草資源の永続的確保が急務である。しかしながら、カンゾウ属植物の栽培研究は、中国、旧ソ連諸国、日本、オーストラリア等で試みられているが、栽培した甘草の GL 含量は一般的に低く、野生品と比較して品質に劣るのが現状である。

本研究の研究代表者は、これまでに世界各地のカンゾウ属植物の自生地 (スペイン、イタリア、トルコ、ウズベキスタン、カザフスタン、タジキスタン) で採集した系統と日本国内の薬用植物園で栽培されている系統を合わせて世界有数のカンゾウ属植物の遺伝資源を収集しており、特に最近、タジキスタンにおいて、最高 9% の高 GL 含量を示す産地からカンゾウ系統を入手することができた (JICA/JSPS による科学技術研究員派遣事業 H23-25)。これらの遺伝資源の中から GL 含量が高含量な優良品種の選抜が期待されるとともに、これまでにない個性的な成分品種の確立も期待される。

2. 研究の目的

本研究では資源枯渇が心配されている重要生薬である甘草に着目し、研究代表者がこれまで世界各地の自生地で収集したカンゾウ属植物の系統から選抜した GL 高生産系統 (T628 系統、タジキスタン採集系統)、GL 非生産変異系統 (83-555 系統)、GL 非生産種の *G. bucharica* (タジキスタンで新規に採集した系統) 等のカンゾウ属植物を研究材料として用い、岩手医科大学薬学部附属薬用植物園の圃場で栽培し、他の系統とサポニン生産能を比較解析するとともに人工気象器内で育成することで、未だ明らかでない GL 生合成の誘導条件の解析を行った。

また、GL をほとんど生産しないが、GL の糖鎖 (-GlcUA-GlcUA) とは異なる糖鎖構造 (-GlcUA-Glc) を持つグルコグリチルリチン (GGL) を生産する GL 非生産変異系統 (83-555 系統) に関しては、この 83-555 系統とその子孫系統の GL 及び GGL の生産能を比較解析することで、GGL 高生産系統の選抜を試みるとともに、83-555 系統の大規模栽培により GGL とその類縁体である新規サポニンの大量精製をした。

さらに、最近、タジキスタンで採集するこ

とが出来た *G. bucharica* に関しては、葉緑体の *rbcl* 遺伝子配列を決定して他のカンゾウ属植物との系統関係を明らかにするとともに、地下部の新規サポニン成分を単離してその構造を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) GL 高生産株 (T628) の解析

ウラルカンゾウの種子を発芽させ、人工照明下で筒栽培を行った。3ヶ月間栽培した地上部を切断して筒を延長することで、筒内にストロンを生成させた。ストロンの生成後、さらに2ヶ月間栽培したストロンを採集して GL 含量を定量した。この方法で選抜された GL 高含量系統 T628 は、薬草園の圃場で栽培した。また、薬草園での栽培により得られた T628 系統の種子と 01A26-6 系統 (非選抜系統) の種子を、人工気象器内で3ヶ月栽培して主根部の GL 含量を比較するとともに、人工気象器を用いて栽培温度の GL 含量に対する効果を検討した。

(2) GL 非生産変異株 (83-555 株) の子孫系統の解析

GL をほとんど生産しないが、GL と異なる糖鎖構造を持つ GGL を生産する GL 非生産変異系統 (83-555 系統) に関して、83-555 系統の種子を発芽させて得た子孫系統を栽培して、葉や果実の形態の特徴、地下部と葉の成分パターン、*pkc* 遺伝子型を解析した。これらの解析により判明した2つの交雑系統 (83-555-2, 83-555-3) は容易に開花して結実したことから、これらの種子を発芽させて得た孫系統も栽培して同様に比較した。

(3) GL 非生産変異株 (83-555 株) の生産するサポニンの単離

83-555 系統の地下部を抽出し、ODS カラム、Sephadex LH20 カラム、Preparative TLC、Preparative HPLC (逆相) を繰り返し行い、これまでに単離報告している GGL に加えて、他のサポニン類を単離して構造決定を行なった。また、大量の地下部より、これらサポニンの大量調製を行なった。

(4) タジキスタンで採集した *G. glabra* の栽培研究

最高 9% の高 GL 含量を示すことが明らかとなっているタジキスタン産の *G. glabra* に関して、タジキスタン南部の Kubodiyon と Muminabad で採集した *G. glabra* 系統の種子を発芽させ、半年間室内で栽培した後に、屋外でワグネルポットを用いて栽培した。3年間栽培した植物の地下部と地上部を採集して、HPLC により GL と化粧品材料として重要

なグラブリジンの含量を定量して比較した。

(5) タジキスタンで採集した *G. bucharica* の解析

タジキスタンで採集した *G. bucharica* の葉からゲノム DNA を抽出し、PCR により葉緑体 *rbcl* 遺伝子を増幅して配列を決定し、他の *Glycyrrhiza* 属と比較した。また、*G. bucharica* の地下部の 20%アセトニトリル抽出物を、ODS カラム、Sephadex LH20 カラム、Preparative HPLC (逆相) を繰り返し行ってサポニンを単離し構造決定を行なった。

4. 研究成果

(1) GL 高生産系統(T628)の解析

室内の筒栽培により生成させたストロンの GL 含量は 1%以下の系統がほとんどであったが、約 100 系統の中から短期間 (2ヶ月) の栽培により 2%以上の高い GL 含量のストロンを生成する *G. uralensis* の系統 T628 が得られた。

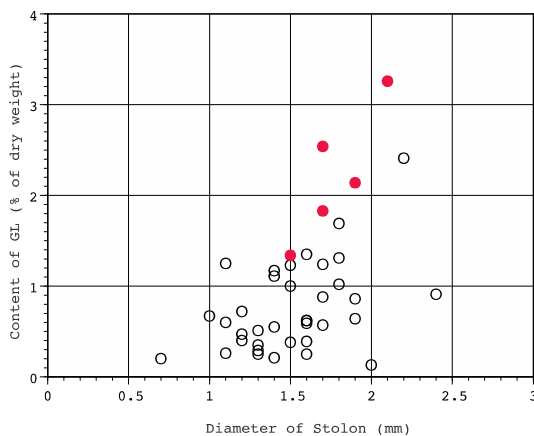


図 1 筒栽培により生成させたストロンの直径と GL 含量の相関関係

:T628 系統, ○:他系統

この T628 系統を屋外で栽培したところ、高い GL 生産能を示したことから、有望な GL 高生産系統であると考えられた。また、T628 系統は、栽培 3 年後から開花と結実が観察され、採取した種子を人工照明下で栽培したところ、未選抜の *G. uralensis* 系統 (01A26-6) に比べて高い GL 含量が得られた。T628 の子系統を 3 つの温度条件 (35、25、15) で栽培して比較したところ、高温条件 (35) では成長は良かったものの、GL 含量は非常に低く、高温条件が GL の蓄積を抑制することが明らかとなった。T628 の子系統 2-3 個体を屋外で 2 年間栽培し、地下部の根 (直径 2mm の部分) の GL 含量を測定したところ、0.42% から 2.14% までの大きな個体差が存在した。

今後、遺伝子解析により父親系統を同定し、GL 含量との相関関係を明らかにしていく予定である。

(2) GL 非生産変異系統(83-555 系統)の子孫系統の解析

83-555 系統の種子を発芽させて得た子系統を栽培して、葉や果実の形態の特徴、地下部と葉の成分パターン、*pkc* 遺伝子型を解析した結果、83-555 系統の 4 つの子系統は、自家受粉によると考えられる子系統 (83-555-5, 83-555-7)、スペインカンゾウと交雑したと考えられる子系統 (83-555-2)、他のウラルカンゾウと交雑したと考えられる子系統 (83-555-3) と推定された。自家受粉によると考えられる 2 つの子系統 (83-555-5, 83-555-7) は、親系統と同じように GGL のみを生産したが、その成長は親系統と同じように良くなかった。一方、2 つの交雑系統 (83-555-2, 83-555-3) は GGL と GL の両者を生産し、83-555 の親系統や自家受粉した子系統に比べて旺盛な生育を示した。

2 つの交雑系統は容易に開花して結実したことから、これらの種子を発芽させて得た孫系統を栽培して比較した。その結果、孫系統の中には GL のみを生産する系統、GGL のみを生産する系統、GL と GGL の両者を生産する系統の 3 種類が存在し、比較的成長が良く GGL のみを生産する 83-555-3-12 系統を選抜することができた。83-555-3-12 系統は、他の GGL 生産系統 (83-555, 83-555-5, 83-555-7) に比べ、成長が旺盛であることから、栽培による GGL の生産に適していると考えている。今後、この系統を用いて、甘草の生理活性に関する比較を行って行く予定である。

(3) GL 非生産変異系統(83-555 系統)の生産するサポニンの大量精製

83-555 系統の地下部から、これまでに単離報告している GGL に加えて、GGL の糖鎖にさらにラムノースが結合したラムノグリチルリチン (RGL) を単離して構造決定した。さらに、これら 2 種のサポニン (GGL、RGL) を、83-555 系統の地下部から大量調製し、今後の生理活性試験の準備を行った。

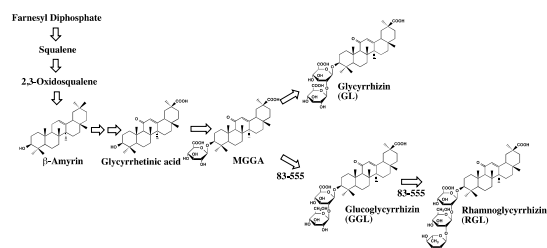


図 2 GL, GGL, RGL の推定生合成経路

(4) タジキスタンで採集した *G. glabra* の栽培研究

タジキスタンで採集した種子を発芽させ、3年間栽培したカンゾウ地下部の GL 含量は 0.75-1.82%と、タジキスタンで採集した甘草 (2.56-9.29%) に比べて顕著に低かった。また、化粧品原料として価値のあるグラブリジン含量は 0.13-0.43%であり、タジキスタンで採集した甘草 (0.09-0.92%) に比べてやや低かった。

(5) タジキスタンで採集した *G. bucharica* の解析

タジキスタンに自生する *Glycyrrhiza bucharica* は、Flora of USSR では *Glycyrrhiza* 属に分類されているが、Flora of Tajikistan では *Meristotropis* 属 (*M. bucharica*) とされているマメ科植物である。*G. bucharica* はタジキスタンの主要な *Glycyrrhiza* 属である *G. glabra* と交配することが知られている。葉緑体の *rbcl* 遺伝子配列を決定して比較したところ、*G. bucharica* は GL を生産する *G. uralensis* や *G. inflata* と非常に近縁であることが明らかになった。しかしながら *G. bucharica* の地下部から GL は検出されなかった。そこで、*G. bucharica* 地下部の抽出液を、各種クロマトグラフィーを用いて精製を繰り返し、5つのサポニンを単離することができた。NMR 等による構造決定の結果、既知化合物の macedonoside C に加え、4つの新規サポニン、bucharosides A-D の構造を決定した。

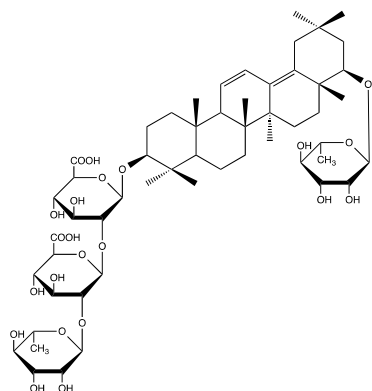


図3 Bucharoside A の構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

(1) Hiroaki Hayashi, Shinya Tamura, Ren Chiba, Isao Fujii, Noboru Yoshikawa, Inoyat Fattokhov, Madibron Saidov. Field survey of *Glycyrrhiza* plants in Central

Asia (4). Characterization of *G. glabra* and *G. bucharica* collected in Tajikistan., *Biol. Pharm. Bull.*, **39** (11) 1781-1786 (2016) (査読あり)

[学会発表](計 6 件)

(1) 林 宏明、皆川知未、藤井 勲：ウラルカンゾウのグリチルリチン酸非生産系統 83-555 の孫系統の解析(日本薬学会第 136 年会、横浜、平成 28 年 3 月 29 日)

(2) 林 宏明、藤井 勲：筒栽培によるグリチルリチン酸高生産株 T628 の選抜とその性質(第 63 回年会日本生薬学会、富山、平成 28 年 9 月 24 日)

(3) 林 宏明、藤井 勲、Inoyat Fattokhov, Madibron Saidov：タジキスタンで採集した *Glycyrrhiza glabra* の栽培とその成分組成(日本薬学会第 137 年会、仙台、平成 29 年 3 月 26 日)

(4) 林 宏明、横島敬子、千葉 廉、藤井 勲、Inoyat Fattokhov, Madibron Saidov：タジキスタンで採集した *Glycyrrhiza bucharica* のサポニン成分について(第 64 回年会日本生薬学会、千葉、平成 29 年 9 月 10 日)

(5) 林 宏明、佐々木未絵、藤井 勲：グリチルリチン酸高生産株 T628 の子系統の解析(第 64 回年会日本生薬学会、千葉、平成 29 年 9 月 10 日)

(6) 林 宏明、皆川知未、藤井 勲：ウラルカンゾウのグリチルリチン酸非生産系統 83-555 の子孫系統の解析(第 64 回年会日本生薬学会、千葉、平成 29 年 9 月 10 日)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 宏明 (HAYASHI HIROAKI)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50260998