

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14972

研究課題名(和文) 昆虫 植物相互作用を利用した薬用植物の機能性強化に関する研究

研究課題名(英文) Quality improvement of medicinal plants using insect-plant interaction

研究代表者

田中 謙 (Tanaka, Ken)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：60418689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生薬の有効成分とされる二次代謝物の多くは、本来ストレスに対する耐性や防御のために生産されているものと考えられる。従って、薬用植物の品質の向上を図るためには、食害など植物の環境に対する応答機能を理解し、それを利用することが合理的である。本研究は、昆虫 植物相互作用を利用した薬用植物の機能性強化を目的として、トウキ及びセンキュウについて、キアゲハ幼虫による食害で含有量に変化する成分を明らかにするとともに、食害で誘導されるタンパク質を網羅的に解析した。さらに、キアゲハ幼虫からのエリシター化合物を特定するための解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Medicinal plants produce many compounds to help them survive in severe environments. The pharmaceutical properties of many crude drugs are attributable to such secondary metabolites. Therefore, knowledge of the actual function of secondary metabolites triggered in response to environmental factors could be utilized to produce highly functional crude drugs. The present study aims at investigating the prompt response of short period damaged *Angelica acutiloba* utilizing metabolomic and proteomic analyses. In addition, LC-MS analyses of the larval oral regurgitation of *Papilio machaon* were performed to identify the natural elicitor.

研究分野：生薬学

キーワード：化学生態学

1. 研究開始当初の背景

生薬の有効成分とされる二次代謝物の多くは、本来、ストレスに対する耐性や防御のために生産されているものと考えられる。従って、薬用植物の品質の向上を図るためには、食害など植物の環境に対する応答機能を理解し、それを利用することが合理的である。本研究開始前に行った予備実験で、食害を受けたトウキで、精油成分やポリアセチレン化合物などの含有量が増加することを見出し、昆虫の影響を薬用植物の機能性強化に利用できる可能性を明らかにしたが、薬用植物に関して昆虫植物相互作用による活性成分変化に関する詳細な研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

(1) これまでにトウキの葉を用いて行った予備試験の結果、食害を受けると、caryophyllene、butylidene phthalide などの含有量が増加すること、根で falcarinone など polyacetylene 類の含有量が増加することを見出した。トウキ及びセンキュウについて地上部及び根でキアゲハ幼虫による食害により含有量が変化する成分及びタンパク質の変動を網羅的に解析する。

(2) キアゲハはセリ科のうちシシウド属植物に好んで産卵し、ミシマサイコ属には産卵しない。そこで、各種セリ科薬用植物葉から放出される揮発性成分を分析し、キアゲハ産卵忌避成分を明らかにする。

(3) これまでにハスモンヨトウの幼虫の唾液や消化管内容物に含まれる volicitin 等脂肪酸とグルタミン酸のアミド類が、寄生された植物の二次代謝を活性化させるエリシターであることが報告されている。本研究では、キアゲハ幼虫の吐き戻し液に含まれる成分からセリ科植物の防御物質合成に関与するエリシターを同定する。

これらの結果から実際に昆虫を使わずとも機能性の高い薬用植物を生産するための全く新しい栽培法を提示する。

3. 研究の方法

(1) キアゲハ幼虫により食害を受ける条件と受けない条件で栽培した。植物は、採集後液体窒素で凍結し、-80 で保存した。採集した植物試料は、標準的なメタボローム解析の方法によりメタノール 水 クロロホルム混液により抽出し、有機層は GC-MS、水層は LC-MS で含有成分を網羅的に分析した。検出された化合物の同定には、NIST 及び Wiley NBS mass spectral databases を使用した。食害と成分変化の動的関係を明らかにするために得られたデータを主成分分析で解析した。

さらに、食害により誘導されるタンパク質を明らかにするため、ショットガンプロテオーム解析を行った。

(2) セリ科薬用植物のうち、キアゲハ幼虫による食害を受けやすい、トウキ、ヨロイグ

サ、ハマボウフウ及び食害を受けにくいミシマシコ、センキュウ、ボウフウの葉部から放出される揮発性成分を SPME-GC-MS により分析した。検出された忌避成分を染み込ませた放出剤を作製し、トウキ栽培場で忌避効果を検証した。

(3) トウキまたはハマボウフウを食害しているキアゲハ幼虫を捕集し、圧迫刺激することにより吐き戻し液を採取した。採取した試料をメタノールで希釈後遠心して上清を分取した。この試料を LC-MS で網羅的に成分分析し、トウキまたはハマボウフウを食害したキアゲハ幼虫吐き戻し液に共通して含有される成分を検索した。

4. 研究成果

(1) 食害を受ける条件と受けない条件で栽培したトウキの地上部と地下部をクロロホルム-メタノールで抽出し、抽出物を GC-MS で分析した。検出された主要なピークを主成分分析で解析したスコアプロットとローディングプロットをそれぞれ図 1、2 に示す。

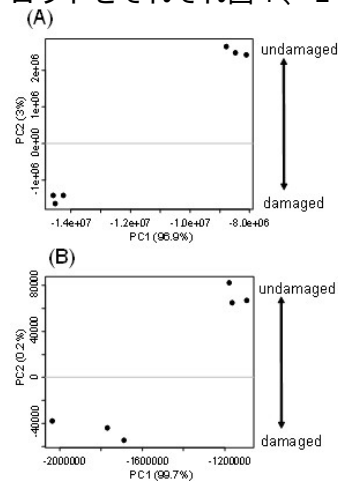


図 1 主成分分析スコアプロット (A) 葉 (B) 根

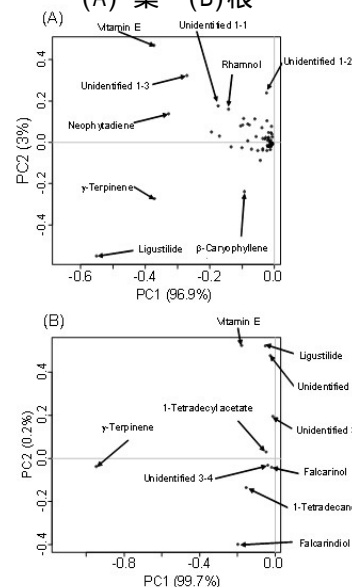


図 2 主成分分析ローディングプロット (A) 葉 (B) 根

主成分分析の解析結果から、食害の有無により大きく含有量が変化するピークを見出し、その EI マススペクトルをデータベース検索してマーカーとなる化合物を特定した。食害を受けたトウキの葉部では caryophyllene、butylidene phthalide などの含有量が増加すること、根で faltarinone など polyacetylene 類の含有量が増加することが明らかとなった。さらに、食害を受けたトウキと受けていないトウキ試料についてショットガンプロテオーム解析を行い、食害により誘導されるタンパク質を分析した。その結果、各試料から 291 個のタンパク質が検出された。その機能別内訳を図 3 に示す。

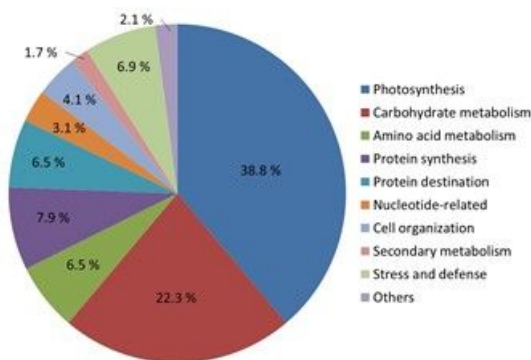


図 3 プロテオーム解析で検出されたタンパク質の機能別内訳

検出されたタンパク質の大部分は一次代謝に関連するもの (50.4%; carbohydrate metabolism (22.3%), amino acid metabolism (6.5%), protein synthesis (7.9%), protein destination (6.5%), nucleotide-related (3.1%), and cell organization (4.1%)) であったが、食害を受けたトウキで、superoxide dismutase や peroxidase が増加していることが確認された。これまでに、植物の防御に関して活性酸素が重要な働きをしていることが報告されている。今回の結果も食害に対するトウキの即発的な防御として過酸化水素が関連していることを示唆するものであった。さらに、二次代謝物の生合成に関連して、食害を受けたトウキで 5-*epi*-aristolochene synthase が減少していた。humulene や caryophyllene 型のセスキテルペンは、farnesyl diphosphate (FPP) が 1 位 - 11 位で環化されて生合成されるが、5-*epi*-aristolochene は FPP が 1 位 - 10 位で環化されて生合成される。トウキが食害を受けた場合、防御に関連する caryophyllene を増加させるため、1 位 - 10 位環化を抑制していることが推定された。

(2) セリ科薬用植物のうち、キアゲハ幼虫による食害を受けやすい、トウキ、ヨロイグサ、ハマボウフウ及び食害を受けにくいミシマシコ、センキュウ、ボウフウの葉部から放出される揮発性成分を SPME-GC-MS で分析

した。その結果を図 4 に示す。さらに、検出されたピークについて主成分分析を行ったスコアプロット及びローディングプロットを図 5、6 に示す。

主成分分析の結果から、キアゲハの食害を受ける植物と受けにくい植物で germacrene D, α -humulene, *trans*-caryophyllene 及び β -elemene の放出量に差が認められた。このうち β -elemene の放出量は、季節変動が大きく、キアゲハの産卵忌避成分として germacrene D, α -humulene 及び *trans*-caryophyllene が重要であることが推定された。そのことを証明するため、これら 3 化合物を染み込ませた放出剤を作製してトウキ栽培場に設置し、非設置区画と産卵数を比較した。その結果、放出剤設置区画内のトウキに対する産卵数が 40% 低下しており、germacrene D, α -humulene, *trans*-caryophyllene にキアゲハ産卵忌避作用があることが明らかとなった。

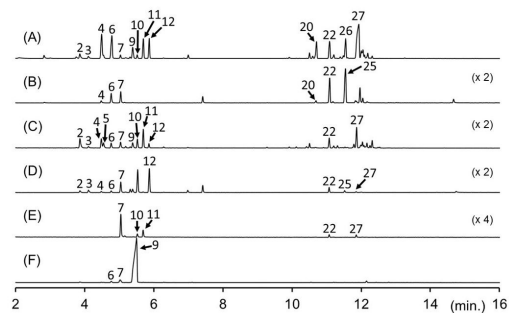


図 4 ミシマシコ(A)、センキュウ(B)、ボウフウ(C)、トウキ(D)、ハマボウフウ(E)、ヨロイグサ(F)の葉部から放出される揮発性成分を SPME-GCMS により分析したクロマトグラム

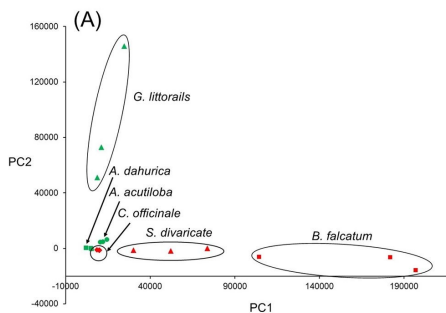


図 5 図 4 で検出されたピークを主成分分析で解析したスコアプロット

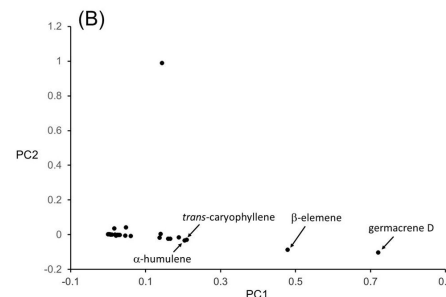


図 6 図 4 で検出されたピークを主成分分析で解析したローディングプロット

(3) トウキまたはハマボウフウを食害しているキアゲハ幼虫を捕集し、圧迫刺激することにより吐き戻し液を採取した。採取した吐き戻し液をメタノールで希釈後遠心して、分析試料を調製した。各分析試料を LC-MS で分析したクロマトグラムを図 7 に示す。

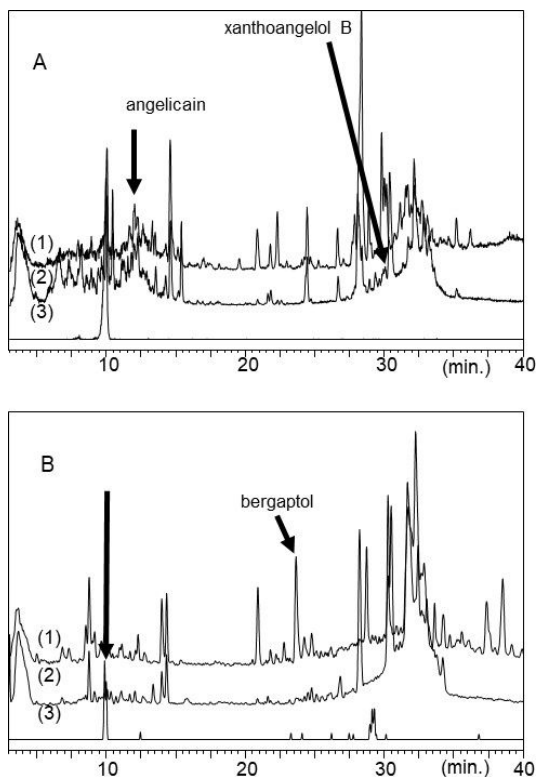


図 7 トウキまたはハマボウフウを食害した幼虫の吐き戻し液を LC-MS で分析したクロマトグラム
(A)トウキ (B)ハマボウフウ

各試料からは、食害した植物に由来する成分も多く検出されたため、吐き戻し液に含まれる昆虫由来のエリシター化合物を特定する目的で、LC-MS データを MS データアレイに変換し、主成分分析を行った。その結果を、図 8、9 に示す。



図 8 吐き戻し液及び植物抽出物 LC-MS 分析結果の主成分分析スコアプロット



図 9 吐き戻し液及び植物抽出物 LC-MS 分析結果の主成分分析ローディングプロット

主成分分析結果から、吐き戻し液試料に共通するイオンを選別し、脂肪酸誘導体をエリシター候補化合物として特定した。

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 2 件)

Morino C., Morita Y., Minami K., Nishidono Y., Nakashima Y., Ozawa R., Takabayashi J., Ono N., Kanaya S., Tamura T., Tezuka Y., Tanaka K., Oviposition inhibitor in Umbelliferous medicinal plants for the common yellow swallowtail (*Papilio machaon*), *Journal of Natural Medicines*, 査読有 72 巻、2018、161-165、doi: 10.1007/s11418-017-1124-3

Kato R., Morita Y., Ina A., Tatsuo Y., Tamura T., Tezuka Y., Tanaka K., Metabolomic and Proteomic Analysis of the Response of *Angelica acutiloba* after Herbivore Attack, *Natural Product Communications*, 査読有、12 巻、2017、1547-1551

〔学会発表〕(計 5 件)

中原陽平、南和輝、原田将光、小野直亮、金谷重彦、田中 謙、化学生態学的応答を用いたトウキの機能性強化に関する研究、日本薬学会 138 年会、2018

南 和輝、阪森宏治、田村隆幸、仲島義貴、西殿悠人、福井麻琴、田中陽一郎、佐藤雅史、小澤理香、高林純示、田中 謙、キアゲハの忌避物質に関する研究、日本薬学会 137 年、2017

加藤梨紗、伊奈隆年、田村隆幸、田中 謙、キアゲハによる食害を受けたトウキのプロテオーム解析、日本薬学会 137 年会、2017

Fukui M., Nishidono Y., Sato M., Sakamori K., Tezuka Y., Tanaka K., Analysis of natural elicitor in oral secretions and egurgitant of the larva of *Papilio Machaon*., *International Symposium on Natural Products for the Future*, 2016

森田侑介、神野拓也、辰尾良秋、田村隆幸、金谷重彦、田中 謙、薬用植物の化学生態学

的応答を用いたトウキの機能性強化に関する研究、日本薬学会 136 年会、2016

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 謙 (TANAKA Ken)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：60418689

(2)研究協力者

高林 純示 (TAKABAYASI Junji)

田村 隆幸 (TAMURA Takayuki)

辰尾 良秋 (TATSUO Yoshiaki)