

令和元年6月10日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08301

研究課題名(和文) 薬用植物カンゾウにおけるグリチルリチン酸の高生産を目的とした分子生物学的研究

研究課題名(英文) Study for glycyrrhizin production in Glycyrrhiza plant.

研究代表者

高上馬 希重 (Kojomo, Mareshige)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：80342781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：薬用植物カンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis*)は世界で広く用いられる。主薬用成分としてトリテルペノイド化合物のグリチルリチン酸が含まれる。トリテルペノイドの生合成機構の解明に取り組んだ。

CYP88D6遺伝子(シトクロムP450酸化酵素)を過剰発現する形質転換培養細胞においてグリチルリチン酸量が増加することを明らかにした。カンゾウ培養細胞においてトリテルペノイド骨格C-28位酸化の機能を担うCYP716A179を新たに見出した。GubHLH3(basic helix-loop-helix 転写因子)はソヤサポニン生合成遺伝子を制御することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品原料として高品質なカンゾウを社会に供するためには、グリチルリチン酸生成に関するトリテルペノイド生合成機構を解明することが必要である。本研究から、トリテルペノイド化合物の生合成酵素遺伝子の解析、発現制御を明らかにした。このような基礎データのさらなる蓄積により、薬用成分含有量の高いカンゾウを品種改良して社会に供給することが可能となる。また培養細胞による医薬品、機能性成分の生産も可能となる。

研究成果の概要(英文)：Glycyrrhiza uralensis (Licorice) is used as a natural herbal drug. Glycyrrhizin, a triterpenoid saponin derived from the underground parts, is a major bioactive compound that has several pharmacological activities. Licorice also produces other triterpenoids, including soyasaponins. Recent studies have revealed various oxidosqualene cyclases and cytochrome P450 monooxygenases required for the biosynthesis of triterpenoids in licorice. [1] CYP88D6 has a key role in the glycyrrhizin biosynthetic pathway. We found that over-expression of the CYP88D6 gene can cause a marked accumulation of glycyrrhizin and 11-oxo--amyrin in the transformed hairy roots. [2] CYP716A179 expressed predominantly in tissue-cultured stolons of licorice, functions as a triterpene C-28 oxidase in the biosynthesis of oleanolic acid and betulinic acid. [3] The basic helix-loop-helix transcription factor GubHLH3 positively regulates soyasaponin biosynthetic genes in licorice.

研究分野：薬用植物学

キーワード：カンゾウ Glycyrrhiza グリチルリチン酸 トリテルペノイド 生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬用植物「カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*)」は世界で最も使用量の多い薬用植物である。日本の漢方薬原料の 70%以上にカンゾウは使用されており、中国、韓国などの伝統医療においても同様である。ヨーロッパ、北米でもカンゾウをハーブとして利用している。また近年、漢方医療の臨床試験がアメリカなどでも行われており、漢方原料の多くを構成するカンゾウの需要が世界的に増加することが予想される。また甘味料として多くの食品にカンゾウは添加されており、市場規模は非常に大きい。カンゾウは中国および周辺諸国に自生するマメ科多年生草本植物である。抗炎症、抗潰瘍、抗ウイルス、抗アレルギー作用などのほか、慢性肝炎などの肝機能改善治療薬としても用いられる。日本はカンゾウの供給を 100%輸入に依存している (輸入量: 約 1 万 t / 年)。医薬品原料等として供給するためにはカンゾウを農作物として生産する必要がある。しかしながらその多くは中国等生産国の野生の採集などに頼っており、高品質なカンゾウの安定供給は極めて重要な課題である。カンゾウの主薬用成分はトリテルペノイド化合物のグリチルリチン酸である (図 1)。近年、市場に流通するカンゾウのグリチルリチン酸含有率の低下が問題となっている。大生産地の中国での消費拡大による乱獲や生育地の砂漠化などに起因して、グリチルリチン酸含有率の低下による品質の劣化が憂慮される。しかしながらカンゾウの生育は遅く (5 年以上)、一般農作物のような品種開発はほとんど進展していないのが現状である。一方で近年、植物の二次代謝化合物の生合成研究がめざましく発展してきている。これまで未解明であったグリチルリチン酸の生合成に関する基礎研究も進捗しつつある。しかしこれらの生合成機構が実際の植物体におけるグリチルリチン酸含有率にどのように寄与しているかは未だ不明の部分が多い。生合成遺伝子と生成化合物とを対応させ、生合成のメカニズムを明らかにすることは、医薬品原料としてのカンゾウを効果的に生産することに有効である。

2. 研究の目的

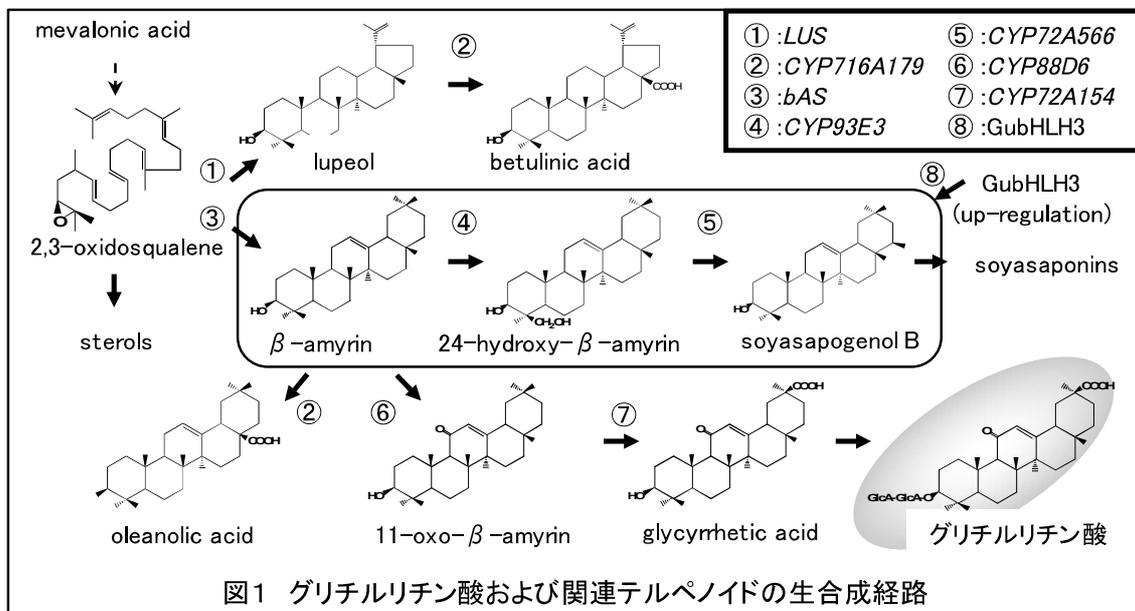
本研究の目的は、カンゾウ体内のテルペノイド (グリチルリチン酸など) の生合成のメカニズムを各化学成分の生合成遺伝子の発現解析等から明らかにすることである (図 1)。申請者らはテルペノイド生合成酵素遺伝子解析を進めており過剰発現ベクターの開発や形質転換培養細胞の作成も行っている。生合成酵素遺伝子の機能解析には当該遺伝子高発現ベクターを導入した形質転換植物体の解析が効果的である。しかしカンゾウでは形質転換再生体を得ることができず遺伝子機能の評価が困難である。そこでカンゾウで外来遺伝子導入を行うことのできる唯一の手法として根培養細胞の一種である「毛状根」を用いる。これらを総合的に融合し、グリチルリチン酸の生成能力の異なる植物材料を用い、様々な生合成酵素遺伝子の過剰発現技術を用いて、形質転換培養細胞でのテルペノイド代謝を解析しようとするものである。CYP88D6 遺伝子 (シトクロム P450 酸化酵素) のカンゾウ植物体内での機能解析ならびに培養細胞でのグリチルリチン酸生産を目的として、CYP88D6 遺伝子を活性化させた CYP88D6 遺伝子過剰発現培養細胞 (毛状根) の作出に取り組んだ。さらに得られた培養細胞の特性解析を行った。

3. 研究の方法

カンゾウの cDNA 情報から CYP88D6 遺伝子断片を合成し、CaMV35S プロモーターの制御下におき、さらに GFP (sGFP-S65T) 遺伝子をレポーターとしたバイナリーベクターを構築した。この CYP88D6 遺伝子過剰発現ベクターを *Agrobacterium rhizogenes* を介してカンゾウへの導入を試みた。なお同様のベクター構成で CYP88D6 遺伝子を除外したものをコントロールとして用いた。ウラルカンゾウの組織培養植物体を *A. rhizogenes* の感染材料として用いた。

4. 研究成果

感染開始 8 週目に 742 個の毛状根クローンを得た。このうち GFP による緑色蛍光が認められたものが 121 クローンであった (GFP 発現率: 16.3%)。GFP 緑色蛍光の認められた毛状根クローンはそれぞれ個別のプレートで培養し、毛状根組織の増殖が旺盛な 14 クローンを選び出した。選抜した 14 クローンの毛状根をさらに培養増殖し、得られた毛状根組織を試料としてグリチルリチン酸の定量分析を行った。CYP88D6 遺伝子過剰発現ベクター導入毛状根クローンにおいて、コントロールに対して最大で約 4 倍のグリチルリチン酸含有率を示すクローンが見出された。さらに、各毛状根組織から total RNA を抽出し RT-PCR による発現解析を行った結果、グリチルリチン酸含有クローンでは全てにおいて CYP88D6 遺伝子の発現量がコントロールに対して顕著に増加していた。本研究から、CYP88D6 遺伝子を過剰発現する毛状根の作出に成功し、毛状根組織内でグリチルリチン酸の生成を増加させることが可能であることを明らかにした。本研究の成果をさらに発展させ、他の生合成遺伝子発現の解析にも応用することによって、カンゾウ属植物のグリチルリチン酸生合成機構の解明に寄与することが期待できる。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Tamura K, Yoshida K, Hiraoka K, Sakaguchi, D, Chikugo A, Mochida K, Kojoma M, Mitsuda N, Saito K, Muranaka T, Seki H, The basic helix-loop-helix transcription factor GubHLH3 positively regulates soyasaponin biosynthetic genes in *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Cell Physiol.*, 59(4), 778-791, (2018)

DOI: 10.1093/pcp/pcy046

Keita Tamura, Hikaru Seki, Hideyuki Suzuki, Mareshige Kojoma, Kazuki Saito, Toshiya Muranaka, CYP716A179 functions as a triterpene C-28 oxidase in tissue-cultured stolons of *Glycyrrhiza uralensis*, *Plant Cell Reports*, 36, 437-775, (2017)

DOI: 10.1007/s00299-016-2092-x

M Kojoma, H Seki, K Ohya, SY Kim, T Muranaka, Glycyrrhizin production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* induced triterpenoid biosynthetic gene, *Planta Med*, 82(S01), S1-S381, (2016)

DOI: 10.1055/s0036-1596798

Sang-Yong Kim, Hisako Nagashima, Naonobu Tanaka, Yoshiki Kashiwada, Jun 'ichi Kobayashi, Mareshige Kojoma, Hitorins A and B, Hexacyclic C25 Terpenoids from *Chloranthus japonicus*, *Organic Letters*, 18, 5420-5423, (2016)

DOI: 10.1021/acs.orglett.6b02842

[学会発表](計6件)

鈴木章弘、山田恵美、原田恵、中尾隆寛、千々岩諒汰、石丸幹二、高上馬希重、有馬進、微生物共生による薬用植物カンゾウのグリチルリチン酸高生産関、第247回日本作物学会、2019年3月、筑波市

中尾隆寛、千々岩諒太、石丸幹二、有馬進、高上馬希重、鈴木章弘、カンゾウと微生物の共生に関する研究、第8回甘草に関するシンポジウム、2017年7月15日、甲州市

Kojoma, H Seki, K Ohya, SY Kim, T Muranaka, Glycyrrhizin production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* induced triterpenoid biosynthetic gene, Joint Natural Products Conference 2016、2016年7月、コペンハーゲン

Keita Tamura, Hikaru Seki, Hideyuki Suzuk, Mareshige Kojoma, Toshiya Muranaka, Identification of beta-amyrin 28-oxidase in *Glycyrrhiza uralensis*, Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America、2016年8月、Davis

田村啓太、關光、吉田光輝、平岡靖子、持田恵一、鈴木秀幸、高上馬希重、光田展隆、高木優、斉藤和季、村中俊哉、植物カンゾウのトリテルペノイド生合成制御に関わる転写因子の

探索、第34回日本植物細胞分子生物学会大会、2016年9月、上田

Keita Tamura, Hikaru Seki, Hideyuki Suzuk, Mareshige Kojoma, Toshiya Muranaka, Identification of -amyrin 28-oxidase in Glycyrrhizauralensis, 第68回日本生物工学会大会、2016年9月、富山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：新規ウラルカンゾウ及びその栽培用ストロン
発明者：高上馬希重 他
権利者：学校法人東日本学園 他
種類：特許
番号：特許第5974211号
取得年：平成28年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：関 光

ローマ字氏名：(SEKI, hikaru)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30392004

研究分担者氏名：金 尚永

ローマ字氏名：(KIM, Sang-Yong)

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：70624287

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。