

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08018

研究課題名(和文)環境制御によるチャボイナモリの栽培化とカンプトテシンの効率生産

研究課題名(英文)Efficient production of camptothecin by *Ophiorrhiza pumila* under controlled environmental

研究代表者

彦坂 晶子 (Hikosaka, Shoko)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：50345188

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)：1. 光合成特性：改良型同化箱で明暗周期とPPFD 100と300の照射時間を組みあわせ、日積算光合成量の増加を試みた。いずれの条件でもPPFD 300では光合成速度が低下し、明暗周期と放射強度の組合せで生育は促進しなかった。他方、明期の延長は日積算光合成量の増加に有効で、花芽分化を促進しカンプトテシン(CPT)濃度の高い種子を多数生産するのに適した条件だった。

2. CPTの高濃度化：根周辺の浸透圧を高めるためにPEGを培養液に添加し、3日間の栽培を行った。2～3日間の浸透圧処理により、茎および根の乾物重あたりのCPT濃度が高まったことから、根からの吸水抑制はCPTの高濃度化に有効だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要な抗がん剤などに利用される植物アルカロイドの一つ、カンプトテシン(CPT)を生産する小型草本植物「チャボイナモリ」の生理生態を調査し、人工環境下で効率生産する好適環境条件についての基礎的知見を得た点で学術的意義がある。特に本研究では、野生では高温多湿条件下で生育するチャボイナモリの生育およびCPT蓄積に適した環境条件をそれぞれ明らかにした。これによりこれまで大型木本植物から抽出されてきたCPTを短期間かつ安価に抽出できることから、大幅な期間とコスト削減につながる。また、人工光型植物工場で生産することで、品質安定化や多段・高密度生産が可能となり、製薬コストの削減によって社会貢献につながる。

研究成果の概要(英文)：1. Basic characteristics of photosynthesis: Using an assimilation improved last year, the effects of PPFD on photosynthesis and transpiration rate were investigated. Although various combinations were studied, the photosynthetic rate decreased within 1 hour under PPFD 300. On the other hand, it was clarified that the increase in the daily cumulative photosynthesis amount by extension of the light period seemed effective to promotion of growth and flower bud differentiation. This was considered to be a suitable condition for producing a large number of seeds with a high concentration of CPT.

2. Optimal environmental conditions for CPT production: Polyethylene glycol (PEG) was added to the nutrient solution to increase the osmotic pressure around the roots for 3 days. The osmotic stress treatment for 2 and 3 days increased the CPT concentration per dry weight of the stems and roots, suggesting that water absorption stress from the roots is effective in increasing the CPT concentration.

研究分野：環境調節工学

キーワード：抗がん成分 アルカロイド 光合成・蒸散速度 光環境 培養液温度 培養液浸透圧 光合成有効放射束密度 カンプトテシン

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、世界中で幅広く臨床利用されている植物由来の抗がん剤の一つにカンプトテシン(CPT)がある。CPTはテルペノイドインドールアルカロイドであり、動植物に共通のDNAトポイソメラーゼを阻害することで細胞分裂を抑制し、強い抗がん作用を発揮する。また、CPTは細胞分裂を可逆的に抑制できるため、再生医療などの研究分野でも重要な化合物である。

現状、CPTを工業的に有機合成することはできず、中国原産の落葉樹である喜樹や南西諸島のクサミズキから抽出、精製されている。これらは中型の木本植物であり、原料の生産に広大な敷地と、長い繁殖・栽培期間を必要とする上、抽出コストもかかる。また、屋外での栽培のため、気象の影響を強く受け、収量が安定しないなどの課題がある。

これらの課題の解決案として期待されている植物に、CPTを生産する多年生草本植物のアカネ科チャボイナモリ(*Ophiorrhiza pumila*)がある。野生のチャボイナモリは、南西諸島などの山地の常緑樹林内の林床に生育し、高さが5~15cmと国内のイナモリ属で最も小さく、植物体全体にCPTを蓄積する。この点で前述の喜樹やクサミズキより高密度栽培(例えば多段式の人工光型植物工場など)に適しており、葉や根からのCPTの抽出が容易であるという利点がある。特に、根は葉緑体を含まないためにCPTの抽出が容易である。しかし、チャボイナモリを生産するに際し、その光合成や成長速度などの植物の基本特性が未解明であり、地上部および地下部の成長やCPT蓄積に適した環境条件を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

CPTを安定的に効率生産するためには、まず、チャボイナモリの栽培環境を最適化し、安定した成長速度を維持する必要がある。本研究では、施設園芸分野で開発・発展してきた環境制御、水耕栽培、組織培養などの技術を組合せ、成長速度を速めると共に、地上部および地下部に蓄積するCPT濃度を高めるための環境条件を探索した。本年度は、成長速度を高める環境条件の探索に加え、CPTの高濃度化に適した環境ストレス条件の探索を行った。

### 3. 研究の方法

#### 3 - 1. 成長速度を高める環境条件の探索

環境制御技術および水耕栽培技術を駆使し、光飽和点が低いチャボイナモリの成長速度を高め、葉または根のCPT濃度を高めるための環境条件を探索した。昨年度までに作製・改良した個体群用の光合成・蒸散測定装置(同化箱、Fig. 1)を用い、風速、湿度制御下での光合成、蒸散速度を測定した。これまでの結果、好適気温、相対湿度条件下では、光合成有効光量子束密度(以下、PPFD)  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  よりもPPFD 300 でより高い光合成速度が得られるものの、これは数時間で低下し、数日後には葉に障害が出ることが明らかになっている。そこで本年度は、様々なパターンで短時間のPPFD 300 とPPFD  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  を交互に繰り返すことで、日積算の光合成量を最大にする条件を探索した。

#### 3 - 2. 環境ストレス付与によるCPTの高濃度化

CPTを高濃度に蓄積する根(Fig. 2、3)に環境ストレスを付与するため、チャボイナモリの培養液温度を5°C、10°Cとし、対照区(28°C)とCPT濃度および含有量を比較した。次に、吸水ストレスを付与するため、培養液に分子量4000のポリエチレングリコールを添加すること(PEG処理)で浸透圧を高め、無添加区と比較した。いずれも処理は3日、5日とした。

### 4. 研究成果

#### 4 - 1. 成長速度を高める環境条件の探索

様々なパターンでPPFDを変えたものの、PPFD  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  で16時間の日積算光合成量(5.7 mol)を上回る照射パターンはなかった。チャボイナモリは24時間明期では生育障害を生じることから、さらなる明期延長による日積算光合成量の増加は難しいと判断した。今後、昨年度までに調査した光質が光合成速度および形態形成に及ぼす影響を利用して、光合成効率や受光体制の改善を利用し、チャボイナモリの成長速度を高める手法の探索が必要と考えられた。

#### 4 - 2. 環境ストレス付与によるCPTの高濃度化

低培養液温度では、5°Cおよび10°C処理で対照区より根の成長が速くCPTが高濃度化する傾

向が見られた。よって、培養液は気温よりも低く管理することで CPT 収量が大となることが明らかになった。PEG 処理を 3、5 日間付与した結果、根および茎の CPT 濃度が無処理より高かった。この結果は乾物重あたりの CPT 濃度であることから、吸水ストレスによる CPT 生合成の促進または CPT 分解の抑制が生じたと考えられた。

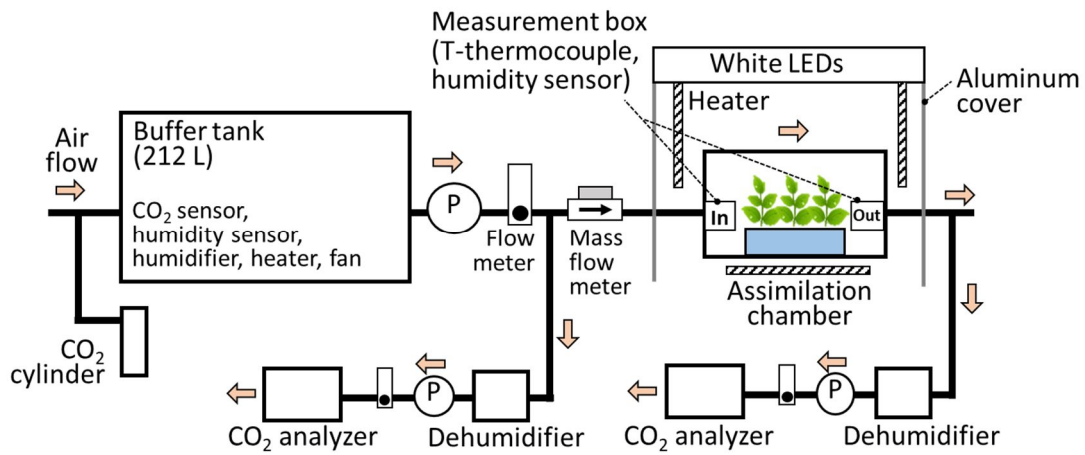


Fig. 1 Diagram of an open-type assimilation chamber. LEDs; light emitting diodes. P; air pump. (J. Agri. Meteor. 76(4): 180-187. <https://doi.org/10.2480/agrmet.D-20-00026>.)

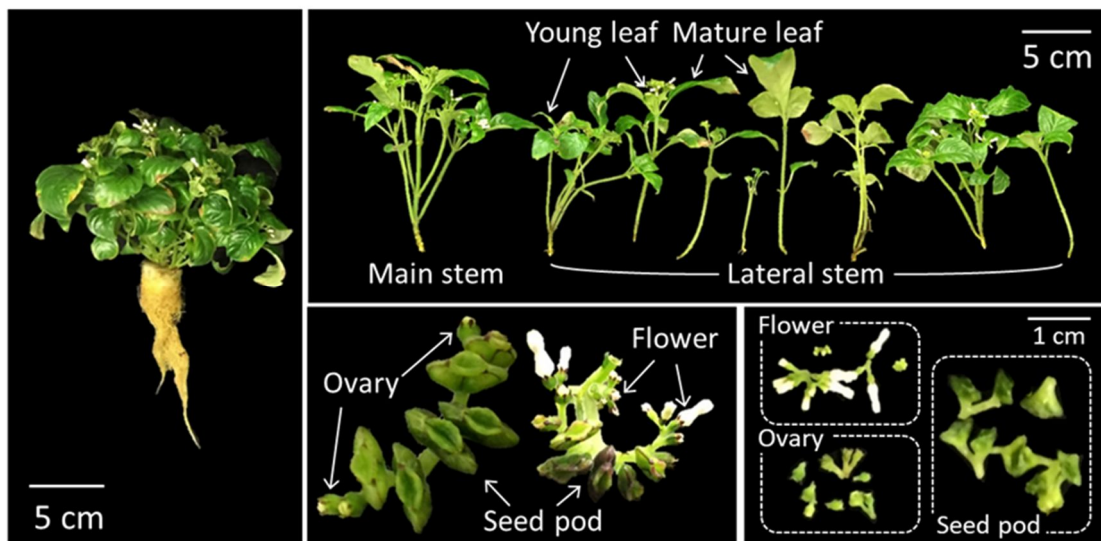


Fig. 2 Classification of the plant organs of *Ophiorrhiza pumila*.

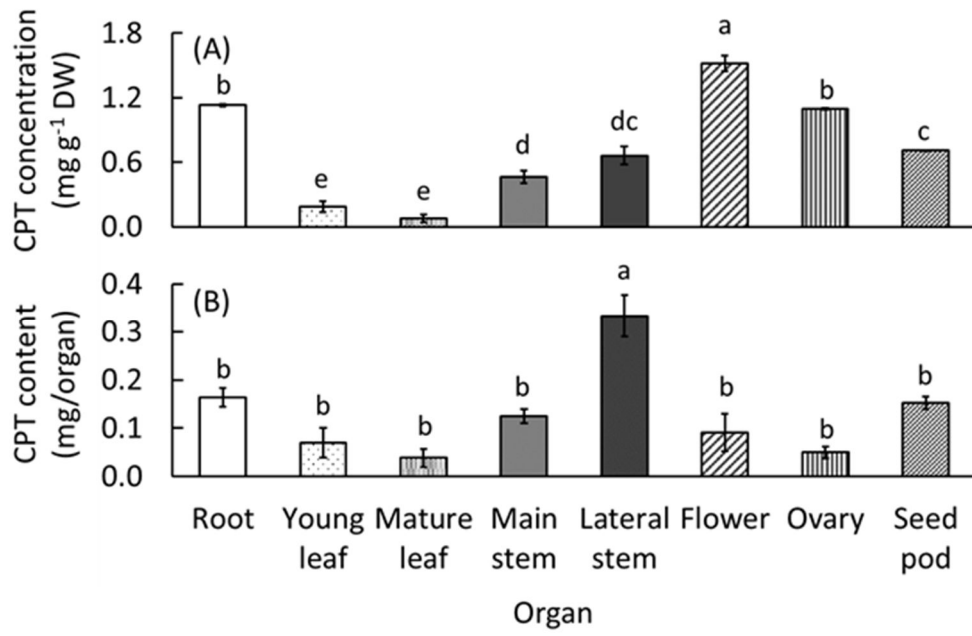


Fig. 3

Camptothecin (CPT) concentration (A) and content (B) in each *Ophiorrhiza pumila* organ at 60 days after transplanting. Vertical bars indicate standard error (n = 3). Different letters indicate significant differences among the organs at  $P < 0.05$  by Tukey-Kramer's test.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rai Amit, Hirakawa Hideki, Nakabayashi Ryo, Kikuchi Shinji, Hayashi Koki, Rai Megha, Tsugawa Hiroshi, Nakaya Taiki, Mori Tetsuya, Nagasaki Hideki, Fukushi Runa, Kusuya Yoko, Takahashi Hiroki, Uchiyama Hiroshi, Toyoda Atsushi, Hikosaka Shoko, Goto Eiji, Saito Kazuki, Yamazaki Mami	4. 巻 12
2. 論文標題 Chromosome-level genome assembly of <i>Ophiorrhiza pumila</i> reveals the evolution of camptothecin biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20508-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee Ji-Yoon, Shimano Akimasa, Hikosaka Shoko, Ishigami Yasuhiro, Goto Eiji	4. 巻 76
2. 論文標題 Effects of photosynthetic photon flux density and light period on growth and camptothecin accumulation of <i>Ophiorrhiza pumila</i> under controlled environments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural Meteorology	6. 最初と最後の頁 180 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2480/agrmet.D-20-00026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee Ji-Yoon, Hiyama Miki, Hikosaka Shoko, Goto Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of Concentration and Temperature of Nutrient Solution on Growth and Camptothecin Accumulation of <i>Ophiorrhiza pumila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 793 ~ 793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9060793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Lee J., Hikosaka S., Ishigami Y, Goto E.
2. 発表標題 Measurement of whole plant gas exchange rates of <i>Ophiorrhiza pumila</i> using an open-type assimilation chamber
3. 学会等名 International Symposium on Advanced Technologies and Management for Innovation (Greensys) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee J., Hikosaka S., Goto E.
2. 発表標題 Effects of nutrient solution concentration on growth and camptothecin content of <i>Ophiorrhiza pumila</i>
3. 学会等名 The annual meeting of Japanese Society of Agricultural, Biological and Environmental Engineers and Scientists
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee, J., Hikosaka, H., Ishigami, Y., Goto, E.
2. 発表標題 Development of an open-type assimilation chamber to measure photosynthetic and transpiration rates of <i>Ophiorrhiza pumila</i> under controlled environments
3. 学会等名 Asian conference for protected horticulture and plant factory (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lee, J., Hikosaka, S., Ishigami, Y., Goto, E.
2. 発表標題 Whole plant photosynthetic and transpiration rates of <i>Ophiorrhiza pumila</i> measured using an open-type assimilation chamber
3. 学会等名 (ISAM2018) International Symposium on Agricultural Meteorology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee, J., Hikosaka, S., Ishigami, Y., Goto, E.
2. 発表標題 Measurement of whole plant gas exchange rates of <i>Ophiorrhiza pumila</i> using an open-type assimilation chamber
3. 学会等名 (GreenSys 2019) International Symposium on Advanced Technologies and Management for Innovative Greenhouses (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	石神 靖弘  (Ishigami Yasuhiro)  (50361415)	高崎健康福祉大学・農学部・准教授    (32305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------