

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07150

研究課題名(和文) 薬用植物カンゾウにおける形質転換培養細胞によるテルペノイド化合物の生成研究

研究課題名(英文) Research on the production of terpenoid compounds by transformed cultured cells in Glycyrrhiza plant

研究代表者

高上馬 希重 (KOJOMA, 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬用植物カンゾウ(Glycyrrhiza植物)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。*G. uralensis*において毛状根を効率的に誘導、増殖する手法を確立した。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。*G. uralensis*のグリチルリチン酸低含量植物体からクローン植物体を得る培養手法を確立した。*G. inflata*のクローン植物体を得る培養手法を確立した。

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 plants (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] We have established a method for efficiently inducing and proliferating hairy roots in *G. uralensis*. [2] 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-b-amyrin in the transformed hairy roots. [3] We have established a culture method for obtaining cloned plants from *G. uralensis* low-content glycyrrhizic acid plants. [4] We established a culture method to obtain cloned plants of *G. inflata*.

研究分野：薬用植物学

キーワード：カンゾウ 培養細胞 テルペノイド

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

1. 研究開始当初の背景

漢方薬原料の生薬「甘草(カンゾウ)」は使用量が非常に多く、日本で使用される漢方処方薬の70%以上に配合される。中国や韓国などでも同様な重要生薬であり、ヨーロッパや北米でも薬用として利用される。甘味料や健康食品としても世界中で利用され市場規模は非常に大きい。生薬「甘草」の原料としてはマメ科薬用植物ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*)、スペインカンゾウ (*G. uralensis*) の地下部が用いられ、日本での医療用途にはウラルカンゾウが主に用いられる。主薬用成分はテルペノイド化合物のグリチルリチン酸である。日本は「甘草」の供給を100%輸入に依存している(輸入量・医療用:約1,300 t/年)。その多くは中国の野生採集などである。中国での消費拡大による乱獲などに起因してグリチルリチン酸含量の低下による品質劣化が憂慮され、高品質な甘草の安定供給は極めて重要な課題である。医薬品原料等として安定供給するためには農作物として生産する必要がある。しかしカンゾウ植物の生育は遅く(5年以上)、品種開発もほとんど進展していなかった。申請者らはこのような事態を打開するため、グリチルリチン酸高含量品種の開発に取り組んでいる。この研究過程において最も重要であるのは、「カンゾウ植物体内でどのような仕組みでグリチルリチン酸及び関連テルペノイドが生成されているのか?」であると痛感した。この「問い」が理解できなければ、植物体の有効な栽培方法、薬用成分量の増強にも決定的な解決方法が得られない。一方、植物の二次代謝化合物の生合成機能に関する研究がめざましい発展を遂げている。カンゾウ植物においてもウラルカンゾウを中心に、テルペノイド(グリチルリチン酸など)の生合成に関わる遺伝子解析に関する報告が数多くなされている。

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。申請者らは植物体間でグリチルリチン酸含量が大きく異なることを世界に先駆けて発見した。研究分担者らと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、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。

3. 研究の方法

(1) *G. uralensis* 毛状根作成手法および増殖条件の改良

先行研究では *G. uralensis* での毛状根の誘導効率、成長増殖量が十分ではなかった。そこで *G. uralensis* の毛状根の成長におよぼす種々の培養条件(基本培地、植物ホルモン、添加糖)の検討を行った。

(2) *G. uralensis* 毛状根による *CYP88D6* 遺伝子の導入

種子から幼植物体に *Agrobacterium rhizogenes* を感染させ毛状根を作成した。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 *A. 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。

(3) *G. uralensis* グリチルリチン酸「低含量」・「高含量」植物体のクローン植物体および毛状根の作成

我々の先行研究で選抜した *G. uralensis* グリチルリチン酸「低含量」・「高含量」植物体の茎切片を用いて、クローン植物体の作成を行った。さらにクローン植物体に *A. rhizogenes* を感染させることで毛状根の誘導を試みた。

(4) *G. inflata* のクローン植物体の作成

上記3項目では *G. uralensis* を用いた。本項目(4)では *Glycyrrhiza inflata* (シンキョウカンゾウ)を用いた。*G. inflata* は日本薬局方には収載されない植物種ではあるがグリチルリチン酸を生成する。植物個体が大きく成長も早いいため研究材料として有意性があると考えられた。*G. inflata* 植物体の茎切片を用いて、クローン植物体の作成を行った。

4. 研究成果

(1) *G. uralensis* 毛状根作成手法および増殖条件の改良

基本培地、植物ホルモン、添加糖、などの検討を行った結果、において従来の6.46倍、において1.27倍、において2.99倍に、それぞれ培養組織の乾燥重量を増加することができた。さらに *Agrobacterium rhizogenes* の感染条件を検討することで毛状根誘導を高率で得ることができた。毛状根における形質転換選択マーカーとして GFP (オワンクラゲ緑色蛍光

タンパク遺伝子)を用いた。植物体内で発現しやすいように改良された *sGFP-S65T* を用いた。742 個の毛状根クローンを獲得し、このうち GFP による緑色蛍光が認められたものが 121 クローンであり、GFP 発現率は 16.3%であった。

(2) *G. uralensis* 毛状根による *CYP88D6* 遺伝子の導入

CYP88D6 遺伝子を導入した毛状根クローンを作成した。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、グリチルリチン高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。

(3) *G. uralensis* グリチルリチン酸「低含量」・「高含量」植物体のクローン植物体および毛状根の作成

我々の先行研究で得られている培養条件を第一に検討した。Murashige-Skoog 培地 (MS 培地) を基本として、種々の植物生長ホルモン濃度の検討を行った。グリチルリチン酸「低含量」植物体において、MS 培地においてクローン植物体の獲得ならびに増殖を確認した。「高含量」植物体では MS 培地では褐変枯死し、クローン植物体を得ることができなかった。クローン植物体の得られた「低含量」において毛状根の誘導を試みた。葉、茎など様々な感染組織を検討した結果、特殊な培養組織を作成することで、毛状根の誘導ならびに GFP による緑色蛍光を確認することができた。さらなる誘導条件の検討を進行中である。

(4) *G. inflata* のクローン植物体の作成

我々の先行研究で得られている *G. uralensis* および *G. glabra* の培養条件を第一に検討した。MS 培地を基本として、種々の植物生長ホルモン濃度の検討を行った。その結果、MS 培地においてクローン植物体の獲得ならびに増殖を確認した。

本研究の成果をさらに発展させ、グリチルリチン酸などのテルペノイド化合物の生合成遺伝子発現の解析に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。

< 引用文献 >

M. Kojoma, S. Hayashi, T. Shibata, Y. Yamamoto, Variation of Glycyrrhizin and Liquiritin Contents within a Population of 5-Year-Old Licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants cultivated under the same conditions, *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 1334-1367 (2011)

M. Kojoma, K. Ohyama, H. Seki, Y. Hiraoka, S. N. Asazu, S. Sawa, S. Yoshida, T. Muranaka, In vitro proliferation and triterpenoid characteristics of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer, Leguminosae) stolons, *Plant Biotechnology*, 27, 59-66 (2010)

M. Kojoma, H. Kohda, N. Tani, K. Ashida, M. Sugino, A. Yamamoto T. Horikoshi, In vitro Propagation from Axillary Buds of *Glycyrrhiza glabra* L., *Plant Tissue Culture Letters*, 12, 145-149 (1995)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 I Kusaba, T Nakao, H Maita, S Sato, R Chijiwa, E Yamada, S Arima, M Kojoma, K Ishimaru, A Akashi, A Suzuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Mesorhizobium sp. J8 can establish symbiosis with Glycyrrhiza uralensis, increasing glycyrrhizin production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.20.1124a	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 Fanani Much Z, Sawai Satoru, Seki Hikaru, Ishimori Masato, Ohyama Kiyoshi, Fukushima Ery O, Sudo Hiroshi, Saito Kazuki, Muranaka Toshiya	4. 巻 62
2. 論文標題 Allylic Hydroxylation Activity Is a Source of Saponin Chemodiversity in the Genus Glycyrrhiza	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 262-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa173	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 Kawasaki Ayumi, Chikugo Ayaka, Tamura Keita, Seki Hikaru, Muranaka Toshiya	4. 巻 38
2. 論文標題 Characterization of UDP-glucose dehydrogenase isoforms in the medicinal legume Glycyrrhiza uralensis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 205-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0222a	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 Kanji Niwa, Renyi, Naonobu Tanaka, Shindai Kitaguchi, Daisuke Tsuji, Sang-Yong Kim, Ariuntuya Tsogtbaatar, Perleidulam Bunddulam, Kazuyoshi Kawazoe, Mareshige Kojoma, Davaadagva Damdinjav, Kohji Itoh, Yoshiki Kashiwada	4. 巻 171
2. 論文標題 Linaburiosides A-D, acylated iridoid glucosides from Linaria buriatica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 112247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytochem.2019.112247	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 該当する

1. 著者名 Masaru Terasakia, Yasuhiro Kuramitsu, Mareshige Kojoma, Sang-Yong Kim, Takuji Tanaka, Hayato Maeda, Kazuo Miyashita, Chikara Kawagoe, Shouji Kohno, Michihiro Mutoh	4. 巻 64
2. 論文標題 High fucoxanthin wakame (<i>Undaria pinnatifida</i>) prevents tumor microenvironment formation in an AOM/DSS mouse carcinogenic model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 103709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2019.103709	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 該当する

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高上馬 希重、金 尚永
2. 発表標題 生薬カンゾウの基原Glycyrrhiza属植物の in vitroストロンによる植物組織培養
3. 学会等名 第43回生薬学会北海道支部例会(札幌)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎真巳, Megha, Amit Rai, 森哲也, 中林亮, 中村道美, 鈴木秀幸, 高橋弘喜, 高上馬希重, 齊藤 和季
2. 発表標題 オクトリカプトの統合オミクス解析に基づくジテルペンアルカロイド生合成遺伝子の推定
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会(東京)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 關 光・高上馬 希重・村中 俊哉	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 92
3. 書名 アグリバイオ 薬用植物の開発と産業利用	

〔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	関 光 (SEKI Hikaru) (30392004)	大阪大学・工学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	金 尚永 (KIM Sang-Yong) (70624287)	北海道医療大学・薬学部・講師 (30110)	

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