

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22314

研究課題名(和文) 高グリチルリチン酸生産に資する微生物共生を利用した薬用植物カンゾウの栽培法

研究課題名(英文) Increased glycyrrhizin production by the inoculation of Rhizobia in Glycyrrhiza uralensis.

研究代表者

鈴木 章弘 (Suzuki, Akihiro)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50305108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬用植物であるウラルカンゾウは、様々な機能性を示すグリチルリチン酸を生産する。またこの植物はマメ科であるため根粒菌との共生関係を確立することができる。この研究ではウラルカンゾウへ感染する根粒菌 *Mesorhizobium* sp. J8を単離してその接種効果を調査した。その結果、J8を接種したウラルカンゾウでは、非接種のものと比較して地上部の成長が旺盛になり、葉の緑度を示すSPAD値も有意に高くなった。さらに地下部におけるGL生産も非接種と比較して約3.2倍にまで上昇した。これらの結果は、根粒菌の接種がウラルカンゾウの生産に有利に働くことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生薬としてのウラルカンゾウの大部分は自生種を採集して調達されているが、ほぼ100%が中国からの輸入であり、価格の高騰や供給不安などから国内栽培が推奨されている。また、ウラルカンゾウはその機能性ゆえに多くの漢方薬に配合されており、我が国は今後もウラルカンゾウの大消費国であり続けると予想される。今回の研究成果は、根粒菌の接種によってウラルカンゾウの成長が促進され、機能性成分のグリチルリチン酸の合成まで活性化されることを示すものであり、実際の栽培に適用できることになればそのインパクトは非常に大きなものとなる。

研究成果の概要(英文)：Glycyrrhiza uralensis is a medicinal plant that contains glycyrrhizin (GL), which has various pharmacological activities. Because *G. uralensis* is a legume, it can establish a symbiotic relationship with Rhizobia. So, Rhizobia were isolated from root nodules of *Glycyrrhiza glabra*, and a rhizobium that can form root nodules in *G. uralensis* was selected. This rhizobium was classified as *Mesorhizobium* by phylogenetic analysis and was designated *Mesorhizobium* sp. J8. When *G. uralensis* plants grown from cuttings were inoculated with J8, root nodules formed. Shoot biomass and SPAD values of inoculated plants were significantly higher than those of uninoculated controls, and the GL content of the roots was 3.2 times that of controls. These results indicate that rhizobial symbiosis promotes both biomass and GL production in *G. uralensis*.

研究分野：作物生理学

キーワード：薬用植物 カンゾウ 根粒菌 共生 窒素固定 グリチルリチン 機能性成分

1. 研究開始当初の背景

薬用植物カンゾウはグリチルリチン酸 (以下 GL と略) をはじめとする様々な機能性成分を含んでいるため漢方処方約 70% に配合されている。また、その供給は中国からの輸入に頼っており、価格の高騰や供給不安などから国内栽培が推奨される。それを受けて様々な方法で栽培が試みられているが、多くは栽培時のストレスが排除された方法であり、生産量が多く且つ GL 含量が高くなる栽培技術は未だに確立されていない。高等植物における二次代謝産物は、往々にして環境ストレスがかかった場合に高生産になることが多く、GL 生産にも正にそれが当てはまる。つまり高いバイオマスと高 GL 含量が両立できない理由の 1 つは、それら 2 つの間にトレードオフの関係が存在するからである。

ところで、土壌微生物の菌根菌と根粒菌は宿主植物と共生関係を築き、宿主の成長に貢献することが知られている。すなわち、菌根菌は 70% 以上の維管束植物と共生し、菌糸を土壤中に張り巡らせて栄養分を吸収することで宿主の成長を支え、根粒菌はマメ科植物の根に「根粒」を形成し、空中窒素を固定して宿主へ供給している。マメ科のカンゾウもこれら共生の例外ではない。しかしカンゾウの場合は、ダイズなどとは異なり共生の頻度は高くない。例えば圃場のダイズは全ての個体に根粒が形成されるが、カンゾウ (特にスペインカンゾウ) の根を観察しても根粒を全く見出せないことが少なくない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の点を目的として研究を実施し、根粒菌との共生によってカンゾウの成長と GL 生産の増加を目指した。

- ・薬用植物カンゾウに根粒を形成する能力を持つ根粒菌を自然界から単離し、その特徴づけを行う。
- ・単離した根粒菌を接種して効率良く共生を確立する条件を見出す。
- ・単離した根粒菌を接種することによって宿主であるカンゾウ植物の成長及び GL 生産へどのような影響があるかを評価する。

3. 研究の方法

<根粒菌の単離及びゲノム解析>

佐賀大学の圃場の土壌にスペインカンゾウの苗を移植して半年以上経過した後、形成されていた根粒を単離した。次のその根粒内に共生していた根粒菌を YM 寒天培地にプレーティングすることで根粒菌を単離した。単離された根粒菌をスペインカンゾウへ接種して根粒形成能を調査したが、少なくとも根粒菌接種 1 ヶ月後では、根粒を形成した株が全く存在しなかった。そこで単離できていた根粒菌をウラルカンゾウへ接種して根粒形成能を評価した。その結果、菌接種 1 ヶ月後でも根粒を形成した菌が存在し、その中でも、もっとも高い窒素固定活性を示した根粒菌を選抜した。

次にこの根粒菌を培養してゲノム DNA を抽出して、PacBio RSII シーケンサーによってゲノムシーケンスを解読し、HGAP4 ソフトウェアによって得られたシーケンスを環状化した。

<根粒着生試験>

宿主となるカンゾウ植物 (スペインカンゾウ及びウラルカンゾウ) は挿木または種子を播種することによって準備した。接種する根粒菌は、YM 液体培地で数日間振盪培養し、増殖した根粒菌を集菌して基本的には 1 個体当たり 1×10^8 細胞を接種した。また根粒着生試験を行う際の、植物を育てるための培地は B&D 寒天培地を用い、 KNO_3 を基本的に 1 mM の濃度で添加した。

<窒素固定活性 (アセチレン還元活性) の測定>

窒素固定を行うニトロゲナーゼ系はアセチレンを還元してエチレンを生成する能力を持つ。したがってアセチレンを含む空气中に根粒を静置して、単位時間あたりのエチレン生成量をガスクロマトグラフィーで測定して窒素固定活性とした。

<グリチルリチン酸の測定>

カンゾウ植物の根を粉砕して 50%エタノールで GL を抽出し、フィルターを通して不純物を除去したのち、HPLC で定量した。使用した HPLC システムは、high-performance liquid chromatography (Chromaster 5310, Hitachi, Tokyo, Japan) と InertSustain C18, 5 μ m HPLC column (GL Sciences Inc. Tokyo, Japan) から構成され、アセトニトリルとギ酸を溶媒として使用し、カラムオーブンを 40°C、カラム流量を 0.6 mL min⁻¹ に設定し、240 から 260 nm で検出を行った。

4. 研究成果

<根粒菌の単離及びゲノム解析>

スペインカンゾウに形成された根粒から少なくとも 14 種類の菌を単離した。その後それらをウラルカンゾウへ接種し、1 ヶ月後に形成された根粒を用いて窒素固定活性を測定し、最も高い値を示した根粒菌をそれ以降の実験に供した。また 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析からこの菌を *Mesorhizobium* sp. J8 と命名した。

ゲノム解析の結果得られたゲノム構造を示すマップを図 1 に示す。この根粒菌は約 6.7 Mb の

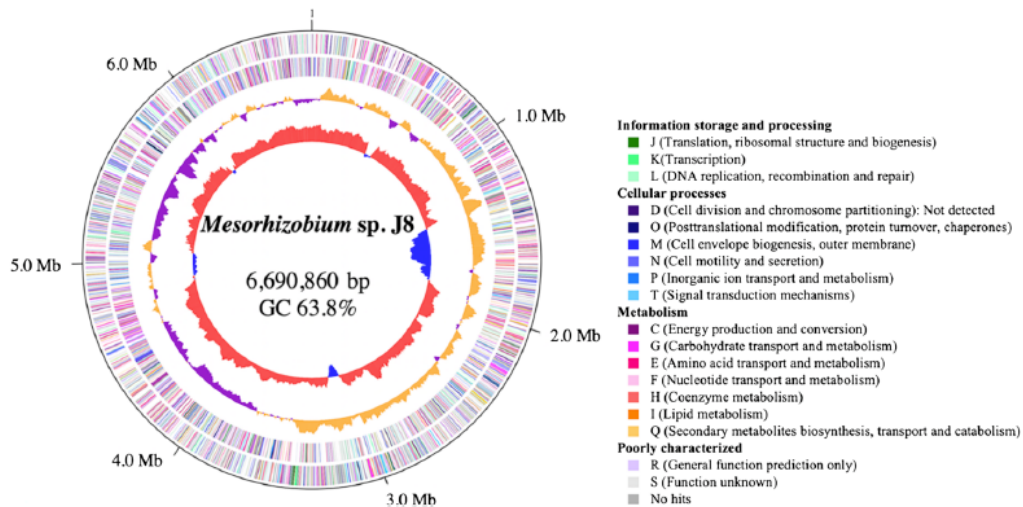


図 1 : *Mesorhizobium* sp. J8 のゲノム構造

環状化ゲノムマップは、in silico Molecular Cloning を用いて作出された。最も外側の円とその内側の円は、タンパク質をコードすると予想された遺伝子を示し、もっとも外側がコードする方向が時計回り、その内側が反時計回りであることを示す。またそれぞれの遺伝子の色は遺伝子の推定される機能を示す。また、最内側の円は GC 含量をその外側の円は GC skew を示す。(出版した Kusaba et al. の論文から引用)

大きさであり、GC 含量は 63.8%、6325 個のタンパク質をコードすると思われる遺伝子と、52 個の tRNA 遺伝子が予測された。

<根粒着生試験>

ウラルカンゾウの苗へ根粒菌を接種して 90 日後の根粒の写真を図 2 に示す。また、その時の窒



図 2 : *Mesorhizobium* sp. J8 を接種して 90 日後に形成された根粒
スケールバーは 5 mm を示す。(出版した Kusaba et al. の論文から引用)

素固定活性を図3に示す。ウラルカンゾウの苗は挿木を用いて準備しており、コンタミネーショ

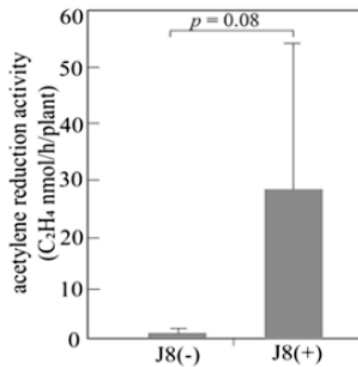


図3 : *Mesorhizobium* sp J8 を接種して 90 日後に形成された根粒による窒素固定活性 (アセチレン還元活性) J8(-)は根粒菌を接種しなかった個体, J8(+)は根粒菌を接種した個体を示す。 (出版した Kusaba et al. の論文から引用)

ンが生じない閉鎖系で行ったわけではなかったため、根粒菌を接種しなかった J8(-)にもわずかながら根粒が形成されていた。しかし検出された個体あたりの窒素固定活性は、図に見られるように J8 を接種した方が明らかに高い値を示した。この結果は J8 が根粒を形成する能力を持つのみならず、窒素を固定する能力を有することを示している。

<根粒菌接種による GL 生産への影響>

次に根粒菌を接種することによって根における GL 生産がどのような影響を受けるかを調査した。根粒菌を接種して 90 日経過したウラルカンゾウの地下部から GL を抽出して解析した結果を図4に示す。地下部の単位重さあたりの GL 含量は、図4から明らかなように根粒菌を接種した場合に高い値を示していた。このことは根粒菌を接種した個体では GL の生産が高まってい

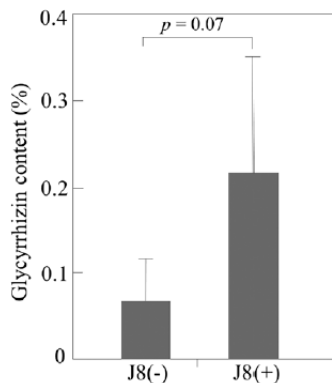


図4 : *Mesorhizobium* sp J8 を接種して 90 日後の地下部における GL 含量 J8(-)は根粒菌を接種しなかった個体, J8(+)は根粒菌を接種した個体の地下部の単位重さあたりの GL 含量を示す。 (出版した Kusaba et al. の論文から引用)

ることを示しており、非常に重要な知見である。

以上の研究は、ウラルカンゾウへ根粒菌を接種して 90 日後という短い期間で調査したものであるが、現在、より長期間に渡った栽培試験に取り組んでおり、それによっても同様の結果が得られれば、ウラルカンゾウの栽培に大きく貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kusaba Ikuko, Nakao Takahiro, Maita Hiroko, Sato Shusei, Chijiwa Ryota, Yamada Emi, Arima Susumu, Kojoma Mareshige, Ishimaru Kanji, Akashi Ryo, Suzuki Akihiro	4. 巻 38
2. 論文標題 <i>Mesorhizobium</i> sp. J8 can establish symbiosis with <i>Glycyrrhiza uralensis</i>, increasing glycyrrhizin production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 57 ~ 66
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木章弘, 山田恵美, 原田恵, 中尾隆寛, 千々岩涼太, 石丸幹二, 高上馬希重, 有馬進
2. 発表標題 薬用植物カンゾウの微生物共生によるグリチルリチン酸生産の活性化
3. 学会等名 日本動物学会, 九州沖縄植物学会, 日本生態学会合同長崎大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------