

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860066

研究課題名(和文) 種内多様性研究と細胞培養による植物二次代謝多様化誘導因子の解明

研究課題名(英文) Exploration of a factor in diversifying plant secondary metabolism based on intra-specific diversity and plant cell culture

研究代表者

齋藤 義紀 (SAITO, Yoshinori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：30441588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：各地に広く分布する高等植物を1つの種につき複数試料，生育地域別に採集し，LC-MS分析および成分の分離・精製を行うことによって種内多様性を有する幾つかの種を見出した。このうち *Eupatorium heterophyllum* は主要成分の異なる3つの成分タイプに分類することができ，これは別途実施した遺伝子解析の結果に基づくクラスター分類の結果とよく対応した。種内多様性が見られた植物からのカルス誘導にも成功したので，異なる成分タイプの野生個体に由来するカルスを用いた成分と培養条件との関連性の検討に着手した。

研究成果の概要(英文)：Higher plants belonging to different geographical populations within a single species were collected, and their chemical ingredients were analyzed using LC-MS and then exhaustively separated. The presence of intra-specific diversity in chemicals was revealed in some species. Of these, *Eupatorium heterophyllum* was classified into three groups based on their major components, which corresponded to the result of clustering of neutral DNA sequences. Calluses were successfully induced from intra-specifically diverse plants for studying a relationship between culture conditions and secondary metabolite profiles.

研究分野：天然物化学

キーワード：種内多様性 細胞培養 高等植物 テルペノイド 薬用資源

### 1. 研究開始当初の背景

植物二次代謝系は驚異的な多様性を有しており、植物自身の生存戦略に大きく関わるとのみならず、人類にとっても重要な数々の医薬品のリード化合物を提供してきた。近年、多くの天然資源のゲノム解読が進んだことで、予想を遙かに超える数の二次代謝産物合成遺伝子が休眠状態で存在することが明らかにされている。高等植物は生合成関連遺伝子の数も多く、そこから推定される植物界全体の二次代謝産物の総数、ならびに1つの種が産生する二次代謝産物の最大数はいずれも現在知られている化合物数を遙かに凌駕する。このように、最も身近な天然資源である高等植物の成分にも未知の部分が多く残されており、この潜在的な二次代謝機能をいかに活性化させるかが注目される。

野生植物が産生する成分には多くの場合種内多様性が存在する。すなわち、同じ種であっても異なる集団間、あるいは異なる個体間では成分組成も異なっており、多様な二次代謝経路が活性化されていると考えられる。

申請者は、これまでにキク科を中心とする国内外の様々な野生植物について、化学成分、塩基配列、および地理的分布といった複合的な観点から、種内多様性の実態を明らかにしてきた。多様化の程度は種によって大小様々であったが、多くの種で主成分や塩基配列パターンの違いに基づいて明確に区別可能な種内グループの存在を見だし、地理的分布も含めた相関関係を明らかにした。同一種内における成分の多様性は多岐に渡っており、特定の成分だけでなく成分組成全体が大きく異なる事例も見付かっている。多様性の大きい種では、多数の試料を別個に成分分析した結果、全体で得られた化合物の総数(重複は除く)が個々の試料から得られた化合物数の平均値の数倍から最大で10倍に達した例もあり、新規化合物も数多く含まれていた。

野生個体における種内バリエーションの形成は何らかの因子による調節を受けていると推測される。この因子を同定できれば、多様化機構の解明および他の種への応用展開が期待され、新規医薬品シーズの探索源としての個々の天然資源の価値を大いに高めることが可能である。

### 2. 研究の目的

本研究では、植物二次代謝産物産生における多様化機構を解明することによって潜在的な有用物質産生能を最大限に引き出すことを最大の目的とし、そのために種内多様性の形成に寄与する主要因子を同定することを目指している。野生個体における種内多様性は、産生主にとって生存戦略上何らかの意味を持つものであり、天然有機化合物の際立った構造多様性をもたらす1つの原動力であると考えられる。種内多様性の大きい種を見だし、そこから得た植物細胞を人工培養に付して、成分パターンの変化(特に、異なる

野生型成分パターンの相互互換)に寄与する主要因子を明らかにする。その知見をもとに、因子の作用点や発現誘導される遺伝子、成分パターン間の生合成的関連など未だ不明な点の多い多様化機構の全容解明に迫り、さらに他の種の植物への応用展開を目指す。

本研究では、同一種内で産生成分の異なる2つ以上の野生株をあらかじめ入手することで、物質産生状態を変化させる因子が環境中に存在することが支持される。さらに、これらの野生個体を同一条件下での培養に付することで、それぞれどのように環境変化にตอบสนองするかを比較検討することが可能である。これによって、成分の違いが意味するところを正しく理解することができ、目的達成につながるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究では、できるだけ種内多様性に富んだ種を材料とすることが肝要である。過去の実績から候補となり得る高等植物を採集してLC-MS分析に付し、実際に多様性が認められた種について成分の網羅的探索と植物細胞の人工培養を組み合わせたアプローチを試みる。

#### (1) 試料の採集とLC-MS分析

各地に広く分布する高等植物について、特にこれまで研究実績のあるキク科植物を中心に採集する。採集は、地方単位で距離的に隔離された複数地点で実施し、地域差以外の影響を確認するため1地点につき数試料を採集する。また、季節変動の影響を避けるためにできるだけ短期間に行う。得られた試料の抽出エキスをLC-MSにて分析し、地域依存的な種内多様性が見られる野生種を選抜する。

#### (2) 成分の網羅的分析

同一種内で異なるLCパターンを示した試料については、各成分タイプごとに主要成分を単離して同定するとともに、LC-MS分析で得られたクロマトグラムのピーク帰属を行う。天然において特定条件下でのみ産生誘導される成分は生物活性を有する可能性が高いと期待されることから、ここでは新物質探索も兼ねる。

#### (3) カルス誘導および植物細胞培養

採集した植物の細胞を人工培養に付してカルス誘導を行う。次いで、カルス誘導、増殖、液体培地による大量培養のための至適培養条件の確立、および異なる培養条件下において成分組成が野生型からどのように変化するかを追跡を企図して、基本培地の種類、植物ホルモンの種類と濃度、窒素源やミネラル類の栄養素濃度、光照射の有無や波長、温度、pH等について詳細な条件検討を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 試料の採集とLC-MS分析

長崎県、大分県、高知県、徳島県にて採集を行い、*Eupatorium* 属、*Ligularia* 属、*Farfugium*

属植物を得た。また、長野県産、北海道産および中国産の *Eupatorium* 属植物を別途入手した。それぞれ LC-MS にて成分分析を行ったところ、本邦産の *E. glehnii* および中国産の *E. heterophyllum* の種内多様性が顕著であった(図1)。前者は以前の報告を支持するものであり、後者については初の知見である。

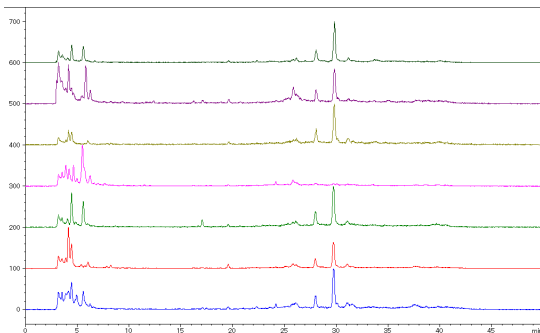


図1 重慶市産 *E. heterophyllum* の HPLC 分析

## (2) 成分の網羅的分析

### ① *Eupatorium heterophyllum* の種内多様性

個別の試料について成分の分離・精製を行った結果、主要成分の組成が大きく異なる3種のケモタイプが存在することを見出した(図2)。以前に知られていたのはケモタイプIのみである。成分と地理的環境との相関は認められなかったことから、遺伝子上の3箇所の領域(核の ITS 領域、葉緑体の *atpB-rbcL* 領域ならびに *trnL-rpl32* 領域)の塩基配列を解析し、クラスター分析を行った。その結果、遺伝子による分類はケモタイプ分類とよく一致した(図3)。

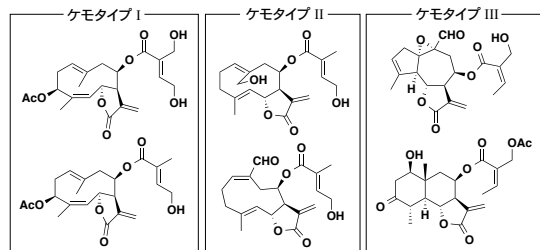


図2 *E. heterophyllum* の各ケモタイプの特徴成分

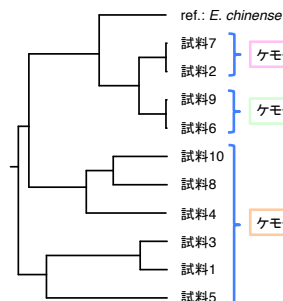


図3 生育地の異なる *E. heterophyllum* 試料の系統樹とケモタイプ

さらに、本植物 10 試料から得た計 21 種の新規化合物について細胞毒性活性試験を行ったところ、2 種の化合物が HL-60 細胞に対してポジティブコントロールのマイトマイシン C ( $IC_{50}$ : 0.12  $\mu$ M) に匹敵する活性を示し

た(図4)。いずれの化合物もマイナーなケモタイプの試料より微量成分として得られたものであった。

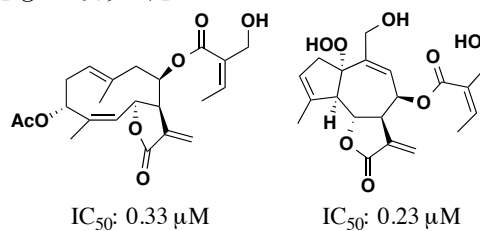


図4 *E. heterophyllum* の活性成分

### ② 本邦産 *Eupatorium* 属植物の成分

*Eupatorium x tripartitum*, *E. variabile*, *E. makinoi*, および *E. fortunei* の4種を同様に成分分析に付した。いずれにおいても主成分と見なせるほどの二次代謝産物は認められず種内多様性の検討には至らなかったが、計8種の新物質を単離・構造決定した。

### ③ *Farfugium japonicum* の種内多様性

今回採集した試料はほぼ同じ LC パターンを示し、実際に単離した化合物の組成も類似していた。しかし、過去の文献にて報告されている成分とは明確に異なっており、種内多様性の存在が示唆された。7 種の新規化合物が得られ、うち1種が1つの試料にのみ主成分として豊富に含まれていたことから、種内多様性を評価する上での重要な指標化合物となり得ることを見出した。

### ④ その他

*Euphorbia* 属, *Cremanthodium* 属, *Saussurea* 属植物についても種内多様性研究に着手した。それらの成果を含め、研究機関を通じて49種の新規化合物を含む計150種の化合物を単離・構造決定した。

### (3) カルス誘導および植物細胞培養

採集した植物試料の各部位からカルス誘導を試みた。その結果、MS 培地に最終濃度 5  $\mu$ M のオーキシシン (2,4-D) と 0.5  $\mu$ M のサイトカイニン (BAP) を添加した場合において *E. glehnii* の茎と *F. japonicum* の葉からカルスが誘導された。本条件下ではカルス誘導に約6週間を要したことから、さらなる条件の最適化を試みている。培養条件の変化に伴う主要成分組成の変化も併せて追跡している。

## 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9件)

- ① Morikawa, H.; Saito, Y.; Matsuo, Y.; Maeda, H.; Tanaka, T. Eudesmane sesquiterpenoids from the wood of *Platycarya strobilacea*. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, in press. (査読有)
- ② Saito, Y.; Takashima, Y.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Hanai, R.; Kuroda, C.; Tori, M. Three new eremophilanes from *Ligularia* collected in China. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, in press. (査読有)

- ③ Ogata, M.; Saito, Y.; Matsuo, Y.; Maeda, H.; Tanaka, T. Triterpene galloyl esters from edible acorn of *Castanopsis cuspidata*. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 179–181. (査読有)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27032195>
- ④ Hao, Q.; Saito, Y.; Matsuo, Y.; Li, H.-Z.; Tanaka, T. Chalcane-stilbene conjugates and oligomeric flavonoids from Chinese Dragon's Blood produced from *Dracaena cochinchinensis*. *Phytochemistry* **2015**, *119*, 76–82. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.09.009
- ⑤ Saito, Y.; Iga, S.; Nakashima, K.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kuroda, C.; Tori, M. Terpenoids from *Ligularia virgaurea* collected in China: the first example of two bakkane derivatives with an anhydride-type ring C and nineteen new chemical constituents. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8428–8435. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.tet.2015.09.011
- ⑥ Hao, Q.; Saito, Y.; Matsuo, Y.; Li, H.-Z.; Tanaka, T. Three new flavans in Dragon's Blood from *Daemonorops draco*. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 1419–1425. (査読有)  
DOI: 10.1080/14786419.2014.1003137
- ⑦ Saito, Y.; Mukai, T.; Iwamoto, Y.; Baba, M.; Takiguchi, K.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kawahara, T.; Kuroda, C.; Tori, M. Germacranolides and their diversity of *Eupatorium heterophyllum* collected in P. R. China. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 1092–1099. (査読有)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/62/11/62\\_c14-00426/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/62/11/62_c14-00426/article)
- ⑧ Saito, Y.; Sasaki, Y.; Komiyama, T.; Ohsaki, A.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kuroda, C.; Tori, M. Structure and cytotoxic evaluation of five 12-oxygenated eremophilanes from *Ligularia lingiana*. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5878–5883. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.tet.2014.06.030
- ⑨ Saito, Y.; Ichihara, M.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kuroda, C.; Tori, M. Twelve new compounds from *Ligularia melanothyrsa*; isolation of melanothyrsin A, and other eremophilane sesquiterpenoids. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 2621–2628. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.tet.2014.02.080
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 緒方美咲, 齋藤義紀, 松尾洋介, Xun Gong, 田中 隆. 中国雲南省産 *Euphorbia griffithii* の新規ジテルペノイド. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日～29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ② 汐崎優子, 齋藤義紀, 松尾洋介, 田中 隆. キク科ツワブキ (*Farfugium japonicum*) の新規エレモフィラン型セスキテルペン. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日～29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ③ Yoshinori Saito, Yuriko Takashima, Aya Kamada, Saori Iga, Mizuho Taniguchi, Kie Hoshiyama, Chika Hayami, Katsuyuki Nakashima, Yasuko Okamoto, Motoo Tori, Ryo Hanai, Xun Gong, Chiaki Kuroda. Chemical and genetic diversity of *Ligularia virgaurea*. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 15 日～20 日, ホノルル (米国)
- ④ Misaki Ogata, Yoshinori Saito, Katsuyuki Nakashima, Yasuko Okamoto, Motoo Tori, Takayuki Kawahara, Ryo Hanai, Yosuke Matsuo, Takashi Tanaka, Xun Gong, Chiaki Kuroda. Intra-specific diversity in cytotoxic sesquiterpene lactone constituents of *Eupatorium heterophyllum* collected in P. R. China. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 15 日～20 日, ホノルル (米国)
- ⑤ 齋藤義紀, 高橋宏明, 岡本育子, 中島勝幸, 通 元夫, 黒田智明, 花井 亮, Xun Gong. 中国雲南省産 *Ligularia pleurocaulis* の化学的種内多様性. 第 57 回天然有機化合物討論会, 2015 年 9 月 9 日～11 日, 神奈川県民ホール (神奈川県横浜市)
- ⑥ 齋藤義紀, 岡本育子, 花井 亮, 平井美咲, 松尾洋介, 田中 隆, Xun Gong, 廣田 洋, 黒田智明. 中国雲南省産 *Ligularia lankongensis* の高度に酸化されたピサボラン型化合物. 第 59 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2015 年 9 月 5 日～7 日, 近畿大学 (大阪府東大阪市)
- ⑦ 通 元夫, 星山紀恵, 速水智加, 中島勝幸, 齋藤義紀, 岡本育子, Xun Gong, 花井 亮, 黒田智明. 中国産 *Ligularia virgaurea* の新規化学成分と多様性(4). 第 59 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2015 年 9 月 5 日～7 日, 近畿大学 (大阪府東大阪市)
- ⑧ Yoshinori Saito, Misaki Ogata, Katsuyuki Nakashima, Yasuko Okamoto, Ryo Hanai, Takayuki Kawahara, Yosuke Matsuo, Takashi Tanaka, Motoo Tori, Xun Gong, Chiaki Kuroda. Chemical and genetic diversity of *Eupatorium heterophyllum* collected in China. Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia, 2015 年 8 月 30 日～9 月 2 日, 徳島文理大学 (徳島県徳島市)
- ⑨ 日高基貴, 齋藤義紀, 中島勝幸, 岡本育子, 通 元夫, 松尾洋介, 田中 隆, Xun Gong, 黒田智明. 中国四川省北西部における *Ligularia lamarum* の化学成分と種内多様性. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 27 日, 神戸サンボーホール (兵庫県神戸市)
- ⑩ 緒方美咲, 齋藤義紀, 中島勝幸, 通 元夫, 河原孝行, 松尾洋介, 田中 隆, Xun Gong, 黒田智明. 重慶市産キク科

*Eupatorium heterophyllum* の化学的種内多様性. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 27 日, 神戸サンボーホール (兵庫県神戸市)

- ⑪ 齋藤義紀, 日高基貴, 中島勝幸, 岡本育子, 通元夫, 河原孝行, 松尾洋介, 田中隆, Xun Gong, 黒田智明. 中国四川省産 *Aquilegia* 未同定種の新規アビエタン型ジテルペン. 第 58 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2014 年 9 月 21 日, 和歌山大学 (和歌山県和歌山市)
- ⑫ 緒方美咲, 齋藤義紀, 中島勝幸, 通元夫, 河原孝行, 松尾洋介, 田中隆, Xun Gong, 黒田智明. 中国雲南省および重慶市産キク科 *Eupatorium heterophyllum* の新規セスキテルペノイド. 第 58 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2014 年 9 月 21 日, 和歌山大学 (和歌山県和歌山市)

[その他]

ホームページ等

[http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/research/rsh\\_npc.html](http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/research/rsh_npc.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 義紀 (SAITO, Yoshinori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・

准教授

研究者番号 : 30441588