

令和 元 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14711

研究課題名（和文）野生漢方薬原料植物カラスビシャクの迅速作物化の為に有効多糖成分合成遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of genes for the biosynthesis of effective polysaccharide component for rapid domestication of crow-dipper, which is a raw material wild plant for a Chinese medicine

研究代表者

松岡 健（Matsuoka, Ken）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：40222294

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）：カラスビシャクの塊茎（イモ）は半夏と呼ばれる重要な生薬であり、国内生産系の確立が望まれている。半夏は自生品の採取や慣行栽培により生産されるため、アラバンとよばれる多糖性有効成分の含量にばらつきが多い。そこで本研究においては、カラスビシャクの網羅的遺伝子発現解析を出発点としてアラバン合成に関わる遺伝子産物候補の獲得に努め、アラビノース転移酵素に対するcDNAを獲得した。また、これがアラバン生合成に関わるかの検討に必須である技術である、カラスビシャクの形質転換系も構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方処方のおよそ23%に処方され、また国内消費のほぼ100%を輸入に頼っている生薬である半夏は、カラスビシャクという植物に形成される芋の乾燥産物である。従って、安定した品質の半夏の国内での生産系の確立が望まれている。

そこで本研究では、半夏の有効成分であるアラバンの生合成系の解析を進め、生合成系候補遺伝子の一つを同定した。この遺伝子を用いることで、成熟した塊茎の形成前にアラバンの含量が均一なカラスビシャク系統の選抜が可能となり、またアラバンの合成量が高い半夏の選抜も可能となる。したがって本研究の成果は、国内での安定した品質の半夏生産に寄与する研究成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The tuber of crow-dipper is an important herbal medicine called “Hange”, and establishment of the system of its domestic production is desired. Since Hange is produced by harvesting the natural products or produced by conventional cultivation, the content of the polysaccharide active ingredient called araban varies widely.

Therefore, in this study, we tried to acquire gene product candidates related to the synthesis of araban from the comprehensive gene expression analysis of crow-dipper and obtained cDNA for an arabinose transferase. In addition, we have established a transformation system of crow-dipper, which is a technique that is essential for examining whether the gene for the isolated cDNA is involved in araban biosynthesis.

研究分野：植物分子細胞生物学、植物バイオテクノロジー

キーワード：アラビノース転移酵素 トランスクリプトーム解析 機能性多糖 cDNA 形質転換系

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

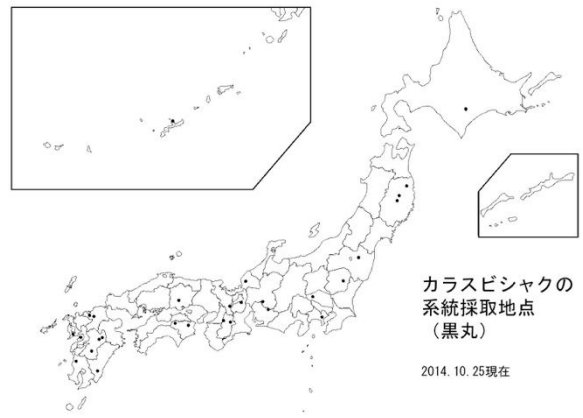
### 1. 研究開始当初の背景

カラスビシャク (*Pinellia ternata*) は日本や中国に分布する、塊茎 (イモ) を有する草本であり、有性生殖と共に、肉芽 (ムカゴ) による栄養繁殖により増殖する。乾燥させたカラスビシャクの塊茎は半夏と呼ばれ約 23% の漢方薬処方に配合されている重要な生薬である。半夏は殆ど中国産であるが、中国の経済発展に伴いその生産量は減少傾向にある。半夏は自生品の採取や慣行栽培により生産され、確立した薬用品種は無いため、植物多糖アラバンからなる有効成分の含量にばらつきが多い。

そこで本申請の代表であるの松岡がセンター長を務める九州大学生物環境利用推進センター (以下、センターと略記) においては、カラスビシャク塊茎の高品質化と効率的人工栽培手法による国内での安定供給体制の構築を出口目標とした研究を開始している。代表者は平成 26 年度に、連携研究者である、センター専任教員の江口及びセンターの複担教員で薬学研究院を本務とし生薬学を専門とする田中と共同しながら、国内各所よりカラスビシャクの収集を進め、研究開始時点迄に 28 地点から 30 群落由来の系統を採取しそれらの栽培を進めていた (右図)。田中はまた江口や松岡と共同で、アラバンの迅速定量系の開発と人工栽培法の確立を目指した研究を進めていた。また松岡は植物多糖や糖蛋白質の生合成機構に関する生化学的・細胞生物学的研究と植物遺伝子の機能解析を進めており、連携研究者の田代は各種生物の遺伝子及びその発現情報の網羅的解析で世界的に高く評価される研究成果をあげていた。



各地から採取し栽培中のカラスビシャク



### 2. 研究の目的

(1) 本研究においては、九州大学において作成した、遺伝的多様性に富むことが期待される国内各地からのカラスビシャクコレクションと、本研究において実施したカラスビシャクのトランスクリプトーム解析と他国のグループが実施したトランスクリプトームデータ、および、塊茎及びそれ以外の器官における生理活性多糖アラバンの定量結果を下にして、アラバン合成遺伝子候補の選抜を進める。

(2) また現在獲得している多数系統の塊茎におけるアラバン含有量をはじめとした各種形態評価を、同一制御環境で生育させた多数系統を用い実施する。

(3) これらの情報と、アラバン合成遺伝子候補の発現パターンの解析を照らし合わせることで、アラバン合成関連遺伝子候補の絞り込を図る。

(4) 更に、絞り込んだ遺伝子候補がアラバン生合成に関わる検討するために必須である、カラスビシャクの遺伝子組換え法の確立を図る。

### 3. 研究の方法

(1) 九州大学の有するカラスビシャク系統のうち 1 系統の、根、塊茎、葉柄、葉から RNA を調製し、それを鋳型にトランスクリプトーム情報を獲得する。またこの情報と共に、公共データベースに登録されたカラスビシャクのトランスクリプトーム情報、および多種生物のアラビノース転移酵素等のアミノ酸配列情報も利用しながら、アラバン合成に関わる可能性のある酵素に対する cDNA を獲得する。

(2) これと並行して、現有するカラスビシャクの代表的な系統をもちいて、標準となる栽培条件を確立する。次いでこの条件で栽培したカラスビシャクの、1 系統の各器官および、手持ちの複数系統の塊茎におけるアラバンの蓄積量を、研究協力者の田中が作成した抗アラバンモノクローナル抗体を用いた、ELISA 法または本研究において開発した電気泳動-免疫ブロッティング法

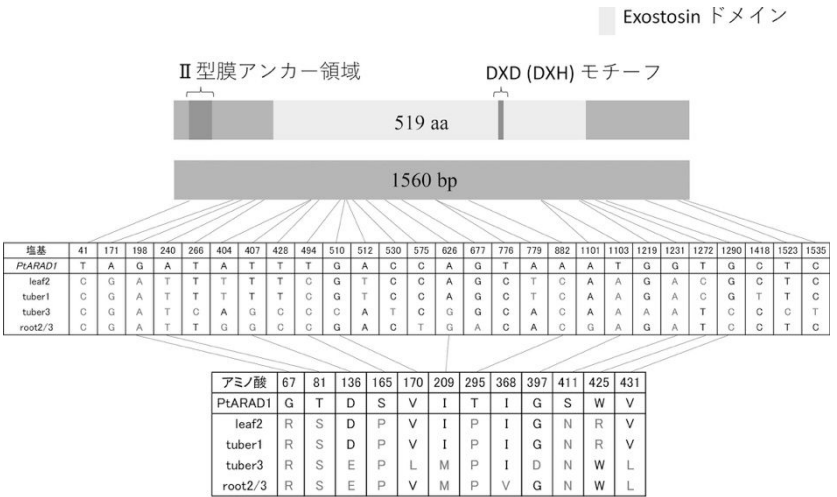
により検討する。併せて、その栽培条件で栽培した手持ちの各系統について、アラバン蓄積以外の各種の形質の比較を進める。

(3) ついでアラバンの蓄積に関する情報を参考にしながら、上記 cDNA の中から、アラバン合成に関わる可能性の高いものの絞り込みを図る。

(4) さらに、獲得した cDNA が、アラバン生合成に関わるかについて遺伝子発現抑制法を用いて検討を行うために、手持ちのカラスビシャク系統と、イントロンを含む GUS 遺伝子を発現させるコンストラクトを有するバイナリープラスミドを持つアグロバクテリウム菌株を用いて、カラスビシャクの形質転換系の確立を図る。

4. 研究成果

(1) アラバンの主鎖合成に関わる可能性のあるアラビノース転移酵素オルソログの cDNA 配列を、本研究においてトランスクリプトーム情報の獲得が完了する以前に公開されていた、中国の研究グループによる情報を用いてアセンブルし、PtARAD1 と名付けたタンパク質に対する cDNA およびそれから予想されるアミノ酸配列情報を獲得した。このタンパク質は典型的な型の膜アンカー配列を N-末端側に持ち、活性ドメインと考えられる Exostosin



カラスビシャク由来の複数のアラビノース転移酵素オルソログ cDNA に見出されるアミノ酸置換を伴う塩基置換

ドメインをその後ろに持つ 519 アミノ酸残基からなっており、また予想活性ドメイン中には、糖転移酵素において基質となる糖ヌクレオチドを結合するモチーフである、DXD モチーフが見出された（上図）。

次いで、この配列を下に設計したプライマーを用いて手持ちのカラスビシャクの 1 系統の葉、根、葉柄および塊茎由来の cDNA ライブラリーを対象に cDNA の探索を進め、計 5 クローンの cDNA を獲得した。これらについての配列解析を行なったところ、4 種の異なる配列からなり、それぞれは全て PtARAD1 とは一部異なる塩基配列を持ち、また塩基置換の一部はアミノ酸置換を伴っていることが明らかとなった（上図）。引き続き、これらクローンが組織特異的な発現を示すか検討したが、全て塊茎では発現しているものの、塊茎特異的に発現しているものは見出されなかった。

(2) 手持ち 2 系統を用いて決定した標準栽培条件を用いて栽培した手持ちの系統由来の塊茎から調整した半夏のアラバン量について、ELISA 法を用いて検討したところ、多くの系統において中国産半夏と同等のレベルのアラバンを含有すること、また一部の系統においてはこれらより高いアラバンの蓄積を示すことを見出した。

一方、葉、葉柄、根からの抽出液中には、ELISA を阻害する物質の存在を示す結果が得られたことから、抽出方法の改良、検出法の改良などについて検討を進めた。その結果、抽出液中の多糖を電気泳動により分離し、電荷を持つ支持体膜に転写後、抗体を反応させることでアラバンを検出する方法を開発した。この方法を用いてこれら器官におけるアラバンの定量を行ったが、検出限界以上のアラバンに起因するシグナルは検出されなかったため、今回検討した器官のうち塊茎だけがアラバンを含有すると結論付けた。

なお、これらの過程において、1 系統が塊茎の高い生産性を示すことを見出し、この系統から選抜した系統について、この植物種としては初めて品種登録を行うために、品種登録申請を行った。

(3) 手持ちのカラスビシャクのうち 1 系統を用い、これまでに中国の研究グループから報告されていた、カラスビシャクの葉柄を出発材料とした方法を参考にしながら形質転換系の作出を試みた。また、この際に獲得された無菌植物も形質転換の際の材料として用いた。

その結果、無菌植物の葉を材料とした際に、一過性の GUS 遺伝子が葉片の多くの部分で見出される条件を確立した。次いで、この条件でアグロバクテリウムを感染させた葉片から、多数の抗生物質耐性を示す形質転換塊茎様構造体を形成させる条件を決定した。現在、これらの構造体が

らの、抗生物質耐性を示す形質転換再生植物の獲得を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Toshihiko EGUCHI, Hiroyuki TANAKA, Satoshi YOSHIDA, Ken MATSUOKA, Temperature Effects on the Yield and Quality of the Medicinal Plant *Pinellia ternata* Breit., Environmental Control in Biology, 査読あり, 印刷中

〔学会発表〕(計 10 件)

青木 達大, 下川 響, 江口 壽彦, 松岡 健, 国内産生薬植物カラスビシャクの形質転換の試み, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019.03.

下川 響, 田中 宏幸, 江口 壽彦, 松岡 健, カラスビシャクの有用多糖アラバン合成関連遺伝子の探索, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019.03.

井上 幸祐, 尾崎 行生, 水ノ江 雄輝, 田中 宏幸, 吉田 敏, 松岡 健, 江口 壽彦, 日本産薬用植物カラスビシャクの倍数性の変異について, 平成 30 年日本生物環境工学会・日本農業気象学会九州支部合同都城大会(第 12 回), 2018.11.

佐川 菜由希, 下川 響, 田中 宏幸, 吉田 敏, 松岡 健, 江口 壽彦, 薬用植物カラスビシャクの塊茎肥大と有用成分の蓄積, 平成 30 年日本生物環境工学会・日本農業気象学会九州支部合同都城大会(第 12 回), 2018.11.

江口 壽彦, 田中 宏幸, 吉田 敏, 松岡 健, カラスビシャク種子の貯蔵期間と発芽率, 日本生物環境工学会 2017 年松山大会, 2017.08.

江口 壽彦, 田中 宏幸, 吉田 敏, 松岡 健, 薬用植物カラスビシャクの生育に及ぼす培養液の影響, 日本生物環境工学会 2017 年松山大会, 2017.09.

江口 壽彦, 森内 大地, 日高 功太, 吉田 敏, 松岡 健, カラスビシャク成葉の光合成速度に及ぼす温度の影響, 日本生物環境工学会 2016 年金沢大会, 2016.09.

江口 壽彦, 田中 宏幸, 吉田 敏, 松岡 健, 薬用植物カラスビシャクの制御環境下での栽培と優良系統の選抜, 日本生物環境工学会 2015 年宮崎大会, 2015.09.

森内 大地, 日高 功太, 吉田 敏, 松岡 健, 江口 壽彦, 日本産薬用植物カラスビシャクの光合成特性の解析, 日本生物環境工学会 2015 年宮崎大会, 2015.09.

Toshihiko Eguchi, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Yoshida, Ken Matsuoka, Influence of Ground Water Level on the Growth of the Medicinal Plant *Pinellia ternata* Breit. in a Solid Substrate Culture System, The International Conference on Plant Factory 2014, 2014.11,

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 九大たまゆたか

育成者: 江口 壽彦, 松岡 健, 田中 宏幸, 吉田 敏

権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 品種登録

番号: 31433

出願年: 2016

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名: 江口 壽彦

ローマ字氏名: (EGUCHI, toshihiko)

研究協力者氏名: 田中 宏幸

ローマ字氏名: (TANAKA, hiroyuki)

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。