

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590121
 研究課題名(和文) 遺伝子型と成分変異を指標にしたカンゾウ属植物の優良品種の選抜
 研究課題名(英文) Comparative analysis of *Glycyrrhiza* plants based on genotypes and chemical variations
 研究代表者
 林 宏明 (HAYASHI HIROAKI)
 岩手医科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：50260998

研究成果の概要(和文)：重要な生薬の1つの甘草の基原植物である *Glycyrrhiza* 属植物における多様性を明らかにするため、世界各地でこれまで採集してきた *Glycyrrhiza* 属植物の遺伝子型と成分型を比較解析して両者の対応関係を明らかにするとともに、中国の甘草産地の現地調査を中国の研究者と共に行った。その結果、代表的な *Glycyrrhiza* 属植物である *G. uralensis* は中国型とカザフスタン型の2種類のグループに分類され、成分型と遺伝子型によりそれぞれ分類したグループがほぼ一致した。また、人工気象器内での筒栽培により、甘味成分であるグリチルリチン酸を高生産する *G. uralensis* 系統(T628 and 01A07-1)を選抜するとともに、グリチルリチン酸を含有せず、代わりにグリチルリチン酸とは糖鎖構造の異なる新規サポニンを生産する *G. uralensis* 系統(83-555)を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Comparative analysis of *Glycyrrhiza* plants based on the DNA sequence and chemical constituents were performed to characterize the variation of *G. uralensis*, which is one of the most important medicinal plants in the world. *G. uralensis* was divided into the two types, China-type and Kazakhstan-type, based on the DNA sequences (*pkc* genotype) and chemical constituents in the leaves (chemotype). There was correlation between the *pkc* genotype and chemotype of *G. uralensis*. Furthermore, high glycyrrhizin-producing strains (T628 and 01A07-1) and a glycyrrhizin-deficient strain (83-555) were selected from the populations of *G. uralensis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：薬用資源学

1. 研究開始当初の背景

甘草は世界中で多量に消費される重要な生薬の1つであるが、その供給は中国北部か

らトルコにかけて分布している野生資源に依存しているのが現状である。また、甘草の基原植物である *Glycyrrhiza uralensis*, *G.*

glabra, *G. inflata*等のカンゾウ属植物には多様な成分変異が存在することが知られているが、その成分変異の遺伝的背景の全貌は明らかではない。さらに、現在のカンゾウ自生地では甘草資源の乱獲による枯渇が問題になっているが、品質の優良な甘草の安定供給のためには、世界各地から輸入されている甘草の多様性を明らかにするとともに、その栽培化が必要であるが、カンゾウ属植物の栽培では甘味主成分のグリチルリチン酸の含量が低いことが問題になっており、グリチルリチン酸含量の高い優良系統の育成が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、良質な甘草の安定供給を目的として、甘草の基原植物であるカンゾウ属植物の多様性を、遺伝子配列を基準とした遺伝子型と成分変異を基準とした成分型で分類することで、カンゾウ属植物の多様性の全貌を明らかにするとともに、多様なカンゾウ属植物系統の中からグリチルリチン酸高生産株などのユニークな成分変異を持つ優良系統を選抜することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者がスペイン、トルコ、中央アジアなどの世界各地で採集してきたカンゾウ属植物系統の *pkc* 遺伝子型を PCR により解析するとともに、地下部と地上部の成分型を HPLC 分析により解析し、遺伝子型と成分型の対応関係を明らかにした。

(2) 中国の甘草産地の現地調査を中国の研究者と共に行い、新疆甘草の産地である中国新疆ウイグル自治区と西北甘草の産地である中国寧夏回族自治区の計 2 カ所の中国国内の自生地を調査するとともに、自生する植物の形態、*pkc* 遺伝子型、地下部と地上部の成分型を比較して解析した。

(3) 収集した植物系統を岩手医科大学の薬用植物園の圃場において栽培するとともに、人工気象器内で地下茎を生成させる筒栽培を用いて多数の系統を実験室内で栽培し、甘草の甘味主成分であるグリチルリチン酸の高生産系統や、グリチルリチン酸非生産系統等のユニークな成分変異系統を選抜し、これらの系統の含有成分を HPLC により解析した。

4. 研究成果

(1) 世界各地で採集したカンゾウ属植物の標本由来の葉をサンプルとして、葉の成分型と *pkc* 遺伝子型を決定した。その結果、葉の

成分型と *pkc* 遺伝子型には大きな変異が存在するが、成分型と遺伝子型の間にはある程度の相関関係が見られた。特に *G. uralensis* に関しては、カザフ型と中国型の 2 種類のグループに分類され、形態的特徴、成分型、遺伝子型の 3 者による分類がほぼ一致した。中国型の代表的な *pkc* 遺伝子型は 5-5-AGATTGTC となる一方、カザフ型の代表的な *pkc* 遺伝子型は 7-3-GGGAGGCT となり、約 300bp の *pkc* 遺伝子の部分塩基配列の中で、2 カ所の SSR の繰り返し回数の違いと 6 カ所の SNPs の変異が観察された。また、両者の遺伝子型が混在しているサンプルも多数存在することから、今後は集団遺伝学的な解析が必要であると考えられた。

(2) 中国復旦大学の生命科学学院の周銅水博士の協力を得て、2007 年の夏には新疆甘草の産地である中国新疆ウイグル自治区の甘草自生地の現地調査を、2008 年の夏には西北甘草の産地である中国寧夏回族自治区の甘草自生地の現地調査を行うとともに、日本で流通している甘草の市場品を入手した。中国の新疆ウイグル自治区の甘草自生地では、*G. glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata* の 3 種のカンゾウ属植物が混在し、これら 3 種の間型と思われる個体も多数存在していた。これらの成分型と遺伝子型を比較したところ、非常に大きな変異が観察されたことから、複雑な交配による雑種形成が繰り返されてきたことが示唆された。また、中国の西北甘草の産地における *G. uralensis* の遺伝子型においても、予想以上の大きな遺伝子型の変異が存在することが明らかになった。

(3) 世界各地で採集したカンゾウ属植物の種子を発芽させ、人工照明下で筒栽培により栽培した。筒栽培で 2 ヶ月間栽培した地下茎におけるグリチルリチン酸含量を測定したところ、乾燥重あたり 0.1% から 2.3% となり、系統間で大きな違いがあった。特に *G. glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata* の 3 種のカンゾウ属植物で比較したところ、*G. uralensis* の系統のグリチルリチン酸含量の平均が 1% 程度の高い数値だったのに対して、*G. glabra* の系統のグリチルリチン酸含量の平均は 0.5% 程度と低かった。なお、選抜したグリチルリチン酸高生産系統は試験管内で増殖するとともに、選抜個体を圃場に定植して栽培して解析した。

(4) 人工気象器内で選抜した植物系統を 2 年間圃場で栽培し、グリチルリチン酸の生産能を比較した。その結果、人工気象器内の栽培で高含量を示した *G. uralensis* の選抜系統 (T628) は 2 年間の屋外での短い栽培期間にもかかわらず、根で 3.76%、ストロン (地下茎) で 5.01% となり、局方の下限値の 2.5%

に比較して非常に高含量なグリチルリチン酸含量を示した。また、この系統は地下部の生長も良く、この点からも優良系統であると考えられた。今後は、この系統と別途人工気象器内で選抜した他の *G. uralensis* の高生産系統 (01A07-1) を実験室内で大量栽培し、グリチルリチン高生産株と低生産株の違いを遺伝子発現レベルで比較していく予定である。

(5) これまでに収集した栽培系統の中から、*G. uralensis* のグリチルリチン酸非生産系統 (83-555) を発見し、グリチルリチン酸の代わりに生産している主サポニンとして新規サポニン glucoglycyrrhizin (図1) を同定するとともに、さらに4種の新規サポニンを単離同定した。これらの新規のサポニンはグリチルリチン酸とは糖鎖の構造が違っているが、グリチルリチン酸と同様の甘味を持つ。今後はこれらの成分の機能性をグリチルリチン酸と比較して行く予定である。

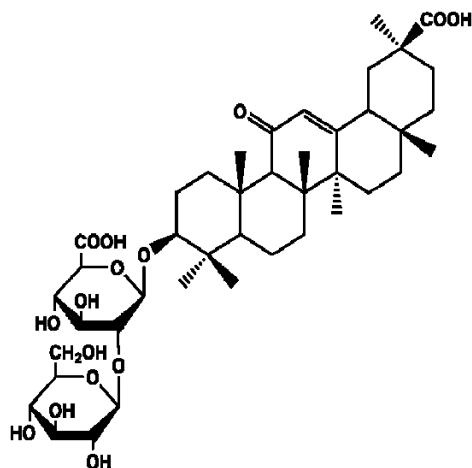


図1 グリチルリチン酸非生産系統の生産する新規サポニン glucoglycyrrhizin の構造

また 83-555 系統の子孫系統からも、新規サポニンの生産株 (83-555-5,7) を選抜し現在圃場で栽培しているところである。なお、これらの子孫系統の中には *G. glabra* との雑種と考えられる系統 (83-555-2) も確認され、今後はこれらの系統の形態、成分型、遺伝子型を詳細に比較解析していく予定である。

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3件)

- ① H. Hayashi, H. Sudo, Economic importance of licorice, *Plant Biotechnology*, 26, 101-104 (2009)
- ② 林 宏明, カンゾウ属植物の自生地調査と系統解析, *Foods & Food Ingredients*

Journal of Japan, 212, 357-364 (2007)

- ③ H. Hayashi, Molecular biology of triterpenoid biosynthesis in *Glycyrrhiza* plants. *Japanese Journal of Plant Science*, 1, 20-24 (2007)

[学会発表] (計3件)

- ① H. Hayashi, Biosynthesis of triterpene saponins in intact plant of *Glycyrrhiza glabra*, Shanghai International Symposium on Pharmacy, Shanghai, China, December 19-20 2008

- ② 林 宏明, 遺伝子配列によるカンゾウの系統解析, 第4回甘草に関するシンポジウム, 大阪, 2008年6月28日

- ③ H. Hayashi, Comparative analysis of *Glycyrrhiza uralensis*, Asian Symposium for Pharmaceutical Science in JSPS Asian Core Program, Sasebo, Japan, October 16-17 2007

[図書] (計2件)

- ① H. Hayashi, Chapter 5, Molecular biology of secondary metabolism: Case study for *Glycyrrhiza* plants, In "Recent Advances in Plant Biotechnology" ed by A. Kirakosyan and P. B. Kaufman, Springer, pp. 89-103, 2009 (共著)

- ② H. Hayashi, Comparative analysis of *Glycyrrhiza* plants based on triterpene saponin constituents and DNA sequences, In "Analysis of Natural Glycosides" ed by Y. Shoyama, Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 33-44, 2007 (共著)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 宏明 (HAYASHI HIROAKI)
岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50260998

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：