

機関番号：30110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580102

研究課題名（和文）薬用植物カンゾウの医薬トリテルペノイド高生産を目的とした分子生物学的制御

研究課題名（英文）Molecular biological control for high triterpenoid production 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

研究成果の概要（和文）：薬用植物カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) は生薬「甘草（カンゾウ）」の原料植物である。カンゾウは漢方薬、医薬品原料、天然甘味料などとして広く利用される。カンゾウは薬用成分としてグリチルリチン（トリテルペノイド化合物の一種）を主に含んでいる。カンゾウにおけるグリチルリチン生産能力を向上させることは医薬品の安定供給にとって重要である。本研究ではグリチルリチンを生成する生合成酵素遺伝子を解明し、培養細胞でグリチルリチンを生成する基礎技術を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Glycyrrhizae Radix, the underground material derived from *Glycyrrhiza uralensis* extensively used as an herbal medicine in worldwide. Biological activities of licorice have been attributed to glycyrrhizin (a triterpenoid compound). It is important to up-regulate the production of glycyrrhizin in *G. uralensis*. In this study, we clarified the gene regulation of glycyrrhizin biosynthesis, and develop a basic technique for the producing glycyrrhizin in the cultured cells.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,400,000 | 720,000   | 3,120,000 |
| 2009年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：カンゾウ、甘草、グリチルリチン、物質生産、生合成

1. 研究開始当初の背景

薬用植物カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*)

は中国および周辺諸国に自生するマメ科多年生草本である。医薬品原料や食品添加物（甘味料など）として世界中で利用されており、我が国は100%輸入に依存している（輸入量：約1万t/年）。漢方薬原料として需要が高く、漢方処方70%以上に配合される。肝機能障害治療を目的としたエキス製剤としても広く利用され医薬品として不可欠な存在である。肝機能改善、抗炎症などの薬理作用に加えて、抗ウイルス、抗HIV、抗アトピーなど新たな薬理作用が近年知られている。高齢化社会に直面した我が国において、国民の健康の維持増進や医療の観点から漢方医薬や機能性食品の利用はますます重要性を増している。このような背景から高品質なカンゾウの安定供給は極めて重要な課題である。カンゾウの主薬用成分はトリテルペノイドサポニンのグリチルリチンである。近年、市場に流通するカンゾウのグリチルリチン含有量の低下が問題となっている。大生産地である中国での消費拡大による乱獲や生育地の砂漠化などに起因して、グリチルリチン含有量の低下、品質の劣化が憂慮されている。しかしながらカンゾウの生育は非常に遅く（5年以上）、育種開発はほとんど進展していない。一方、グリチルリチンを主とするトリテルペノイドの生合成研究は数例の遺伝子が報告されてはいるものの未解明の現状である。グリチルリチンなど二次代謝化合物の生合成研究には培養細胞を利用した代謝研究が有効な手段であるが、グリチルリチンを産生する培養細胞はこれまで得られていない。また遺伝子組み換えによる機能発現解析は生合成研究に有効な手法であり、優良品種の開発にも極めて有効である。しかしながらカンゾウにおける形質転換植物体の作成は世界的にも未だ成功例はない。

以上から、グリチルリチンや関連トリテルペノイドの生合成を遺伝子レベルで制御することによってこれらの化合物の代謝研究を行い、医薬品原料としてのカンゾウの生産性を向上させることが急務の課題である。

## 2. 研究の目的

(1) グリチルリチン生合成酵素遺伝子導入培養細胞（毛状根）の作成

$\beta$ -amyrin11 位酸化酵素遺伝子（*CYP88D6*）を導入した培養細胞（毛状根）の作成を行った（図1）。

(2) ストロロン培養細胞によるグリチルリチンおよびテルペノイド生成

カンゾウ培養細胞中のグリチルリチンおよび生合成関連トリテルペノイド化合物の生成解析のため、各種テルペノイド化合物の定量分析を行った。

(3) グリチルリチン生合成酵素遺伝子プロモーター領域の単離

2,3-oxidosqualene 環化 $\beta$ -amyrin 合成酵素遺伝子（*bAS*）、 $\beta$ -amyrin11 位酸化酵素遺伝子（*CYP88D6*）の遺伝子発現制御において重要な役割を担うと考えられるプロモーター領域の単離解析を行った（図1）。

(4) グリチルレチン酸によるヒト大腸がん増殖抑制作用

グリチルリチンの生合成関連物質であるグリチルレチン酸の薬理作用を調べた。

## 3. 研究の方法

(1) グリチルリチン生合成酵素遺伝子導入カンゾウ培養細胞（毛状根）の作成

*CYP88D6* 遺伝子をカンゾウ培養細胞に導入するため、pENTR-D-TOPO ベクターに組み込むことで GATEWAY エントリークローンを作成した。ベクターに *GFP* 遺伝子をシグナルマーカーとして同時に構築し、蛍光発光の検出によって容易に遺伝子発現クローンを選抜した。

(2) ストロロン培養細胞によるグリチルリチンおよびテルペノイド生成

カンゾウ腋芽組織より液体振倒培養法によりストロン細胞を誘導、増殖した。このストロン培養細胞に含まれるグリチルリチンおよび16種のトリテルペノイド化合物の微量定量分析を GC/MS により行った。

(3) グリチルリチン生合成酵素遺伝子プロモーター領域の単離

*bAS*、*CYP88D6* について、翻訳開始点から約1.8~2.0kbの5'上流領域を PCR-based DNA Walking 法を用いて単離し塩基配列を決定した。得られた塩基配列を植物遺伝子のシスエレメントデータベースを用いて解析した。次に Gateway クローニング法によりプロモーター::GUS レポーター遺伝子コンストラクトを作製した。*bAS*、*CYP88D6* のプロモーター::GUS コンストラクトを、パーティクルガン法を用いカンゾウの各組織（葉および培養ストロン）に導入した後 GUS 染色を行い一過的な GUS 発現を観察した。また各コンストラクトを導入した形質転換シロイヌナズナを作出し組織特異的な GUS 発現パターンを観察した。

(4) グリチルレチン酸によるヒト大腸がん増殖抑制作用

ヒト大腸がん細胞 HCT116、HT29 にグリチルレチン酸を投与し（0.1、1.0  $\mu$ M）、各細胞増殖抑制効果を調べた。

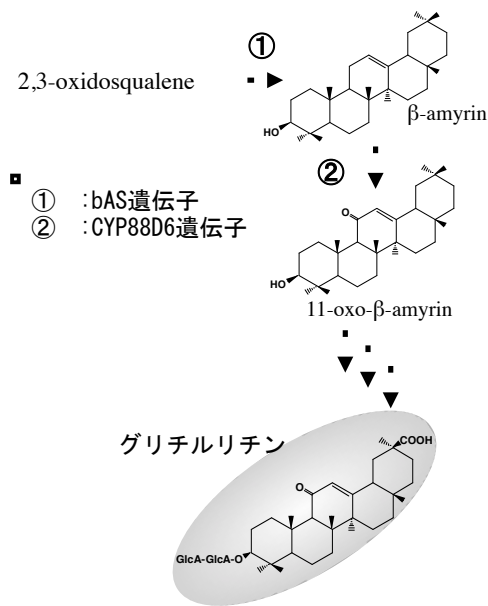


図1 グリチルリチンの生合成経路

#### 4. 研究成果

(1) グリチルリチン生合成酵素遺伝子導入カンゾウ培養細胞（毛状根）の作成

*CYP88D6* 遺伝子を導入した培養細胞（毛状根）クローン（14クローン）の作成に成功した。14クローンは全て GFP による緑色蛍光も認められた（図2）。

(2) ストロン培養細胞によるグリチルリチンおよびテルペノイド生成

ストロン培養細胞においてグリチルリチンの生成が確認された（14.00  $\mu$ g/g、DW）。また関連トリテルペノイド化合物として  $\beta$ -amyrin (12.51)、lupeol (13.60)、oleanolic acid (23.80)、betulinic acid (160.90) などの生成が確認された。しかしながらグリチルレチン酸およびグリチルレチン酸モノグルクロナイドは検出されなかった。

(3) グリチルリチン生合成酵素遺伝子プロモーター領域の単離

*bAS* 遺伝子のプロモーター断片、*CYP88D6* 遺伝子のプロモーター断片配列を明らかにした。これらのプロモーター領域が *bAS* 遺伝子、*CYP88D6* 遺伝子の根特異的な発現に必要なシス配列を含むことを明らかにした。

(4) グリチルレチン酸によるヒト大腸がん増殖抑制作用

1.0  $\mu$  M のグリチルレチン酸処理により、ヒト大腸がん細胞 HCT116 の増殖を有意に抑制することを明らかにした。



図2 *CYP88D6*遺伝子導入培養細胞(毛状根)

#### 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8件）

- ① Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Muranaka T, Licorice  $\beta$ -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有、105巻、2008、14204-14209
- ② Seki H, Ohyama K, Nishizawa T, Yoshida S, Muranaka T, The "all-in-one" rol-type binary vectors as a tool for functional genomic studies using hairy roots, Plant Biotechnology, 査読有、25巻、2008、347-355
- ③ 高上馬希重, 林茂樹, 柴田敏郎, 山本豊, 浅津サンドラなおみ, 澤聡子, 関崎春雄, 薬用植物カンゾウ(甘草, *Glycyrrhiza uralensis*)の高品質系統の育成に向けた研究: 薬用成分グリチルリチンの高含有系統の選抜, 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報、査読無、50号、2009、19-20
- ④ Sudo H, Seki H, Sakurai N, Suzuki H, Shibatad, Toyoda A, Totoki Y, Sasaki Y, Iida O, Shibata T, Kojoma M, Ohyama K, Muranaka T, Saito

- K、Expressed sequence tags from rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis*, Plat Biotechnology, 査読有、26 巻、2009、105-107
- ⑤ 關光、大山清、村中俊哉、薬用植物甘草のグリチルリチン生合成遺伝子の発見、化学と生物、査読有、47 巻、2009、714-716
- ⑥ 村中俊哉、關光、大山清、カンゾウのグリチルリチン生合成遺伝子ディスカバリーと今後の研究展開、ファルマシア、査読有、45 巻、2009、865-869
- ⑦ Kojoma M, Ohyama K, Seki H, Yasuko H, Asazu N, Sawa S, Yoshida S, Muranaka T, *In vitro* proliferation and triterpenoid characteristics of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer, Leguminosae) stolons, Plat Biotechnology, 査読有、27 巻、2010、59-66
- ⑧ Kojoma M, Hayashi S, Shibata T, Yamamoto Y, Sekizaki H, Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants cultivated under the same conditions, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 査読有、in press
- [学会発表] (計 44 件)
- ① Kojoma M. *et al.*, Clonal propagation and chemical characteristics of in vitro plant of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*), International Symposium on East Asian Plant Diversity and Conservation, 2008/8/2, Sapporo, Japan
- ② Seki H. *et al.*, Licorice  $\beta$ -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 committed in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin, 7th Japan-US Seminar, Biosynthesis of Natural Products, Enzymology, Structural Biology, and Drug Discovery, 2008/6/22, San Diego, USA
- ③ Sawai S. *et al.*, Recombinant Yeast System for Mechanistic Study of the First Committed P450 Oxidation in Glycyrrhizin Biosynthesis, 7th Japan-US Seminar, Biosynthesis of Natural Products, Enzymology, Structural Biology, and Drug Discovery, 2008/6/22, San Diego, USA
- ④ 高上馬ら、甘草 (カンゾウ) の培養細胞によるトリテルペノイド生成に関する研究、第 32 回日本生薬学会北海道支部例会、2008/5/10、札幌
- ⑤ 浅津なをみら、甘草 (カンゾウ) の培養細胞によるトリテルペノイド生成に関する研究 ~毛状根培養について~、130 回日本薬学会北海道支部例会、2008/5/10、札幌
- ⑥ 關ら、薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成に関わる P450 遺伝子のクローニング (2)、第 26 回日本植物細胞分子生物学会大会、2008/9/2、大阪
- ⑦ 關ら、甘草グリチルリチン生合成遺伝子の同定 (1) EST ライブラリーの構築と遺伝子マイニング、日本生薬学会第 55 回年会、2008/9/19、長崎
- ⑧ 澤ら、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) のグリチルリチン生成に関する研究・実生植物体と培養植物体を用いた実験環境下での成育制御について、日本生薬学会第 55 回年会、2008/9/19、長崎
- ⑨ 澤井ら、甘草グリチルリチン生合成遺伝子の同定 (2) 酵母発現系を用いた遺伝子機能同定、日本生薬学会第 55 回年会、2008/9/19、長崎
- ⑩ 石森ら、カンゾウ属植物におけるグリチルリチン生合成に関わる P450 遺伝子の多様性、日本薬学会第 129 年会、2009/3/26、京都
- ⑪ 高上馬ら、甘草 (カンゾウ *Glycyrrhiza uralensis*) の新規ストロン培養システムによるクローン増殖に関する研究、第 33 回日本生薬学会北海道支部例会、2009/5/30、札幌
- ⑫ 高上馬ら、薬用植物カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) のストロン培養システムによるクローン増殖について、第 30 回根研究会集会、2009/5/9、足寄
- ⑬ 高上馬ら、薬用植物カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) の高品質系統の育成研究：グリチルリチン含有量の個体間変異、第 116 回日本育種学会講演会、2009/9/25、札幌
- ⑭ 高上馬ら、カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) の育種研究：グリチルリチン高含有系統の選抜について、日本生薬学会第 56 回年会、2009/10/3、京都
- ⑮ 浅津なをみら、カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) のストロン培養システムによるクローン増殖について、日本生薬学会第 56 回年会、2009/10/4、京都
- ⑯ 寺崎将ら、薬用植物及び食品由来成分による複合的がん細胞増殖抑制作用、第 133 回日本薬学会北海道支部例会、2009/11/28、札幌
- ⑰ 高上馬ら、薬用植物カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) の高品質系統の育成研究：薬用成分グリチルリチン高含有系統の選抜、日本育種学会・日本作物学会北海道談話会第年次講演会、2009/12/5、札幌
- ⑱ 高上馬ら、カンゾウ (*Glycyrrhiza*

- uralensis) の高品質系統の育成研究: グリチルリチン高含有個体の選抜、日本薬学会第 130 年会、2010/3/29、岡山
- ①9 寺崎将ら、薬用植物及び食品由来成分による複合的大腸がん細胞増殖抑制効果、日本薬学会第 130 年会、2010/3/29、岡山
- ②0 Sawai S. *et al.*、Identification of cytochrome P450s involved in the biosynthesis of glycyrrhizin.、Terpnet 2009、2009/5/26、Tokyo, Japan
- ②1 Hiraoka Y. *et al.*、Promoter analysis of glycyrrhizin biosynthetic genes.、Terpnet 2009、2009/5/26、Tokyo, Japan
- ②2 Ishimori M. *et al.*、The diversity of *CYP88D* genes is presumably responsible for chemical diversity of saponins in *Glycyrrhiza* spp.、Terpnet 2009、2009/5/26、Tokyo, Japan
- ②3 Seki H.、T Identification of cytochrome P450s involved in the biosynthesis of glycyrrhizin.、Terpnet 2009、2009/5/26、Tokyo, Japan
- ②4 關、代謝研究に適した新規毛状根ベクターの開発および薬用植物のテルペノイド生合成関連遺伝子の探索、第 27 回日本植物細胞分子生物学会大会、2009/7/30、藤沢
- ②5 福島エリら、トリテルペノイドサポニン生合成に関わる *Medicago truncatula* P450 の機能解析、第 27 回日本植物細胞分子生物学会大会、2009/7/31、藤沢
- ②6 澤井悟ら、カンゾウ属植物のグリチルリチン生合成に関わる P450 遺伝子の多様性、第 27 回日本植物細胞分子生物学会大会、2009/7/31、藤沢
- ②7 平岡靖子ら、薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成遺伝子の発現制御機構の解析、第 27 回日本植物細胞分子生物学会大会、2009/7/31、藤沢
- ②8 關、薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成酵素遺伝子の探索、第 30 回富山大学・和漢医薬学総合研究所特別セミナー、2009/10/9、富山
- ②9 關、薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成遺伝子ディスカバリー、第 5 回ミヤコグサ・ダイズワークショップ、2009/12/3、かずさ
- ③0 高上馬ら、薬用植物カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) に含まれるグリチルリチン量の個体間差異、日本植物学会第 74 回大会、2010/9/10、春日井
- ③1 北内ら、FTIR イメージングによる生薬の分析、第 59 回日本高分子学会大会、2010/5/27、横浜
- ③2 Kojoma *et al.*、*In vitro* proliferation and triterpenoid characteristics of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) stolons、The 5<sup>th</sup> JSP-CCTNM-KSP Joint Symposium on Pharmacogenosy、2010/9/24、Tokushima, Japan
- ③3 Kitauchi *et al.*、Analysis of licorice roots (*Glycyrrhiza uralensis*) by FTIR imaging、11<sup>th</sup> CHITOSE International Forum on Photonics Science and Technology、2010/11/27、Chitose, Japan
- ③4 高上馬ら、甘草 (カンゾウ、*Glycyrrhiza uralensis*) におけるグリチルリチン酸生合成酵素遺伝子を導入した培養細胞作成に関する研究、第 135 回日本薬学会北海道支部例会、2010/11/27、札幌
- ③5 高上馬ら、甘草 (カンゾウ、*Glycyrrhiza uralensis*) の高品質系統の育成研究、日本薬学会第 131 年会、2011/3/29、静岡
- ③6 關ら、植物の代謝多様性を利用した非天然型テルペノイドの創製、第 62 回生物工学会大会シンポジウム、2010/10/28、宮崎
- ③7 關、漢方原料「甘草」のトリテルペノイド生合成酵素遺伝子解析、日本植物学会第 74 回大会シンポジウム、2010/9/9、春日井
- ③8 平岡ら、薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成遺伝子の発現制御機構の解析 (2)、第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会、2010/9/2、仙台
- ③9 Seki H. *et al.*、Identification of cytochrome P450s involved in triterpenoid saponin biosynthesis in licorice.、21th International Congress on Arabidopsis Research、2010/6/7、Yokohama, Japan
- ④0 Fukushima E.O. *et al.*、Discovery of P450 genes in triterpenoid saponin biosynthesis.、21th International Congress on Arabidopsis Research、2010/6/7、Yokohama, Japan
- ④1 Hiraoka Y. *et al.*、Promoter analysis of saponin biosynthetic genes in licorice.、21th International Congress on Arabidopsis Research、2010/6/7、Yokohama, Japan
- ④2 寺崎ら、Shikonin および食品由来脂溶性成分による複合的大腸がん細胞増殖抑制作用、日本生薬学会北海道支部例会、2010/5/8、札幌
- ④3 Terasaki *et al.*、PPARgamma suppression of dietary components in human colon colorectal cancer cells、日本癌学会学術総会 第 69 回、2010/9/22、大阪
- ④4 寺崎ら、食餌性脂質はヒト大腸がん細胞を NF $\kappa$ B 及び TRIB3 を介して増殖抑制する、日本薬学会第 131 年会、2011/3/30、静岡

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Muranaka T, Kojoma M, Sudo H, Saito K, Blackwell Publishing, Oxford, UK, Medicinal Plants, in Kole, C. and Hall, T. C. (eds.), “Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Plantation Crops, Ornamentals and Turf Grasses”、2008、16

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：カンゾウ属植物由来トリテルペン酸化酵素、それをコードする遺伝子およびその利用法

発明者：村中俊哉、關光、大山清、須藤浩、澤井学、斉藤和季

権利者：理化学研究所、千葉大学、常磐植物化学研究所

種類：特許

番号：2008-222483

出願年月日：2008/8/6

国内外の別：国外

名称：新規ウラルカンゾウ及びその栽培用ストロン

発明者：林茂樹、柴田敏郎、高上馬希重

権利者：医薬基盤研究所、北海道医療大学、栃本天海堂

種類：特許

番号：2009-200179

出願年月日：2009/8/31

国内外の別：国内

○取得状況 (計1件)

名称：カンゾウ属植物の組織培養方法

発明者：高上馬希重、村中俊哉、吉田茂男

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：P4452483

取得年月日：2010/2/5

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

關 光 (SEKI HIKARU)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30392004

### (3) 連携研究者

寺崎 将 (TERASAKI MASARU)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：10391195