

センブリの組織培養と二次代謝物質産生に関する研究

The tissue culture and secondary metabolites production  
of *Swertia japonica*

2015 年 9 月 25 日

川上 寛子

Hiroko Kawakami

## 目次

<b>1. 序論</b>	<b>4</b>
1.1. 薬用植物の組織培養研究の意義	4
1.2. センブリについて	5
1.3. セコイリドイド生合成について	6
1.4. KODA について	8
1.5. 目的	9
<b>2. センブリの組織培養法の確立</b>	<b>10</b>
2.1. 目的	10
2.2. カルス誘導条件の最適化と培養物の成分	10
2.2.1. 材料と方法	10
2.2.2. 結果	12
2.2.3. 考察	15
2.3. 不定根培養条件の最適化とセコイリドイド産生への影響	16
2.3.1. 材料と方法	16
2.3.2. 結果	17
2.3.3. 考察	21
2.4. まとめ	22
<b>3. 培養物特有成分の単離・構造決定</b>	<b>23</b>
3.1. 目的	23
3.2. 材料と方法	23
3.3. 結果	26
3.4. 考察	33
3.5. まとめ	35
<b>4. KODA の不定根の分化とキサントン配糖体産生に与える影響</b>	<b>36</b>
4.1. 目的	36
4.2. 固体培養	36
4.2.1. 材料と方法	36
4.2.2. 結果	37
4.3. 液体培養	38
4.3.1. 材料と方法	38
4.3.2. 結果	39
4.4. 考察	41
4.5. まとめ	43
<b>5. 細胞懸濁系培養による成分生産条件の確立</b>	<b>44</b>
5.1. 目的	44

<b>5.2. 基本培地の影響</b>	<b>44</b>
5.2.1. 材料と方法	44
5.2.2. 結果	45
<b>5.3. 植物ホルモンの影響</b>	<b>48</b>
5.3.1. 材料と方法	48
5.3.2. 結果	49
<b>5.4. 糖の影響</b>	<b>51</b>
5.4.1. 材料と方法	51
5.4.2. 結果	52
<b>5.5. 継代培養回数が細胞増殖に与える影響</b>	<b>53</b>
5.5.1. 材料と方法	53
5.5.2. 結果	53
<b>5.6. 細胞増殖と BELLIDIFOIN DIGLYCOSIDE 産生の経時変化</b>	<b>54</b>
5.6.1. 材料と方法	54
5.6.2. 結果	55
5.6.3. 考察	56
<b>5.7. セコイリド産生を促進する化合物と抽出物のスクリーニング</b>	<b>58</b>
5.7.1. 材料と方法	58
5.7.2. 結果	60
5.7.3. 考察	62
<b>5.8. まとめ</b>	<b>63</b>
<b>6. 次世代シーケンサーによるセコイリド生合成経路の解明</b>	<b>64</b>
<b>6.1. RNA-SEQ</b>	<b>64</b>
6.1.1. 目的	64
6.1.2. 材料と方法	64
6.1.3. 結果	67
6.1.4. 考察	80
<b>6.2. RT-PCR による半定量的発現量解析</b>	<b>82</b>
6.2.1. 目的	82
6.2.2. 材料と方法	82
6.2.3. 結果	88
6.2.4. 考察	95
<b>6.3. まとめ</b>	<b>98</b>
<b>7. 総括</b>	<b>99</b>
<b>8. 引用文献</b>	<b>101</b>
<b>9. 発表論文</b>	<b>104</b>
<b>10. 謝辞</b>	<b>105</b>

# 1. 序論

## 1.1. 薬用植物の組織培養研究の意義

薬用植物とは薬理活性成分を産生する植物のことであり、主にこの乾燥物や抽出物を混合して薬として用いるのが生薬である。薬用植物を医薬資源として利用する背景に、栽培に長期間を要する事や、病害、産地や環境による成分産生の変動に伴う品質低下が一般的に深刻な問題となっており、安定供給、品質の向上は国内において非常に重要な課題である。この課題を解決する有効な手段として植物組織培養技術に着目した。これまで、植物組織培養技術を利用した工業的な物質生産の例としては、オウレン培養細胞のベルベリン、シコン培養細胞のシコニンの生産等が有名な例としてあげられ、有用成分の持続的な生産を可能にした。近年国内では、有用植物の成分、栽培法、組織培養法、生合成経路に関わる機能遺伝子の情報をまとめたデータベースの構築が進められており、本研究の成果はそのデータベースの充実はもとより、新たな医薬資源の持続的利用へ貢献できると考えられる。

## 1.2. センブリについて

本研究ではモデルとしてリンドウ科センブリ属に属するセンブリ (*Swertia japonica*, Figure 1-1) を用いる。現在までに、健胃効果 (Yamahara *et al.* 1991, Niiho *et al.* 2006, Kimura & Sumiyoshi 2011) や、育毛効果 (Kubo *et al.* 1988) など多くの薬理活性が報告されており、医薬資源として、さらなる利用が期待される。現在、長野県や高知県での一部の契約農家で生産され、市場に出荷されている。生薬には開花期の2年草の全草が用いられることから、効率的生産には、生産期間の短縮が必要である。主成分としてセコイリドイドの swertiamarin と gentiopicroside を含む。更に、リンドウ科に属し、同様に健胃薬として利用のあるゲンチアナ (*Gentiana lutea*) やトウリンドウ (*Gentiana scabra*) においてもセコイリドイドは重要な薬理活性成分である。これまでセンブリを組織培養し、セコイリドイドを大量生産する試みは少ない。また、カルスでセコイリドイドを産生した例はない。毛状根を用いた培養においては swertiamarin と gentiopicroside の類縁体、キサントン、フェニルプロパノイドの産生が認められたが (Ishimaru *et al.* 1990a, 1990b)、swertiamarin、gentiopicroside の産生は報告されていない。他のリンドウ科植物でも培養の報告はあるものの、カルスや不定根においては swertiamarin、gentiopicroside の産生例はなく、脱分化することによって swertiamarin や gentiopicroside 生合成にとって強い抑制が生じることが示唆された。そのため、カルスを用いた物質生産系の構築には、培養条件の詳細な検討や、外部刺激を与えるエリシター活性成分のスクリーニング、培養物特有の成分の同定といった課題が存在する。

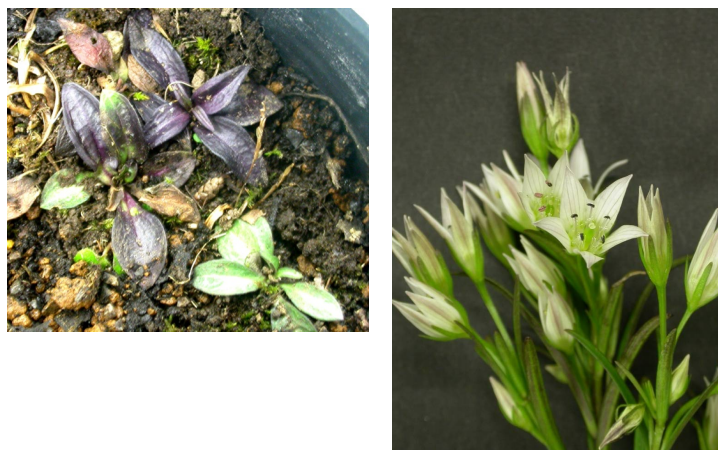


Figure 1-1 Annual (left) and biennial (right) plant of *S. japonica*.

### 1.3. セコイリドイド生合成について

センブリは国内において重要な有用植物であるにも関わらず、主成分のセコイリドイドの生合成経路に関与する機能遺伝子の情報は無い。リンドウ科、キョウチクトウ科、アカネ科、マチン科において産生される二次代謝物群であるイリドイドは、モノテルペノイドに分類され、生薬における医薬原料として重要な位置を占める。イリドイド生合成においては、メバロン酸経路から合成されたゲラニオールが折り畳まれ、ログニンとセコロガニンが主な中間体となって様々な構造のイリドイド化合物が生合成される。セコロガニンから合成されるインドールアルカロイドやセコイリドイドは有用な薬理活性成分として知られている。インドールアルカロイドはセコロガニンがトリプタミンと結合し、その後、薬理活性が知られる多くの類縁体が生合成される。この経路においては、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) をモデルとする研究が盛んに行われ、ログニンの開裂反応に関与するセコロガニン合成酵素 (SLS) として CYP72A ファミリーに属する遺伝子の機能が多くの報告されている (Miettinen *et al.* 2014)。一方、リンドウ科の植物に含まれる swertiamarin や gentiopicroside はインドールアルカロイドとは別の経路で合成され、セコロガニンからエステルの加水分解を伴うラクトン形成の後、水酸化により swertiamarin が合成され、更に脱水酸化されることで gentiopicroside が生合成されと考えられている (Jensen & Schripsema 2002, Figure 1-2)。この生合成経路における SLS 及び、その下流の合成酵素遺伝子についての報告はないため、これらをターゲットとして、その塩基配列の決定、酵素の機能を解析することでセンブリにおけるセコイリドイドの生合成経路の解明につながると期待できる。これまで私は、二次代謝物の生合成経路について、特に swertiamarin、gentiopicroside 生合成に関与する遺伝子として SLS の単離を試みてきた。まず、既知の SLS の塩基配列を参考に、ディジェネレート PCR 法を用いてセンブリカルスからブドウ、ダイズ、タバコの SLS の配列と塩基配列及びアミノ酸レベルで 67~69% の相同性を示す配列を 1 個単離した。しかし、swertiamarin 産生量に差のある培養系間で、RT-PCR 法によりこの遺伝子の発現量を比較したところ、成分産生量との相関は得られなかったため、swertiamarin 生合成には別の遺伝子の関与が示唆された。

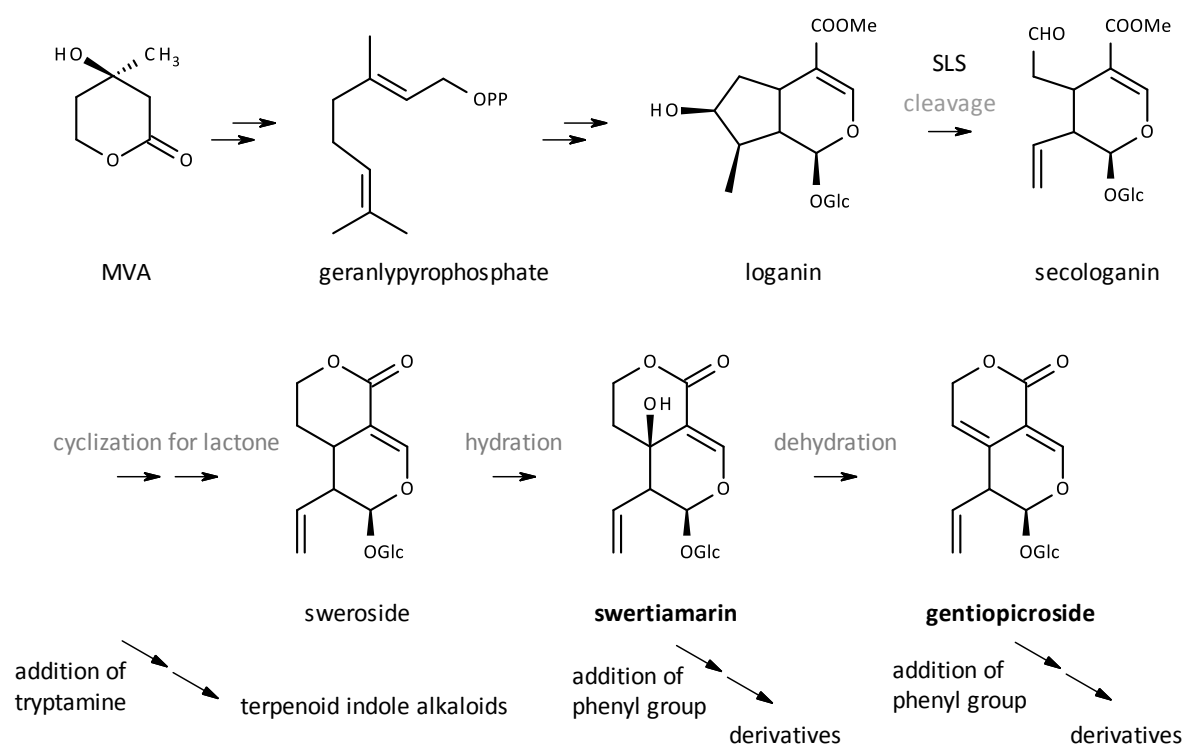


Figure 1-2 Putative secoiridoid biosynthesis pathway

#### 1.4. KODA について

リノレン酸の類縁体である 9-hydroxy-10-oxo-12(Z),15(Z)-octadecadienoic acid (KODA, Figure 1-3) はストレス誘導物質としてアオウキクサから単離された (Yokoyama *et al.* 2000)。KODA はカテコールアミンと反応することで花芽形成を促進することがアオウキクサの 151 株を用いた試験で明らかにされた (Yamaguchi *et al.* 2001)。KODA は単一でもアサガオ (Ono *et al.* 2013) やカーネーション (Yokoyama 2005) などの花卉やリンゴ (Kittikorn *et al.* 2011) や温州みかん (Nakajima *et al.* 2011) といった果実の花芽形成も促進する。加えて、KODA はナンにおける休眠打破を促進する効果も報告されている (Sakamoto *et al.* 2010)。また、ケヤキに KODA を噴霧したところ、発根効果を示したことが報告されている (Yamamoto *et al.* 2009)。このように KODA は様々な生理活性を有する活性成分であるが、KODA が組織培養物に与える影響については現在まで報告はない。そこで、本研究ではセンブリカルスに KODA を与えた場合、形態や二次代謝にどのような効果を示すのか検討することとした。

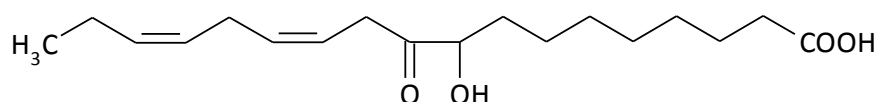


Figure 1-3 Chemical structure of KODA (9-hydroxy-10-oxo-12(Z),15(Z)-octadecadienoic acid) .

## 1.5. 目的

本研究では、センブリの有用成分を医薬資源として持続的に大量生産する方法を確立することを目的として、センブリの組織培養法を確立し、培養物特有の成分の単離構造決定を行った。さらに、不定根培養をより効率的にするために KODA の新規な生物活性を見出した。また、懸濁細胞培養系におけるセコイリドイド産生条件を検討した。最後に、遺伝子工学的手法で物質生産性を向上させる方法を確立するために、次世代シーケンサーを用いた *de novo* RNA-seq 解析でセコイリドイド生合成に関与すると予想される遺伝子を特定し、その発現量と様々な実験条件下におけるセコイリドイド産生パターンとの関係性を明らかにした。

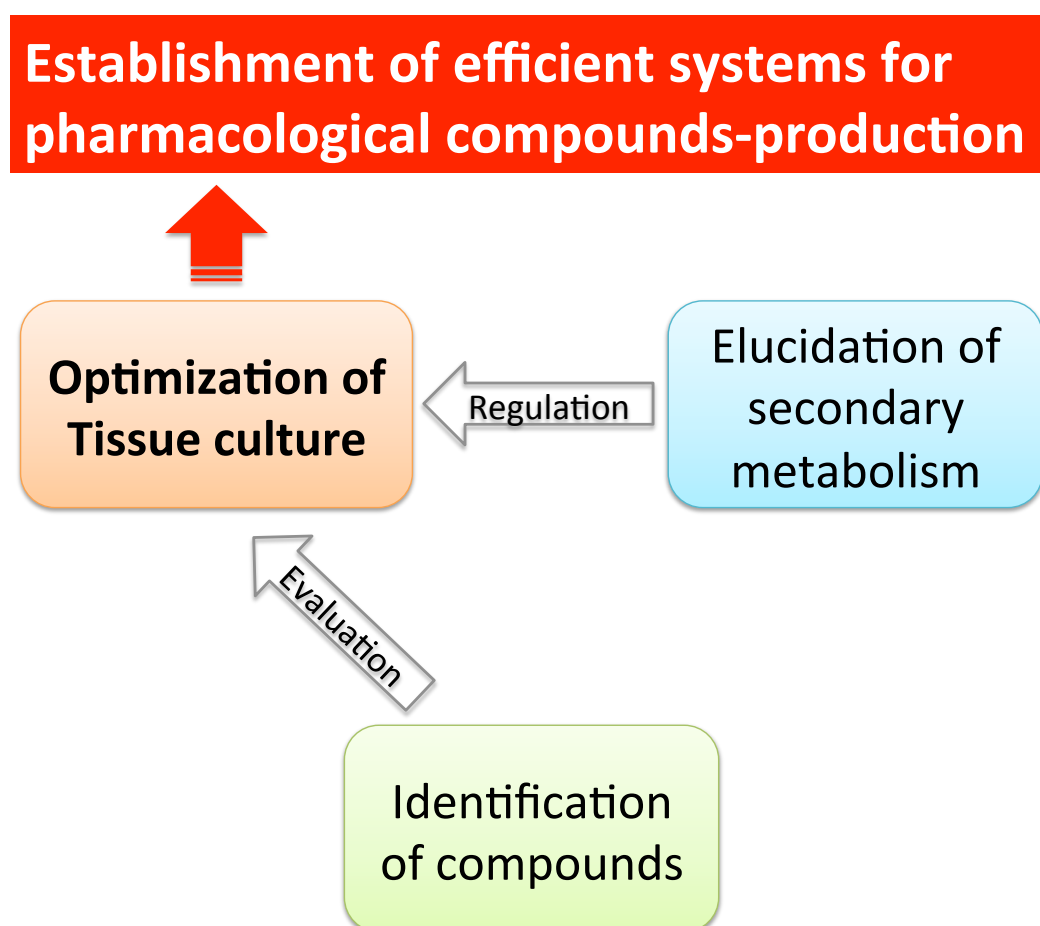


Figure 1-4 Strategy and objects of research.

## 2. センブリの組織培養法の確立

### 2.1. 目的

大量培養法の確立のために、まずカルス誘導条件と培養物の成分を明らかにすることを目的として、ここではカルス誘導条件の最適化と、培養物の成分分析、さらに液体培養における植物ホルモンの不定根の分化とセコイリドイド産生に対する影響を明らかにした。

### 2.2. カルス誘導条件の最適化と培養物の成分

#### 2.2.1. 材料と方法

##### カルス誘導

カルスは太平山（秋田県、秋田市）より採取したセンブリ天然植物体の茎を材料に誘導した。滅菌処理した茎（ $n=5$ ）を約 3 mm の長さに切り、3% (w/v) sucrose、1% (w/v) agar、10 もしくは 1  $\mu\text{M}$  naphthylacetic acid (NAA; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、と 10 もしくは 1  $\mu\text{M}$  kinetin (KIN; Nacalai Tesque) または thidiazuron (TDZ; Phytotechnology Laboratories, Shawnee Mission, KS, USA) を含む Murashige Skoog 基本培地 (MS; Murashige & Skoog 1962; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、Gamborg B5 基本培地 (B5; Gamborg *et al.* 1968; Wako Pure Chemical Industries)、Lloyd McCown's Woody Plant 基本培地 (WP; Lloyd & McCown 1981; Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) それぞれの培地に植え付け、20°C、明条件下 (1042.8 lux) で培養した。カルス誘導率は培養 30 日後のカルス形成数を植え付け数で割り、算出した。

##### セコイリドイドの分析

凍結乾燥したカルスと不定根 (100 mg) をメタノール 1 ml に浸漬し 24 時間室温で抽出した。カルス、不定根のメタノール抽出物を HPLC-PDA 分析 (SPD-M10A VP, SCL-10A VP HPLC system, 溶媒; 12%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , カラム; YMC-Pack ODS-A column (4.6  $\times$  150 mm; YMC, Kyoto, Japan) , 分析時間; 40 min, 流量; 1 ml/min; SHIMADZU, Kyoto, Japan) と LC-ESI-MS/MS 分析 (TSQ Quantum Ultra equipped with an Accela 600 HPLC system, 溶媒; 10–35%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0–15 min; 35–100%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 15–20 min; 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 20–30 min, カラム; Thermo Scientific Hypersil GOLD column (2.1  $\times$  100 mm; Thermo Fisher Scientific) , 流量; 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 電圧; 10 eV, Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) した。Swertiamarin と gentiopicoside (Wako Pure Chemical Industries) を標品として用いた。Swertiamarin と

gentiopicroside の定量分析は HPLC-PDA を用いて行い、それぞれ検量線は swertiamarin を  $Y=2.734 \times 10^{-7}X-0.0125$ 、gentiopicroside を  $Y=2.855 \times 10^{-7}X-0.0049$  とした (X, peak area; Y, concentration)。

## 2.2.2. 結果

### 2.2.2.1. カルス誘導と不定根の分化

センブリの最適なカルス誘導条件を明らかにするために、まず茎を MS、B5、WP 培地それぞれで培養した。また、植物ホルモンについて最適化するために 10 もしくは 1  $\mu\text{M}$  NAA と 10 もしくは 1  $\mu\text{M}$  KIN または TDZ を組み合わせた試験区でのカルス誘導率を比較した。Figure 2-1 はカルス誘導への植物ホルモンと基本培地の影響について示している。

WP 培地はカルス誘導に最も効果的であり、続いて B5 培地を用いた場合にもカルスが誘導された。MS 培地はカルス誘導には適さなかった。植物ホルモンの影響については、KIN は TDZ よりカルス誘導を促進した。10  $\mu\text{M}$  NAA と 1  $\mu\text{M}$  KIN の組み合わせが最もカルス誘導に適していた。カルスを 3% sucrose、10  $\mu\text{M}$  NAA、1  $\mu\text{M}$  KIN を含む WP 基本培地で継代培養したところ、10 日間経過すると不定根が容易に再分化した。

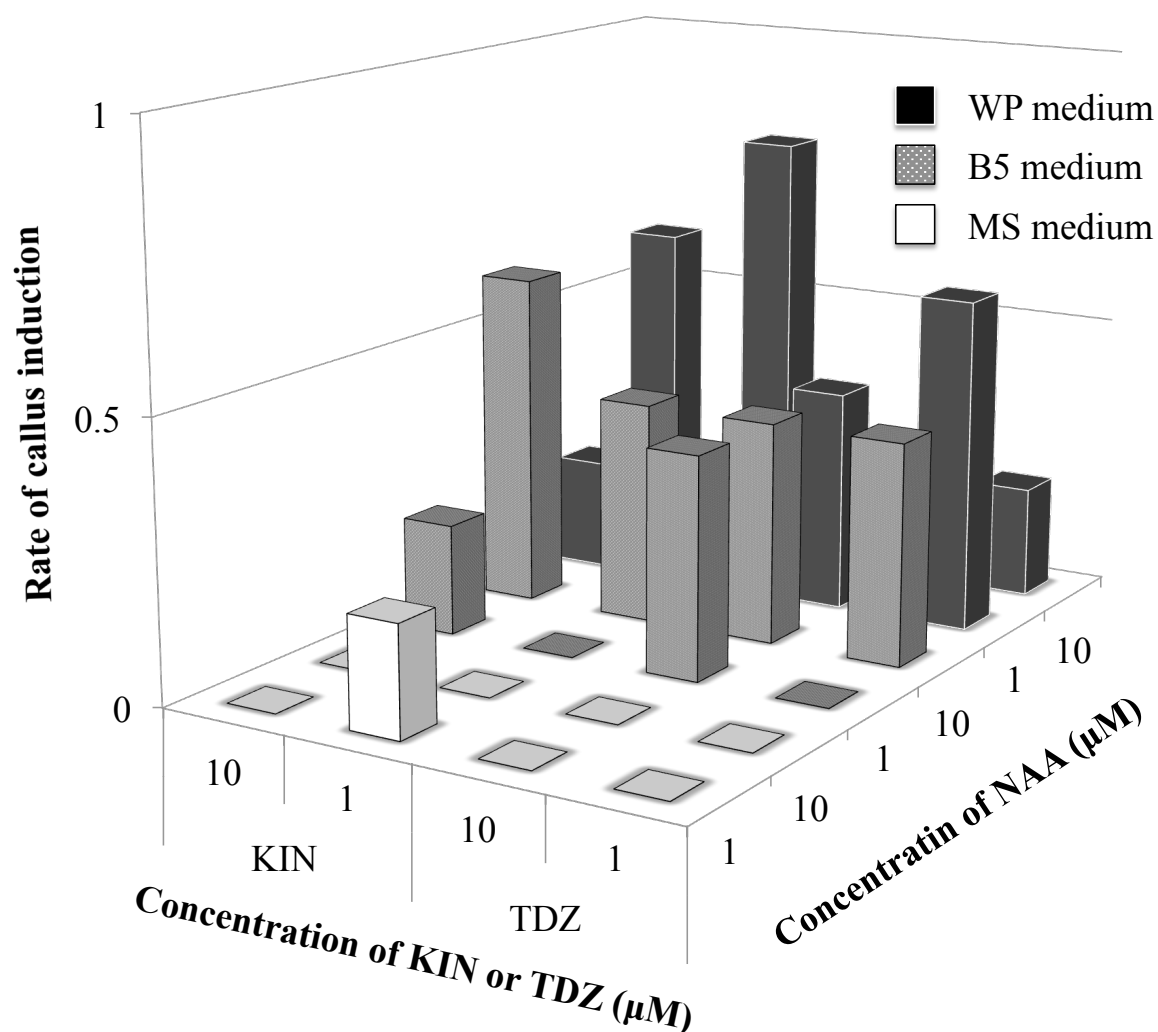


Figure 2-1 Effects of phytohormones and basal media on the rate of callus induction.

### 2.2.2.2. カルスと不定根の含有成分

カルスと不定根がセコイリドイドを産生しているのか確認するために、swertiamarin と gentiopicroside の標品を HPLC-PDA と LC-ESI-MS/MS 分析した。Figure 2-2 はカルスと不定根の HPLC-PDA 分析結果を示している。保持時間と UV スペクトルが標品の Swertiamarin (Rt 6.1 min) と gentiopicroside (Rt 7.8 min) のものと一致したため、不定根は swertiamarin と gentiopicroside を含むことが明らかになった。しかし、カルスには両者ともに検出されなかった。また、4 種類の培養物特有の成分を検出した。これら成分の UV スペクトラムはセコイリドイドとは異なっているため、基本骨格の違う成分と考えられる。19.2 min に検出された成分を不定根の主成分として Compd 1 とした。

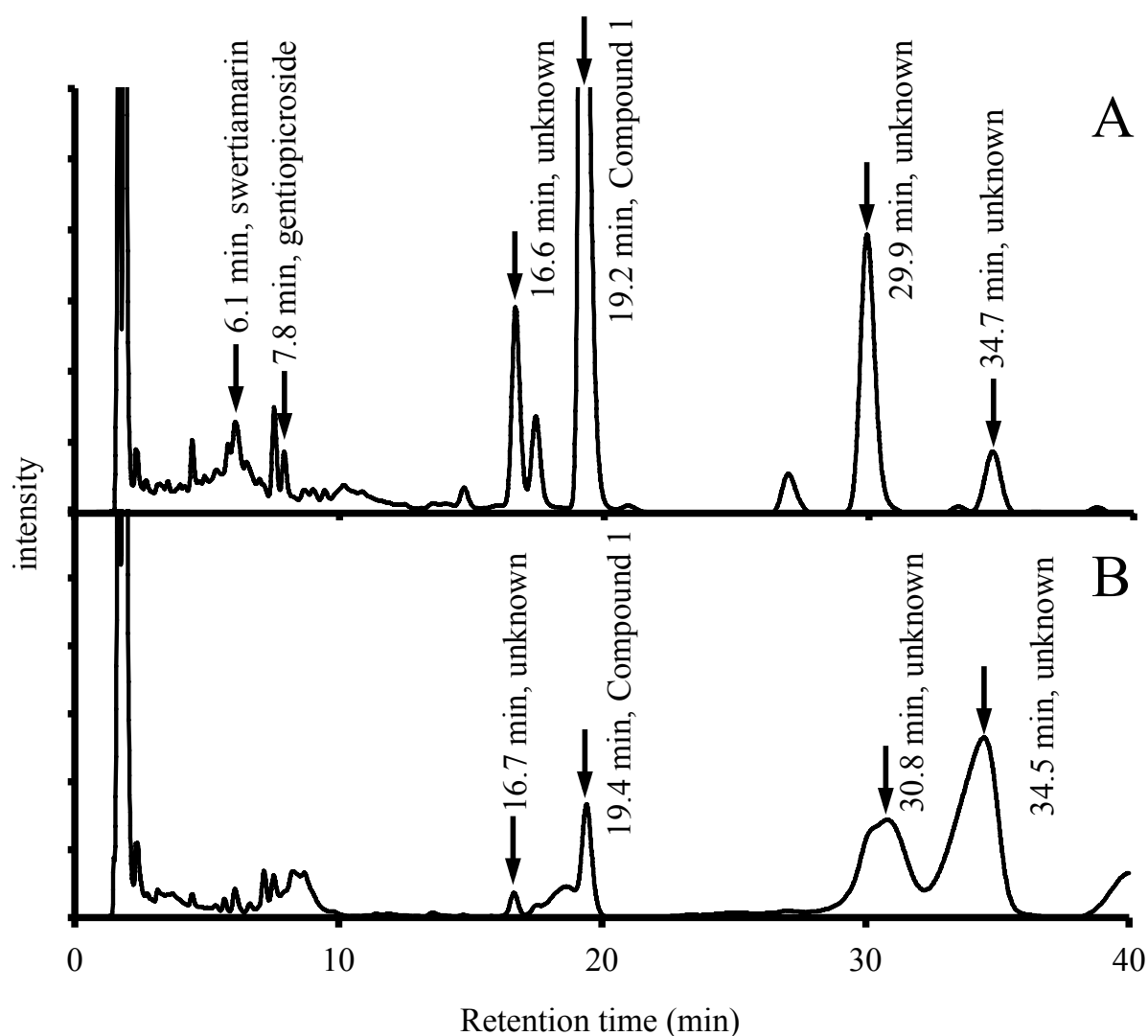


Figure 2-2 HPLC-PDA analyses of the constituents of the adventitious root (A) and callus (B).

さらに、微量なサンプルの定量を可能にするために、より感度の良い LC-ESI-MS/MS により不定根に含まれる swertiamarin と gentiopicroside を分析した。標品の swertiamarin と gentiopicroside と不定根に含まれる成分の保持時間と分子量、開裂パターンが一致したため、不定根に含まれる成分が swertiamarin と gentiopicroside であると同定した。swertiamarin (Rt

2.4 min) の陽イオン分析モードにおけるフラグメントイオンは 375(7)  $[M+H]^+$ 、357(4)  $[M+H-H_2O]^+$ 、213(10)  $[M+H-Glc+O]^+$ 、195(100)  $[M+H-Glc]^+$ 、177(39)  $[M+H-Glc-H_2O]^+$  であった。一方、gentiopicroside (Rt 3.7 min) の陽イオン分析モードにおけるフラグメントイオンは 357(4)  $[M+H]^+$ 、195(100)  $[M+H-Glc]^+$ 、177(27)  $[M+H-Glc-H_2O]^+$  だった (Figure 2-3)。 $[M+H]^+$  で示した swertiamarin と gentiopicroside の母ピークの分子量の差は  $H_2O$  に相当し、この2つの化学成分の分類に非常に重要であった。

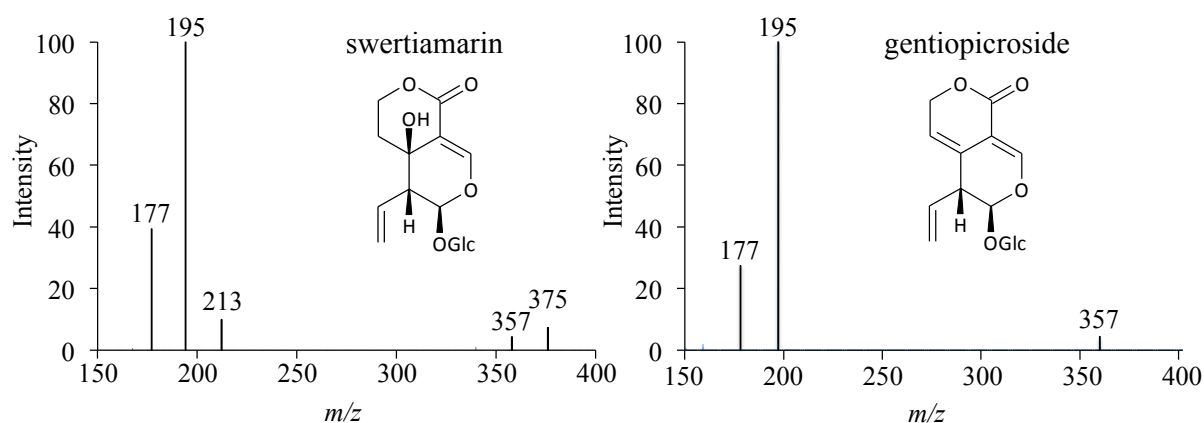


Figure 2-3 Fragmentation pattern of swertiamarin and gentiopicroside analyzed by LC-MS/MS

### 2.2.3. 考察

本研究において、センブリのカルスの最適誘導条件を明らかにし、不定根が swertiamarin (1) と gentiopicroside (2; Figure 2-4)を産生することを明らかにした。これまで、センブリの毛状根は amarogentin (3)や amaroswerin (4)のような biphenyl secoiridoids を産生するものの、swertiamarin や gentiopicroside を産生しないことが報告されている (Ishimaru *et al.* 1990a)。センブリ属植物においても、*Swertia chirata* の毛状根が amarogentin と amaroswerin を産生する他 (Keil *et al.* 2000)、*S. pseudochinensis* の培養根がセコイリドイドは産生しないことが報告されている (Kitamura *et al.* 1988)。よって、本研究はセンブリ属植物の組織培養研究において、swertiamarin や gentiopicroside を産生した初めての例である。また、biphenyl 基の付加などの生合成は用いる培養材料や種によって制御が異なることも示唆された。

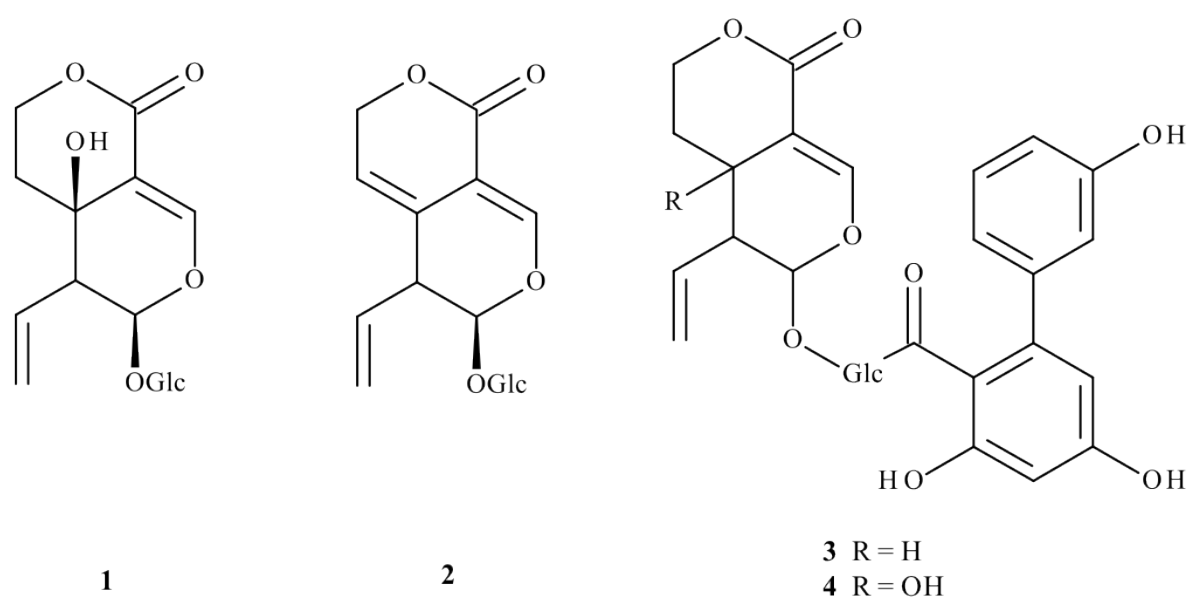


Figure 2-4 Secoiridoids produced in *Swertia* plants. Chemical structures showed as swertiamarin (1), gentiopicroside (2), amarogentin (3) and amaroswerin (4).

## 2.3. 不定根培養条件の最適化とセコイリドイド産生への影響

### 2.3.1. 材料と方法

#### カルス誘導

液体培養の材料にはセンブリの種子（秋田県太平山の野生種から 2009 年 10 月に採取）を無菌播種して得られた芽生えの葉を外植片として組織培養し、脱分化して得られたカルスを用いた。3 mm 四方に切った芽生えの葉を 3% (w/v) sucrose, 1% agar, 10  $\mu$ M naphthylacetic acid (NAA) と 1  $\mu$ M kinetin (KIN) を含む Lloyd & McCown Woody Plant basal medium (WP, Lloyd & McCown 1981) 固体寒天培地に植え付け、20 °C、明条件下で培養し、カルスを誘導した。誘導したカルスは同条件の固体寒天培地に約 1 ヶ月おきに植え換え、25 °C、明条件下で継代培養した。カルス誘導から約 10 日で不定根が再分化するため、継代の際にはカルスから不定根が分化した状態で培養した。

#### 液体培養

継代培養しているカルスを 3% sucrose を含む 1/8WP 液体培地に植え替えた。NAA と KIN をそれぞれ最終濃度が 10、1、0.1、0.01  $\mu$ M になるように組み合わせて加えた。培養物 (n=3) を 110 rpm で振とう培養し、25°C、明条件下 (1042.8 lux) に置き、35 日後に回収した。回収した培養物はカルスと不定根に分け、凍結乾燥した。

さらに、経時変化を観察するため、3% sucrose、0.01  $\mu$ M NAA、0.01  $\mu$ M KIN を含む 1/8WP 液体培地にカルスを植え付け、5 日ごとに 35 日まで回収し、カルス (n=5) と不定根 (n=5) に分け、凍結乾燥し、乾燥重 (mg DW) を測定した。

#### セコイリドイドの分析

凍結乾燥したカルスと不定根 (100 mg) と天然植物体の根 (100 mg) をメタノール 1 ml に浸漬し 24 時間室温で抽出した。カルス、不定根、根 (n=3) のメタノール抽出物を HPLC-PDA 分析 (SPD-M10A VP, SCL-10A VP HPLC system, 溶媒; 12% CH<sub>3</sub>CN, カラム; YMC-Pack ODS-A column (4.6  $\times$  150 mm; YMC, Kyoto, Japan) , 分析時間; 40 min, 流量; 1 ml/min; SHIMADZU, Kyoto, Japan) とした。Swertiamarin と gentiopicroside (Wako Pure Chemical Industries) を標品として用いた。Swertiamarin と gentiopicroside の定量分析は HPLC-PDA を用いて行い、それぞれ検量線は swertiamarin を  $Y=2.734 \times 10^{-7}X-0.0125$ 、gentiopicroside を  $Y=2.855 \times 10^{-7}X-0.0049$  とした (X, peak area; Y, concentration)。

### 2.3.2. 結果

Figure 2-5 は NAA と KIN を各濃度で組み合わせて 35 日間培養した様子を示している。不定根の分化は NAA 濃度に影響され、低濃度の NAA は分化を促進した一方 (Figure 2-5 13~16)、高濃度の NAA は阻害した (Figure 2-5 1~4)。また、KIN は不定根の伸長ではなく、肥大を促進する傾向が観察され 10  $\mu\text{M}$  KIN の試験区で最も太い不定根が観察された (Figure 2-5 1, 5, 9, 13)。

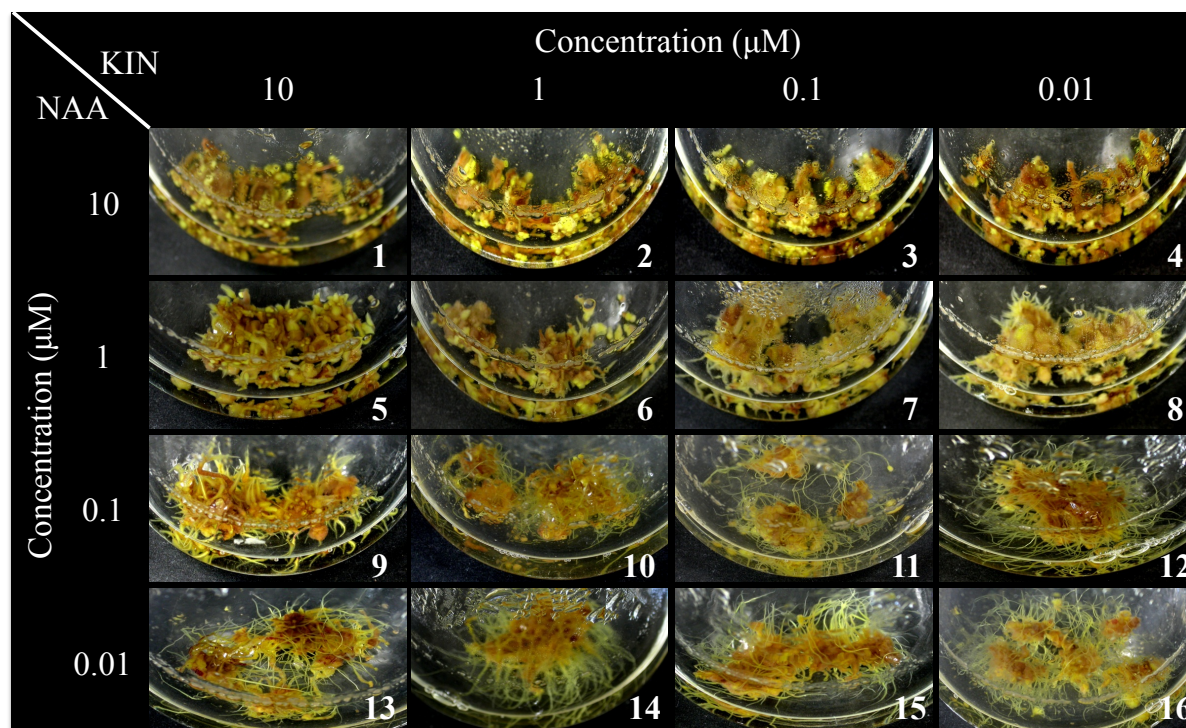


Figure 2-5 Effects of phytohormone on the redifferentiation of adventitious roots. Lateral line shows the effects of KIN on the differentiation of adventitious roots, beside longitudinal line shows that of NAA.

NAA の不定根の分化に対する影響を明らかにするために、10、1、0.1、0.01  $\mu\text{M}$  NAA もしくは KIN、0.01  $\mu\text{M}$  NAA もしくは KIN を組み合わせて含む液体培地でカルスを培養し、35 日後の不定根の乾燥重量を比較した。その結果、不定根の乾燥重量は NAA 濃度と反比例して増加した (Figure 2-6A)、一方 KIN 濃度は不定根の増加に関与していなかった (Figure 2-6B)。低濃度の NAA は不定根の分化を促進し、一方 10  $\mu\text{M}$  NAA は有意に不定根の分化を阻害した。形態観察の結果と不定根の乾物重の傾向は一致した (Figure 2-5, 2-6)。

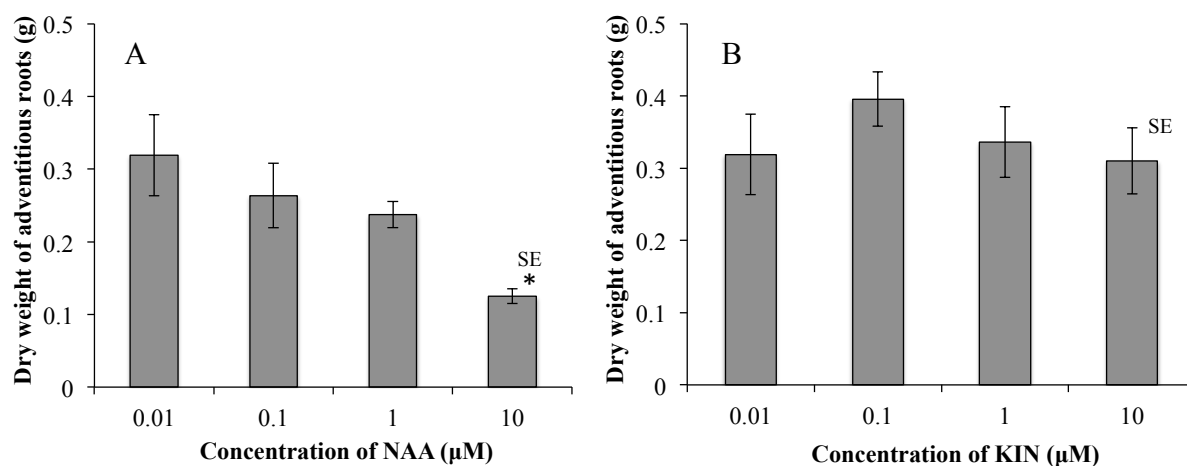


Figure 2-6 Effects of NAA (A) and KIN (B) on the growth of adventitious roots. Differences of the dry weight on various concentration of phytohormone were compared using *t*-test ( $*P < 0.05$ ). Error bars in (A) and (B) indicate standard error (SE).

NAA と KIN が不定根のセコイリドイド生産に与える影響を明らかにするために、各試験区の不定根のセコイリドイド含有量を HPLC-PDA で定量した。0.1 μM NAA より高濃度の試験区ではセコイリドイドは産生されなかった。セコイリドイド含有量を 0.01 μM NAA と 10、1、0.1、0.01 μM KIN それぞれを含む液体培地で培養した不定根で比較した。セコイリドイド含有量は KIN 濃度に影響され、10 μM KIN の試験区で多い傾向があった (Figure 2-7)。10 μM KIN の試験区において、Gentiopicroside 含有量は swertiamarin の 16 倍であった。天然植物体の根のセコイリドイド含有量を測定したところ、swertiamarin は  $2.15 \pm 1.62$  μg/mgDW、gentiopicroside は  $3.98 \pm 0.93$  μg/mgDW であった。不定根で産生された swertiamarin と gentiopicroside の最大含有量はそれぞれ天然植物体の根の 1.48% と 12.75% に相当した。

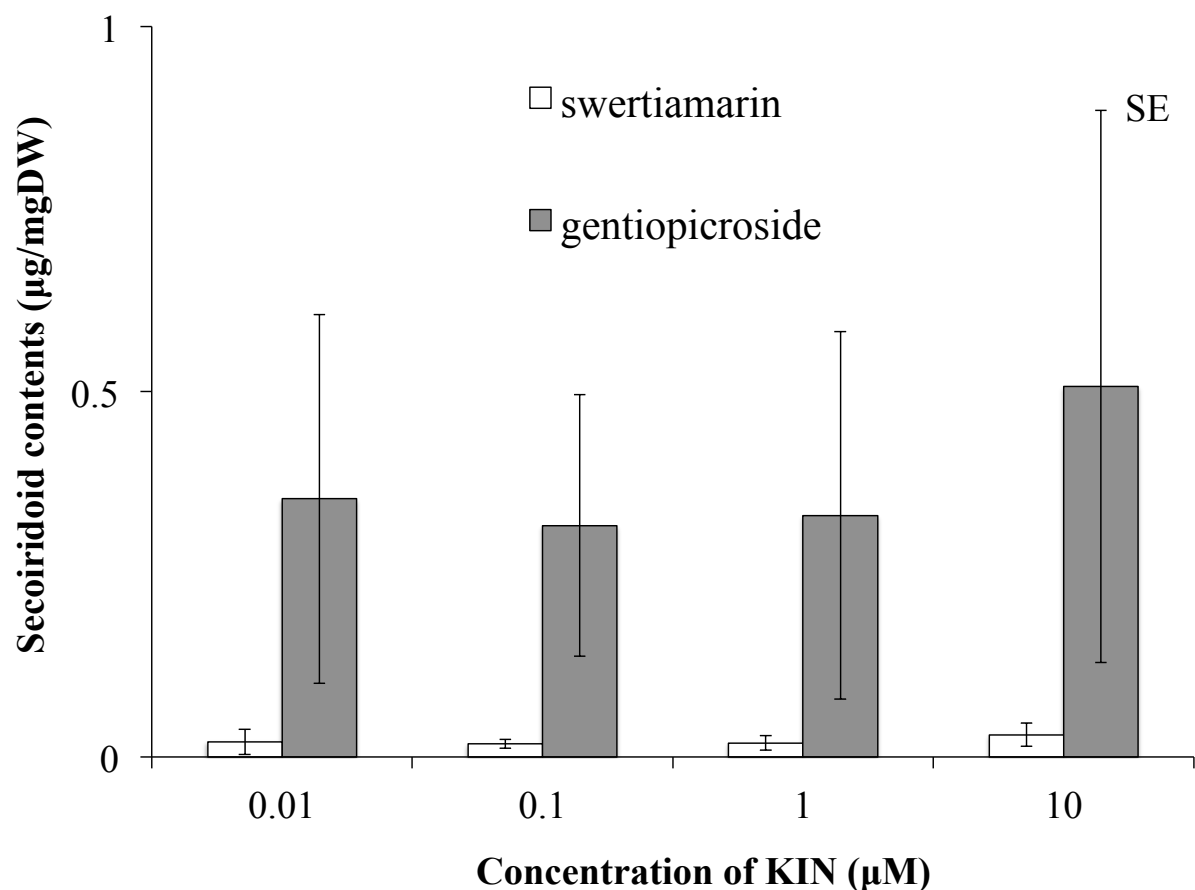


Figure 2-7 Effects of KIN on the secoiridoid production in adventitious roots. Error bars in graph indicate standard error (SE).

不定根は培養 10 日目から分化し、増殖を続け、35 日目で最大となった (Figure 2-8A)。カルスは 0 から 25 日にかけて 2 倍に増殖したが、25 日以降減少した。セコイリドイド産生は 15 日から観察され、不定根の分化が観察された 10 日から 5 日のタイムラグがあった (Figure 2-8B)。Swertiamarin は培養 20 日目で最大に達し、一方 gentiopicroside は 25 日目に最大になった。また 25 日以降セコイリドイド含有量は減少する傾向があったが、個体差が大きく、有意差な差はなかった。

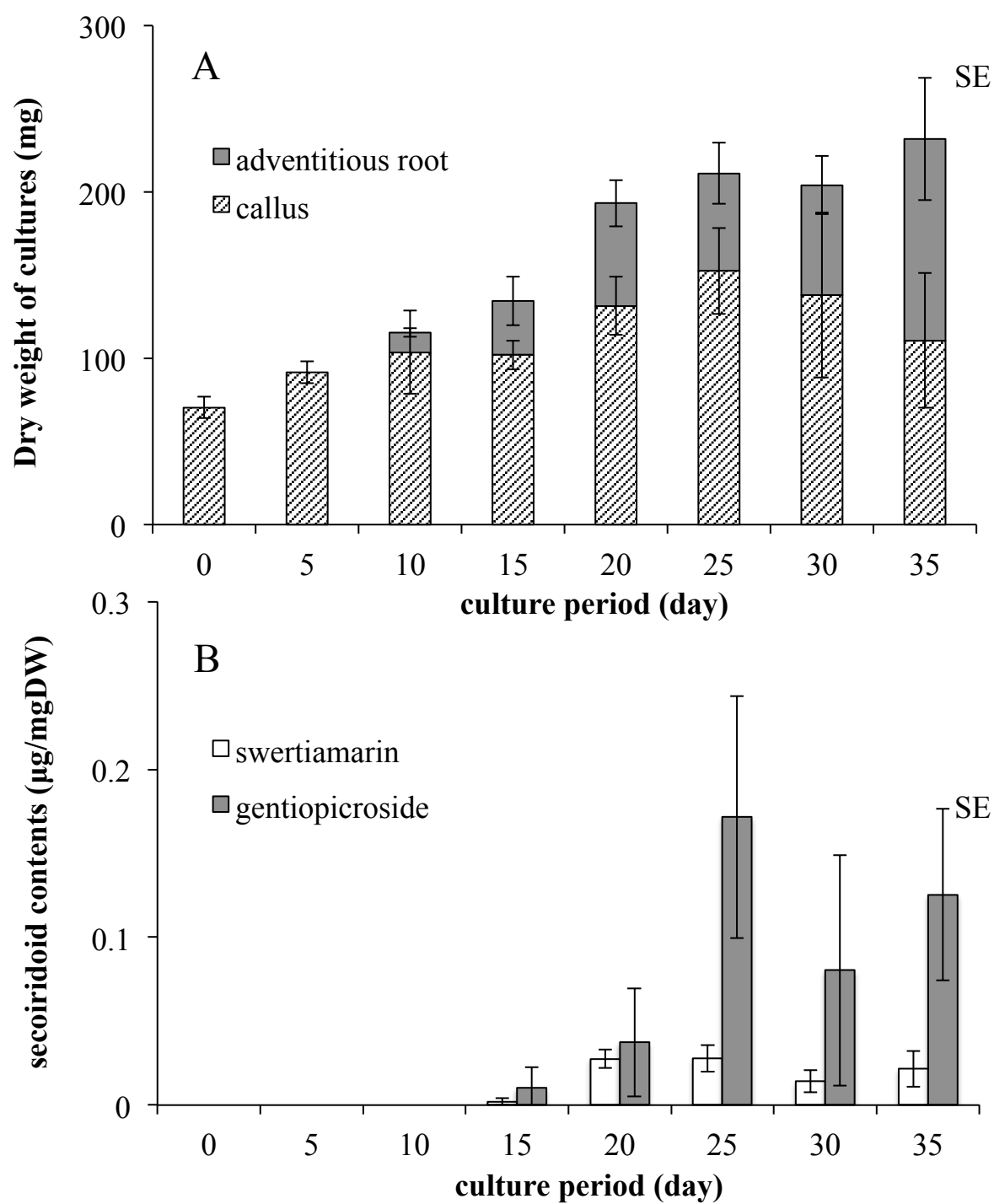


Figure 2-8 Time course of growth of callus and adventitious root (A) and secoiridoid production of adventitious root (B). Error bars in (A) and (B) indicate standard error (SE).

### 2.3.3. 考察

Piatczak *et al.* (2005) は、*Centaurium erythraea* の液体培養した不定芽が産生する swertiamarin と gentiopicroside 含有量が、培養 10 週目のマイクロプロパゲート植物体に含まれる swertiamarin と gentiopicroside 含有量のそれぞれ 3.1% と 30.2% に相当することを報告した。本研究では、不定根で産生された swertiamarin と gentiopicroside の最大含有量はそれぞれ天然植物体の根の 1.48% と 12.75% に相当した。不定芽や不定根のセコイリドイド含有量についての現象はマイクロプロパゲート植物体や天然植物体のそれぞれの部位の含有量より少ないという現象に一致した。組織培養の分野では、天然植物体が含有する成分が培養物では産生されない例、または減少する例が多く報告されているが、本研究でも同様の現象が認められた。今後、生合成に関与している遺伝子が天然植物体と培養物間で発現量にどのような差があるか検討することで、培養物のセコイリドイド含有量を増加させる要因を明らかにできると考えられる。

セコイリドイドはメバロン酸から 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate を介した非メバロン酸経路を経由して生合成されることが知られており、その経路は terpenoid indole alkaloids (TIA) に類似している。ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) の TIA 生合成経路に関与する遺伝子の発現はオーキシンで阻害され、一方サイトカイニンとエチレンで促進されることが知られている (Hedhili *et al.* 2007)。本研究ではセコイリドイド生合成が高濃度の KIN に促進される傾向があり、一方、NAA が高濃度に傾くと産生が阻害された。このことより、セコイリドイド生合成は TIA 生合成と類似する制御が働く可能性が見られた。

オーキシンが不定根の分化を制御することは広く知られている (Gaspar *et al.* 1996)。本研究においては、低濃度の NAA が不定根の分化を促進した。低濃度のサイトカイニンが不定根の分化を促進する例は、コメ (*Oriza sativa*, Nishi *et al.* 1973) やリンゴ (*Malus domestica*, Pawlicki & Welander 1995) など多くの植物で報告されている。他のセンブリ属植物においても、ムラサキセンブリ (*Swertia pseudochinensis*) の根の断片から分化させた不定根が 0.005  $\mu$ M NAA で増殖が促進することが報告されている (Kitamura *et al.* 1987)。以上のことから、センブリにおいて低濃度の NAA が不定根の分化を促進した現象は、植物にも共通して観察される可能性が高い。

液体培養において、不定根の分化が起きた 10 日から 5 日後にセコイリドイドが産生された。このことから、セコイリドイドの生合成には不定根の成熟という過程が伴うことが示唆された。不定根の成熟を促進する要因を明らかにすることは、センブリ培養根の大量生産技術の開発に非常に有効的であると考えられる。

## 2.4. まとめ

本研究で、センブリカルの効率的な誘導条件を明らかにし、液体培養において、不定根の分化を促進する培養条件を確立した。不定根の分化は低濃度のオーキシンで促進された。一方、セコイリドイド産生は高濃度のサイトカイニンで促進され、オーキシンの阻害された。今回、不定根がセコイリドイドを産生することを初めて明らかにしたが、天然植物体の根の含有量と比較すると微量であることから、今後、不定根のセコイリドイド含有量を増加する要因を明らかにする必要がある。セコイリドイド生合成にはサイトカイニン濃度が影響することが明らかになったほか、成熟過程が重要であることがわかったので、これらの現象に付随して働く遺伝子の発現解析を進めることで、セコイリドイド生合成を促進する要因が明らかになると期待できる。

### 3. 培養物特有成分の単離・構造決定

#### 3.1. 目的

「2. センブリの組織培養法の確立」において、カルスと不定根に共通し、天然植物体には含まれない培養物特有の成分が4種類明らかになった。そのうち不定根に主成分として含まれる Compd 1 の構造や薬理活性を明らかにすることでセンブリ培養物の医薬資源としての価値が高まると考え、Compd 1 を単離構造決定することとした。

#### 3.2. 材料と方法

##### 目的化合物の単離

Compd 1 を単離する分画フローを 3.2 結果の Figure 3-2 に示すとともに手順を以下に示した。

- 1) まず、センブリ不定根の MeOH 抽出物 (6.92 g) を 200 ml H<sub>2</sub>O に溶解し、hexane、ethyl acetate、n-butanol の順に分配し、4 つの画分を得た。
- 2) TLC と PDA-HPLC で各画分を分析し、Compd 1 が最も多く含まれる n-butanol 画分を少量の MeOH に溶解し、シリカゲルクロマトグラフィーで分画した。シリカゲル (Wakogel<sup>®</sup> C-200, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 100 g を chloroform で充填し、その後、chloroform と MeOH を 19:1、9:1、4:1、3:1、2:1、1:1、0:1 の比率で混合した溶媒 300 ml で溶出し、7 つの画分を得た (Fr.1～Fr.7)。
- 3) 最も多く Compd 1 が含まれていた Fr.5 を H<sub>2</sub>O に溶解し、糖を除去するために HP-20 を用いて精製した。DIAION<sup>®</sup> HP20 (Mitsubishi Chemical Co.) を MeOH で充填し、その後 H<sub>2</sub>O に置き換えて、Fr.5 エキスをカラム面に置いた。H<sub>2</sub>O で糖を溶出させ、その後、Compd 1 を含む画分を MeOH で溶出した。
- 4) 得られた画分、Fr.5-hp を H<sub>2</sub>O に溶解し、次に ODS カラム (Wakogel<sup>®</sup> 100C18, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で分画した。ODS 20 g を MeOH で充填し、次に H<sub>2</sub>O で置換した後、MeOH と H<sub>2</sub>O を 1:9、3:7、4:6、7:3、1:0 の比率で混合した溶媒 150 ml で溶出し、10 つの画分を得た (Fr.5-hp-Fr.1～Fr.10)。
- 5) Compd 1 が高い純度で含まれていた Fr.5-hp-Fr.6～Fr.9 を合わせて、再度 ODS カラムで精製した。ODS 20 g を MeOH で充填し、次に H<sub>2</sub>O で置換した後、MeOH と H<sub>2</sub>O を 0:1、2:8、3:7、4:6 の比率で混合した溶媒 150 ml で溶出し、9 つの画分を得た (Fr.5-hp-Fr.69-1～Fr.9)。
- 6) 最も純度の高い Fr.5-hp-Fr.69-8 を 3 ml MeOH に溶解し、70 °C に熱した後、4 °C の冷蔵庫内で一晩静置し、再結晶させた。

## 糖の PDA-HPLC 分析

実験は 2007 年に報告された田中らの方法に従った。この方法では L-cysteine methyl ester と *o*-tolyl isothiocyanate のアルドールのワンポット反応によって生成される methyl 2-(poly-hydroxyalkyl)-3-(*o*-tolylthiocarbamoyl)-(thiazolidine-4(R)-carboxylates (Figure 3-1) を HPLC-PDA 分析することで、アルドールの D 体と L 体のエナンチオマーを判別する。反応液を直接 HPLC-PDA 分析し、250 nm の吸収波長における各糖誘導体の保持時間の違いで判別する。化学修飾方法は以下に示す。

- 1) Compd 1 1 mg に 3.5 % HCl を加え 110 °C で 1 時間加水分解反応させた。
- 2) glucose 5 mg と galactose 5 mg を秤量し、5 mg L-cysteine を加え、pyridine 1 ml に溶解し、60°C で 1 時間反応させた。Compd 1 反応液には 1 mg L-cysteine を加え、pyridine 200  $\mu$ l に溶解し、60°C で 1 時間反応させた。
- 3) その後、5 mg *o*-tolyl isothiocyanate (Compd 1 反応液には 1 mg *o*-tolyl isothiocyanate) を加え、さらに 60°C で 1 時間反応させた。
- 4) 反応液 2  $\mu$ l を HPLC 分析 (SSC-3461 HPLC Pump with a SSC-5410 UV/VIS detector, Senshu Scientific Co., Ltd.) に供し、250 nm における紫外吸収を検出した。

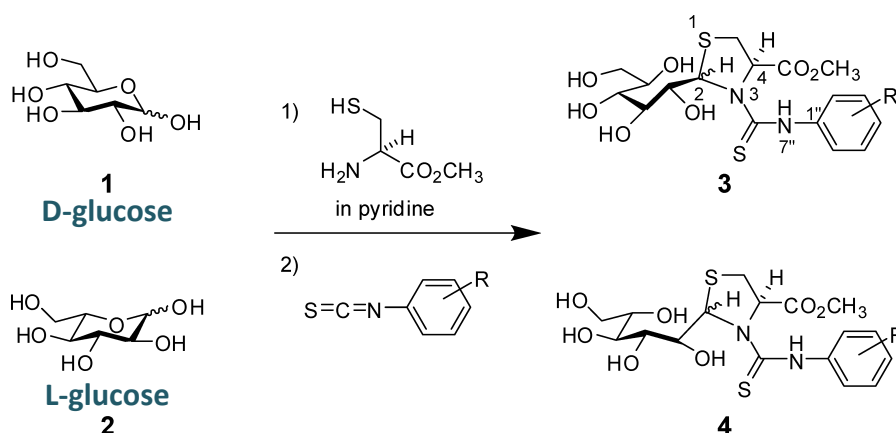


Chart 1. Reaction of Aldoses with L-Cysteine Methyl Ester and Aryliso-thiocyanate

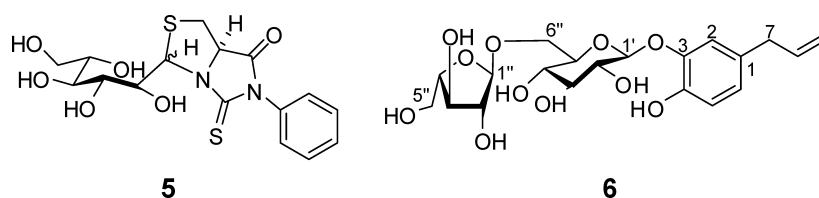


Chart 2. Structures 5 and 6

Figure 3-1 Reaction of aldoses with L-cysteine methyl ester and arylisothiocyanate. (Tanaka *et al.* 2007)

## 機器分析

$^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルと HMQC、HMBC、COSY の相関は JEOL-ECS 400 ( $^1\text{H}$  400 and  $^{13}\text{C}$  100 MHz) spectrometer を用いて測定した。TMS を内部標準に含む  $\text{DMSO-}d_6$  に Compd 1 (5 mg) を溶解した。精密分子量は Exactive (Thermo Fisher Scientific Inc.)、開裂パターンは TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて測定した。

## 抗酸化活性の評価

TLC アルミシート (シリカゲル 60 F<sub>254</sub> 20 × 20 cm, 1.05554.0009, メルク・ジャパン (株)) に Compd 1 1 mg/ml と不定根 MeOH 抽出物 (1 mg/ml) をスポットし、 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=1:1$  に調整した溶媒で展開した。2 % DPPH 溶液を粉霧し、抗酸化活性の有無を確認し、10 % 硫酸を粉霧した後 100 °C で加熱し、化合物のスポットを検出した。

### 3.3. 結果

Figure 3-2 に示した単離フローに従い、Compd 1 を単離した。その後、HR-MS、LC-MS/MS、NMR の各機器分析によって構造決定した。

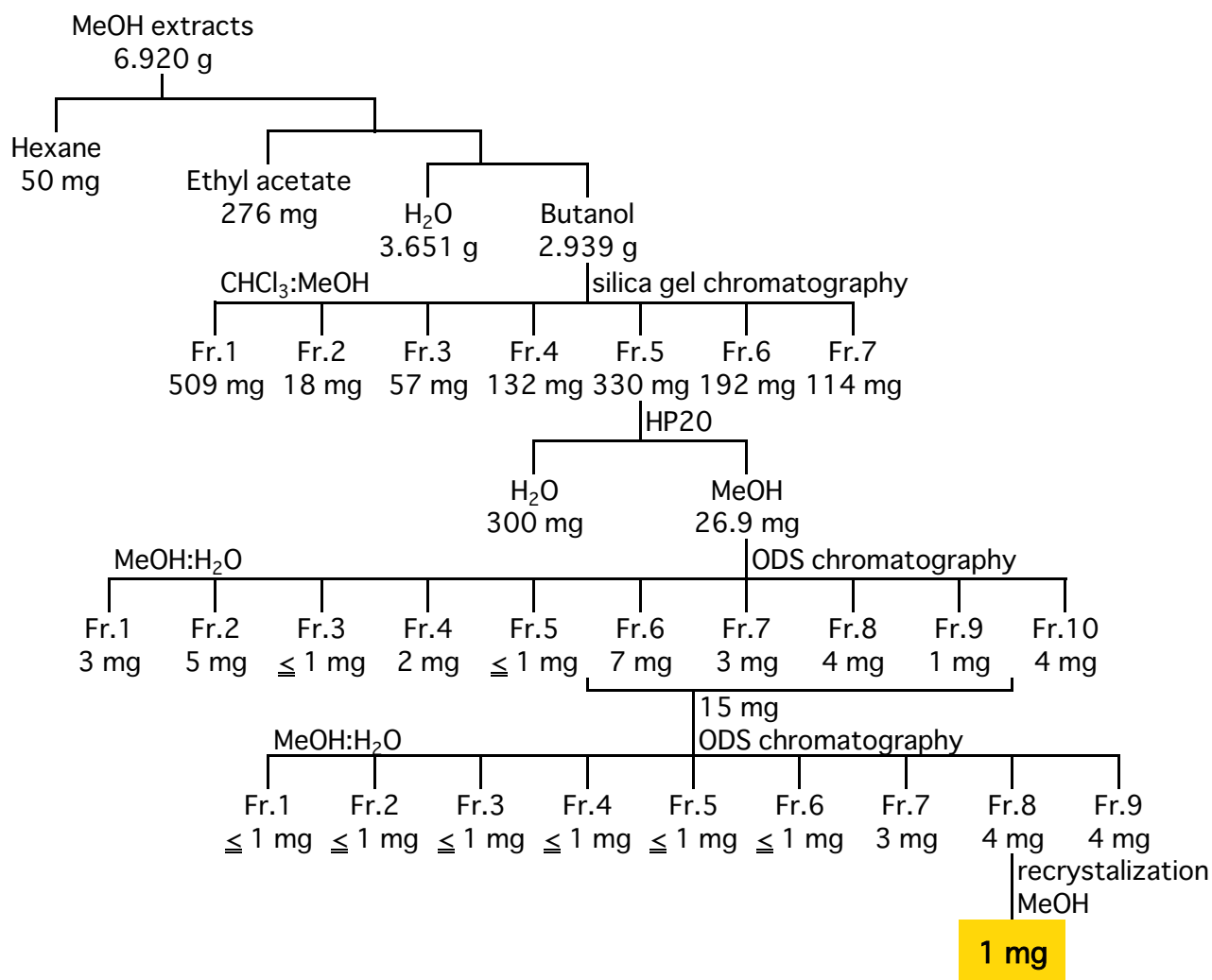


Figure 3-2 Isolation flow of Comp 1

HR-MS 分析 (Figure 3-3) により、Compd 1 の分子式は  $C_{26}H_{30}O_{16}$  と予想され、精密分子量は 597.1446  $[M-H]^-$ ; calcd. for  $C_{26}H_{29}O_{16}$ , 597.1455 , 621.1400  $[M+H+Na]^+$ ; calcd. for  $C_{26}H_{30}O_{16}Na$ , 621.1431 と測定された。分子式から計算した分子量は 598.5185 であった。

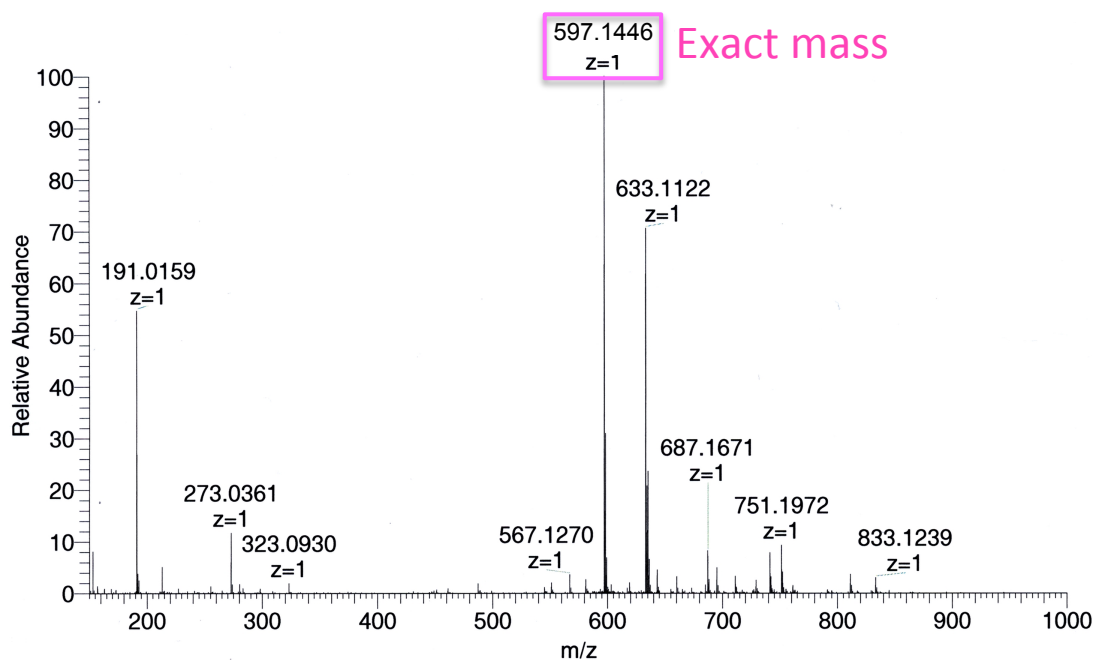


Figure 3-3 Exact mass of Compd 1 analyzed by HR-MS in negative ion mode

ESI-MS/MS 分析 (Figure 3-4) により Negative ESIMS  $m/z$  597 ( $[M-H]^-$ , 14), 322(29), 273 ( $[M-H-324]^-$ , 100)、Positive ESIMS  $m/z$  599( $[M+H]^+$ , 29), 566(11), 515(31), 419( $[M+H-180]^+$ , 20), 316(50), 298(100), 275( $[M+H-324]^+$ , 22)のフラグメントイオンが得られた。273  $[M-H-324]^-$ 、275  $[M+H-324]^+$ のフラグメントイオンより、Compd 1 のアグリコンはセンブリ植物体から単離されたキサントンとして知られる bellidifolin であり、2 糖が結合した配糖体であることが示唆された。

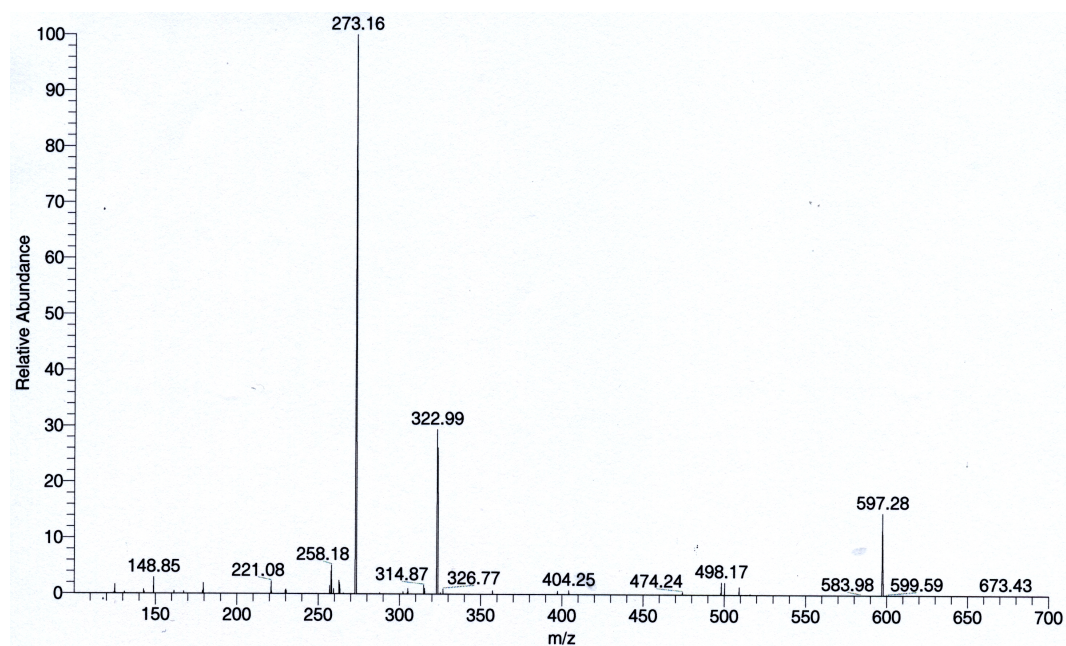


Figure 3-4 Fragmentation pattern of Compd 1 analyzed by LC-MS/MS in a negative ion mode

MS/MS 分析の開裂パターンから判断し、本化合物はキサントン配糖体であると推定されたので、糖の同定のため、配糖体を加水分解し、糖を化学修飾した後、HPLC 分析で同定した。

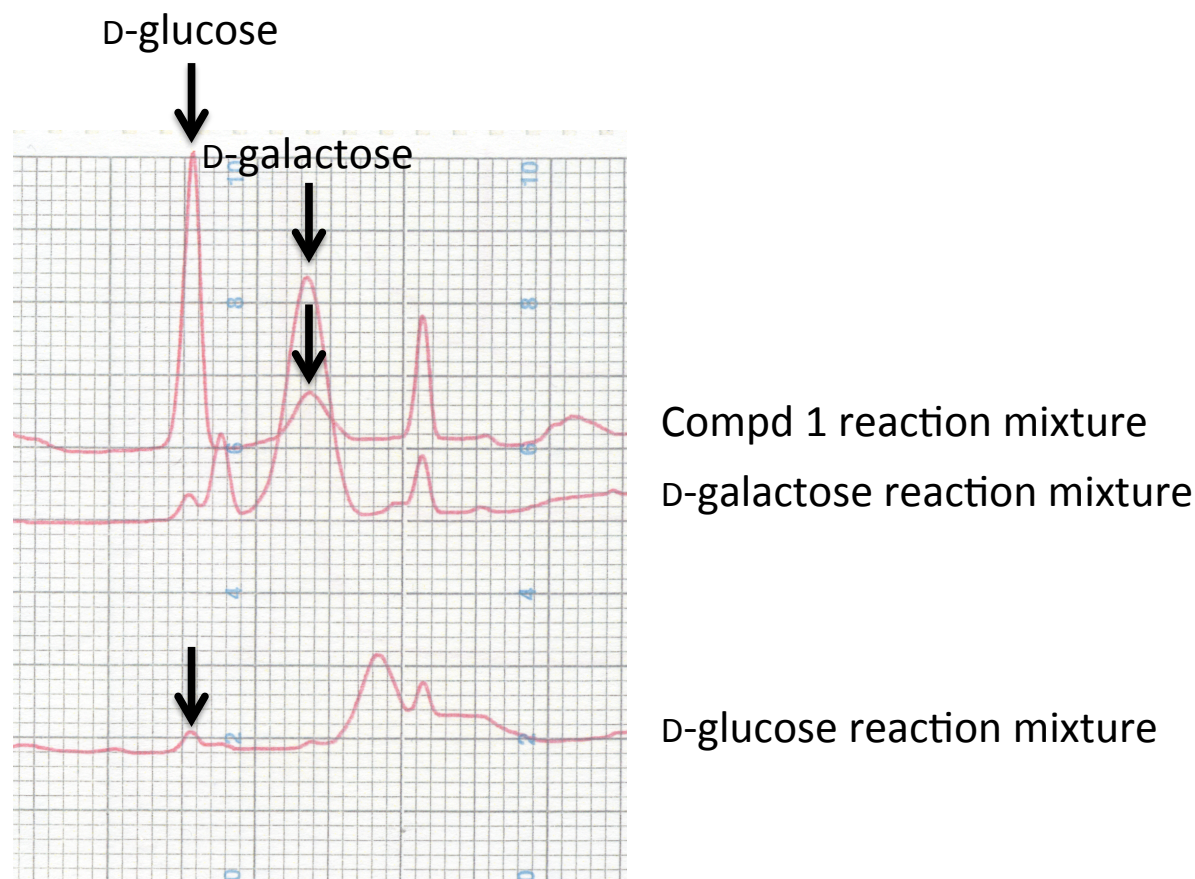


Figure 3-5 HPLC chromatograms of Compd 1 mixture, D-galactose and D-glucose derivatives

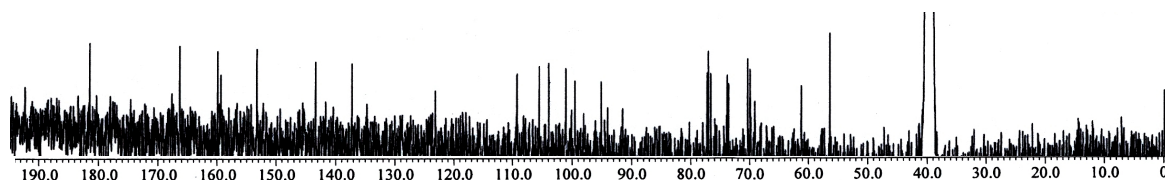
標品に D-galactose (Rt 53.6 min) と D-glucose (Rt 59.6 min) の反応液を用い、Compd 1 の反応液のクロマトグラムと比較したところ、保持時間が一致した。田中らの報告 (Tanaka *et al.* 2007) によると、D 体と L 体の化学修飾物質の保持時間の差 ( $\Delta R_{t(D-L)}$ ) は glucose においては 1.33 min、galactose は -0.49 min であり、判別可能であるので本化合物の糖部分は D-glucose と D-galactose であると推定した。

次に Compd 1 の化学構造を決定するために NMR 分析に供した。 $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  NMR から得られたシグナルについて Figure 3-6、Table 3-1 に示した。 $^{13}\text{C}$  NMR 分析と HMQC (Hetero-nuclear Multiple Quantum Coherence) 分析の結果より、 $^1\text{H}$  と相関のある  $^{13}\text{C}$  が 26 個検出された。C-1 から C-10a の化学シフトは bellidifolin に非常に類似しており (Purev *et al.* 2002)、Compd 1 のアグリコンは bellidifolin であると推定した。 $^1\text{H}$  NMR 分析より、メトキシ基が 1 個、ベンゼン管に結合する水素が 4 個、bellidifolin 配糖体の糖部分に類似する水素と考えられる 21 個のシグナルを検出した。 $\delta$  6.75 (H-4) と  $\delta$  6.81 (H-2)、 $\delta$  6.58 (H-7) と  $\delta$  7.19 (H-6) のカップリング係数はそれぞれ、 $J = 8.8$  と 2.4 であり、前者はメタカップリングした

水素、後者はオルソカップリングした水素と帰属した。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY と HMBC (Hetero-nuclear Multiple-Bond Connectivity) 分析の結果を Figure 3-7 に示した。HMBC の相関より、メトキシ基と帰属した  $\delta$  3.97 の水素が  $\delta$  165.4 (C-3) の炭素に相関があるため、本化合物は 3 位にメトキシ基を持つことを示唆した。また、糖部分のシグナルの帰属に関して、HMQC と  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY の結果より、 $\delta$  100.6 (C-1') -  $\delta$  73.1 (C-2') -  $\delta$  60.9 (C-3') -  $\delta$  68.7 (C-4') -  $\delta$  75.5 (C-5') -  $\delta$  76.2 (C-6') と  $\delta$  103.5 (C-1'') -  $\delta$  73.4 (C-2'') -  $\delta$  76.5 (C-3'') -  $\delta$  69.9 (C-4'') -  $\delta$  76.7 (C-5'') -  $\delta$  69.5 (C-6'') の連続した相関が得られた。また、シグナルの積分値が 2 個の水素に相当し、 $\delta$  3.42 (H-2') と  $\delta$  3.72 (H-5') のシグナルと  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY において相関があるため、 $\delta$  3.66 (H-4') のシグナルは  $\delta$  3.66 (H-3') と重なっていると帰属した。HMQC の相関より、 $\delta$  3.66 (H-4') に検出した水素が  $\delta$  68.7 (C-4') のシグナルとして得られた炭素と相関があり、更に HMBC の相関より  $\delta$  3.66 (H-4') の水素が  $\delta$  75.5 (C-5') の炭素に相関があるため、 $\delta$  3.66 に検出されたシグナルが 4' 位であると帰属した。HMBC の相関より、 $\delta$  5.11 (H-1') に帰属した水素が  $\delta$  159.0 (C-1) の炭素に相関があるため D-galactose はアグリコンの 1 位に結合しており、 $\delta$  4.18 (H-1'') に帰属した水素が  $\delta$  68.7 (C-4') の炭素に相関があるため、D-galactose と D-glucose が 1,4 結合していることが明らかになった。また  $\delta$  5.11 (H-1') と  $\delta$  3.42 (H-2')、 $\delta$  4.18 (H-1'') と  $\delta$  2.97 (H-2'') の J 値から判断して糖の構造は  $\beta$  位であることも示唆された。以上の結果より、本化合物をキサントン配糖体の 5,8-dihydroxy-1-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-3-methoxyxanthen-9-one (1-O-galactoglucosylbellidifolin, **1**) であると同定した。

### $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz)

【C<sub>26</sub>】



### $^1\text{H}$ NMR (400 MHz)



Figure 3-6  $^{13}\text{C}$ -(100 MHz) and  $^1\text{H}$ -(400 mHz) NMR spectroscopic data for Compd 1

Table 3-1  $^{13}\text{C}$ -(100 MHz) and  $^1\text{H}$ -(400 MHz) NMR spectroscopic data for Compd 1 (in DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\sigma$  in ppm,  $J$  in Hz)

No.	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	—	159.0 (C)
2	6.81, <i>d</i> (2.4)	99.1 (CH)
3	—	165.4 (C)
4	6.75, <i>d</i> (2.4)	94.7 (CH)
4a	—	158.5 (C)
5	—	136.6 (C)
6	7.19, <i>d</i> (8.8)	122.6 (CH)
7	— 6.58, <i>d</i> (8.8)	108.9 (CH)
8	—	152.5 (C)
8a	—	108.8 (C)
9	—	180.6 (C)
9a	—	105.1 (C)
10a	—	142.6 (C)
OMe	3.97, <i>s</i>	56.1 ( $\text{CH}_3$ )
5-OH	9.56, <i>s</i>	
8-OH	12.36, <i>s</i>	
<i>Gal</i>		
1'	5.11, <i>d</i> (7.6)	100.6 (CH)
2'	3.42, <i>ddd</i> (4.8, 7.6, 8.8)	73.1 (CH)
3'	3.66, <i>m</i>	60.9 (CH)
4'	3.66, <i>m</i>	68.7 (CH)
5'	3.72, <i>brdd</i> (8.6, 8.6)	75.5 (CH)
6'	2.97, <i>m</i>	76.2 ( $\text{CH}_2$ )
	3.24, <i>m</i>	
2'-OH	4.43, <i>t</i> (4.8)	
3'-OH	4.91, <i>d</i> (4.6)	
6'-OH	5.15, <i>d</i> (4.8)	
<i>Glc</i>		
1''	4.18, <i>d</i> (7.6)	103.5 (CH)
2''	2.97, <i>m</i>	73.4 (CH)
3''	3.12, <i>ddd</i> (4.6, 8.7, 8.4)	76.5 (CH)
4''	3.06, <i>m</i>	69.9 (CH)
5''	3.05, <i>m</i>	76.7 (CH)
6''	3.38, <i>m</i>	69.5 ( $\text{CH}_2$ )
	3.49, <i>d</i> (7.2)	
2''-OH	4.83, <i>d</i> (4.4)	
3''-OH	4.87, <i>d</i> (4.4)	
4''-OH	5.10, <i>m</i>	
6''-OH	5.16, <i>d</i> (4.7)	

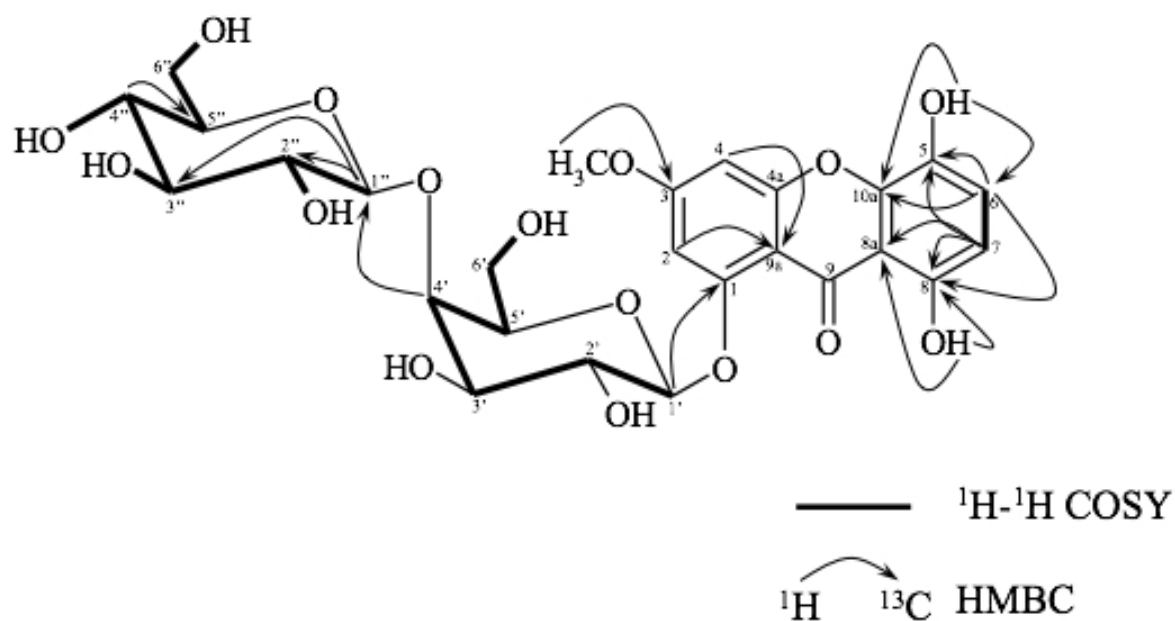


Figure 3-7 Selected  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations for Compd 1

また、TLC-DPPH 法により Compd 1 の抗酸化活性を検証したところ、DPPH の退色反応が認められたことから、Compd 1 は抗酸化活性を有することが明らかになった。

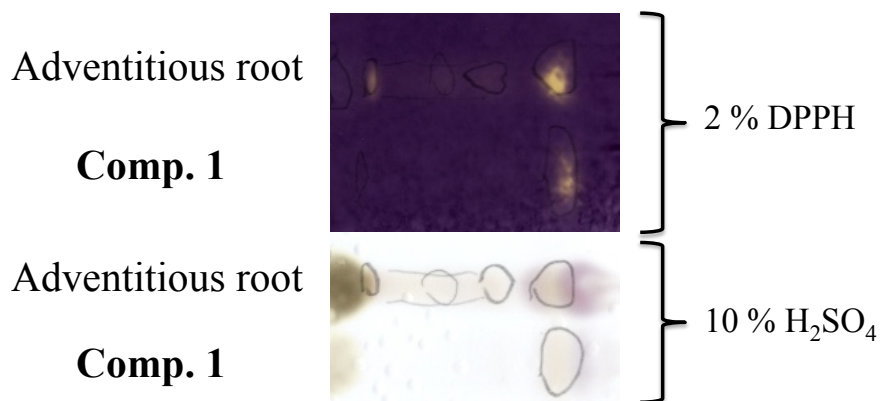


Figure 3-8 Antioxidative activity of Compd 1 analyzed by TLC-DPPH method

### 3.4. 考察

これまで、センブリ培養物が産生する二次代謝物についての報告は少なく、三浦 *et al.* (1986) はカルスがクマリン誘導体を産生するが、キサントンやセコイリドイドは産生しないことを HPLC 分析で明らかにした。また、センブリの毛状根の産生する二次代謝物に関する報告においてはキサントンとビフェニル基が結合したセコイリドイドを数種産生することが知られている (Ishimaru *et al.* 1990a, 1990b)。本研究において、初めてカルスがキサントン配糖体を産生することが明らかになり、更にそのキサントン配糖体の化学構造を 5,8-dihydroxy-1-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-3-methoxyxanthone-9-one (1-*O*-galactoglucosylbellidifolin, **1**) と決定した。三浦 *et al.* (1986) の報告と二次代謝物が異なる原因としては、培養に用いた材料が異なることと、本研究では WP 基本培地に NAA と KIN を添加して培養しているのに対し、Murashige Skoog's (MS) 基本培地に 2,4-D と KIN を添加して培養しており、基本培地と植物ホルモンの違いが関係していると考えられる。

センブリ属植物が産生する二糖が結合したキサントン配糖体には Figure 3-9 に示した様な 4 種類の化合物が知られている。毛状根は bellidifolin とその配糖体である 8-*O*-primeverosylbellidifolin (**2**) を産生することが報告されている (Ishimaru *et al.* 1990a, 1990b)。1-*O*-galactoglucosylbellidifolin は二糖が結合した bellidifolin 配糖体においては 2 例目である。また、センブリにおいて 2 位に二糖が結合した化合物として 2-*O*-rhamnoxylosylxanthone (**3**, Jamwal 2012) が知られているが、1 位に二糖が結合した化合物は初めての報告である。また他のセンブリ属植物において報告された二糖が結合したキサントン配糖体は 1-*O*-xyloglucosylxanthone の 2 種 (**4**, **5**) であるが、本化合物のように galactose が配糖化した例はこれまでない。以上より、本化合物はセンブリ属においても新規の構造を持つキサントン配糖体であることが明らかになった。

センブリの天然植物体では 1 位に配糖化したキサントン配糖体は報告がないものの、今回培養物特有に産生することが明らかになったことから、センブリにも 1 位に配糖化する生合成経路が存在することが示唆された。配糖化は一般的に植物体内で二次代謝物を安定化し、貯蔵するのに役立つ機能であるため、本化合物のアグリコンである bellidifolin のように生理活性の強い化合物を貯蔵するために、様々な位置に配糖化できるような生合成の機能をセンブリ属は持っており、種によって配糖化に関わる制御が異なることが示唆された。

また、本化合物はわずかに抗酸化活性を有することが明らかになったが (Figure 3-8)、本化合物のアグリコンに相当する bellidifolin は強い抗酸化活性を有することが報告されている (Ashida *et al.* 1994)。アグリコンの化学構造が活性に寄与していることは明らかであるが、配糖化することにより化学構造が安定化して反応性が落ちたため、本化合物の活性が低くなったと考えられる。

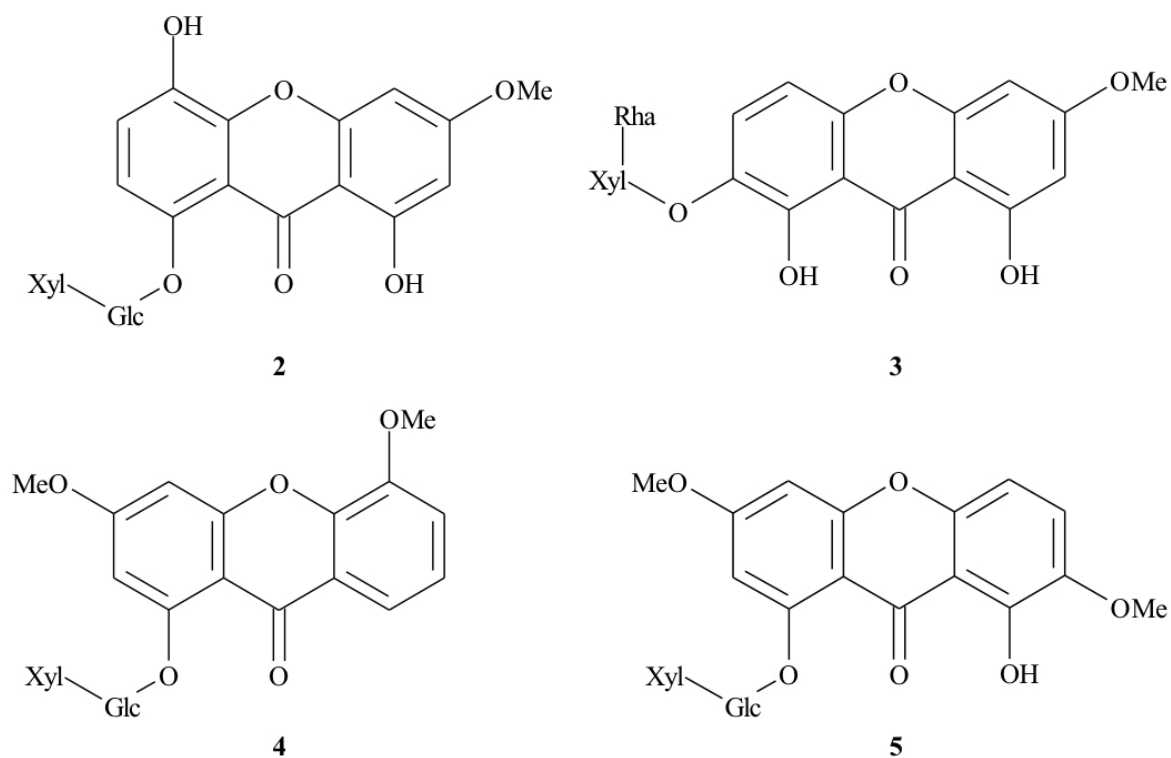


Figure 3-9 Structures of xanthone diglycosides isolated from *Swertia* plants. 8-*O*-primeverosylbellidifolin (2) and 1,8-dihydroxy-2-*O*-[α-*L*-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-*D*-xylopyranosyl]-6-methoxyxanthone (3) were isolated from *S. japonica*. Other xanthone diglycosides, 1-*O*-[β-*D*-xylopyranosyl-(1→6)-β-*D*-glucopyranosyl]-3,5-dimethoxyxanthone (4) and 8-hydroxy-1-*O*-[β-*D*-xylopyranosyl-(1→6)-β-*D*-glucopyranosyl]-3,7-dimethoxyxanthone (5), were isolated from both *S. franchetiana* and *S. przewalskii*.

### 3.5. まとめ

カルスと不定根に共通し、天然植物体には含まれない培養物特有の成分が4種明らかになった。そのうち不定根に主成分として含まれる Compd 1 の化学構造を 5,8-dihydroxy-1-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-3-methoxyxanthen-9-one (1-*O*-galactoglucosylbellidifolin, 以下 bellidifolin diglycoside , **1**)と決定した。この化合物は glucose と galactose をアグリコンの1位に持つ二糖の配糖体であるが、これまで galactose をもつキサントン配糖体の報告はないため、本研究で初めて明らかにした。

## 4. KODA の不定根の分化とキサントン配糖体産生に与える影響

### 4.1. 目的

不定根はセコイリドイドを含み、さらに「3. 培養物特有成分の単離・構造決定」において、抗酸化活性を有する *bellidifolin diglycoside* を含むことが明らかになった。不定根の増殖を高める方法を明らかにすることで、より効率的な大量生産が可能になると考え、近年発根作用などで注目されている新規の脂肪酸の KODA を用い、不定根の分化と成分産生に与える影響を明らかにすることとした。

### 4.2. 固体培養

#### 4.2.1. 材料と方法

##### カルス誘導

液体培養の材料にはセンブリの種子（秋田県太平山の野生種から 2009 年 10 月に採取）を無菌播種して得られた芽生えの葉を外植片として組織培養し、脱分化して得られたカルスを用いた。3 mm 四方に切った芽生えの葉を 3% (w/v) sucrose, 1% agar, 10  $\mu$ M naphthylacetic acid (NAA) と 1  $\mu$ M kinetin (KIN) を含む Lloyd McCown Woody Plant basal medium (WP, Lloyd & McCown 1981) 固体寒天培地に植え付け、20 °C、明条件下で培養し、カルスを誘導した。誘導したカルスは同条件の固体寒天培地に約 1 ヶ月おきに植え換え、25 °C、明条件下で継代培養した。カルス誘導から約 10 日で不定根が再分化するため、継代の際にはカルスから不定根が分化した状態で培養した。

##### KODA 処理と固体培養

継代培養で維持している培養物から再分化した不定根を取り除き、残ったカルスを 5 mm 四方に分割した。滅菌水 (control) もしくは 0.1 % ethanol で溶解した 1、10、100  $\mu$ M KODA に約 2 秒間浸し、9 個につき 1 枚の固体培地上に植え付けた (n=3)。培地は 3% (w/v) sucrose, 1% agar, 10  $\mu$ M NAA と 1  $\mu$ M KIN を含む WP 培地とし、25 °C、明条件下で培養した。30 日間培養し、培養物を回収してカルスと不定根に分割した。それぞれ凍結乾燥し、シャーレ 1 枚あたりの不定根の乾物重を測定した。

#### 4.2.2. 結果

まず、30日間固体培養した培養物において、シャーレ1枚あたりの不定根の乾物重をコントロールと各濃度のKODA処理区で比較した (Figure 4-1A, B)。10  $\mu\text{M}$  KODA は不定根の再分化を促進する傾向があり、一方100  $\mu\text{M}$  KODA は阻害したが、有意な差は認められなかった。シャーレ1枚あたりの不定根の乾物重は10  $\mu\text{M}$  KODA の試験区においてコントロールの倍だった。

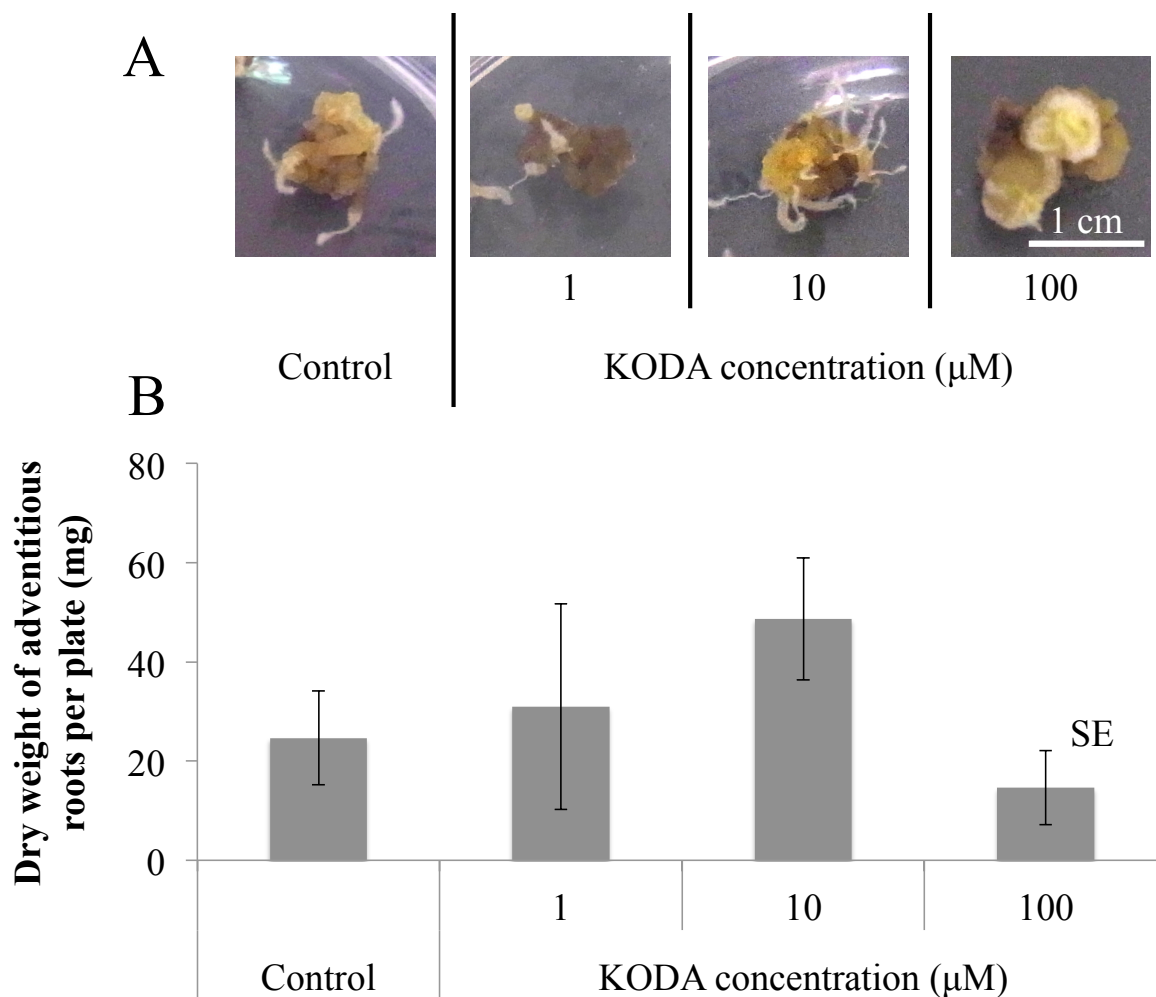


Figure 4-1 Effects of KODA on redifferentiation of adventitious roots from calli in solid culture. Representative samples of 30-day-cultures are shown (A). Dry weight of adventitious roots per plate (mg) was measured at 30 days, and the comparison of it between control and various concentrations of KODA-treatment is shown (B). Error bars in (B) indicate standard error (SE).

### 4.3. 液体培養

#### 4.3.1. 材料と方法

##### KODA 処理と液体培養

培地の金属イオンと反応して KODA が分解するため、10  $\mu$ M KODA 溶液に約 5 mm<sup>2</sup> のカルスを約 2 秒浸し、固体寒天培地上で 10 日間前培養した。固体培養の条件は、3% (w/v) sucrose、1% agar、10  $\mu$ M NAA、1  $\mu$ M KIN を含む WP 固体寒天培地で 25 °C、明条件で 10 日間培養した。

前培養したカルスを 3% (w/v) sucrose、0.01  $\mu$ M NAA、0.01  $\mu$ M KIN を含む 1/8 WP 液体培地に植え換え、110 rpm、25 °C、明条件で 30 日間振盪培養した。培養物を 10 日おきに回収し、不定根とカルスに分割した。不定根の本数と凍結乾燥後の乾物重を測定した。

##### LC-ESI-MS 分析による bellidifolin diglycoside の分析

液体培養で培養した不定根の成分を LC-ESI-MS で分析した (LC-ESI-MS, InterSustain C18, 2.1  $\times$  50  $\mu$ m, 0-10 minute. 10% CH<sub>3</sub>CN, 10-25 minute 75% CH<sub>3</sub>CN, 25-30 minute. 90% CH<sub>3</sub>CN, 200  $\mu$ l/minute)。bellidifolin diglycoside の量は検量線を用いて測定した  $Y=5.777 \times 10^{-13} X^2 + 1.536 \times 10^{-6} X - 0.0073$  (X, peak area; Y, concentration;  $R^2=0.9999$ )。乾燥した不定根 (n=9) を 12 時間 MeOH に浸してエキスを作成し、LC-ESI-MS 分析に供し、単位乾物重辺りの bellidifolin diglycoside 含有量の平均値を算出した (ng/mgDW)。

### 4.3.2. 結果

不定根をより増殖させて KODA の効果を検証するために、コントロールと KODA 処理したカルス両方を液体培地で培養した。液体培養した不定根は固体培養したものより明らかに多く増殖した (Figure 4-1A、Figure 4-2A、B)。Figure 4-2 に示したように、不定根の乾物重と本数は KODA 処理区において 0 から 10 日の間で顕著に増殖した。培養 30 日まで乾物重と本数は平行して増殖した。一方、KODA 処理区において不定根の長さは顕著に伸長せず、またコントロールに比べ、細い根が観察された (Figure 4-2A、B)。

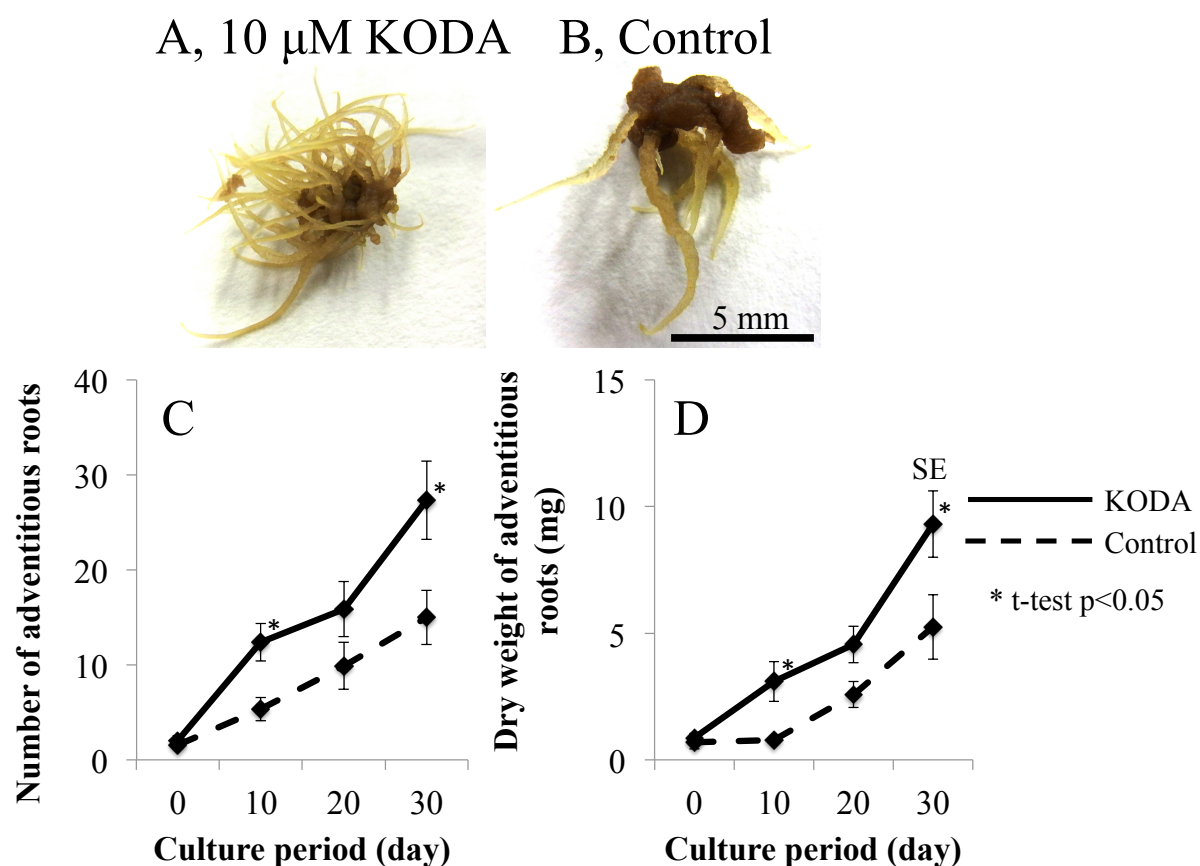


Figure 4-2 Effects of KODA on redifferentiation of adventitious roots from calli in liquid culture. Representative samples of 10  $\mu$ M KODA-treatment (A) and control (B) in 30 day-cultures are shown. The number of adventitious roots was counted after lyophilized, and the dry weight of it was measured. Time courses of the number (C) and the dry weight (D) of adventitious roots in liquid culture were compared between control and 10  $\mu$ M KODA-treatment. X-axis in (C) and (D) indicate the culture periods of the liquid culture. Statistical significance in (C) and (D) was determined by *t*-test (\* $P < 0.05$ ) between control and KODA-treatment. Error bars in (C) and (D) indicates standard error (SE).

単位乾燥重辺りの bellidifolin diglycoside 含有量 (ng/mgDW) を算出した (Figure 4-3)。0 から 10 日までの培養物においては、コントロールと KODA 処理区両方で bellidifolin diglycoside が産生されなかった。しかしながら、培養 20 日以降、bellidifolin diglycoside が産生され、30 日目において KODA 処理区の不定根の含有量はコントロールの 1/5 に減少した。

また材料に用いたカルスは長く継代を続けているカルスであるため、そこから分化した不定根にはセコイリドイドが見いだされなかった。

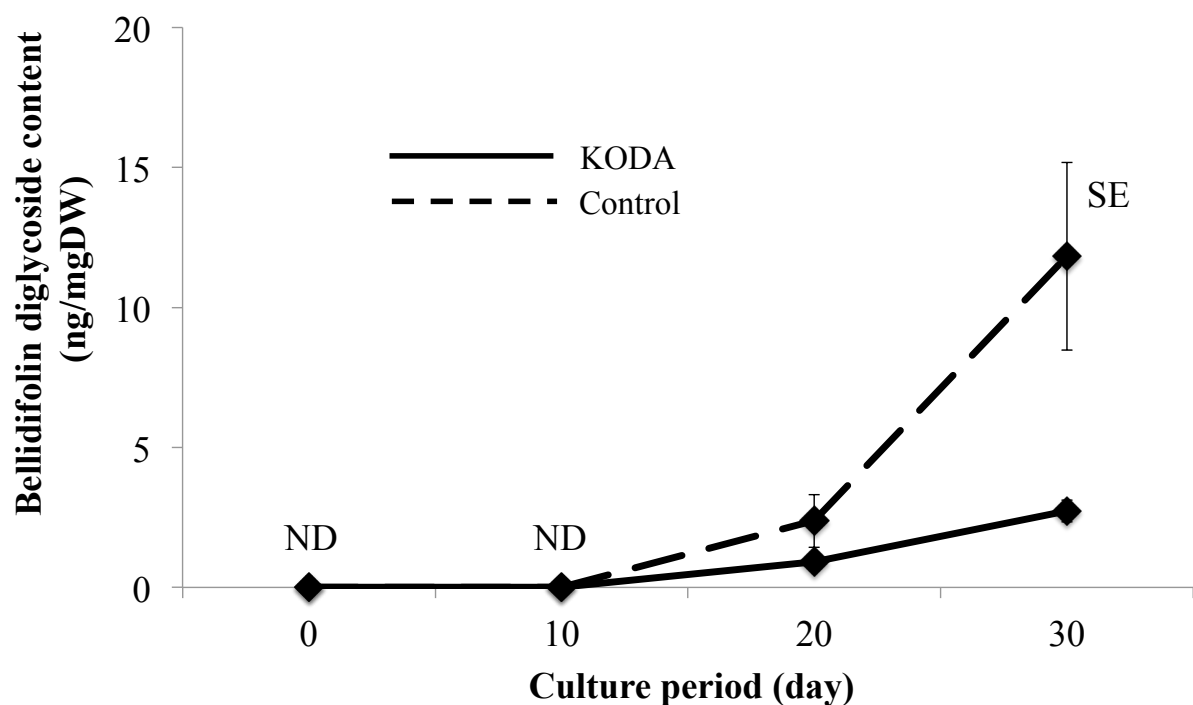


Figure 4-3 Effects of KODA treatment on bellidifolin diglycoside production. Bellidifolin diglycoside contents were compared between control and 10  $\mu$ M KODA-treatment. The constituents of adventitious roots incubated by liquid culture were analyzed by LC-ESI-MS. X-axis indicates the culture periods of the liquid culture. Error bars indicate standard error (SE).

#### 4.4. 考察

固体培養、液体培養両方の試験区において、KODA はセンブリカルスからの不定根の分化を促進した (Figure 4-1, 4-2)。組織培養物の発根を促進した例は本研究で初めての例である。

KODA は 12-oxophytodienoic acid (OPDA) 還元酵素の発現を促進することから (Yokoyama 2005)、ジャスモン酸 (JA) の生合成を制御することが示唆されている。JA はリノレン酸がリポゲナーゼ経路を介して合成されるオキシリピン化合物の一つであり、OPDA 還元酵素によって OPDA は JA に生合成される。一方、JA は植物体内において生理活性成分としてエチレン産生を促進し、更にエチレンはオーキシンの生合成を促進することが知られている (Gaspar *et al.* 1996)。オーキシンは組織培養の分野において、不定根の分化を促進する生理活性成分である。以上より、KODA は間接的にオーキシン生合成を促進したため、オーキシンによる不定根分化の促進効果が得られた可能性が考えられる。今後、内在性のオーキシンを定量することで KODA とオーキシン生合成の関係性が見いだせると考えられる。

Figure 4-2 に示したように、培養 30 日目においては KODA 処理によって不定根が肥大する現象は認められなかったが、培養が 30 日より長期になった場合に肥大する傾向が観察された (data not shown)。加えて、培養している間、KODA は bellidifoin diglycoside の生合成を抑制した (Figure 4-3)。これらの現象は KODA が不定根の分化を促進したが、その不定根は未成熟であったことを示している。KODA はリンゴ (*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf) の果実が初期ステージの時に与えると成熟を抑制し、逆に成熟のステージで与えると成熟を促進することが報告されている (Kondo *et al.* 2012)。以上より、KODA を与えた生長ステージで効果が異なることが示唆された。本研究で我々は、不定根の原基が多量に形成されていると考えられるカルスに KODA を与えたため、初期の不定根の形成のみが促進され、その後の成熟過程が抑制されたと示唆された (Figure 4-4)。

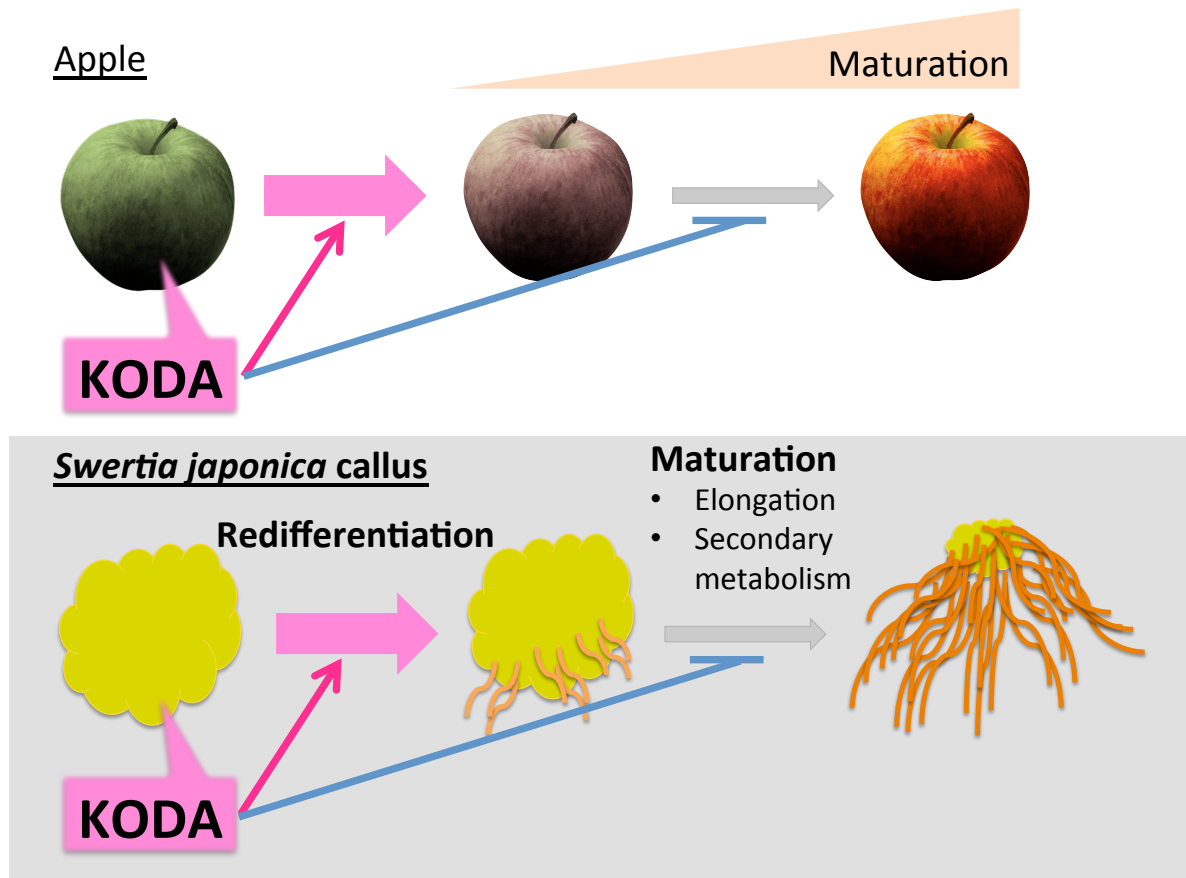


Figure 4-4 Effects of KODA on redifferentiation and maturation of *S. japonica* cultures. Upper figure shows the effects of KODA on apple fruit. Immature fruit treated by KODA was inhibited to mature, beside the fruit in early mature stage was enhanced to mature by KODA-treatment. Lower figure shows the hypothesis of the mechanisms of KODA-function for *S. japonica* callus. Callus in the stage of redifferentiation of adventitious root was treated by KODA, and redifferentiation of adventitious root was enhanced by KODA-treatment.

#### 4.5. まとめ

KODA がカルスの不定根の分化を促進する効果は本研究で初めて報告された。一方、KODA は bellidifoin diglycoside の産生を抑制したが、この現象は KODA を与える生育ステージと関連があると考えられる。KODA が二次代謝に与える影響についても、本研究で初めて知見が得られた。これらの事実は KODA の作用機構に関する研究に非常に有益である上、培養材料として不定根を大量培養する手法に対して効果的である。

## 5. 細胞懸濁系培養による成分生産条件の確立

### 5.1. 目的

大量培養法として一般的に最も効率が良いのは細胞懸濁系培養であるが、その培養系を構築するには、培地と設置する面が細胞にとって多くなりストレスとなるため、基本培地、植物ホルモン、糖条件など詳細に検討する必要がある。そこで、まず細胞懸濁培養系の確立を目的に、基本培地、植物ホルモン、糖条件を最適化し、その後、継代回数や培養期間が細胞増殖に与える影響を明らかにした。また、セコイリドイドを細胞で産生させる手法を明らかにするために、培地成分や植物ホルモン、ビタミン類、酵母抽出物などを添加し、細胞増殖とセコイリドイドやキサントン産生に及ぼす影響を明らかにした。

### 5.2. 基本培地の影響

#### 5.2.1. 材料と方法

まず、最適な基本培地条件を明らかにするために、WP 培地、B5 培地、MS 培地の3種類の培地の2倍希釈系列で細胞を培養し、細胞が健全に増殖するかどうか観察した。植物ホルモンの条件は、 $10^{-5}$  M NAA と  $10^{-6}$  M KIN とした。6穴のシャーレに培地をそれぞれ3 ml 入れ、約5 mm の細胞塊を培地に植え付け、ピンセットで細かくした。植え付け直後の細胞の状態を確かめるため、顕微鏡を用いて観察した。その後、110 rpm で懸濁培養し、1週間後の細胞の状態を顕微鏡で再度観察した。

さらに、1/8 B5、1/2、1/4、1/8 MS の4試験区で、培養液を100 ml にスケールアップし、細胞増殖を確認した。その後スケールアップして培養した細胞は2週間おきに継代培養した。細胞濃度は6%に調整した。

### 5.2.2. 結果

植え付け直後の細胞を Figure 5-1 に示した。

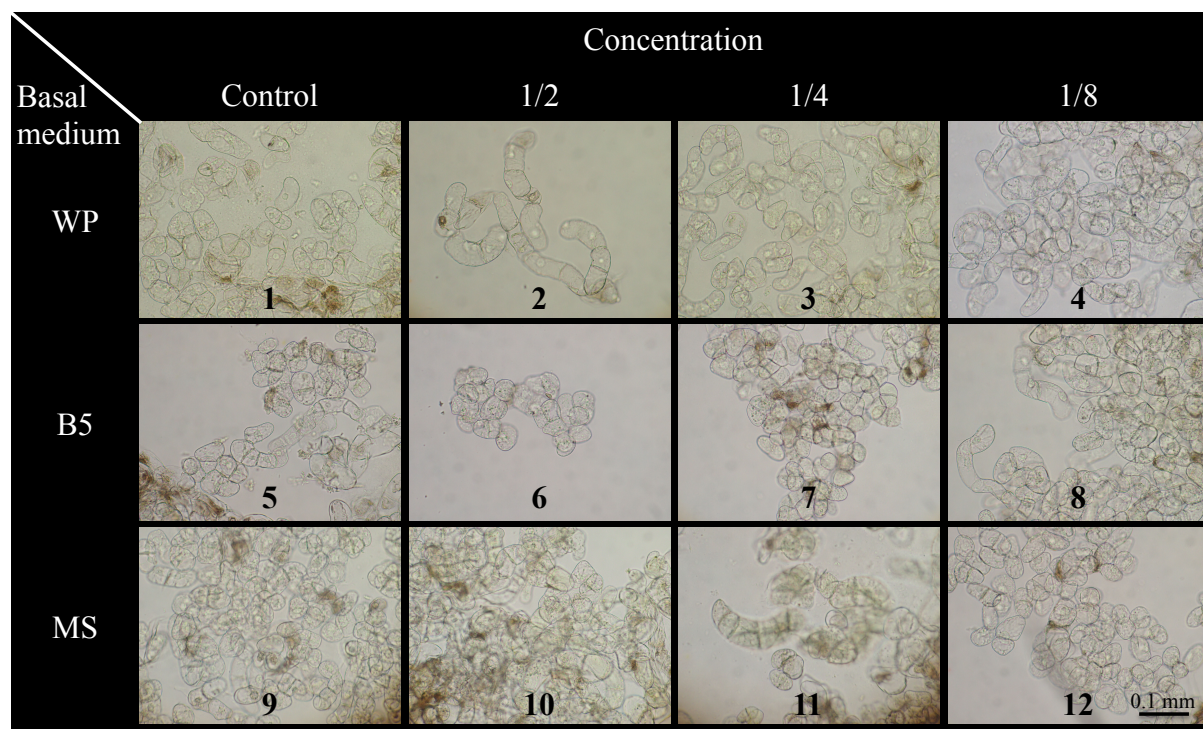


Figure 5-1 Cells of *S. japonica* callus cultured in various basal medium at 0 day. Lateral line shows the effects of concentration, beside longitudinal line shows that of basal medium.

細胞の大きさを選抜しなかったため、各試験区で細胞の大きさに差があるものの、植え付け直後に原形質分離は観察されなかった。

次に、植え付けから 1 週間後の細胞の様子を Figure 5-2 に示した。目視観察において、B5 培地の 1/8 濃度 (Figure 5-2, 8)、MS 培地の 1/2、1/4、1/8 濃度 (Figure 5-2, 10~12) において顕著に細胞の増殖が観察できた。その他の試験区 (Figure 5-2, 1~7, 9) においては細胞の原形質分離を観察し、増殖しなかった。増殖を確認した B5 培地の 1/8 濃度、MS 培地の 1/2、1/4、1/8 濃度の条件を用いて、培地量を 100 ml にスケールアップして培養した。

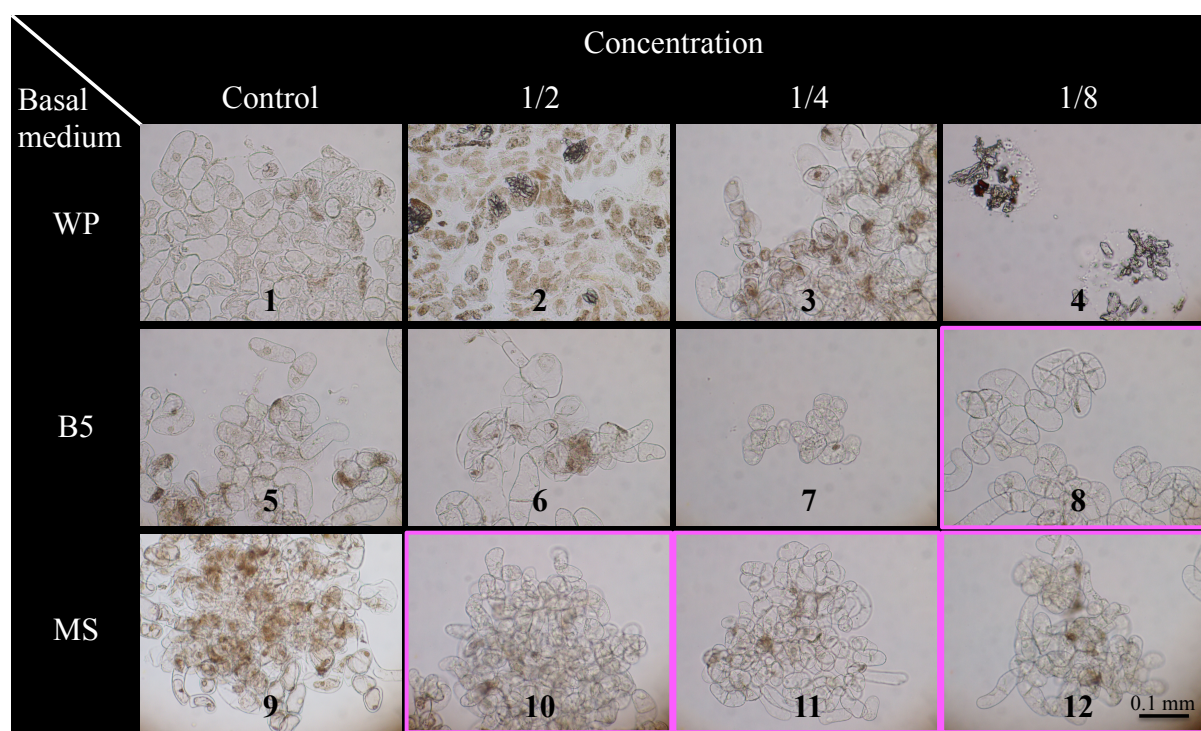


Figure 5-2 Cells of *S. japonica* callus cultured in various basal medium at 1 week. Lateral line shows the effects of concentration, beside longitudinal line shows that of basal medium. Pink color shows the conditions, which enhance the growth of cells.

その結果、基本培地について、1/8 B5、1/2、1/4、1/8 MS の4 試験区で培養し、4 週間後の細胞増殖を比較した (Figure 5-3)。1/8 B5 の条件において、4 週間で 1.5 倍に増殖したが、他の条件では細胞の増殖が認められなかった。

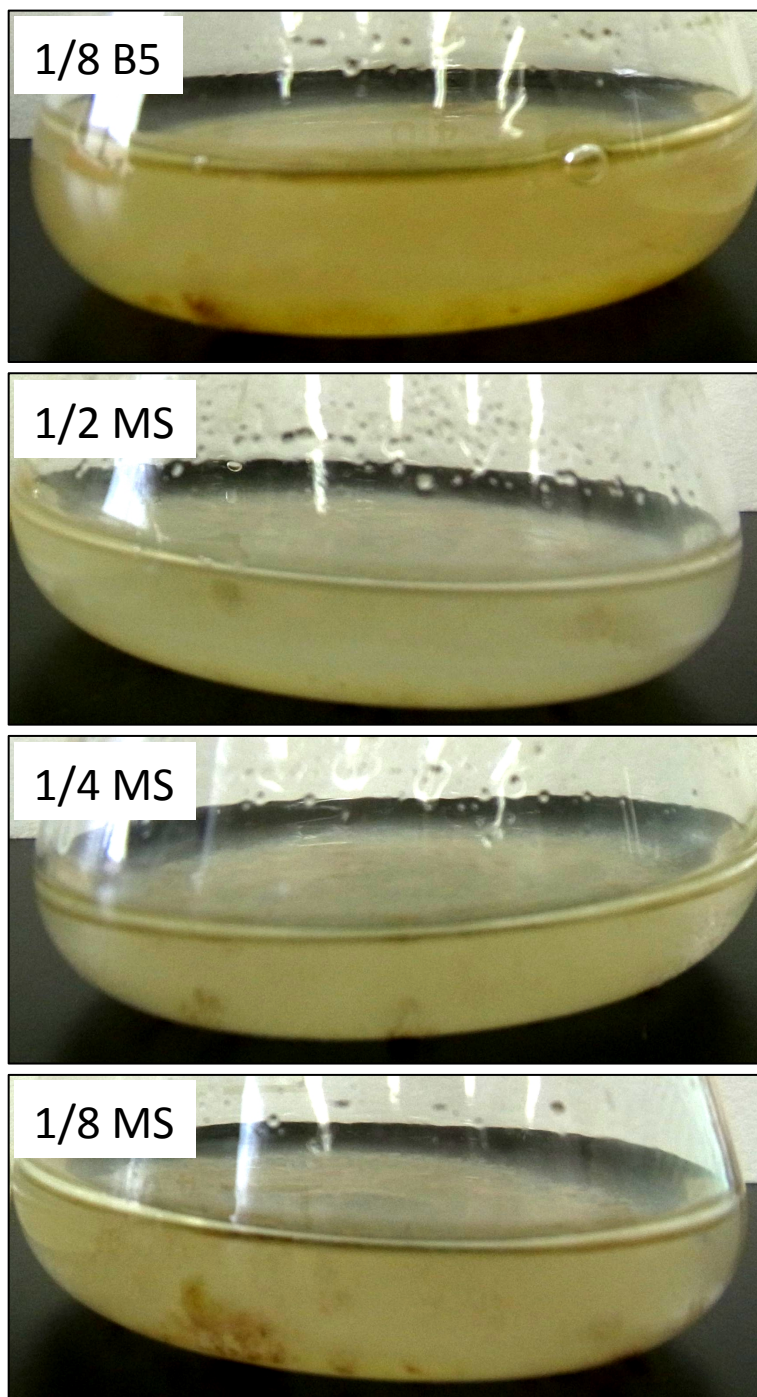


Figure 5-3 Cell suspension cultures of *S. japonica* callus cultured in various basal medium at 2 weeks.

### 5.3. 植物ホルモンの影響

#### 5.3.1. 材料と方法

植物ホルモン条件を最適化するために、2,4-D、NAA、IBA と KIN、BA、TDZ ( $10^{-5}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M) を組み合わせた 72 試験区で 3 週間培養して得られる乾燥重において、細胞増殖を比較した。基本培地は 1/8 B5 を用い、糖条件は 3 % sucrose とした。6 穴のシャーレに培地をそれぞれ 3 ml 入れ、細胞濃度が 3 % になるように  $180 \pm 10$  mg FW の細胞塊を培地に植え付け、ピンセットで細かくした。植え付け直後の細胞の状態を確かめるため、顕微鏡を用いて観察した。その後、110 rpm で懸濁培養し、1 週間後の細胞の状態を顕微鏡で再度観察した。植え付けた細胞 180 mgFW の乾燥重は 13 mg (初期値) であり、試験区間でほとんど差はないと考え、培養 3 週後の乾燥重量を初期値で割り、細胞増殖率を算出した。

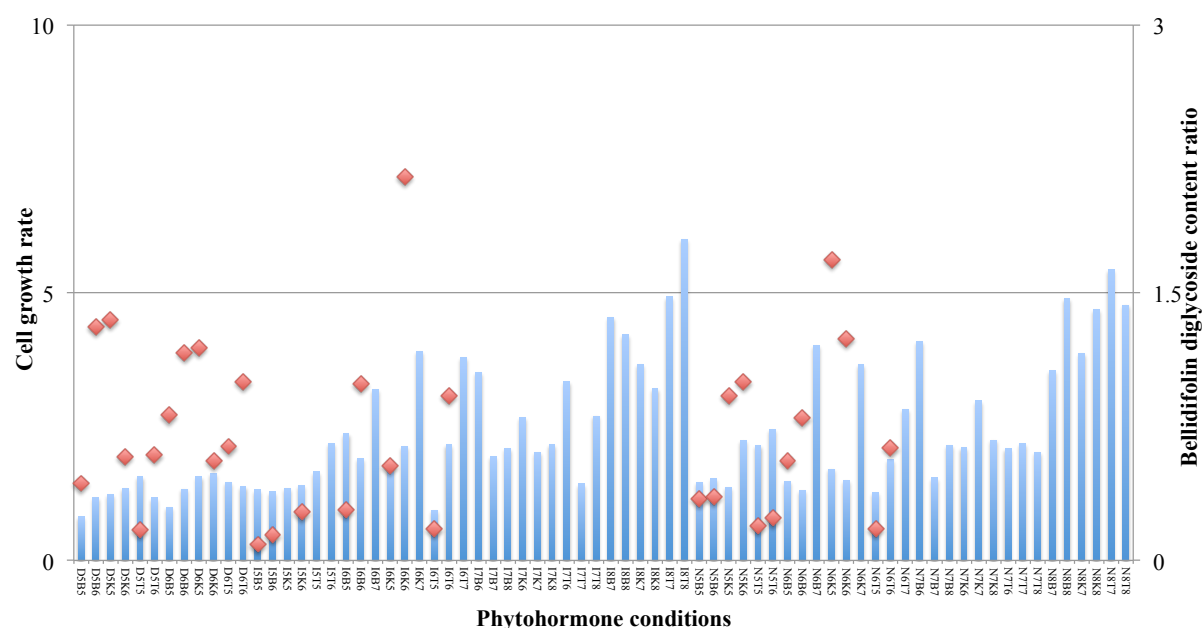
乾燥した細胞を MeOH ( $10$  mgDW/ $300$   $\mu$ l) に一晩浸漬し、メタノール抽出物を得た。セコイリドイドとキサントンの分析のため、メタノール抽出物を HPLC-PDA 分析 (SPD-M10A VP, SCL-10A VP HPLC system, 溶媒; 12%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , カラム; YMC-Pack ODS-A column ( $4.6 \times 150$  mm; YMC, Kyoto, Japan) , 分析時間; 40 min, 流量; 1 ml/min; SHIMADZU, Kyoto, Japan) に供した。

### 5.3.2. 結果

2,4-D、NAA、IBA、KIN、BA、TDZ はそれぞれ D、N、I、K、B、T と省略し、濃度に関して  $10^{-5}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M はそれぞれ 5、6、7、8 と省略して示した。I8B7、I8T7、I8T8、N8B8、N8T7、N8T8 の 6 試験区において細胞増殖が多く、全体としては植物ホルモン濃度が低くなると細胞増殖が促進する傾向が認められた。オーキシンにおいては、2,4-D は細胞増殖に適さないということがわかった。サイトカイニンについては TDZ に次いで、BA を用いた条件で細胞増殖が促進した。オーキシン、サイトカイニン両方について、 $10^{-7}$  M 以下の濃度の試験区で細胞増殖が促進される傾向があった。

さらに、それぞれの試験区で得られたカルスの MeOH 抽出物を HPLC-PDA で成分分析した。どの試験区でもセコイリドイドは産生されていなかった。

Bellidifoin diglycoside については、N5K6 試験区の bellidifoin diglycoside のピーク面積を 1 とした相対値を算出し、各試験区での bellidifoin diglycoside 産生量を比較した。bellidifoin diglycoside 産生量は I6K6 の試験区で最も多かったが、細胞増殖は少なかった。植物ホルモンの組合せや濃度との関係性については、I5K5、I5T5、I5T6 の 3 試験区と、オーキシンとサイトカイニンいずれかの植物ホルモン濃度が  $10^{-7}$  M 以下の時、bellidifoin diglycoside を産生しなかった。bellidifoin diglycoside を産生する植物ホルモン条件は、本来センブリカルスにはストレスのかかる条件であり、そのため二次代謝物を産生している可能性が考えられる。



## 5.4. 糖の影響

### 5.4.1. 材料と方法

糖条件を最適化するために、sucrose、glucose、fructose、maltose、mannitol、sorbitol、ribitol の7種類の糖について、濃度を3%から2倍希釈系列の4試験区に調整し、合計28試験区で3週間の培養後に得られる乾燥重において、細胞増殖を比較した。基本培地は1/8 B5、植物ホルモンは $10^{-5}$  M NAA と  $10^{-6}$  M KIN に調整した。6穴のシャーレに培地をそれぞれ3 ml 入れ、細胞濃度が6%になるように  $180 \pm 10$  mg FW の細胞塊を培地に植え付け、ピンセットで細かくした。植え付け直後の細胞の状態を確かめるため、顕微鏡を用いて観察した。その後、110 rpm で懸濁培養し、1週間後の細胞の状態を顕微鏡で再度観察した。植え付けた細胞 180 mgFW の乾燥重は13 mg（初期値）であり、試験区間でほとんど差はないと考え、培養3週後の乾燥重量を初期値で割り、細胞増殖率を算出した。

乾燥した細胞を MeOH（10 mgDW/300  $\mu$ l）に一晩浸漬し、メタノール抽出物を得た。セコイリドイドとキサントンの分析のため、メタノール抽出物を HPLC-PDA 分析（SPD-M10A VP, SCL-10A VP HPLC system, 溶媒; 12% CH<sub>3</sub>CN, カラム; YMC-Pack ODS-A column（4.6  $\times$  150 mm; YMC, Kyoto, Japan）, 分析時間; 40 min, 流量; 1 ml/min; SHIMADZU, Kyoto, Japan）に供した。

## 5.4.2. 結果

糖条件を最適化するために、sucrose、glucose、fructose、maltose、mannitol、sorbitol、ribitol の7種類の糖について、濃度を3%から2倍希釈系列の4試験区に調整し、合計28試験区で3週間の培養後に得られる乾燥重において、細胞増殖を比較した (Figure 5-5)。

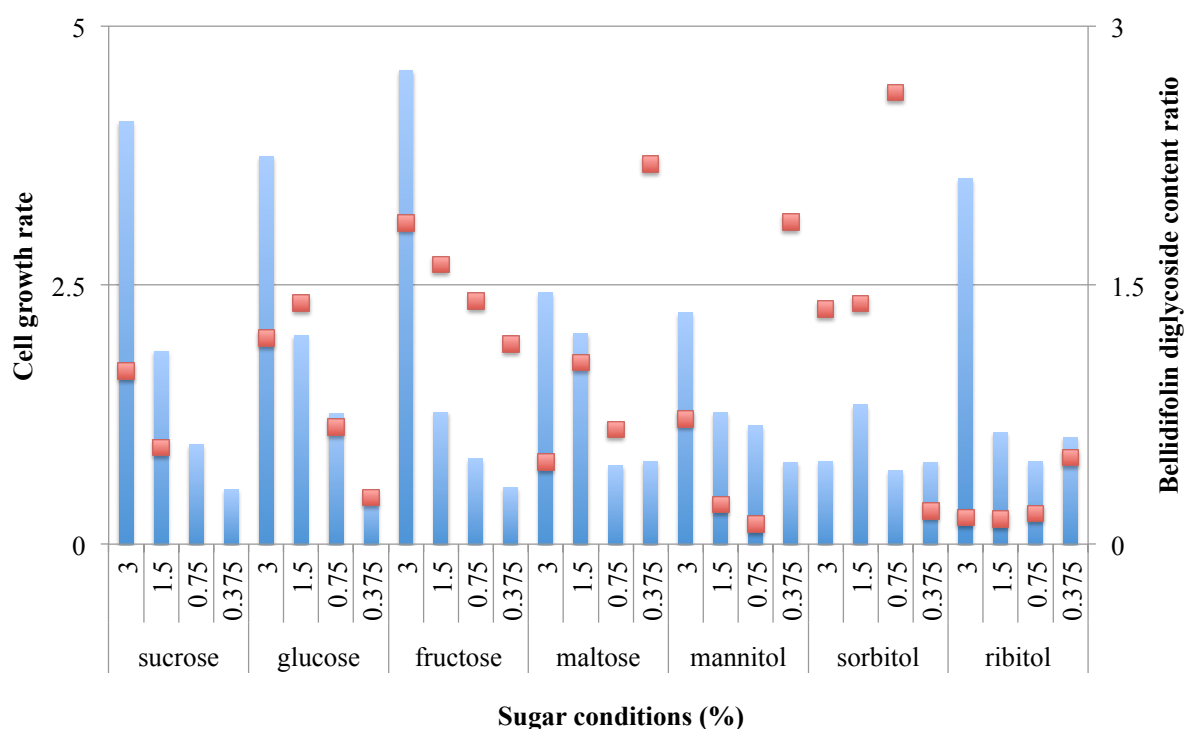


Figure 5-5 Comparison with cell growth rate and bellidifolin diglycoside content ratio of callus and relative amount of bellidifolin diglycoside on various sugar conditions. X-axis indicates phytohormone condition, and 2,4-D, NAA, IBA, KIN, BA and TDZ were showed D, N, I, K, B and T and these concentrations were showed as 5~8 ( $10^{-5}$ ~ $10^{-8}$  M). Blue bar graph shows cell growth rate, and red marker shows content ratio of bellidifolin diglycoside.

細胞増殖が多かったのは3% sucrose、glucose、fructose の条件であった。糖濃度に細胞増殖は比例する傾向があった。どの条件でもセコイリドイドは産生しなかった。Bellidifolin diglycoside 産生量も糖濃度に比例する傾向があった。

## 5.5. 継代培養回数が細胞増殖に与える影響

### 5.5.1. 材料と方法

継代培養回数が細胞増殖に与える影響を明らかにするために、これまで細胞増殖が sucrose、glucose、fructose と I6T6、I8B7、I8T7、I8T8、N6K5、N5K6、N8B8、N8T7、N8T8 を組み合わせた植物ホルモン条件に調整した 1/8B5 液体培地 20 ml に、細胞濃度が 5 % になるようにカルス塊をピンセットによりほぐし、懸濁した。

2 週間おきに 2 回継代培養し、新鮮重 (g FW) を測定した。N6K5、N5K6 の条件は Figure 5-4 に示したように、初期の培養においては増殖が少なかったものの、固体培地による継代に用いていた条件であるため、細胞にとって長期的な培養に適していると考え、条件として追加した。

### 5.5.2. 結果

継代培養回数が細胞増殖に与える影響について Figure 5-6 に示した。

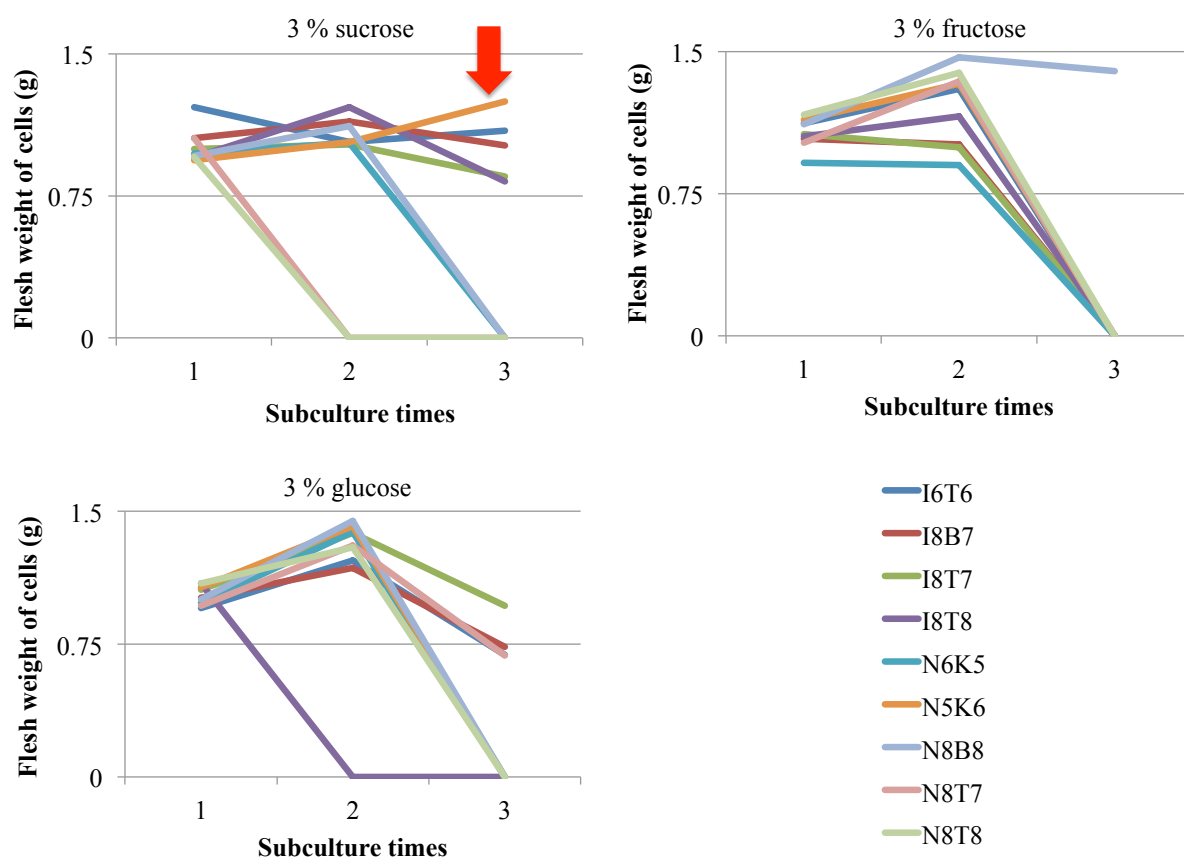


Figure 5-6 Effects of subculture times on cell growth. X-axis indicates subculture times. Red pointer shows the condition that makes cells to grow continuously.

3 % sucrose の条件において、2 回目の継代では比較的増殖は少ないものの、N5K6 の条件で培養期間が長くなった 3 回目でも増殖が確認された。3 % fructose の条件において、N8B8 の条件で最も増殖したものの、3 回目の継代の際には増殖が減少し、細胞は褐変した。3 % glucose の条件下では 3 回目の継代の際にはほとんどの条件で細胞増殖が減少した。

## 5.6. 細胞増殖と bellidifolin diglycoside 産生の経時変化

### 5.6.1. 材料と方法

懸濁培養細胞を  $10^{-5}$  M NAA、 $10^{-6}$  M KIN (N5K6)、3% sucrose を含む 1/8 B5 液体培地に 6 % の細胞濃度になるように植え付け、3 ml ずつ 6 穴シャーレに分注し、約 10 日おきに 40 日まで細胞を回収した (n=3)。回収した細胞は新鮮重を計測し、凍結乾燥後乾燥重を計測した。細胞は -20 °C で冷凍保存した。乾燥したカルス (n=3) を 12 時間 MeOH 300  $\mu$ l に浸して抽出物を作成し、LC-ESI-MS 分析 (LC-ESI-MS, InterSustain C18, 2.1  $\times$  50  $\mu$ m, 0-10 minute. 10% CH<sub>3</sub>CN, 10-25 minute 75% CH<sub>3</sub>CN, 25-30 minute. 90% CH<sub>3</sub>CN, 200  $\mu$ l/minute) に供し、単位乾物重辺りの bellidifolin diglycoside 含有量の平均値を算出した (mg/g DW)。bellidifolin diglycoside の量は検量線を用いて測定した  $Y=5.777 \times 10^{-13} X^2 + 1.536 \times 10^{-6} X - 0.0073$  (X, peak area; Y, concentration;  $R^2=0.9999$ )。

### 5.6.2. 結果

懸濁培養細胞の乾燥重と bellidifolin diglycoside 含有量の経時変化を Figure 5-7 に示した。細胞の乾燥重は約 25 日間で 2 倍に増加して最大に達し、その後減少した。Bellidifolin diglycoside は培養初期より微量に産生され、細胞の増殖が最大に達した約 25 日以降、含有量が顕著に増加した。

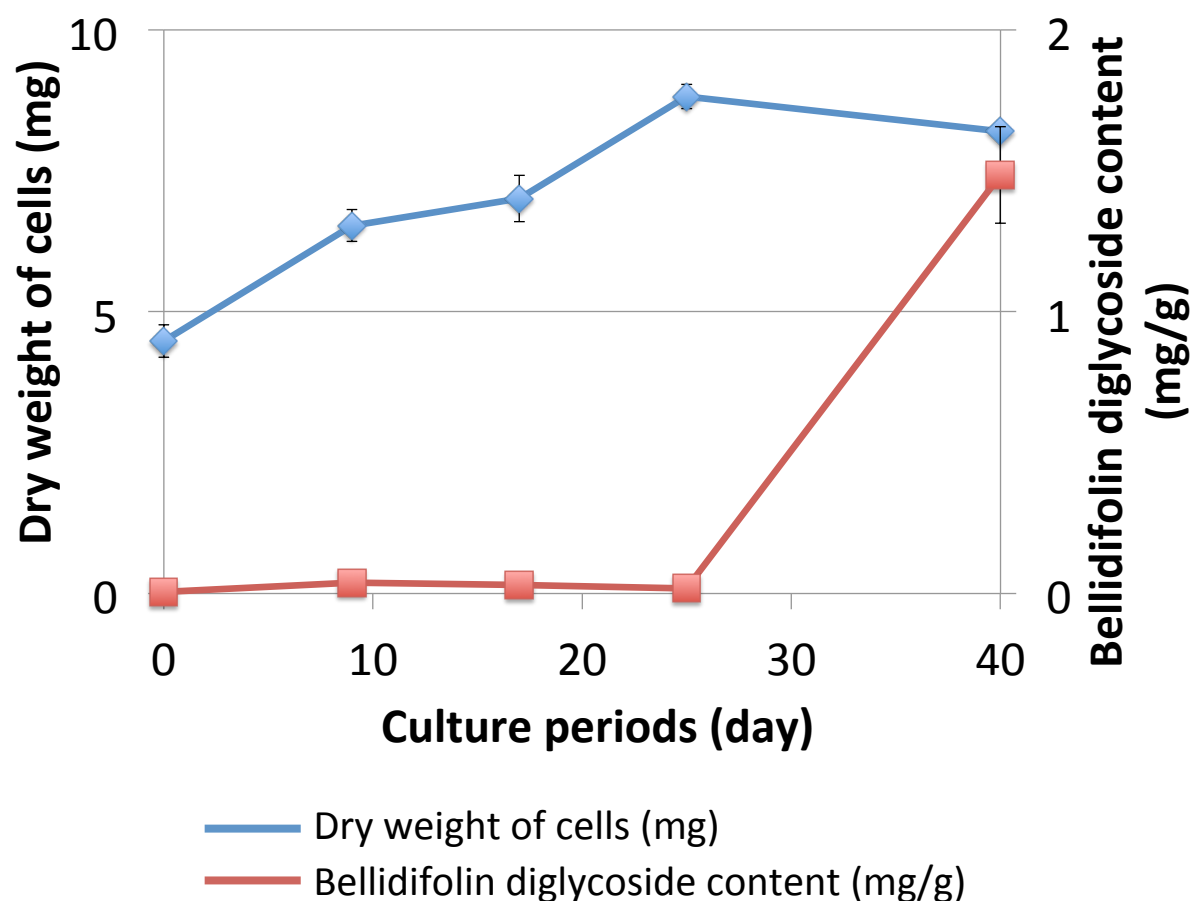


Figure 5-7 Effects of culture periods on dry weight and bellidifolin diglycoside content of cells. X-axis shows culture periods. Blue line indicates call growth and red line shows bellidifolin diglycoside content.

### 5.6.3. 考察

今回、センブリの細胞懸濁培養系を確立するために、基本培地条件、植物ホルモン条件、糖条件を最適化した。また、継代培養回数や、培養期間が細胞増殖や bellidifolin diglycoside 含有量に与える影響を明らかにした。その結果、基本培地は 1/8 に希釈した B5 培地、植物ホルモンは  $10^{-5}$  M NAA、 $10^{-6}$  M KIN、糖は 3 % sucrose を用いる条件が最も長期的に培養維持可能であることが明らかになり、センブリの細胞懸濁培養系を初めて確立した。以後この培養系は 1/8 B5 N5K6 系と記載する。

基本培地条件について、1/8 B5、1/2、1/4、1/8 MS の条件で原形質分離が起きにくく、特に 1/8 B5 の条件で顕著に細胞増殖が観察された。一方、WP を用いた場合はどの濃度においても原形質分離を起こし、増殖が阻害された。各基本培地の組成を比較すると、最も異なっているのは N 源であり、MS は  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$  として最も多くの N 源を含み、次いで B5 培地が  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KNO}_3$ 、最も少ないのは WP 培地で  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$  を含む。MS と B5 の N 源の含有量は大きな差はないため、B5 培地が特徴的に含んでいる  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  が細胞懸濁において利用しやすい N 源だったことが示唆された。

また、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_4\text{SO}_4$  は WP 培地にのみ含まれる培地成分 (Table 5-1) であり、これら無機塩類が細胞増殖を阻害している可能性も考えられる。

細胞増殖が多かったのは 3 % sucrose、glucose、fructose の条件であり、糖濃度に細胞増殖は比例する傾向があった。また、bellidifolin diglycoside 産生量も糖濃度に比例する傾向があった。また植物ホルモンの条件と糖の条件を組み合わせた場合には、3 % sucrose と N5K6、3 % fructose と N8B8 の組み合わせで細胞増殖が良い傾向があったが、継代培養することで、3 % fructose と N8B8 の組み合わせでは細胞が褐変した。初期の培養では増殖するものの、継代すると増殖しなくなる現象については、植物ホルモン条件や糖条件が初期はストレスとして働き、一時的に細胞増殖が促進されるものの、持続的にストレスを与えられると増殖しなくなることが原因と考えられる。今回は細胞懸濁培養系の確立を目的としているため、それぞれのストレスと増殖の関係性については検討しなかったが、次の 5.7 においてセコイリドイド産生、細胞増殖に対して、培地に含まれる植物ホルモンや無機塩類が与える影響について述べる。

Table 5-1 Components of MS, B5 and WP basal medium. N sources were most different among MS, B5 and WP medium, highlighted with gray color in this table.

	MS	B5	WP
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00	-	400.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134.00	-
KNO <sub>3</sub>	1900.00	2500.00	-
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	332.20	113.24	72.50
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	16.90	122.09	180.54
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	-	170.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	130.50	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	3.00	6.20
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	16.90	10.00	22.30
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8.60	2.00	8.60
KI	0.83	0.75	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.03	0.03	0.25
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.03	0.03	-
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.26	37.26	-
FeNaEDTA	-	-	36.70
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	27.80	27.80	27.85
K <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	990.00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	-	-	471.26
myo-Inositol	100.00	100.00	100.00
Nicotinic acid	0.50	1.00	0.50
Pyridoxine HCl	0.50	1.00	0.50
Thiamine HCl	0.10	10.00	0.10
Glycine	2.00	-	2.00

(mg/l)

## 5.7. セコイリドイド産生を促進する化合物と抽出物のスクリーニング

### 5.7.1. 材料と方法

5.1～6 で確立した 1/8 B5 N5K6 系を用い、セコイリドイド産生を促進する化合物と抽出物をスクリーニングするため、植え換え時にエリシター実験を行った。

エリシター添加実験に用いた化合物、抽出物のリストを Table 5-2 に示した。6 穴のシャーレに細胞濃度 6 % に調整した培地を 3 ml 分注し、それぞれエリシター溶液を添加した。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(KP)、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O (ZS)、CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O (CS)、K<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (KS)、2 種の酵母抽出物 (BD\_YE, Bectone Dickinson and Company, USA; DIFCO\_YE, Bectone Dickinson and Company, France)、麦芽抽出物 (BD\_ME, Bectone Dickinson and Company, USA)、ascorbic acid (AA, Wako Pure Chemical Industries)、thiamine HCl (TM, Wako Pure Chemical Industries)、pyridoxine HCl (PD, Wako Pure Chemical Industries)、glycine (Gly, Wako Pure Chemical Industries)、nicotinic acid (NA, Wako Pure Chemical Industries)、myo-Inositol (mI, Wako Pure Chemical Industries) は蒸留水 (Control 1) に、naphthylacetic acid(NAA)、Indole-3-butyric acid (IBA)、Indole-3-acetic acid (IAA)、dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)、kinetin (KIN)、benzyl adenine (BA)、thidiazuron (TDZ)、abscisic acid (ABA, Wako Pure Chemical Industries)、salicylic acid (SA, Wako Pure Chemical Industries)、gibberellin 3 (GA3, Wako Pure Chemical Industries) は 0.02 N KOH (Control 2)、methyl jasmonate (MJ, Wako Pure Chemical Industries) は 40 % EtOH (Control 3) にそれぞれ溶解した。試薬は全てフィルター滅菌して用いた。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(KP, Wako Pure Chemical Industries)、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O (ZS, Wako Pure Chemical Industries)、CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O (CS, Wako Pure Chemical Industries)、K<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (KS, Wako Pure Chemical Industries) は WP 培地にのみ含まれる培地成分 (Table 5-1) であり、5.2 において WP 培地が細胞増殖を阻害することからこれら無機塩類がストレスとして働く可能性があると考え、これらを用いた。また、NAA と KIN の濃度は継代培養に用いている培地に含まれている濃度とあわせて、NAA は 110 μM、KIN は 101 μM となる。添加するタイミングを検討するため、植え換え直後に添加し、培養 14 日後の細胞乾燥重量 (mgDW) を測定した。

さらに、セコイリドイドを産生するか評価するため、乾燥したカルス (n=1 もしくは 3) を 12 時間 MeOH 300 μl に浸してエキスを作成し、LC-MS 分析 (TSQ Quantum Ultra equipped with an Accela 600 HPLC system, 溶媒; 8–15% CH<sub>3</sub>CN, 0–15 min; 15–100% CH<sub>3</sub>CN, 15–20 min; 100% CH<sub>3</sub>CN, 20–30 min, カラム; Thermo Scientific Hypersil GOLD column (2.1 × 100 mm; Thermo Fisher Scientific)) により swertiamrin 含有量を求めた。swertiamrin の量は検量線 (Y=634933X + 2E+06 (X, concentration; Y, peak area; R<sup>2</sup>=0.9968)) を用いて測定した。さらに、細胞懸濁培養系とセコイリドイドの生産性を比較するために、2015 年 9 月に秋田県太平山から採取したセンブリ (n=5) の葉 (LF)、茎 (SM)、根 (RT)、花 (FL) の swertiamrin 含有量も、同様の操作で LC-MS 分析により測定した。

Table 5-2 Compounds and extracts used as elicitors

Types	Elicitors	Concentrations
Basal medium components	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (KP)	170
	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O(ZS)	6.6
	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O(CS)	0.226
	K <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> (KS)	990
Extracts		(µg/ml)
	Yeast extract (BD_YE)	10, 1
	Yeast extract (DIFCO_YE)	10, 1
	Molt extract(BD_ME)	10, 1
Phytohormone		(mg/ml)
	naphthylacetic acid(NAA)	100
	Indole-3-butyric acid(IBA)	100
	Indole-3-acetic acid(IAA)	100
	dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)	100
	kinetin(KIN)	100
	benzyl adenine(BA)	100
	thidiazuron(TDZ)	100
	methyl jasmonate(MJ)	100
	abscisic acid(ABA)	100
	salicylic acid(SA)	100
	gibberellin 3(GA3)	100
Vitamins		(µM)
	ascorbic acid(AA)	15
	thiamine HCl(TM)	15
	pyridoxine HCl(PD)	12
	glycine(Gly)	130
	nicotinic acid(NA)	20
		(µM)
	myo-Inositol(mI)	2.5
		(M)

## 5.7.2. 結果

細胞増殖率と swertiamarin の含有量に対する植物ホルモンの影響について Figure 5-8 に示した。細胞増殖率はそれぞれ試薬を溶解した溶液をコントロールとして、コントロールの乾燥重量で、各試験区の乾燥重量を割って算出したため、1 より小さい値は増殖が阻害されたことを意味する。また、今回、いずれの試験区においても gentiopicroside は検出されなかったため、swertiamarin についてのみ記載する。

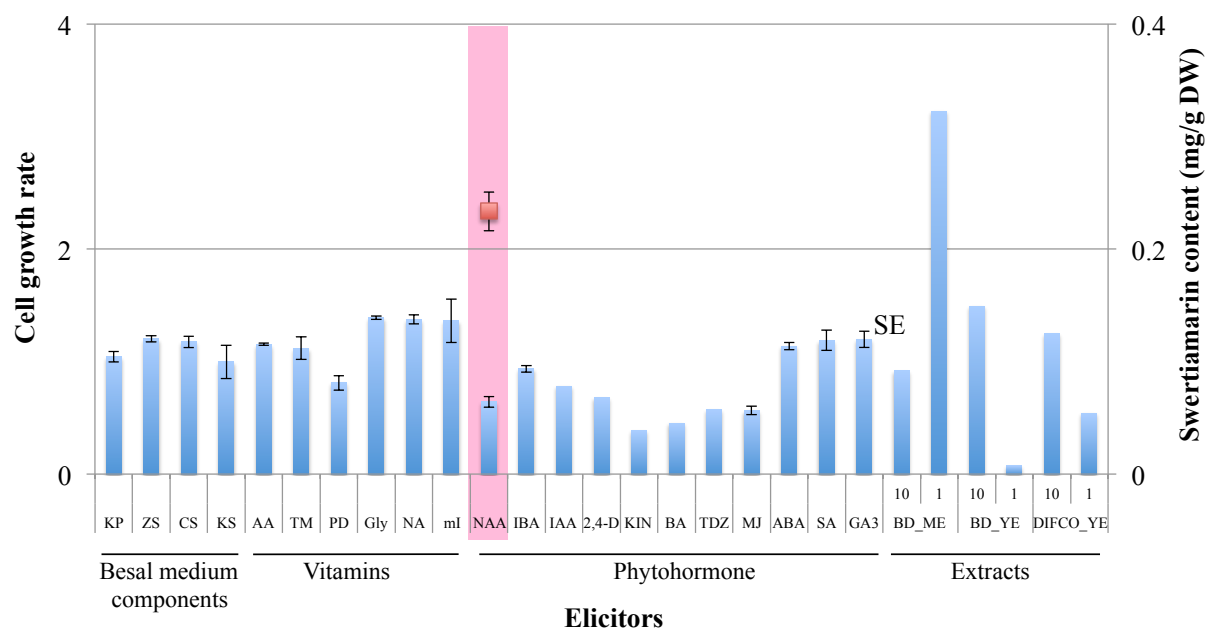


Figure 5-8 Effects of treatment of various compounds and extracts on cell growth rate and swertiamarin production. Blue bar graph shows cell growth rate, and red marker shows swertiamarin content. Error bars indicate standard error (SE).

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (KP)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (ZS)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (CS)、 $\text{K}_4\text{SO}_4$  (KS) は WP 培地にのみ含まれる培地成分 (Table 5-1) であり、前章において WP 培地が細胞増殖を阻害することからこれら無機塩類がストレスとして働く可能性があると考え、これらを用いたが、細胞増殖率にも影響はなく、swertiamarin 産生も促進しなかった。

高濃度に調整した naphthylacetic acid (NAA)、Indole-3-butyric acid (IBA)、Indole-3-acetic acid (IAA)、dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)、kinetin (KIN)、benzyl adenine (BA)、thidiazuron (TDZ)、abscisic acid (ABA)、salicylic acid (SA)、gibberellin 3 (GA3)、methyl jasmonate (MJ) の植物ホルモンにおいては、NAA、KIN、BA の試験区で細胞増殖が阻害される傾向が認められ、その中で NAA 処理試験区でのみ swertiamarin が産生し、その含有量は  $0.234 \pm 0.017 \text{ mg/g DW}$  だった。これは天然植物体の葉 (LF)、茎 (SM)、根 (RT)、花 (FL) それぞれと比較すると、3.7、6.0、9.0、4.4 %に相当する (Figure 5-9)。

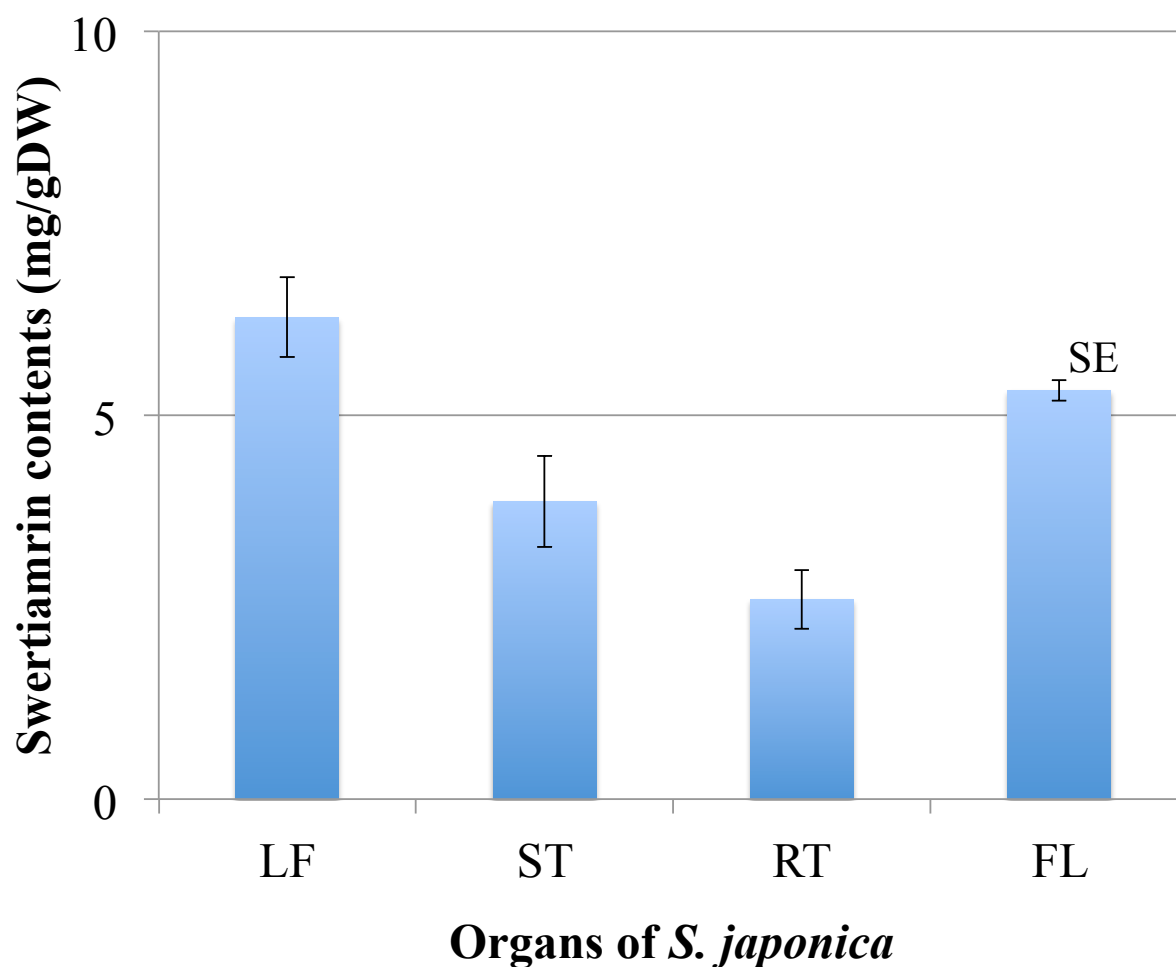


Figure 5-9 Comparison of swertiamarin contents among the organs of *S. japonica*. Error bars indicate standard error (SE).

ascorbic acid (AA) や培地中に含まれるビタミン類の thiamine HCl (TM)、pyridoxine HCl (PD)、glycine (Gly)、nicotinic acid (NA)、myo-Inositol (mI) の細胞増殖に対する影響は認められず、swertiamarin 産生も促進しなかった。

一般に広く用いられるエリシターである、酵母抽出物 (BD\_YE、DIFCO\_YE) や麦芽抽出物 (BD\_ME) においては、1 mg/ml の酵母抽出物 (BD\_YE) 試験区で顕著に細胞増殖が阻害されたが、swertiamarin は産生されなかった。

### 5.7.3. 考察

セコイリドイドを産生する培養系の確立を目的に、1/8 B5 N5K6 系の細胞懸濁培養系を用いて、24 種類の化合物や抽出物のエリシター効果についてスクリーニングしたところ、今回、高濃度の NAA が swertiamarin 産生を促した (Figure 5-8)。その含有量は天然植物体の葉 (LF)、茎 (SM)、根 (RT)、花 (FL) それぞれと比較すると、3.7、6.0、9.0、4.4 % に相当した (Figure 5-9)。これまで、NAA などのオーキシシン類はセコイリドイドの産生を阻害することが知られており (Hedhili *et al.* 2007)、さらに、今回、NAA は細胞増殖を阻害していたことから、生合成経路を直接的に促進したのではなく、高濃度の NAA がストレスとなって細胞の状態が悪化したため、細胞が自身を防御するために swertiamarin を産生したと示唆された。

また、5.5.3 で述べたように、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_4\text{SO}_4$  は WP 培地にのみ含まれる培地成分 (Table 5-1) であり、これら無機塩類が細胞増殖を阻害している可能性も考えられたが、今回、これら 4 つの無機塩類を高濃度で加えた場合には細胞増殖に影響がなかったため、これら単独では増殖を阻害する効果はないと考えられる。

さらに、一般に広く用いられるエリシターである、酵母抽出物 (BD\_YE、DIFCO\_YE) においては、1 mg/ml の酵母抽出物 (BD\_YE) 試験区において、顕著に細胞増殖が阻害されたが、swertiamarin は産生されなかった。このことから、センブリの天然植物体において、swertiamarin が病害に対して産生するような二次代謝物ではないことが示唆された。今後、センブリで最も被害が知られるさび病菌を細胞懸濁培養系に与えた際の反応に興味がもたれる。

## 5.8. まとめ

今回、センブリの細胞懸濁培養系を確立するために、基本培地条件、植物ホルモン条件、糖条件を最適化した。また、継代培養回数や、培養期間が細胞増殖や bellidifolin diglycoside 含有量に与える影響を明らかにした。その結果、基本培地は 1/8 に希釈した B5 培地、植物ホルモンは  $10^{-5}$  M NAA、 $10^{-6}$  M KIN、糖は 3 % sucrose を用いる条件が最も長期的に培養維持可能であることが明らかになり、センブリの細胞懸濁培養系を初めて確立した。さらに、セコイリドイドを産生する培養系の確立を目的に、1/8 B5 N5K6 系の細胞懸濁培養系を用いて、24 種の化合物や抽出物のエリシター効果についてスクリーニングしたところ、今回、高濃度の NAA が swertiamarin 産生を促した (Figure 5-8)。細胞懸濁培養系の確立はセンブリ属において初めてであるほか、swertiamarin を産生する培養系を明らかにしたのも初めての報告である。

## 6. 次世代シーケンサーによるセコイリドイド生合成経路の解明

### 6.1. RNA-seq

#### 6.1.1. 目的

近年、機能遺伝子を探索し、生合成経路に関与する遺伝子を明らかにする手法として威力を発揮する次世代シーケンサーを用いた解析がある。今回、カルスと不定根では不定根にのみセコイリドイドが産生することから、この両者間で遺伝子発現を比較することで、セコイリドイド生合成に関与する遺伝子が明らかになると考え、*de novo* RNA-seq を行った。

#### 6.1.2. 材料と方法

##### 6.1.2.1. RNA 抽出

凍結乾燥したカルスと不定根 (n=2) を約 70 mg 測りとり、QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA はそれぞれ Nanodrop と Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Assay, Agilent Technology, Inc.) で RNA 濃度と純度を確認した。

##### 6.1.2.2. 次世代シーケンサー用のライブラリーの作製

カルス・不定根の各サンプルそれぞれ、1.2 µg の全 RNA より、TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) を用いて、異なるアダプター配列を付加して、ペアエンド (PE) のライブラリーを作製した。核酸の精製には AMPure XP (A63880, ベックマン) を、逆転写反応には PrimeScript Reverse Transcriptase (2680A, TaKaRa) を、反応容器として 96 ウェルプレートとシール (HSS9641 と MSB-1001、バイオラッド) をそれぞれ用いた。作製したライブラリーは、Nanodrop、Bioanalyzer (DNA-1000)、定量 PCR (KAPA Library Quantification Kits for Illumina sequencing platform, 日本ジェネティクス株式会社) を用いて定量し、最終濃度が 10 nM になるようにそれぞれ 10 mM Tris-HCl (pH8.5) と 0.1% Tween 20 の混合溶液で希釈し、10 µl ずつ混合して解析用ライブラリーとした。

##### 6.1.2.3. 次世代シーケンシング

本学バイオテクノロジーセンターの HiSeq 1000 (illumina 社) で片側 100 bp のペアエンドの塩基配列を読み取った。

#### 6.1.2.4. *de novo* アセンブル、Differential expression (DE) analysis とアノテーション

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の実験フローを Figure 6-1 に示す。

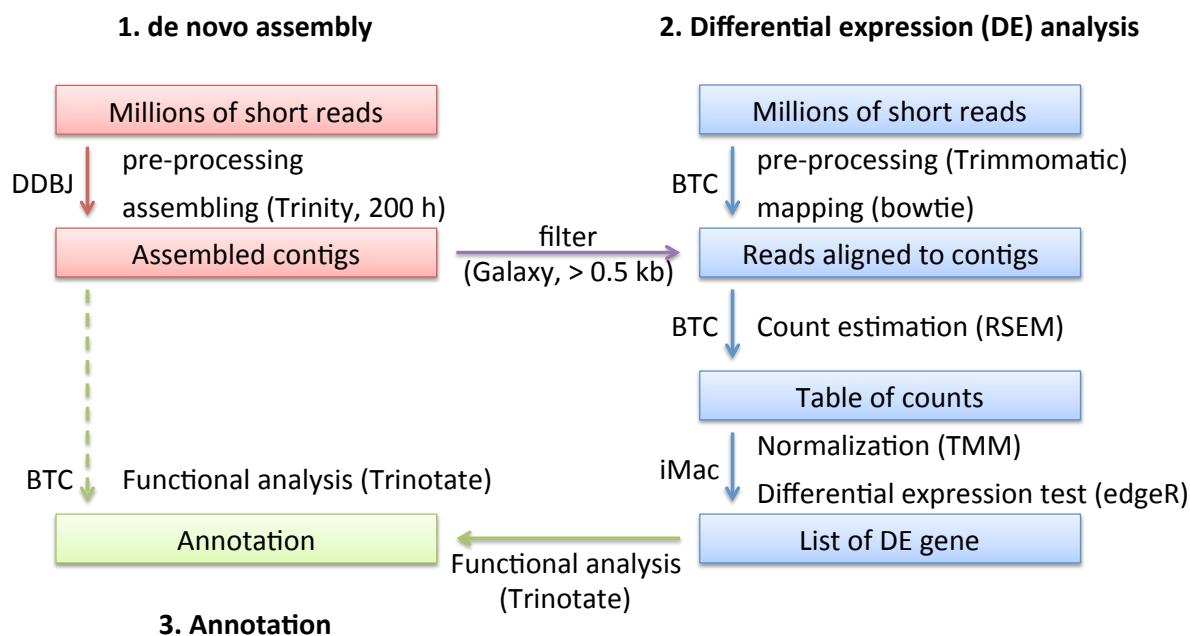


Figure 6-1 Experimental flow of NGS

次世代シーケンサーで読み取った塩基配列は、まず日本 DNA データバンク (DDBJ) の解析パイプライン (DDBJ Read Annotation Pipeline) 上で低品質リードの除去、および Trinity プログラム (Ver. R20130225) による *de novo* アセンブルを行った。得られたコンティグのうち、500 bp 以上のコンティグを発現変動遺伝子 (DEGs) の探索のために用いた。DE 解析には、各サンプル由来のリードごとに、Trimmomatic プログラム (Ver. 0.30) で低品質リードおよびアダプター配列を除去し、bowtie プログラムで配置し (mapping)、カルスおよび不定根それぞれで発現した遺伝子の数をカウントし (RSEM)、発現量の差を検定した。正規化には TMM アルゴリズムを、検定には edgeR プログラムをそれぞれ用いた。その後、Trinotate (Ver. R20131110) を利用して得られた全コンティグのアノテーションを行った。DE 解析およびアノテーションには、本学バイオテクノロジーセンター (BTC) 所有の Linux マシン (DELL T7500, Cent OS 5.9, Xeon 2.13GHz 4 core, 128G memory) および所属研究室所有の iMac (Apple, Mid 2011) をそれぞれ用いた。

#### 6.1.2.5. Blast2GO によるアノテーション

Trinity によって *de novo* アセンブルしたコンティグから不定根とカルスそれぞれで高い発現量を示した遺伝子を用い、その塩基配列をアミノ酸配列に変換し、Blast2GO (Ver. 0.3) を用いて解析した。Blast2GO において、Blastp のシロイヌナズナ (12.01.2015) のデータベースを元にアミノ酸配列をアノテーションし、遺伝子オントロジー (Gene Ontology, GO) の概念に基づいて分類された遺伝子についてまとめた。

#### 6.1.2.6. Mapman と KEGG による代謝マップの作成

Mapman (Ver. 3.5.1R2) と KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) のソフトウェアによって得られた塩基配列をアノテートし、代謝マップを作成した。

### 6.1.3. 結果

#### 6.1.3.1. 次世代シーケンシング

次世代シーケンサーで呼んだ塩基配列をアセンブルした結果を以下の Table 6-1 に示した。

Table 6-1 Summary of assembly

Read #	227,196,729
Read (processed) #	225,876,908 (99.42%)
Contig (genes) #	118,027
Contig (transcripts) #	247,042
Total contig size (bp)	313,232,812
Maximum contig size (bp)	16,075
N50 contig size (bp)	2,247
GC content (%)	39.22
Elapsed time	199:58:45
Contig (genes, > 500 bp) #	46,028 (39.0%)
Contig (transcripts, > 500 bp) #	151,667 (61.4%)

*de novo* アセンブル用プログラムの Trinity は、遺伝子 (gene) とそこから転写される複数の転写産物 (アイソフォームなど、transcript) の 2 つの概念に基づいてコンティグが生成され、それぞれについてまとめた。遺伝子レベルの場合、500 bp 以上の長さのコンティグは 46,028 個、アイソフォームにおいては、151,667 個あった。

### 6.1.3.2. 発現変動 (DE) 解析と Trinotate によるアノテーション

次に、マッピング後、遺伝子発現量を統計的に処理して、発現比 (FC: Fold Change) を算出し、有意な差があるかどうか検定した。Figure 6-2 はアイソフォームのデータを edgeR で発現変動 (DE) 解析した結果を示す。

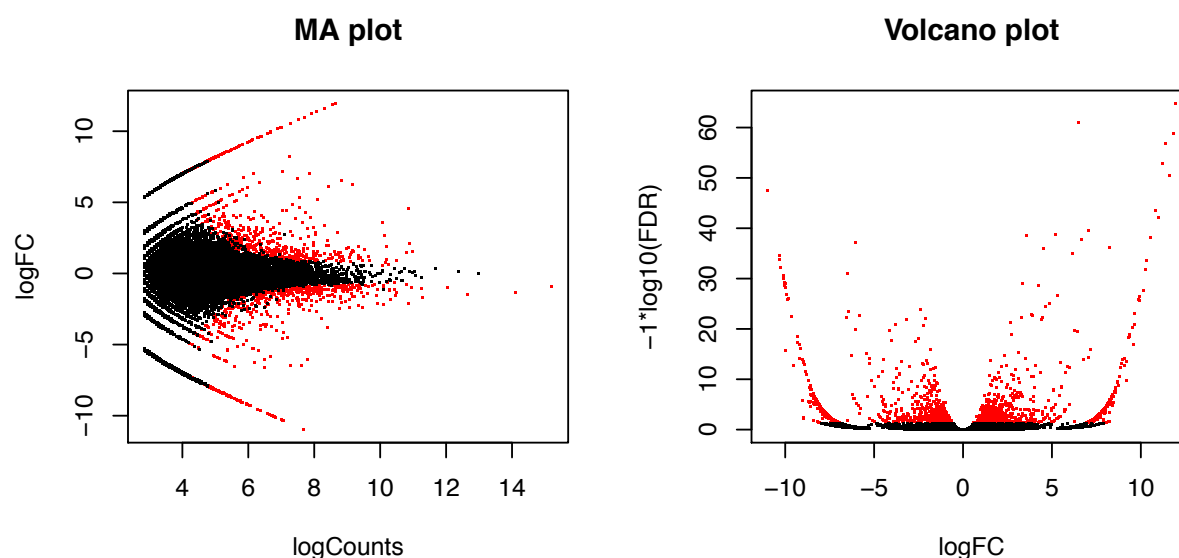


Figure 6-2 MA plot (left) and Volcano plot (right) indicated by differential expression (DE) analysis. In MA plot (left), X-axis shows expression level (logCounts) and Y-axis shows ratio of expression level (logFC). In Volcano plot (right), X-axis shows ratio of expression level (logFC), and Y-axis shows negative value of false discovery rate ( $-1 \cdot \log_{10}(\text{FDR})$ ).

MA plot は X 軸に発現量 (logCounts)、Y 軸に発現比 (logFC) をとり、全転写産物の発現量と発現比の分布を見ることができる。カルスと不定根で発現している遺伝子において、最も発現に差がある遺伝子は logFC 10.5 (約 1500 倍) の発現比で、発現量は logCounts 9 (約 500 Counts) であり、発現量が logCounts 6~9 (60~500 Counts) である遺伝子において高い発現比を示す傾向があった。

Volcano plot は X 軸に発現比 (logFC)、Y 軸に統計的な確からしさを示す偽発見率の負 ( $-1 \cdot \log_{10}(\text{FDR})$ ) をとった値をとり、発現比が統計的に有意な差であるかを示している。低い発現比を示す遺伝子ほど、有意な差はないが、高い発現比を示す遺伝子に関して有意な差が多く認められた。

次に、カルスと不定根それぞれ特異的に発現した遺伝子において、発現量・発現パターンを元に階層的クラスターに分類した。Figure 6-3 にはアイソフォームのクラスター分析結果を示した。さらに、20%の高さで 11 のサブクラスターに分類した。

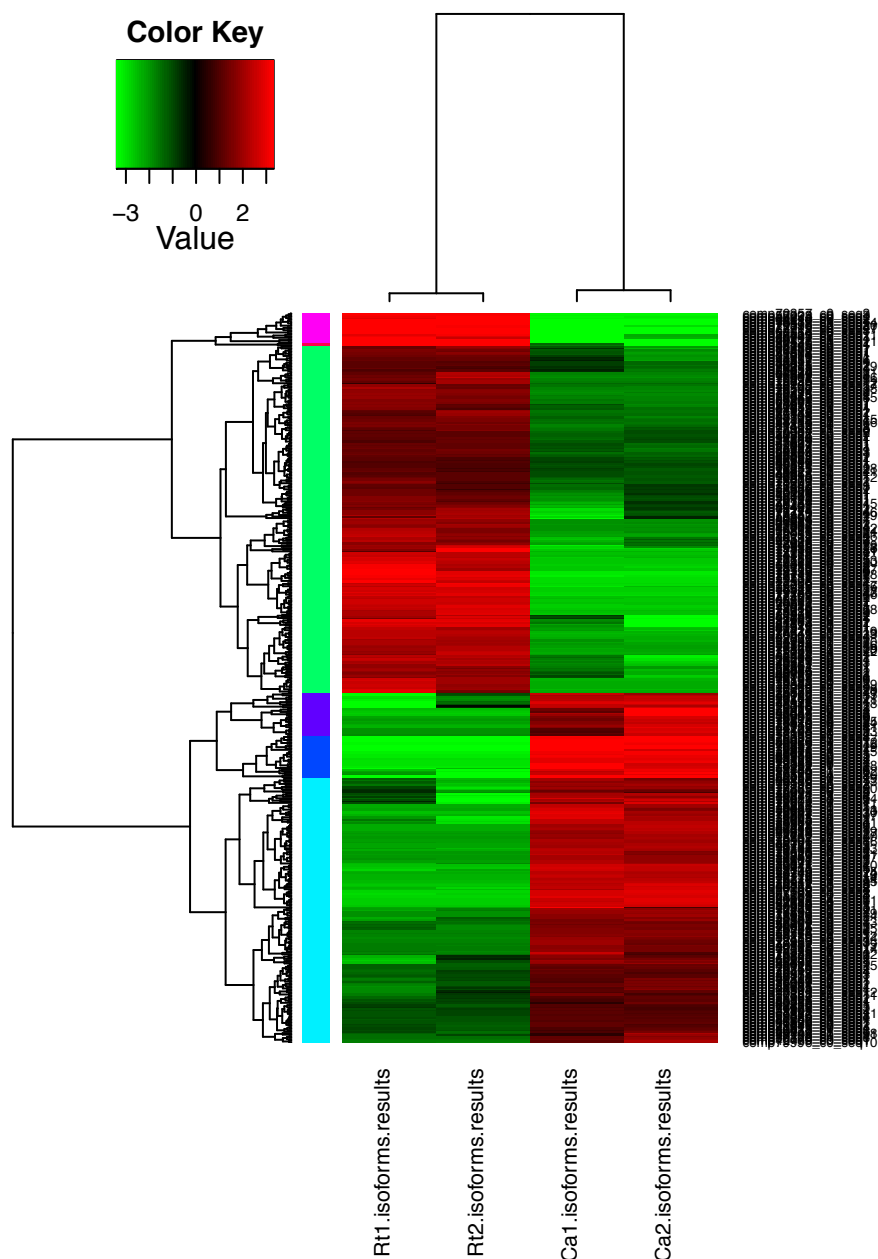


Figure 6-3 Relationships between hierarchical clustering and the value of gene expression indicated by Trinotate. Red zone indicates that difference level of expression is higher, beside green zone shows that it is lower.

Trinotate で遺伝子の機能をアノテートし、不定根で高い発現量を示した遺伝子、カルスで高い発現量を示した遺伝子 (Figure 6-4) およびアイソフォーム (Figure 6-5) をまとめた。得られたコンティグを遺伝子レベルで比較した場合、500 bp 以上の長さのコンティグは 46,028 個あり、そのうちの 791 個の遺伝子に 4 倍以上の発現量の差があった。そのうち、416 個は不定根で高い発現量を示し、残り 375 個の遺伝子はカルスで高い発現量を示した。それぞれ、不定根では 295 個、カルスでは 193 個の遺伝子の機能がアノテートされた。

一方、アイソフォーム (Figure 6-5) においては、500 bp 以上の長さのコンティグは 151,667

個あり、そのうちの 482 個の遺伝子に 4 倍以上の発現量の差があった。そのうち、251 個は不定根で高い発現量を示し、残り 231 個の遺伝子はカルスで高い発現量を示した。それぞれ、不定根では 169 個、カルスでは 151 個の遺伝子の機能がアノテートされた。

### DE analysis; gene

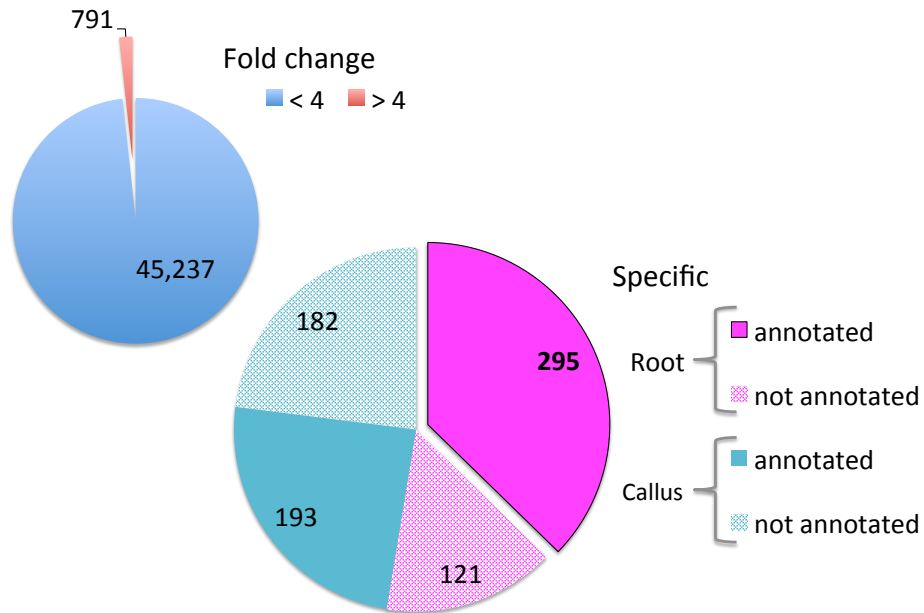


Figure 6-4 Proportion of tissue-specific expressed genes and annotation among the genes

## DE analysis; isoform

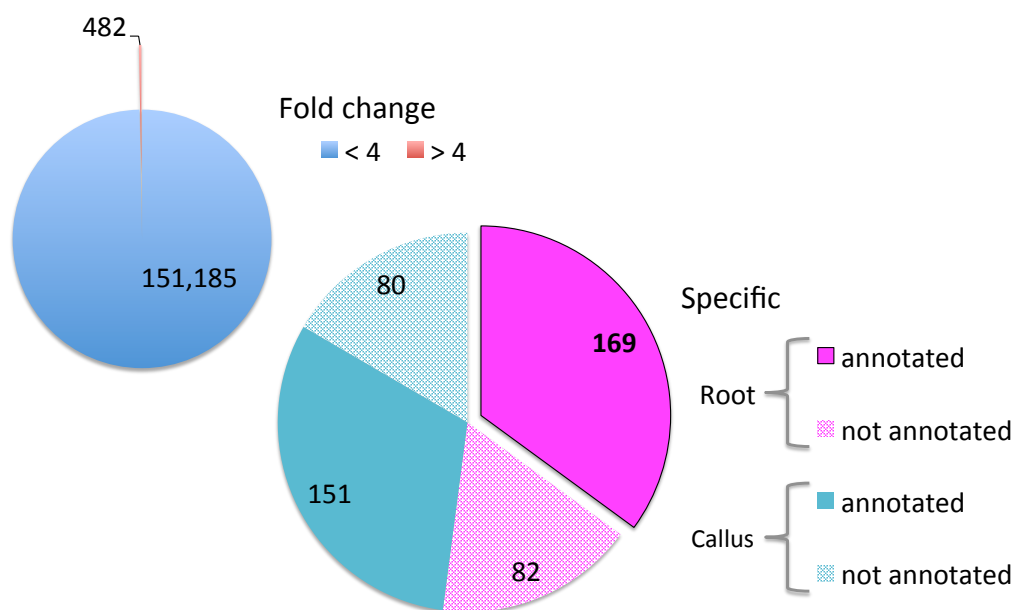


Figure 6-5 Proportion of tissue-specific expressed isoforms and annotation among the isoforms

クラスターはカルスと不定根における発現のパターンが類似している遺伝子で分けられており、特に発現比が高いクラスターについてまとめた。Figure 6-6 は遺伝子レベルにおいて発現比が不定根において 500~900 倍高いクラスターを示し、Table 6-2 にそのクラスターに属する遺伝子のアノテーション結果をまとめた。

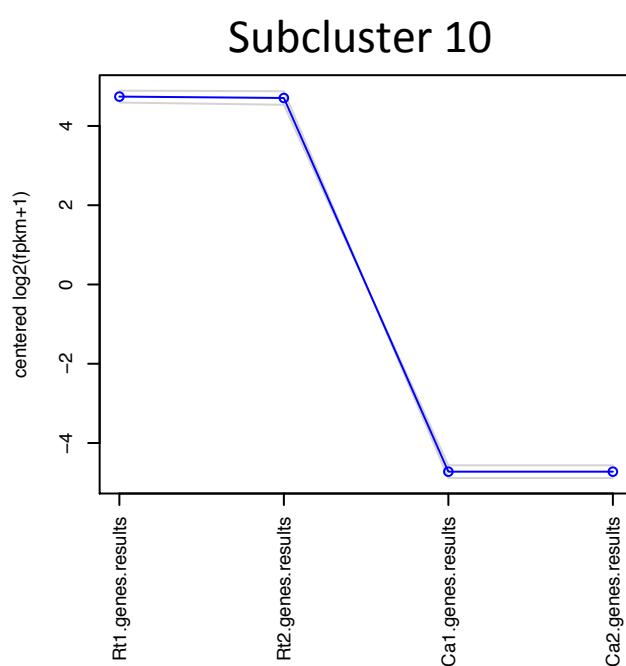


Figure 6-6 Gene expression pattern in Subcluster 10

Table 6-2 Genes functionally annotated by Blastx and value of fold change (Root/Callus) in Subcluster 10

Subcluster	Gene number	Fold change (Root/Callus)	BLASTX
10	comp80530_c0	871.3	No hit
10	comp80911_c0	558.6	Proline-rich protein 4

comp80530\_c0、comp80911\_c0 の 2 種が最も発現比が高く、不定根特有の遺伝子として subcluster 10 に属したが、comp80530\_c0 の機能は未知だった。

Figure 6-7 はアイソフォームにおいて発現比が不定根において約 140~900 倍高いクラスターを示し、Table 6-3 にそのクラスターに属する遺伝子のアノテーション結果をまとめた。

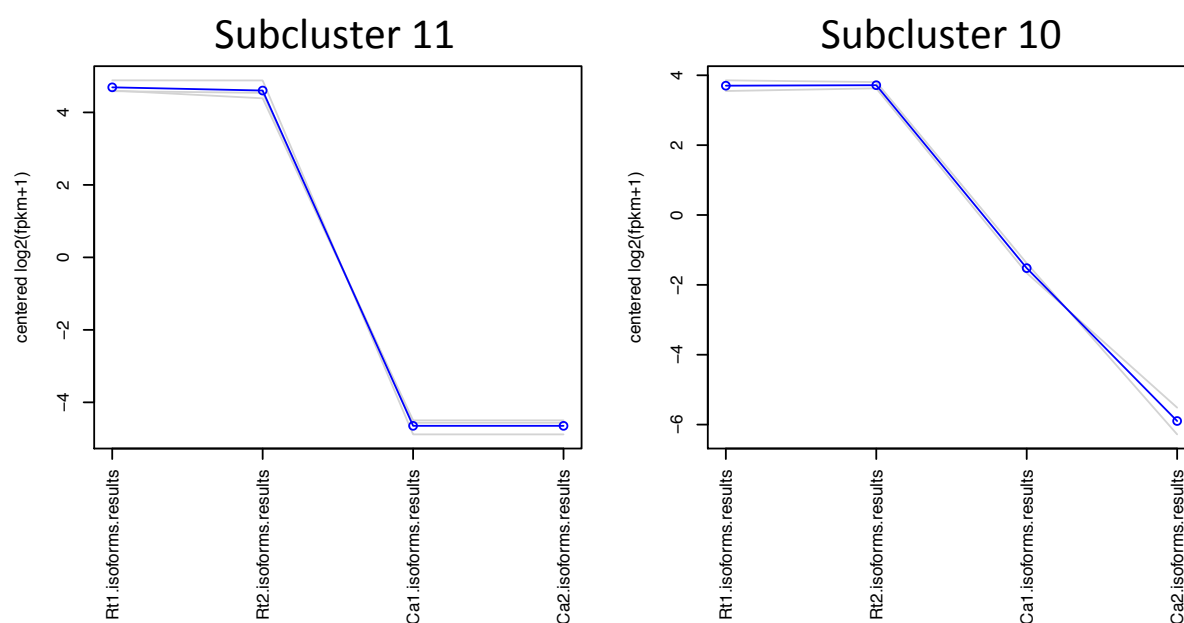


Figure 6-7 Isoform expression pattern in Subcluster 10 and 11

Table 6-3 Isoforms functionally annotated by Blastx and value of fold change (Root/Callus) in subcluster 10 and 11

Subcluster	Isoform number	Fold change (Root/Callus)	BLASTX
10	comp80530_c0_seq1	871.2	No hit
10	comp80911_c0_seq1	558.6	Proline-rich protein 4
10	comp78137_c1_seq21	509.7	No hit
11	comp37449_c0_seq1	202.4	Probable non-specific lipid-transfer protein AKCS9
11	comp76345_c0_seq1	144.5	Secologanin synthase

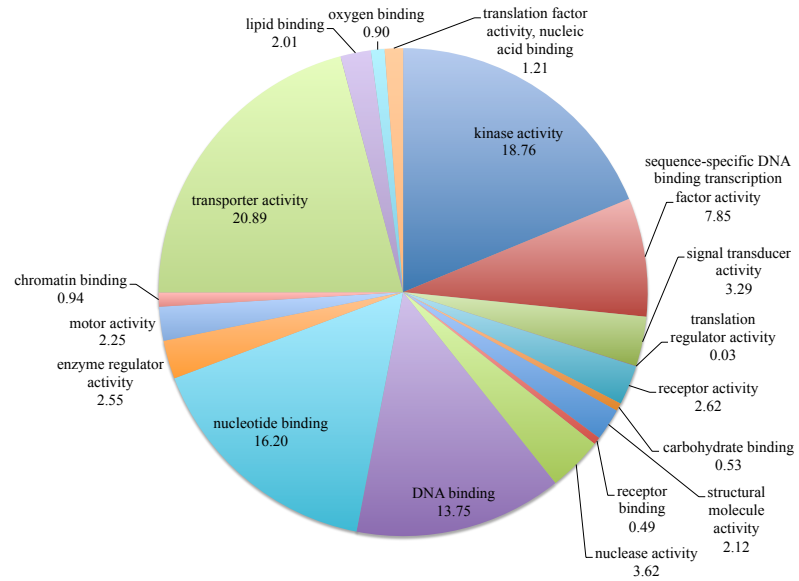
comp80530\_c0\_seq1、comp80911\_c0\_seq1、comp78137\_c1\_seq21、comp37449\_c0\_seq1、comp76345\_c1\_seq1 の 5 種が最も高い発現比を示し、不定根特有の遺伝子として subcluster 10 と 11 に属したが、comp80530\_c0\_seq1 と comp78137\_c1\_seq21 の機能は未知だった。comp76345\_c1\_seq1 はロガニンの開裂反応に関与する Secologanin synthase (SLS) とアノテートされ、その後の発現量解析の候補遺伝子の一つとした。

### 6.1.3.3. Blast2GO による遺伝子オントロジー (GO) 分類

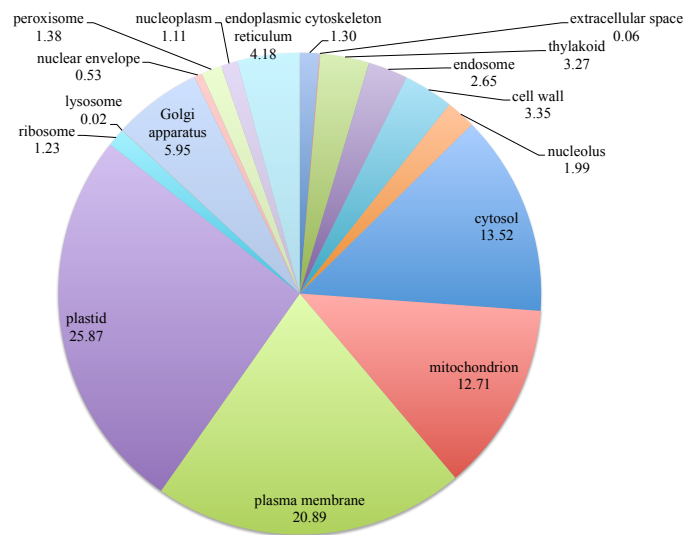
不定根とカルスで高い発現を示した遺伝子をアミノ酸配列に変換し、シロイヌナズナが持つ遺伝子配列に基づいてアノテーションした結果、用いた 320 個のうち 73.6 % が GO によって機能付けされた。それぞれ分子機能 (Figure 6-8A)、細胞組成 (Figure 6-8B)、生物学的プロセス (Figure 6-8C) に分類し、その割合を比較した。

分子機能においては輸送 (20.89 %)、キナーゼ活性 (18.76 %)、ヌクレオチド結合 (16.20 %)、細胞組成においては、プラスチド (25.87 %)、プラズマ膜 (20.89 %)、サイトゾール (13.52 %) に関する遺伝子と相同性を示すアミノ酸配列が多く見られた。また、生物学的プロセスにおいては、細胞組成構成物 (10.62 %)、ストレス応答 (9.68 %)、非生物的刺激に対する応答 (7.34 %) に関する遺伝子と相同性を示した他、細胞分化に関与する遺伝子として 2.90 % が分類された。二次代謝に関与する遺伝子は少なく、1.64 % が分類された。

### A, Molecular function



### B, Cellular component



### C, Biological process

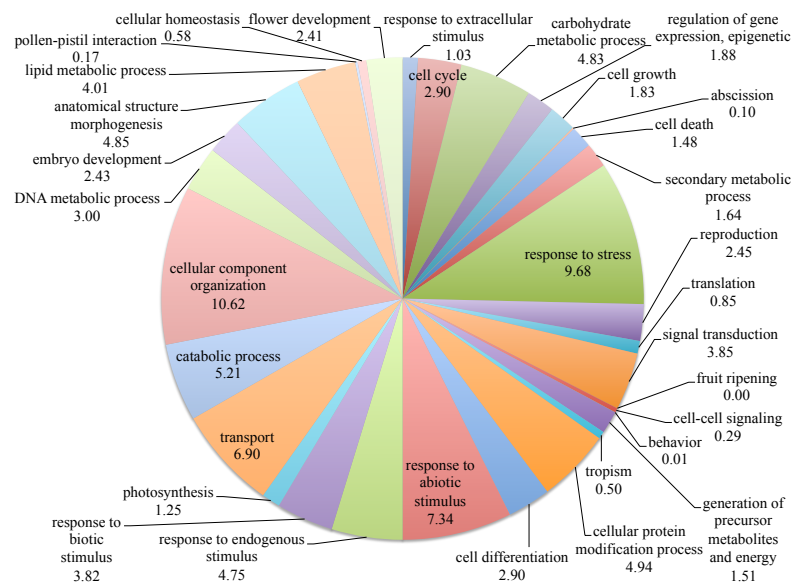


Figure 6-8 Gene Ontology classification of genes specifically in adventitious root and callus. Categories for molecular function (A), cellular component (B) and biological process (C).

#### 6.1.3.4. Mapman と KEGG による代謝マップの作成

アノテートされた遺伝子について効率よく解析するために、Mapman や KEGG 等の機能を利用して、代謝マップと遺伝子の機能について図を作成した。Mapman はセンプリ培養物の配列をシロイヌナズナと照らし合わせて、アノテーションし、図に起こすソフトウェアである。

Figure 6-9 には全体図を示した。シロイヌナズナと相同性のある遺伝子は二次代謝に関与する遺伝子で最も多くアノテートされた。

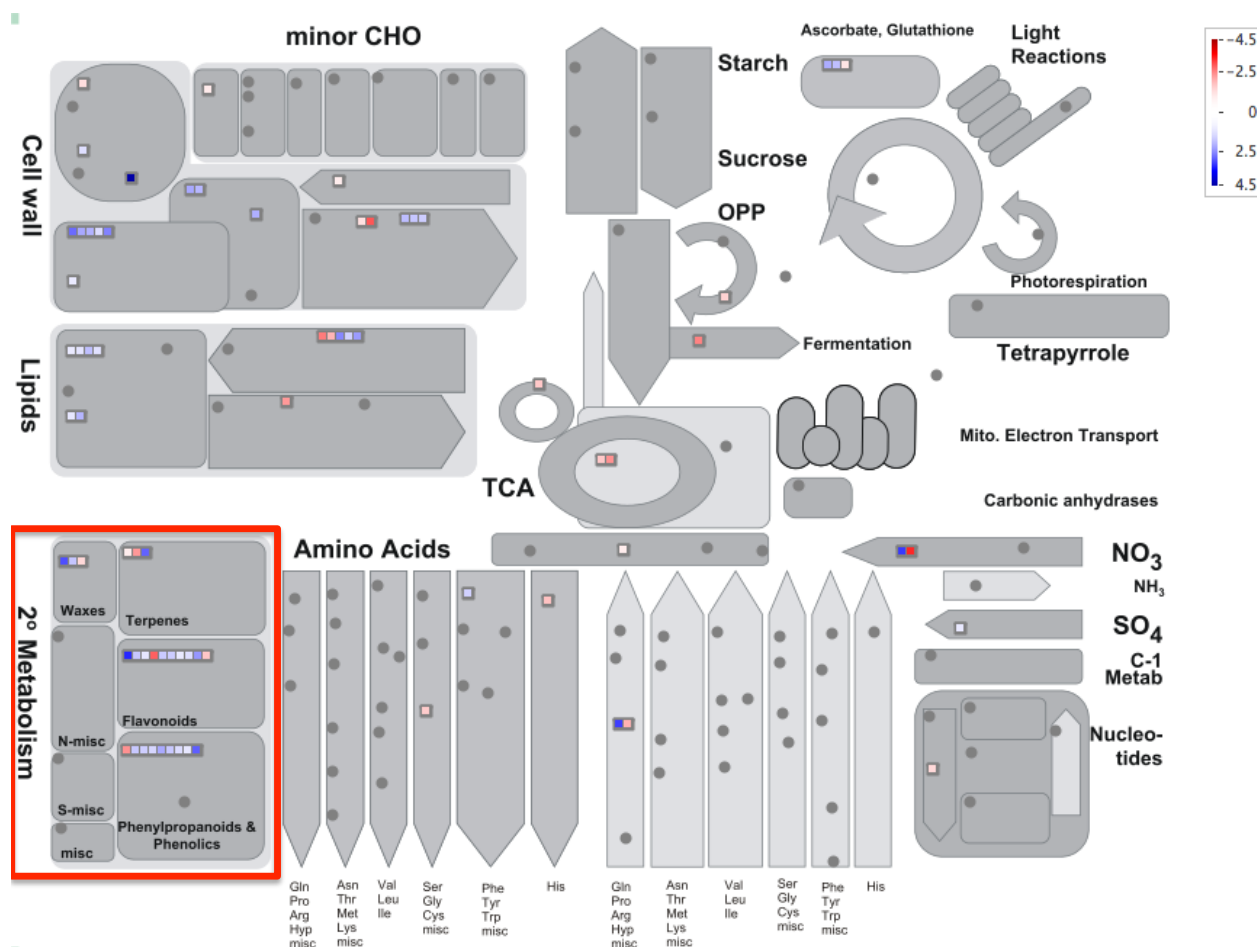


Figure 6-9 Overview of metabolism made by Mapman. Blue zone indicates that difference level of expression is higher, beside red zone shows that it is lower. Red square highlights secondary metabolism.

二次代謝について再度マップを作成し、Figure 6-10 に示した。セコイリドイドが属するテルペノイド生合成に関与する遺伝子が1個あったが、blast 検索の結果、セコイリドイド合成には関与していなかった。

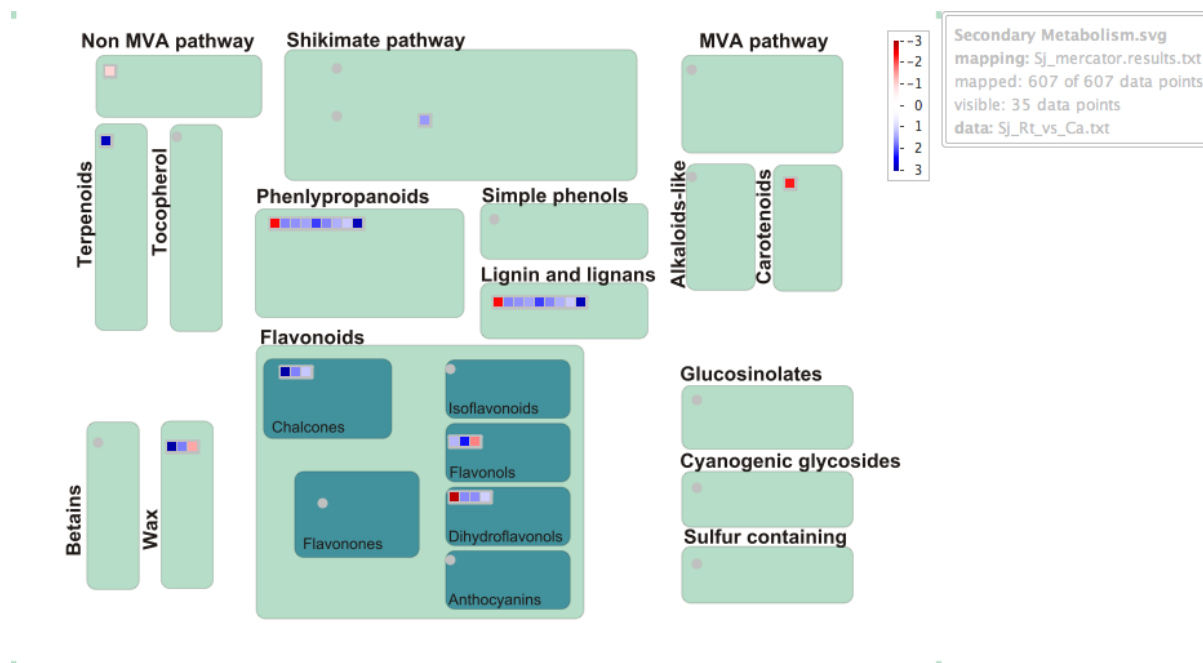


Figure 6-10 Secondary metabolism map made by Mapman. Blue zone indicates that difference level of expression is higher, beside red zone shows that it is lower.

さらに Trinotate で解析して発現比があり、527 アイソフォームを root で高い発現を示した 271 個と、カルスで高い発現を示した 256 個の遺伝子に分けて、KEGG を用いてマップを作成した。Figure 6-11 に示したように、不定根で高い発現を示した遺伝子においても、セコイリドイド生合成に関与する遺伝子はアノテートされなかった。

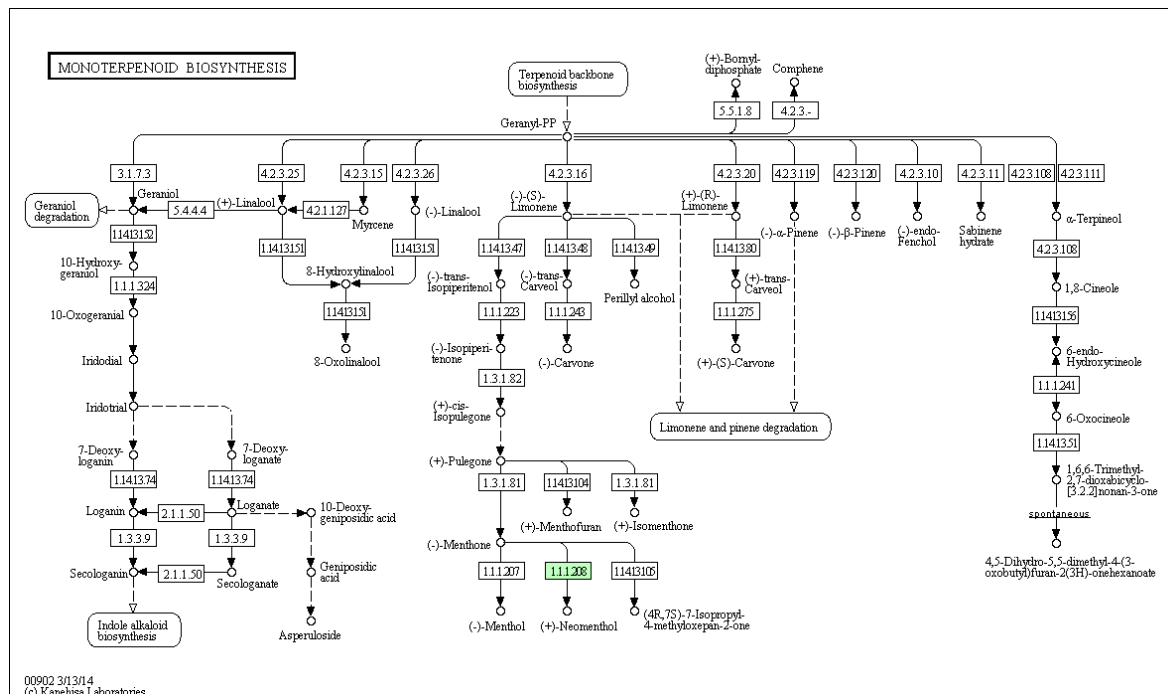


Figure 6-11 Monoterpenoid biosynthesis map made by KEGG. Green highlight shows annotated genes.

また、不定根で高発現している遺伝子の多くが、フェニルプロパノイド経路とフラボノイド生合成経路の二つの生合成経路に関与する遺伝子としてアノテートされた (Figure 6-12, 6-13)。センブリの不定根は主成分に *bellidifolin diglycoside* を産生するが、キサントンはフェニルプロパノイド経路を介して生合成されることから、これら遺伝子が多く発現していると考えられる。また、センブリ天然植物体ではフラボノイドを産生することが報告されており、フラボノイド生合成に関与する遺伝子が明らかになったことから、不定根でもフラボノイドを産生している可能性が示された。

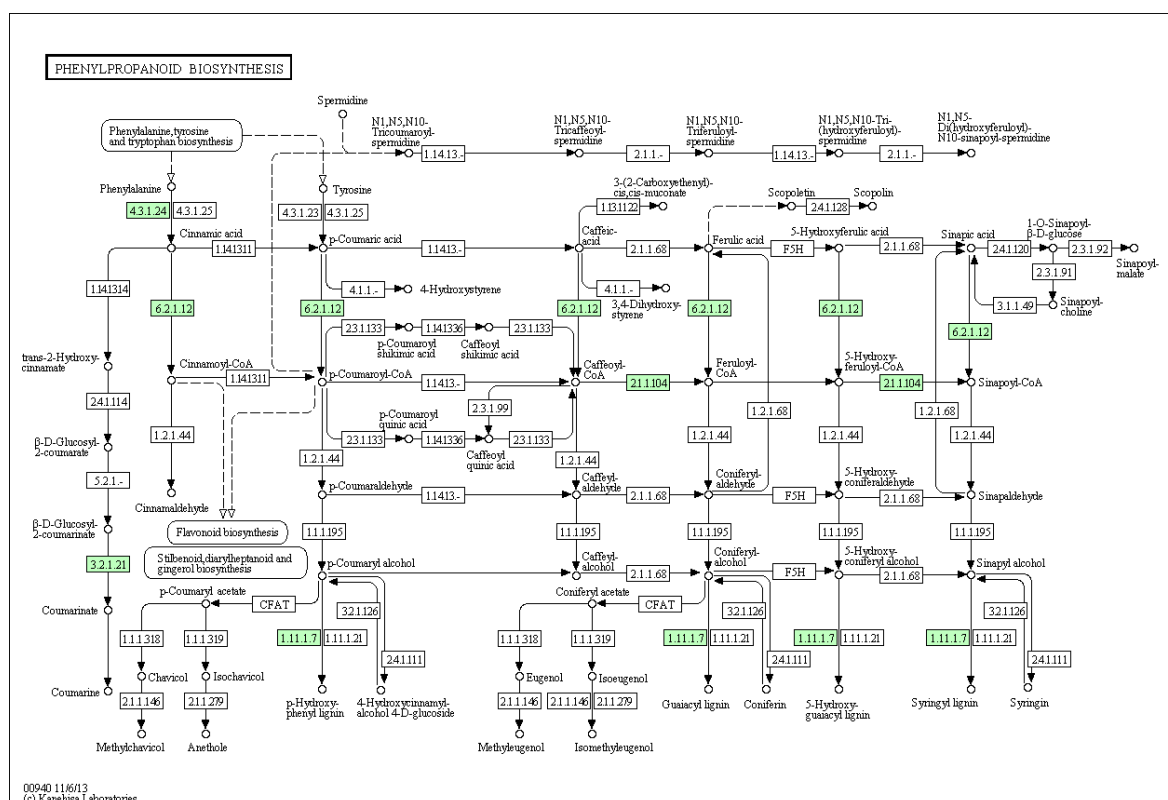


Figure 6-12 Phenylpropanoid biosynthesis map made by KEGG. Green highlight shows annotated genes.



個 (Sun *et al.* 2011) と、今回読んだ配列の数は比較的多いほうだった。これらの例は全て天然植物体から RNA を抽出して材料に用いているが、本研究のように培養物を用いても十分質の良い情報が得られた。また、今回はカルスと不定根を比較しているため、発現比が高い遺伝子の組織特異性が明確であり、これらの例以上に遺伝子の機能付けが確かであると考えられる。

Trinonate によってアノテーションされた遺伝子において、不定根で高発現している遺伝子に Proline rich protein が 1 個見つかった (Table 6-2)。Proline rich protein は細胞壁の生成に機能している (Showalter 1993) ことから、不定根の再分化に伴い、強く発現したと考えられ、組織特異的な遺伝子であることが示唆された。この遺伝子と同じサブクラスターに属する機能未知の遺伝子がもう 1 個あり、同様の発現パターンを示すことから、Proline rich protein のような細胞壁生成に関わる遺伝子であると示唆された。このように、今回用いた材料がカルスと不定根と形態が異なるものだったため、分化に関わる遺伝子に発現比が多く現れていると予想され、今後解析を進めることで、不定根の分化に機能する遺伝子も明らかになる可能性がある。

不定根で特異的に発現し、セコイリドイド生合成に関与する遺伝子と類似する遺伝子として SLS が 1 個見つかった。*G. macrophylla* において、SLS は 30 個見つかったが、植物体の部位間で発現量に差があるかどうかの議論はされていない (Hua *et al.* 2014)。本研究においても、SLS は同程度の数で見つかったため、複数の SLS が環境応答や組織特異的に制御されて機能していることが示唆された。本研究ではそのうち 1 個の SLS を見つけ、この遺伝子は不定根特有に機能していると考えられる。

さらに、シロイヌナズナの情報をもとに Blast2GO による遺伝子機能の分類 (Figure 6-8) や代謝マップを描画する Mapman (Figure 6-9, 6-10) や KEGG (Figure 6-11 ~ 13) といったソフトウェアを利用して解析した結果、1.64 % のアミノ酸配列が二次代謝に関与することが明らかになった他、フラボノイドやフェニルプロパノイド生合成経路に関与する遺伝子が培養物内で発現していることが示唆された。さらに、Blast2GO の GO 解析において、生物学的プロセスに分類された遺伝子の多くがストレス応答に関与しており、これら遺伝子は組織培養に起因する培地条件や光、温度などの培養環境によるものと予想されるため、他の植物との共通性や培養環境とこれら遺伝子の発現パターンの解析を進めることで、脱分化や再分化の際に働く遺伝子が特定できると期待できる。

## 6.2. RT-PCR による半定量的発現量解析

### 6.2.1. 目的

5.1.2.2 でセコイリドイド生合成に関与すると考え特定した遺伝子について、センブリ植物体の各部位と、培養物においてセコイリドイド産生に差のある細胞間で遺伝子発現量を比較し、セコイリドイド産生パターンと遺伝子発現の関係性を明らかにすることを目的とした。

### 6.2.2. 材料と方法

#### 6.2.2.1. 候補遺伝子の探索

6.1 で得られた Trinotate のアノテーション結果から、SLS と Cytochrome P450、WRKY をキーワードとして、遺伝子を検索した。不定根で高発現の遺伝子もしくは塩基配列の長い遺伝子を候補遺伝子として選抜した。

#### 6.2.2.2. 定量 PCR による発現量解析

RNeasy Plant Mini Kit（キアゲン）を用いて、センブリ植物体の各部位、葉、茎、根、花（LF、SM、RT、FL と表記；n=3）とカルスと不定根（CA、cRT と表記；n=2）、さらに 4.5 においてセコイリドイド産生パターンに差が見られた細胞懸濁培養系より NAA 処理細胞、IBA 処理細胞、無処理細胞（NAA、IBA、Con と表記；n=3）の合計 9 試験区の材料から RNA を抽出した。

得られた RNA を iTaq™ Universal SYBR Green One-Step Kit（BIO RAD）を用いて半定量 PCR に供し、Ct 値を算出した。目的遺伝子は 5.1.2.2 で特定された遺伝子 8 種とし、各遺伝子を Sj〜と命名した（Table 6-4）。コントロールとして、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH の配列（2012 年修士論文）を用いた。プライマーは Primer3（version 3.0.0）を用いて設計した。Figure 6-14 には各遺伝子におけるプライマーの位置と長さを示した。

発現量の算出には  $\Delta \Delta Ct$  法※を用い、LF1 の SjSLS-1 の発現量を 1 とした場合の相対発現量比（relative expression ratio）を算出した。

#### ※ $\Delta \Delta Ct$ 法

$$\Delta Ct_{LF1} = Ct_{\text{Target gene}_{LF1}} - Ct_{\text{House keeping gene}_{LF1}}$$

$$\Delta Ct_{\text{sample}} = Ct_{\text{Target gene}_{\text{sample}}} - Ct_{\text{House keeping gene}_{\text{sample}}}$$

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{LF1}$$

$$\text{Relative expression ratio} = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

LF1 のターゲット遺伝子の発現量に対して Sample は  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  倍の発現量比を示す。

Table 6-4 Name and isoform Number each of gene selected from NGS analysis

Name	Isoform number	BLASTX
SjSLS-1	comp76345_c0_seq1	Secologanin synthase
SjSLS-2	comp35343_c0_seq1	Secologanin synthase
SjSLS-3	comp42434_c1_seq1	Secologanin synthase
SjP450-1	comp75001_c0_seq1	Cytochrome P450 71D10
SjP450-2	comp37625_c0_seq1	Cytochrome P450 71D8
SjP450-3	comp89878_c0_seq1	Cytochrome P450 77A2
SjWRKY-1	comp77477_c0_seq1	Probable WRKY transcription factor 71
SjWRKY-1	comp29696_c0_seq1	Probable WRKY transcription factor

>Secologanin synthase (セコログニン合成酵素)

>comp76345\_c0\_seq2 (SjSLS-1)

SjSLS1\_F2-->

--//--CATTGGATCCAA**AACTGTGGCTGCATTGTGAG**GATAGTGAAAGGACTATGAGCAT >420

<--SjSLS1\_R2

ATGATGGAGAGACAT**CCCAAGTGAATCGTTGCAGA**AGCATTGTGAGTCCCAATT--//-- >1955

>comp35343\_c0\_seq1 (SjSLS-2)

SjSLS2\_F2-->

--//--TTCGCTAAATCTCT**CTGGCTTGA**ACTCTCT**CGCA**TCAGCTCCCCATATACTTTC >120

ATCGTGGTGCAGCATGATGACTGGCAAGAAAATTTGAATCCCAGCAGGTAGAGTTTTATT >180

CCCCAGAGTGGTATCTTCATGAATC**ATCCGCTCCAGTATTGCTCCGGGTG**--//-->758

<--SjSLS2\_R2

>comp42434\_c1\_seq1 (SjSLS-3)

--//--CACCATGACACTGCTATATGGGGTGAAGATGCGATGGAGTTCAACCCAGAGCGA >1440

SjSLS3\_F1-->

TTTGCAGAGGGAGTCACGAAAGCAACTAAGAGCCAAG**GGCGCATTTTTCCCCTTCAG**TTTA >1500

GGTCCAAGAATGTGCATTGGCCAAAATTTTGCTATGCTTGAAGCAAAGATGGCAATGGCC >1560

<--SjSLS3\_R1

TTAGTTCTTCGACGCTTCTCATTTACCCTTTCAC**CATCCTATGTCCATGCGCCT**--//-->1959

>Cytochrome P450 71D10

>comp75001\_c0\_seq1 (SjP450-1)

SjP4501\_F

--//--AATTAATGTCATGGGTTTTTCATAACATCTTTTGCAGCTTCGGCTGAGGAAACAA >1680  
2-->

CAAGATTGAATACTTCACCTAATTGAATGCGCATAAGGGGTCCGTGTTTTTCAGCTAATC >1740

<-- SjP4501\_R2

CTTTCATGGTTTTGTGTGGAAGAGAGCCAGCAAGTGCAAGCTGGTGAAGGTTGCCAAGAA >1800

GAGGCAGTCTCCATGGCCCAGGGGGAAATTTGCCGCCGTTGAA--//-->1962

>Cytochrome P450 71D8

>comp37625\_c0\_seq1 (SjP450-2)

SjP4502\_F2-->

--//--GTTATTACCATTCGGTTCGGGAAGAAGGATTTGCCCAGGAATTGCATTTGGTTT >240

AGCAAATGTACAGCTGCCTTTAGCTCTATTGCTCTATCACTTTGATTGGAACTCCCTGG >300

<-- SjP4502\_R2

AAGCATGAAACCAGAAGATATTGACATGACCGAAGCCTTTGGAGCAACAAGCCCGCTCGT >360

TAACGACCTTTGTTTGGTTCCCACTTTA--//--AACTTGGGTTGTGGTTAGCCATTGGG >900

GAAGTTTTGCAGTTATCGTTGAGTTACTGCCTTCATGTAGTGGGGATAACCGTCGTGCAA >960

TTGTCATGCCT--//-->1737

>Cytochrome P450 77A2

>comp89878\_c0\_seq1 (SjP450-3)

--//--TTCATCAACTTTCTTCTCGCCGACAACGCTTGCAATCTCCTCGTACA--//-- >780

TATCCGTCCCGCCGTTTCAGAACTCCGACAACAGCGTAACGAGCTCGGCATTAGTCGGCG >840

SjP4503\_F2-->

--//--TGCTAAAAAAGCATACCGGGCATTCTCAGAACCAGACCGCTCCATCGTTTT >1200

<-- SjP4503\_R2

CCGCAGCTTCATTTTTTCAGCTTCACAATTAATTTATCATGGCGATTCTCTTGCTTTT >1260

--//-->2020

>WRKY transcriptional factor

>comp77477\_c2\_seq1 (SjWRKY-1)

SjWRKY1\_F1-->

--//--TATAGCTGGAATGTTGCATCCCATGTTTACTACTACTCCAAATTCTAACTTTCT >240

<-- SjWRKY1\_R1

TCCTCCTCCTCATGAACTCTTTGTTCAAATGCCACATCTTTACGGCAGCCATGCCGGTAG >300

CGATGGCGGTGGTGCCACGGGTGGTAGCTCTATGTATCATCAACAAAATCTAACACATCA >360

TGAGCAGCAGATGCAGTTTCCGGAT--//-->692

>comp29696\_c0\_seq1 (SjWRKY-2)

--//--TGATGAAAAGTCGAAAACACGATGGTCTTCTTGCAAGAACTCTCAGTAAAGTT >420

SjWRKY2\_F2-->

GATGTGATTATAAGTAGAAGGGTATTCATAATCAGCCATAGAAGAACTAAACCCCATATG >480

<--SjWRKY2\_R2

CCCACCACCATAAGCTCCTG--//-->784

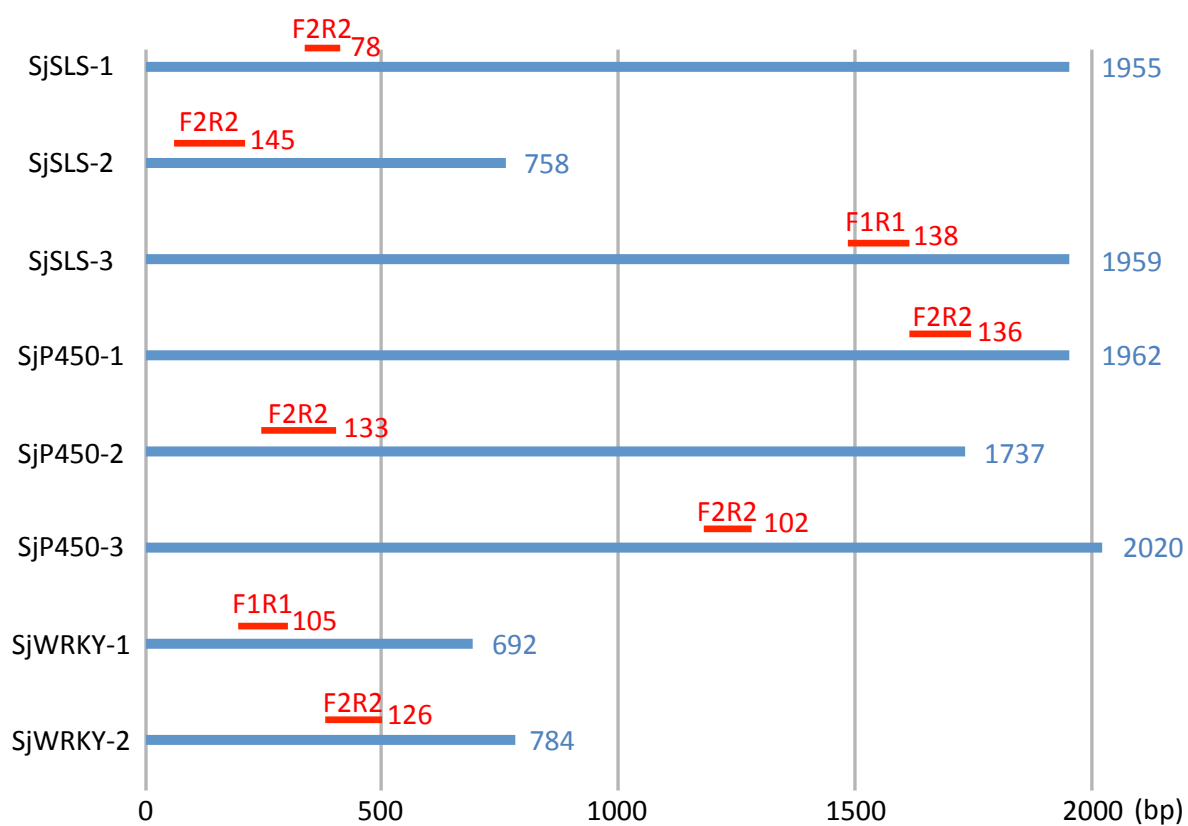


Figure 6-14 Primer positions of SjSLS-1 to 3, SjP450-1 to 3 and SjWRKY-1, 2. F indicates forward primer, beside R shows reverse primer. Each base sequences of gene were showed as blue. Primers used in RT-PCR were showed as red.

### 6.2.3. 結果

#### 6.2.3.1. 候補遺伝子の探索

6.1 で述べたように、発現比が高く、不定根で特異的に発現している SLS は 1 個のみであった。センブリの二次代謝に関与する遺伝子はこれまで報告がないため、SLS として機能している遺伝子にも Blast の検索ではアノテーションがつかなかった可能性も考えられた。よって、SLS が属する Cytochrome P450 遺伝子をターゲットとして Trinotate において検索し、まとめた (Table 6-5)。

Table 6-5 Cytochrome P450 expressed specifically in adventitious root

Subcluster	Isoform number	Fold change (Root/Callus)	BLASTX
4	comp75001_c0_seq1	15.9	Cytochrome P450 71D10
4	comp89878_c0_seq1	12.9	Cytochrome P450 77A2
1	comp37625_c0_seq1	4.2	Cytochrome P450 71D8

Cytochrome P450 遺伝子に属する遺伝子はアイソフォームにおいて 12 個あり、そのうちの 3 個がテルペノイドの生合成に関与する遺伝子だった。いずれも不定根において約 5～20 倍高い発現量を示す遺伝子であったため、セコイリド生合成に関与している可能性があると考え候補遺伝子とした。

さらに、SLS の転写を制御することが報告されている WRKY 転写調節因子を検索したところ、遺伝子レベルにおいて 1 個の遺伝子が不定根で多く発現していることがわかった (Table 6-6)。不定根において約 5 倍高く発現している遺伝子であったため、SLS の転写を制御し、セコイリド生合成に関与している可能性があると考え候補遺伝子とした。

Table 6-6 WRKY transcription factor expressed specifically in adventitious root

Subcluster	Gene number	Fold change (Root/Callus)	BLASTX
6	comp77477_c2	4.4	Probable WRKY transcription factor 71

また、カルスと不定根において発現量の差がないが、比較的長い塩基配列を持つ SLS を 2 個、WRKY を 1 個検索し、合計 3 個の遺伝子をまとめた (Table 6-7)。

Table 6-7 SLS and WRKY selected as control

Isoform Number	BLASTX
comp35343_c0_seq1	Secologanin synthase
comp42434_c1_seq1	Secologanin synthase
comp29696_c0_seq1	Probable WRKY transcription factor

#### 6.2.3.2. Secologanin synthase と P450 遺伝子の発現量解析

セコログニン生合成に関与する遺伝子を特定するために、swertiamarin の産生パターンと SjSLS-1～3 の遺伝子発現量を比較した。Figure 6-15 には SjSLS-1～3 の遺伝子発現量を示し、遺伝子間の発現量の差を比較した。

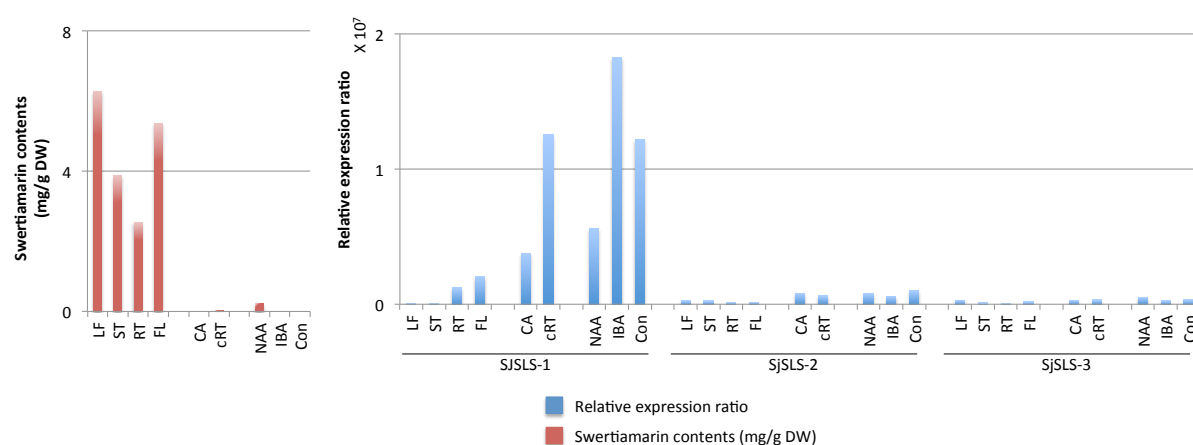


Figure 6-15 Comparison of relative expression ratio among SjSLS-1, SjSLS-2 and SjSLS-3. Blue bar graph shows relative expression ratio, and red marker shows swertiamarin content.

他の遺伝子に比べ、SjSLS-1 が最も高い発現量を示し、特に培養物において高い発現量を示した。次に SjSLS-1～3 のそれぞれの遺伝子における発現パターンを試験区間で比較した (Figure 6-16)。

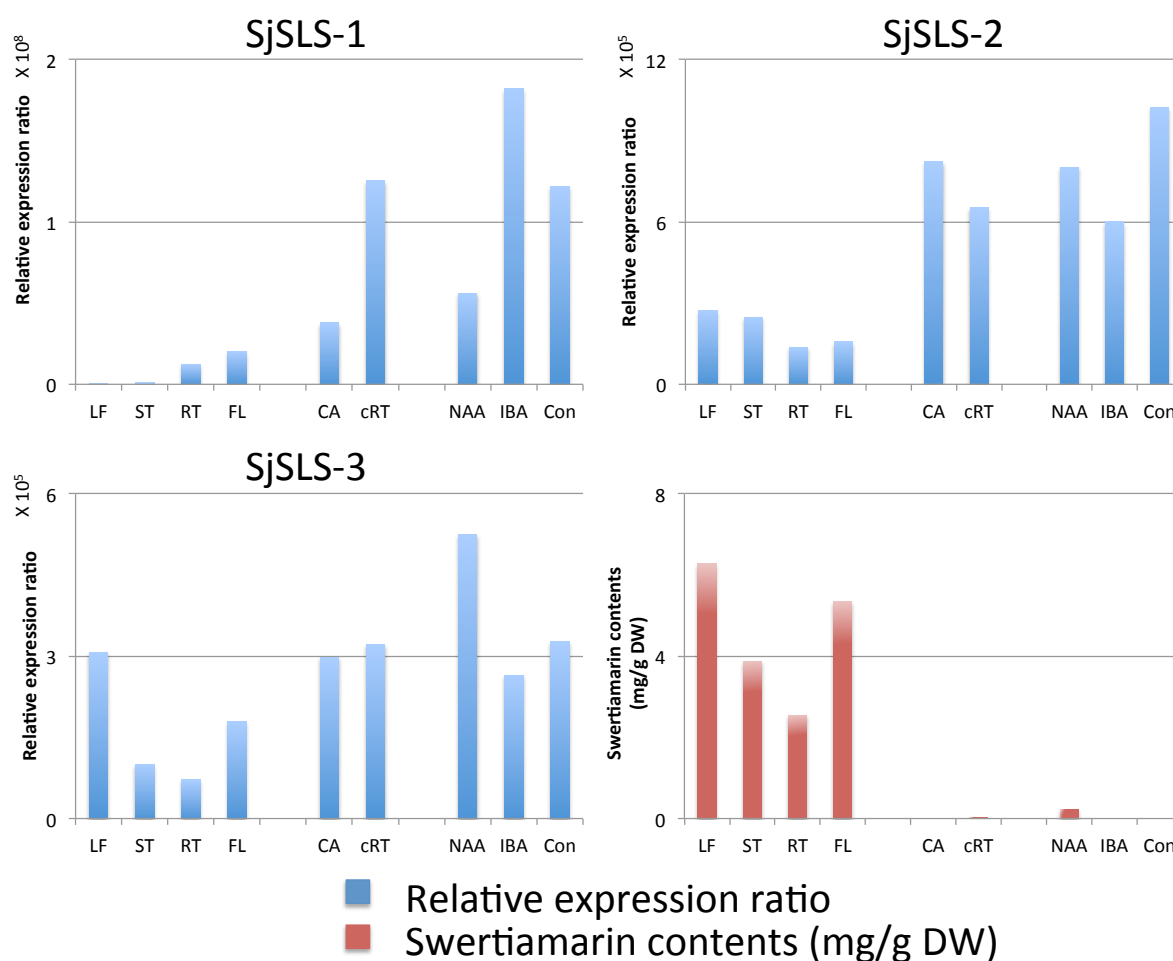


Figure 6-16 Comparison of relative expression ratio of SjSLS-1, SjSLS-2 and SjSLS-3 among LF, ST, RT, FL, CA, cRT, NAA, IBA and Con

SjSLS-1 の発現量は培養物で高く、CA より cRT の発現量が高いことから、次世代シーケンサーによる発現変動 (DE) 解析の再現性を確認し、さらに swertiamarin 産生パターンと一致した。しかし、細胞懸濁培養系における、NAA と IBA、Con 試験区の発現パターンは swertiamarin 産生パターンと一致しなかった。天然植物体においては RT と FL において特異的に発現した。

SjSLS-2 は培養物で比較的高い発現量を示す半面、その発現パターンは CA と cRT、細胞懸濁培養系いずれの試験区においても swertiamarin 産生パターンとは一致しなかった。天然植物体において低い発現量を示すものの、swertiamarin 産生パターンと一致する傾向が認められた。

SjSLS-3 は培養物においてわずかに天然植物体より高い発現量を示した。また、NAA 処理区においてよく高い発現量を示し、swertiamarin 産生パターンと一致する傾向が認められた。CA と cRT においては差がなかった。天然植物体においても、発現パターンが swertiamarin 産生パターンの傾向と類似した。

次に、SLS と予想される遺伝子以外にセコログニン生合成に関与する遺伝子を特定するために、swertiamarin の産生パターンと SjP450-1～3 の遺伝子発現量を比較した。Figure 6-17 には SjP450-1～3 の遺伝子発現量を示し、遺伝子間の発現量の差を比較した。

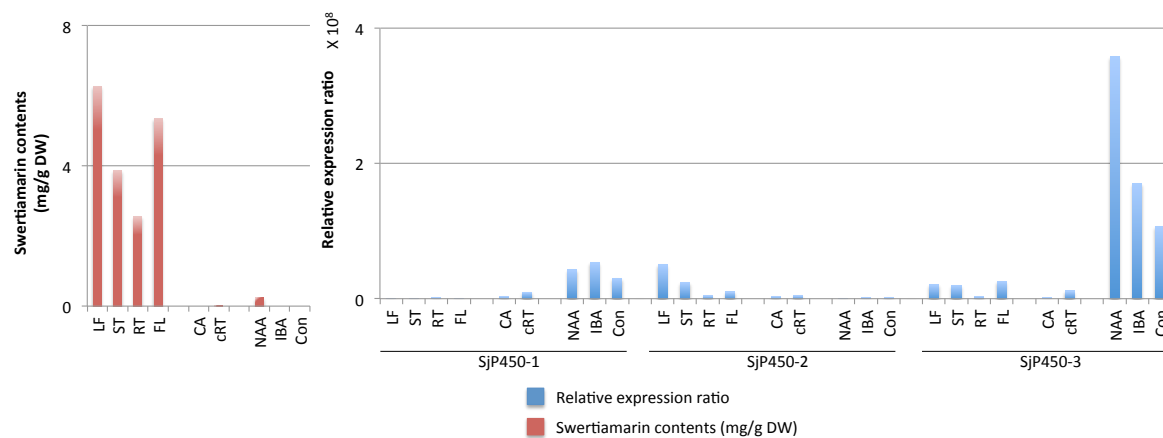


Figure 6-17 Comparison of relative expression ratio among SjP450-1, SjP450-2 and SjP450-3

SjP450 遺伝子は 1～3 全ての遺伝子において、天然植物体と培養物間で発現量に大きく差が認められた。SjP450-3 は細胞懸濁培養系において最も高い発現量を示した。

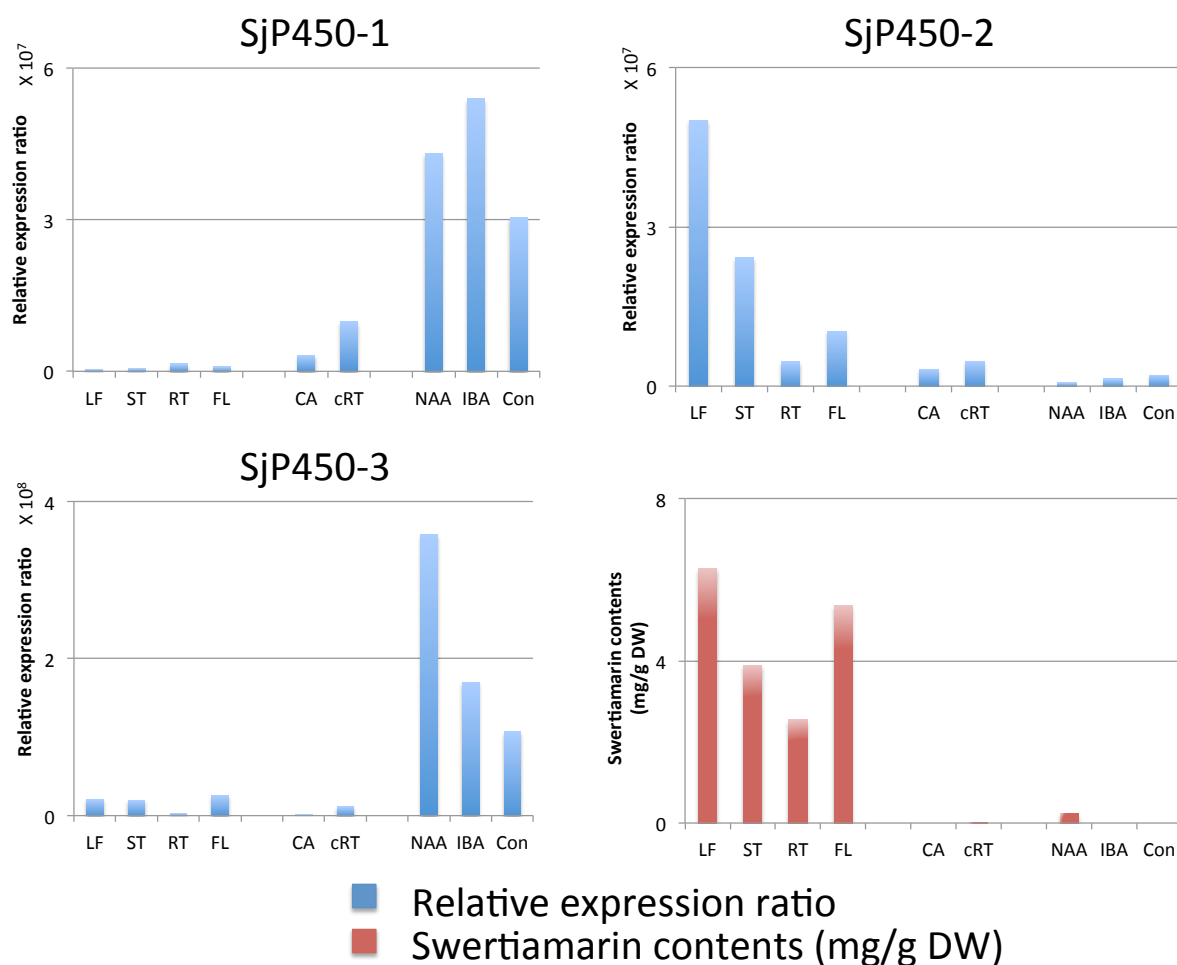


Figure 6-18 Comparison of relative expression ratio of SjP450-1, SjP450-2 and SjP450-3 among LF, ST, RT, FL, CA, cRT, NAA, IBA and Con.

SjP450-1 の発現量は培養物で高く、天然植物体ではほとんど発現していなかったが、わずかに天然植物体の根で高い発現量を示す傾向があった。CA より cRT において高い発現量を示すことから、発現変動 (DE) 解析の再現性を確認し、さらに swertiamarin 産生パターンと一致した。RT と cRT で高い発現量を示した。しかし、細胞懸濁培養系における、NAA と IBA、Con 試験区の発現パターンは swertiamarin 産生パターンと一致しなかった (Figure 6-18)。

SjP450-2 は天然植物体で高い発現量を示し、その発現パターンは swertiamarin 産生パターンと一致した。培養物ではほとんど発現しなかったものの、CA より cRT において高い発現量を示すことから、発現変動 (DE) 解析の再現性を確認し、さらに swertiamarin 産生パターンと一致した。しかし、細胞懸濁培養系における、NAA と IBA、Con 試験区の発現パターンは swertiamarin 産生パターンと一致しなかった。

SjP450-3 の発現量は細胞懸濁培養系で高く、NAA 処理区において高い発現量を示し、swertiamarin 産生パターンと一致した。CA と cRT ではほとんど発現しなかった。また、天然植物体においては低い発現量を示し、swertiamarin 産生パターンとの関係性は認められなかった。

### 6.2.3.3. 転写調節因子 WRKY の発現量解析

セコロガニン生合成に関与する SLS 遺伝子の転写調節因子である、WRKY 転写因子の発現量を解析した。Figure 6-19 には SjWRKY-1 と SjWRKY-2 の遺伝子発現量と swertiamarin 産生パターンとの関係性を示した。

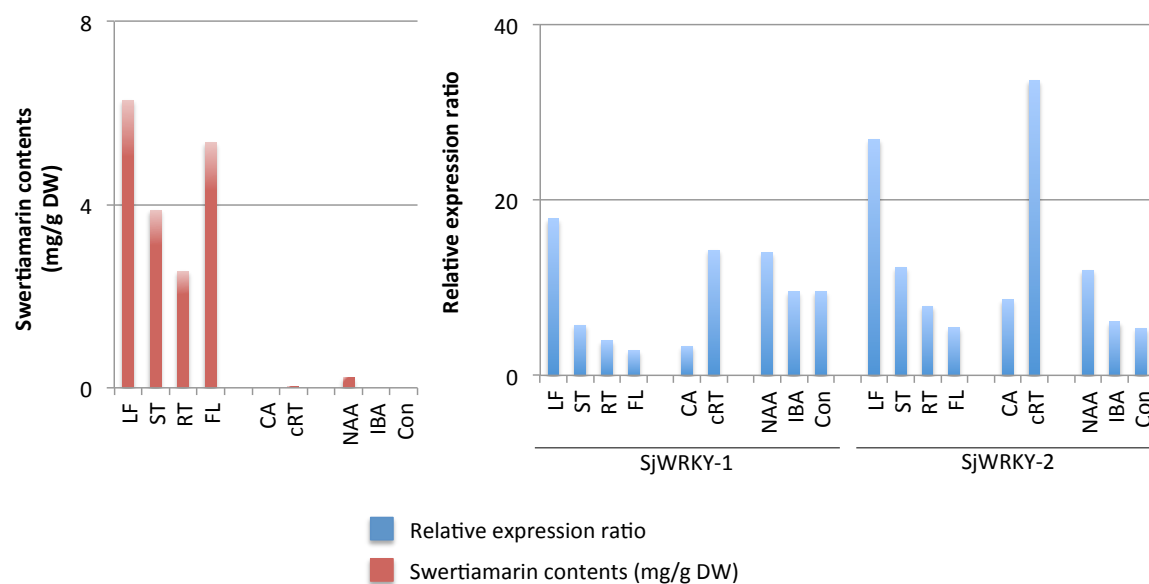


Figure 6-19 Comparison of relative expression ratio between SjWRKY-1 and SjWRKY-2

6.2.3.2 で述べた SjSLS と SjP450 の遺伝子発現と比較すると低い発現量を示すものの、天然植物体と培養物両方において、SjWRKY の発現パターンは swertiamarin 産生パターンといずれも類似した。しかし、FL においてはより低い発現量を示した。

## 6.2.4. 考察

次世代シーケンサーの解析結果から絞り込んだ目的遺伝子 9 種について RT-PCR による半定量 PCR を行い、センブリ植物体の各部位、葉、茎、根、花 (LF、SM、RT、FL) とカルスと不定根 (CA、cRT)、さらに 4.5 においてセコイリドイド産生パターンに差が見られた細胞懸濁培養系より NAA 処理細胞、IBA 処理細胞、無処理細胞 (NAA、IBA、Con) の合計 9 試験区において各遺伝子の発現量を比較した。これまでセコイリドイドの生合成を制御する遺伝子や外的要因に関する知見はなかったが、このような、様々な条件下での実験により、セコイリドイド生合成経路と、それに関わる遺伝子、外的要因との関係性が明確することが可能になる。そこで、本研究で試験した SjSLS-1～3、SjP450-1～3 とセコイリドイド生合成経路との関係性についてモデルを提案する (Figure 6-20)。

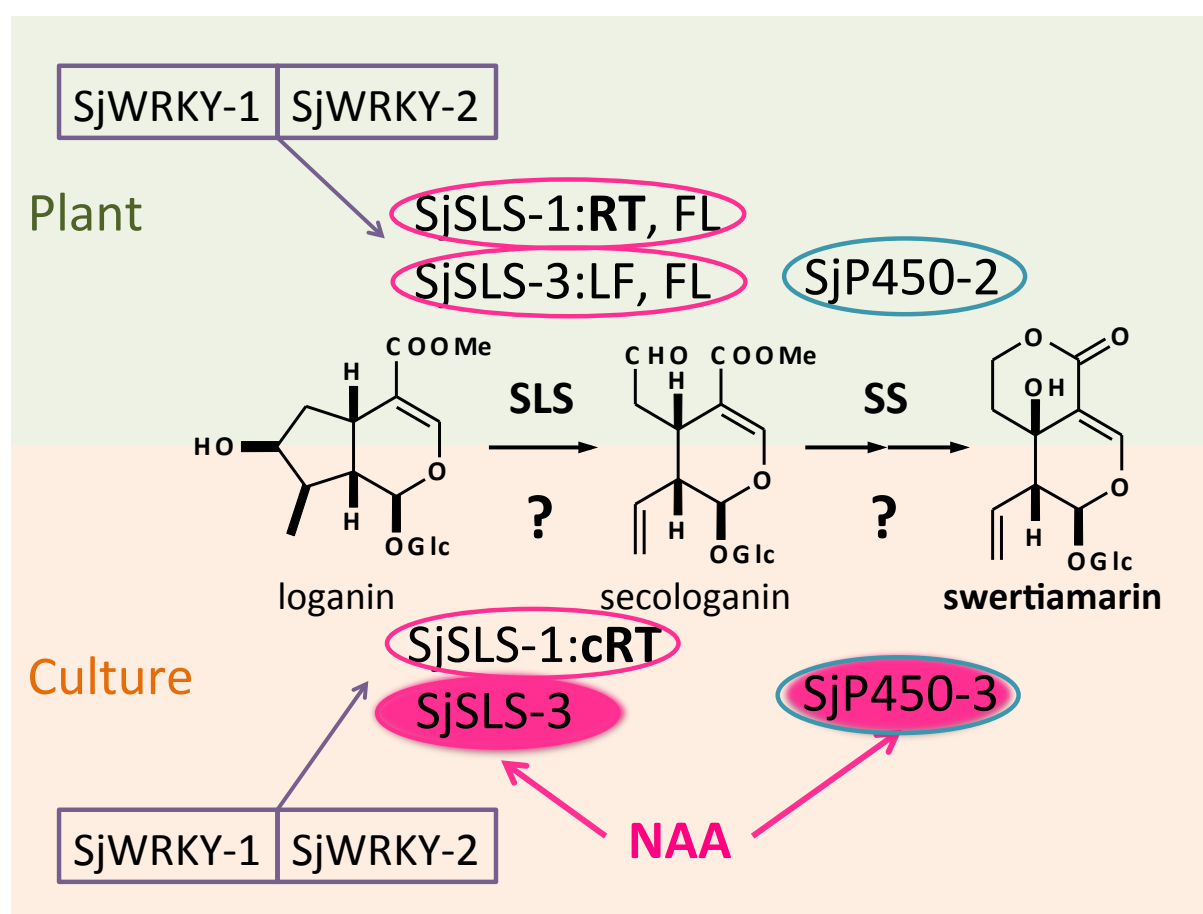


Figure 6-20 Summary of effects of tissue and hormone regulator on differential gene expression in the predicted secoiridoid biosynthesis

まず、SjSLS-1 は細胞懸濁培養系においては swertiamarin 産生パターンと発現パターンが一致しなかったため、培養細胞においてはセコイリドイド生合成に関与していないと考えられる。しかし、天然植物体においては根と花で特異的に発現しており、さらに不定根で高い発現量を示すことから、特に根においてセコイリドイド生合成に関与している可能性

が考えられる。SjSLS-2 はどの試験区でも発現する一方、天然植物体において組織特異性はなく、また培養においてもカルスと不定根間での発現量に差がなかった。また、細胞懸濁培養系では NAA 処理で発現量の増加も認められなかったことから、恒常的に発現するが、外部刺激に応答するような遺伝子ではないと考えられる。さらに、SjSLS-3 は天然植物体や培養物において発現パターンと swertiamarin 産生パターンが一致することから、SjSLS-3 がセコイリドイド生合成により関与していることが強く示唆された。また SjSLS-1 と反して、SjSLS-3 は天然植物体の根や不定根で共通して発現が少ないことから、根においては SjSLS-1 が特異的に発現し、植物体内では機能分けされることが示唆された。

セコログニン以降の生合成は、P450 遺伝子が機能して、エステルの加水分解を伴うラクトン形成の後、水酸化により swertiamarin が合成されると考えられている (Jensen & Schripsema, 2002)。先に述べた SjSLS は CYP72A ファミリーに属する P450 遺伝子であるが、今回試験した SjP450-1~3 は SLS 遺伝子とは異なる塩基配列を持つことから、セコログニン以降の生合成に関与する P450 遺伝子ではないかと考え、モデルを作成した。SjP450-1~3 は天然植物体と培養物で発現パターンが異なり、SjP450-2 は天然植物体、SjP450-1 と SjP450-3 は培養物でそれぞれ高発現していた。SjP450-1 は RT と cRT で発現量が高くなる傾向があることから、根に特有の遺伝子であると考えられる。SjP450-2 の発現パターンは swertiamarin 産生パターンと一致したため、植物体内では swertiamarin 生合成に関与していることが示唆された。一方、SjP450-3 の発現量は NAA 処理した細胞懸濁培養系において高く、swertiamarin 産生パターンと一致した。そのため、細胞懸濁培養系においては SjP450-3 が主として swertiamarin 生合成に関与していることが予想された。

*Catharanthus roseus* で見つかった CrWRKY1 は SLS 遺伝子の発現を調節し、花での発現が比較的低いことが報告されている (Suttipanta *et al.* 2011)。SjSLS と SjP450 の遺伝子発現と比較すると発現量は少ないものの、天然植物体と培養物両方において、SjWRKY の発現パターンは swertiamarin 産生パターンといずれも類似したことから、SLS 遺伝子の発現調節として機能している可能性が考えられる。また、FL においては SjWRKY の発現量が少なかったことから、WRKY 以外の調節因子が働き、他の器官とは異なる調節機構の存在が示唆された。

さらに RT と cRT では共通して、他の器官とは異なる遺伝子が高発現していた (Figure 6-17, 19)。センブリの根では swertiamarin より水酸基が脱離した gentiopicroside が多く含まれており、さらには同じく生薬として用いられるゲンチアナは根では swertiamarin よりも多くの gentiopicroside を産生することが報告されている (Szűcs *et al.* 2002)。このように植物体内で、根は他の部位とは異なったセコイリドイド化合物を産生する現象が知られており、異なった生合成遺伝子が主として発現していることに起因すると考えられる。

カルスの状態になると元の植物体で産生していた二次代謝物を産生しない例が数多く報告されているが、天然植物体では swertiamarin が多く産生されているにもかかわらず、本研究ではカルスや細胞懸濁培養系において発現している遺伝子は、天然植物体では低い発現量を示した。このことから、今回、SjSLS-3、SjP450-3 が細胞懸濁培養系で swertiamarin 生合成に関与することが示唆されたが、天然植物体においてはマイナーな遺伝子だと考えられる。次世代シーケンサーを用いて目的遺伝子を選別する際に、カルスと不定根のデータを用いたために、本研究では培養物もしくは根特有の遺伝子を選抜している可能性があ

り、今後天然植物体での解析を行うことで、そこで主に発現している SLS が培養物内ではどのような発現パターンを示すのか大変興味深い。

以上より、細胞懸濁培養系においては、NAA 処理により swertiamarin 生合成が誘導された原因として、SjSLS-3、SjP450-3 の発現が促進したことが考えられる。また、それら遺伝子の発現が SjWRKY-1、-2 のような転写調節因子によって制御されていることも示唆された。今後、ラベル標識した前駆体として、ログニンやセコログニンを投与し、さらに NAA 処理し、SjSLS-3、SjP450-3 の発現とラベル標識されたセコイリドイドの産生パターンを比較することで、遺伝子の機能を特定できると考える。

### 6.3. まとめ

今回、初めて次世代シーケンサーを用いて、センブリカルスと不定根において *de novo* RNA-seq 解析を行い、SLS や P450、WRKY 転写調節因子などセコイリドイド生合成に関与すると予想される遺伝子を特定した。センブリ植物体の各部位、葉、茎、根、花とカルスと不定根、細胞懸濁培養系より NAA 処理細胞、IBA 処理細胞、無処理細胞について RT-PCR による発現量解析を進めた。その結果、SjSLS-1～-3、SjP450-1～-3、SjWRKY-1、-2 の遺伝子がセコイリドイド生合成にどのように機能しているかモデルを構築した。今後、実際にセコイリドイド生合成に伴う開裂反応や酸化反応がこれら遺伝子から得られる酵素によって進むかどうか確認していくことで、セコイリドイド生合成に関与する遺伝子の解明ができると考えている。

## 7. 総括

本研究では、センブリの有用成分を医薬資源として持続的に大量生産する方法を確立することを目的として、センブリの組織培養法を確立し、培養物特有の成分の単離構造決定を行った。さらに、不定根培養をより効率的にするために KODA の新規な生物活性を見出した。また、細胞懸濁培養系におけるセコイリドイド産生条件を検討した。最後に、遺伝子工学的手法で物質生産性を向上させる方法を確立するために、次世代シーケンサーによるセンブリ培養物の *de novo* RNA-seq 解析で目的遺伝子を特定し、その発現量と様々な実験条件下におけるセコイリドイド産生パターンとの関係性を明らかにした。

まず、センブリの組織培養において以下に示した Table 7-1 に、それぞれの培養手法による物質生産の体系についてまとめた。

Table 7-1 Summary of efficient culture systems of *S. japonica*

Materials		Culture conditions			Productivity			Elicitors		
		Basal medium	Phytohormones (μM)		Growth	Secondary metabolites		KODA	NAA	
			NAA	KIN		Secoiridoid	Xanthone		Growth	Secoiridoid-production
Solid	Callus	WP	10	1	+	-	+	-		
	Adventitious root	WP	10	1	+	+	+	++		
Liquid	Callus	1/8 B5	10	1	++	-	+	-	-	+
	Adventitious root	1/8 WP	0.01	0.01	++	+	++	++++	-	-

固体培地と液体培地両方を用いて、カルスと不定根の効率的な培養条件を明らかにしたが、培養物の増殖には液体培地が適しており、特に不定根は KODA を添加することで増殖が促進された。しかし、カルスと不定根両方において、増殖と成分産生を促す条件は相反しており、KODA は不定根の増殖を促進する一方主成分の bellidifolin diglycoside の産生を抑制し、高濃度の NAA は細胞懸濁培養系において細胞増殖を阻害するものの、swertiamarin の産生を促した。今後、培養技術を用いてセンブリの二次代謝物を大量生産するには、細胞増殖を促進する培養条件で前培養し、その後成分産生を促進する培養条件に移行するような二段階の培養システムを用いることで、実現すると考えられる。

また、KODA による組織培養物の発根促進作用は本研究で初めての報告である。KODA の発根作用はソメイヨシノなどの樹木でも報告されている他、KODA は多くの植物で生合成される脂肪酸に似た構造を持つため、センブリ以外の植物においても同様の効果を示すことが予想される。そのため今後、日本国内で需要の高いカンゾウなどの根茎を生薬として用いるような薬用植物にも応用することで、薬用植物の安定的供給や生産効率の向上に貢献できると期待される。

さらに、今回カルスと不定根に共通に含まれる主成分を bellidifolin diglycoside と構造決定した。この化合物は glucose と galactose をアグリコンの 1 位に持つ二糖の配糖体だが、これまで galactose をもつキサントン配糖体の報告はないため、本研究が初めての報告であ

り、抗酸化活性を有することも明らかになった。本化合物の類縁体が培養物には数多く含まれており、センブリ培養物抽出物の抗酸化剤としての利用が期待される。

また、天然植物体が産生する成分を組織培養物は産生しない現象が組織培養の分野において広く知られており、この要因は未だ明らかになっていない。センブリにおいてはカルスに脱分化した際にセコイリドイドを産生しない一方、キサントンの産生能は維持された。セコイリドイドはメバロン酸経路、キサントンはフェニルプロパノイド経路と異なる生合成経路を持つが、この2つの主要な代謝系は同じ植物体内においても器官分化による制御が異なっていることが示唆される。本研究において、次世代シーケンサーによるセコイリドイド生合成遺伝子の解明を進めた。今後、不定根の分化に関与する遺伝子との関係性を明らかにし、器官分化に伴って発現するどの遺伝子が主要な二次代謝系を制御するのかという重要な課題についてメカニズムを明らかにすることで、多くの薬用植物の組織培養に応用でき、有用成分の大量生産方法の確立に大きく貢献できると考えられる。

## 8. 引用文献

- Ashida S, Noguchi BD SF, Suzuki T (1994) Antioxidative components, xanthone derivatives, in *Swertia japonica* Makino. J Am Oil Chem Soc 71:1095-1099
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:151-158
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid M. D, Thorpe A. T (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 32: 272–289
- Hedhili S, Courdavault V, Giglioli-Guivarc'h N, Gantet P (2007) Regulation of the terpene moiety biosynthesis of *Catharanthus roseus* terpene indole alkaloids. Phytochem Rev 6:341-351
- Hua W, Zheng P, He Y, Cui L, Kong W, Wang Z (2014) An insight into the genes involved in secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* by RNA-seq. Molecular Biology Reports 41:4817-4825
- Ishimaru K, Sudo H, Satake M, Matsunaga Y, Hasegawa Y, Takemoto S, Shimomura K (1990a) Amarogentin, amaroswerin and four xanthenes from hairy root culture of *Swertia japonica*. Phytochemistry 29:1563-1565
- Ishimaru K, Sudo H, Satake M, Shimomura K (1990b) Phenyl glucosides from hairy root culture of *Swertia japonica*. Phytochemistry 29:3823-3825
- Jamwal A (2012) Systematic review on xanthenes and others isolates from genus *Swertia*. Int J Pharm Chem Sci 1:1115-1133
- Jensen SR, Schripsema J (2002) Chemotaxonomy and pharmacology of *Gentianaceae*. Chemotaxonomy and pharmacology, Systematics and Natural History, 573-631, Cambridge University.
- Keil M, Hartle B, Guilaume A, Psiorz M (2000) Production of amarogentin in root cultures of *Swertia chirata*. Planta Medica 66:452-457
- Kimura Y, Sumiyoshi M (2011) Effects of *Swertia japonica* extract and its main compound swertiamarin on gastric emptying and gastrointestinal motility in mice. Fitoterapia 82:827-833
- Kitamura Y, Dono M, Miura H, Sugii M (1988) Production of swertiamarin in cultured tissues of *Swertia pseudochinensis*. Chem Pharm Bull 36:1575–1576 (in Japanese)
- Kitamura Y, Nakano M, Miura H, Sugii M (1987) Root cultures of *Swertia pseudochinensis*. Shoyakugaku Zasshi 41:58–60 (in Japanese)

- Kittikorn M, Okawa K, Ohara H, Kotoda N, Wada M, Yokoyama M, Ifuku O, Yoshida S, Kondo S (2011) Effects of fruit load, shading, and 9,10-ketol-octadecadienoic acid (KODA) application on *MdTFL1* and *MdFT1* genes in apple buds. *Plant Growth Regul* 64:75–81
- Kondo S, Tomiyama H, Kittikorn M, Okawa K, Ohara H, Yokoyama M, Ifuku O, Saito T, Ban Y, Tatsuki M, Moriguchi T, Murata T, Watanabe N (2012) Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase gene expression in apple fruit are affected by 9,10-ketol-octadecadienoic acid (KODA). *Postharvest Biol Technol* 72:20–26
- Kubo M, Matsuda H, Fukui M, Nakai Y (1988) Development Studies of Cuticle Drugs from Natural Resources. I. : Effects of Crude Drug Extracts on Hair Growth in Mice. *藥學雜誌* 108:971-978
- Lloyd G, McCown B (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int Plant Propag Soc* 30:421-427
- Miettinen K, Dong L, Navrot N, Schneider T, Burlat V, Pollier J, Woittiez L, Krol S, Lugan R, Ilc T, Verpoorte R, Oksman-Caldentey KM, Martinoia E, Bouwmeester H, Goossens A, Memelink J, Werck-Reichhart D (2014) The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*. *Nature Communications* 5:3606:1-11
- Miura H, Kawashima K, Kitamura Y (1986) Studies on the tissue culture of *Swertia japonica* Makino. III. Glycosylation of naringenin in cultured cells. *Shoyakugaku Zasshi* 40:40-43 (in Japanese)
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nakajima N, Ikoma Y, Matsumoto H, Nakamura Y, Yokoyama M, Ifuku O, Yoshida S (2011) Effect of 9,10- $\alpha$ -ketol linolenic acid treatment on flower bearing in Satsuma Mandarin. *Hort Res* 10:407–411 (in Japanese)
- Niiho Y, Yamazaki T, Nakajima Y, Yamamoto T, Ando H, Hirai Y, Toriizuka K, Ida Y (2006) Gastroprotective effects of bitter principles isolated from Gentian root and *Swertia* herb on experimentally-induced gastric lesions in rats. *J Nat Med* 60:82–88
- Nishi T, Yamada Y, Takahashi E (1973) The role of auxins in differentiation of rice tissues cultured *in vitro*. *Bot Mag Tokyo* 86:183–188
- Ono M, Kataoka M, Yokoyama M, Ifuku O, Ohta M, Arai S, Kamada H, Sage-Ono K (2013) Effects of 9,10-ketol-octadecadienoic acid (KODA) application on single and marginal short-day induction of flowering in *Pharbitis nil* cv. Violet. *Plant Biotechnol* 30:17–24
- Pawlicki N, Welander M (1995) Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Sci* 106:167–176

- Piatczak E, Wielanek M, Wysokinski H (2005) Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Sci* 168:431–437
- Purev O, Oyun Kh, Odontuya G, Tankhaevaa A M, Nikolaeva G G, Khan K M, Shah S T A, Voelter W. Isolation and structure elucidation of two new xanthenes from *Gentiana azurea* Bunge (Fam. Gentianaceae). *Naturforsch.* 2002;57b;331-334.
- Sakamoto D, Nakamura Y, Sugiura H, Sugiura T, Asakura T (2010) Effect of 9-hydroxy-10-oxo-12(Z), 15(Z)-octadecadienoic acid (KODA) on endodormancy breaking in flower buds of Japanese pear. *HortScience* 45:1470–1474
- Sun Y, Luo H, Li Y, Sun C, Song J, Niu Y, Chen S (2011) Pyrosequencing of the *Camptotheca acuminata* transcriptome reveals putative genes involved in camptothecin biosynthesis and transport. *BMC Genomics* 12:533
- Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, Patra B, Singh SK, Yuan L (2011) The Transcription Factor CrWRKY1 Positively Regulates the Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 157:2081–2093
- Szücs Z, Ddnos B, Nyirecty Sz (2002) Comparative Analysis of the Underground Parts of *Gentiana* Species by HPLC with Diode-Array and Mass Spectrometric Detection. *Chromatographia Supplement* 56:19-23
- Tanaka T, Nakashima T, Ueda T, Tomii K, Kouno I (2007) Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC. *Chem Pharm Bull* 55:899-901
- Wang Y, Hua W, Wang J, Hannoufa A, Xu Z, Wang Z (2013) Deep sequencing of *Lotus corniculatus* L. reveals key enzymes and potential transcription factors related to the flavonoid biosynthesis pathway. *Molecular Genetics and Genomics* 288:131–9
- Yamaguchi S, Yokoyama M, Iida T, Okai M, Tanaka O, Takimoto A (2001) Identification of a component that induces flowering of *Lemna* among the reaction products of  $\alpha$ -ketol linoleic acid (FIF) and norepinephrine. *Plant Cell Physiol* 11:1201–1209
- Yamahara J, Kobayashi M, Matsuda H, Aoki S (1991) Anticholinergic action of *Swertia japonica* and an active constituent. *J Ethnopharmacol* 33:31–35
- Yamamoto S, Hakamata T, Yokoyama M, Ohji I (2009) The influence of  $\alpha$ -ketol linolenic acid (KODA) and 4-(3-indolyl)-4-butanolide (IBL) on cutting propagation in *Zelkova serrata*. 静岡県農林技術研究所研究報告 第3号
- Yokoyama M (2005) Roles of 9, 10- $\alpha$ -ketol linolenic acid (KODA), one of the oxylipins formed with 9-lipoxygenase in plant growth regulation. *Regul Plant Growth Dev* 40:90–100 (in Japanese)
- Yokoyama M, Yamaguchi S, Inomata S, Komatsu K, Yoshida S, Iida T, Yokokawa Y, Yamaguchi

M, Kaihara S, Takimoto A (2000) Stress-induced factor involved in flower formation of *Lemna* is an  $\alpha$ -ketol derivative of linolenic acid. *Plant Cell Physiol* 41:110–113

## 9. 発表論文

Kawakami H, Yokoyama M, Takagi K, Ogawa S, Hara K, Komine M, Yamamoto Y (2015) 9-hydroxy-10-oxo-12(Z),15(Z)-octadecadienoic acid (KODA) enhances adventitious root redifferentiation from *Swertia japonica* callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 51(2); 201-204.

Kawakami H, Hara K, Komine M, Yamamoto Y, Production of secoiridoids by adventitious root culture of *Swertia japonica*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, DOI 10.1007/s11627-015-9686-9.

## 10. 謝辞

本研究は著者が秋田県立大学大学院生物資源科学研究科生物資源科学専攻に在学中、主に同大学生物生産科学科 山本好和教授のご指導のものに行いました。本論文をまとめるにあたり、これまで約 10 年間にわたり、山本好和教授、主査の小峰正史准教授、特別審査員の原光二郎准教授に暖かく激励、ご指導ご鞭撻いただきました。これから社会人として、研究者として生きていく糧となります。ご指導を賜り、心から感謝申し上げます。

また、副査をお引き受けくださり、熱心にご指導くださいました、我彦廣悦教授、水野幸一准教授に心から感謝申し上げます。さらに、日頃より私を気にかけて、激励してくださいました、吉澤結子教授、服部浩之教授、古屋廣光教授、藤晋一教授、藤田直子教授、村田純教授、テリー・リー・ナガハシ教授、櫻井健二准教授、常盤野哲生准教授、修士課程在籍中に深夜まで実験指導くださいました野下浩二助教はじめ、秋田県立大学の多くの先生方に深く感謝申し上げます。

キサントン配糖体の構造決定の分析において明治薬科大学の木下薫博士に熱心にご指導いただきました。心より感謝申し上げます。

KODA 試験に関する研究において横浜市立大学の横山峰幸博士、株式会社資生堂の小川滋之グループリーダー、高木一輝博士にご指導いただき、約 1 ヶ月の資生堂での研修にもご尽力いただき、貴重な勉強の機会をいただきましたことを、深く感謝申し上げます。

細胞懸濁培養系の構築に関して北海道三井化学株式会社の多葉田誉氏に熱心にご指導いただきました。心から感謝申し上げます。

次世代シーケンサーの解析で秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに大変お世話になりました。心から感謝申し上げます。

同期の秋田県立大学 8 期卒業生の皆さんや、植物資源創成システム研究室で共に活動してきた諸先輩方、後輩の皆さんの応援や明るい雰囲気にも励まされ、ここまで来ることができました。本当にありがとうございました。また、山本教授の奥様には、娘のように暖かく応援していただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、日頃私を励ましてくださった恩師や多くの友人の皆様、暖かく見守ってくれた茨城の伯父と伯母、仙台・東京の伯父はじめ親戚の皆様、いつも私の身体を心配してくれた祖父と祖母、どんな時も私を信じ、深い愛情で支え続けてくれた兄と両親に心からの感謝の意を込めて、謝辞と致します。