

氏名	かわかみ ひろこ 川上 寛子
授与学位	博士 (生物資源科学)
学位授与年月日	平成27年9月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科専攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学位論文題目	センブリの組織培養と二次代謝物質産生に関する研究
指導教員	准教授 小峰 正史
論文審査委員	主査 准教授 小峰 正史 副査 教授 我彦 廣悦、准教授 水野 幸一 特別 准教授 原 光二郎、外部 山本 好和

論 文 内 容 要 旨

I. 背景及び目的

センブリは日本固有の民間薬として知られ、主成分として苦味配糖体のセコイリドイドの swertiamarin (SW) や gentiopicroside (GE) を含む。健胃薬として利用される重要な医薬資源であるが、効率的な培養条件や培養物成分、セコイリドイドの生合成に関わる遺伝子の情報は現在まで報告がない。

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、まず組織培養法を確立し、不定根とカルスの効率的培養条件について明らかにし、それぞれのセコイリドイドの産生条件を明らかにした (Ⅱ)。さらに、培養物特有成分の単離構造決定を行った (Ⅲ)。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 (NGS) 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、セコイリドイド産生パターンとの関係性についてモデルを構築した (Ⅳ)。

II. 効率的培養条件とセコイリドイド産生条件の確立

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) を無菌播種して芽生えを発芽させ、芽生えの葉を 3% sucrose, 1% agar, 10 μ M naphthylacetic acid (NAA) と 1 μ M kinetin (KIN) を含む Lloyd McCown Woody Plant 基本培地 (WP, Lloyd & McCown 1981) 固体培地に植え付け、20 $^{\circ}$ 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培地に約 1 ヶ月おきに植え換え、25 $^{\circ}$ C、明条件下で継代培養し、以降の液体培養に用いた。

液体培養において低濃度の植物ホルモンの組み合わせによって不定根が分化し、不定根は SW と GE を産生した。不定根の増殖を促進する培養方法を確立するために、近年発根促進作用が知られる 9-hydroxy-10-oxo-12(Z),15(Z)-octadecadienoic acid (KODA) のカルスへの影響を検討した。KODA の不定根の分化促進効果を固体培養で確認し、至適濃度を明らかにした。次に、より不定根の増殖を高めるため、液体培養での KODA の効果を検証した。培地の金属イオンと反応して KODA は分解するため、10 μ M KODA 溶液にカルスを約 2 秒浸し、固体培地上で 10 日間前培養した。前培養したカルスを 3% sucrose, 0.01 μ M NAA, 0.01 μ M KIN を含む 1/8 WP 液体培地に植え換え、110 rpm、25 $^{\circ}$ C、明条件下で 30 日間振盪培養した。培養物を 10 日おきに回収し、不定根の本数と凍結乾燥後の乾物重を測定した。

不定根の分化は低濃度の NAA が促進する一方、SW や GE の産生は高濃度の KIN が促進し、NAA が阻害した (Figure 1, 2)。さらに、固体培養、液体培養両方の試験区において、10 μ M KODA はカルスからの不定根の分化を促進した (Figure 3)。組織培養物において KODA が不定根の分化を促進した例は本研究が初めての例である。

次に、カルスを継続的に増殖可能な細胞懸濁培養系として 1/8 B5 N5K6 系を構築し、セコイリド産生を促進する化合物と抽出物を 24 種スクリーニングした。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植え換え直後に添加した。培養 14 日後の細胞を回収し、細胞乾燥重量 (mgDW) を測定した。さらに、乾燥したカルス (n=3) の MeOH エキスを作成し、LC-MS 分析により SW 含有量を求めた。

細胞懸濁培養系においてセコイリド産生を促進する条件を明らかにするために、24 種の化合物、抽出物をスクリーニングしたところ、100 μ M NAA、KIN、BA の試験区で細胞増殖が阻害される傾向を示し、NAA 処理試験区でのみ SW が産生された (Figure 4)。これまで NAA 等のオーキシン類はセコイリ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 がストレスとなり、SW を産生したと考えられる。

III. 培養物特有成分の単離構造決定

カルスと不定根は天然植物体に含まれない数種の共通成分を産生した。そこで、不定根を MeOH で抽出し、減圧濃縮して得られた粗抽出物を hexane、ethyl acetate、n-butanol、water の順に分配抽出した。次に n-butanol 層を水に溶解し、silica gel、HP20、ODS それぞれを用いて目的化合物を単離した。単離した化合物の化学構造を NMR、HR-ESI-MS、LC-ESI-MS で機器分析した。

^1H および ^{13}C NMR、HMQC、HMBC、 ^1H - ^1H COSY の結果より、単離した化合物はキサントン骨格の bellidifolin をアグリコンとして、galactose と glucose が 1 位に結合した配糖体構造と推定された。HR-ESI-MS より化合物の分子式は $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ (m/z 597.1446 [M-H] $^-$) と決定した。各機器分析の情報から、カルスと不定根が産生する成分の 1 種を 1-O-galactoglucosylbellidifolin (1, Figure 5) と構造決定した。

センブリにおいて毛状根は bellidifolin と 8-O-primeverosylbellidifolin (2) を産生し (Ishimaru *et al.* 1990a, 1990b)、天然植物体は 2-O-rhamnoxylosylxanthone (3, Jamwal 2012) を産生することが報告されており、1 位に二糖が結合した化合物は初めての報告である。他のセンブリ属植物において二糖が結合したキサントン配糖体は 1-O-xyloglucosylxanthone の 2 種 (4, 5) があり、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。また、カルスがキサントン配糖体を産生することも初めての報告である。

IV. NGS によるセコイリド生合成経路の解明

凍結乾燥したカルスと不定根 (n=2) から RNA を抽出し、全 RNA からライブラリーを作成し、HiSeq 1000 (illumina) で片側 100 bp のペアエンドの塩基配列を読み取った。Trinity プログラムによる *de novo* アセンブルを行い、500 bp 以上のコンティグを発現変動解析に用いた。その後、Trinotate で得られた全コンティグのアノテーションを行い、セコイリド生合成に関与すると予想される遺伝子を特定した。

NGS を用いてカルスと不定根において *de novo* RNA-seq 解析を行い、転写産物を示すアイソフォームにおいては、500 bp 以上の長さのコンティグは 151,667 個あり、0.3% の遺伝子に 4 倍以上の発現比があり、その他大多数の遺伝子はカルスと不定根で共通して発現している遺伝子だった。また、発現量に差のある遺伝子はそれぞれ半数がカルスと不定根に特有であり、不定根特有遺伝子の 67% が機能付けされた。機能付けされた遺伝子の中で、細胞壁の生成に機能する Proline rich protein が高い発現比を示した。さらに、セコイリド生合成への関与が予想されるセコロガニン合成酵素 (SLS)、シトクローム P450 遺伝子 (P450)、WRKY 転写調節因子 (WRKY) を特定した。

SW 産生パターンと目的遺伝子の発現パターンを比較するために、センブリ植物体の各部位、葉、莖、根、花 (n=3) とカルスと不定根 (n=2)、さらに II において SW 産生パターンに差があった細胞懸濁培養系より NAA、IBA 処理、無処理の細胞 (n=3) の合計 9 試

験区の材料から RNA を抽出し、得られた RNA を半定量 PCR に供して $\Delta\Delta Ct$ 法により相対発現比を算出した。目的遺伝子 8 種をそれぞれ Sj~と命名した。それぞれの遺伝子の Ct 値はハウスキーピング遺伝子の GAPDH の Ct 値で補正した。

各試験区において、目的遺伝子の発現パターンと SW 産生パターンを比較した結果、SjSLS-1 と 3 が SW 産生パターンとの相関を示し、SjSLS-1 は天然植物体と培養物共通に根で特異的発現を示した。また SjSLS-3 は NAA によって発現が促進された (Figure 6)。P450 遺伝子は天然植物体と培養物間で発現する遺伝子が異なり、それぞれ SjP450-2 と SjP450-3 が SW 産生パターンと相関を示し (Figure 7)、SW 合成遺伝子 (SS) と推定した。SjWRKY-1 と 2 は SW 産生パターンと相関を示す傾向があり、SW 生合成を制御することが示唆された (Figure 8)。天然植物体の花においては別の転写調節因子が関与している可能性が考えられた。以上をまとめ、セコイリド生合成に関与すると予想される遺伝子を特定し、セコイリド産生パターンの関係性についてモデルを構築した (Figure 9)。

V. 総括

本研究ではまず組織培養法を確立し、不定根とカルスの効率的培養条件とセコイリドの産生条件を明らかにした。カルスと不定根において、増殖と成分産生を促す条件は相反しており、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。

KODA による不定根の分化促進作用は本研究が初めての報告である。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薬用植物の栽培や組織培養における生薬生産の効率化にも貢献できる。

天然植物体が産生する成分を組織培養物が産生しない現象は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。センブリはカルスに脱分化した際にセコイリドを産生しない一方、キサントン配糖体を産生したため、キサントン生合成は脱分化によって阻害されないことがわかった。セコイリ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で産生されるが、この 2 つの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ることが示唆される。本研究において、NGS によるセコイリド生合成遺伝子が推定された他、加えて分化に関与する遺伝子も数種予想された。今後、生合成遺伝子と分化遺伝子の相互作用という観点で解析を進めることで、将来的に機能分化と器官分化の関係性解明という組織培養分野において長年の疑問について明らかになるだけでなく、その成果は、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することが期待される。

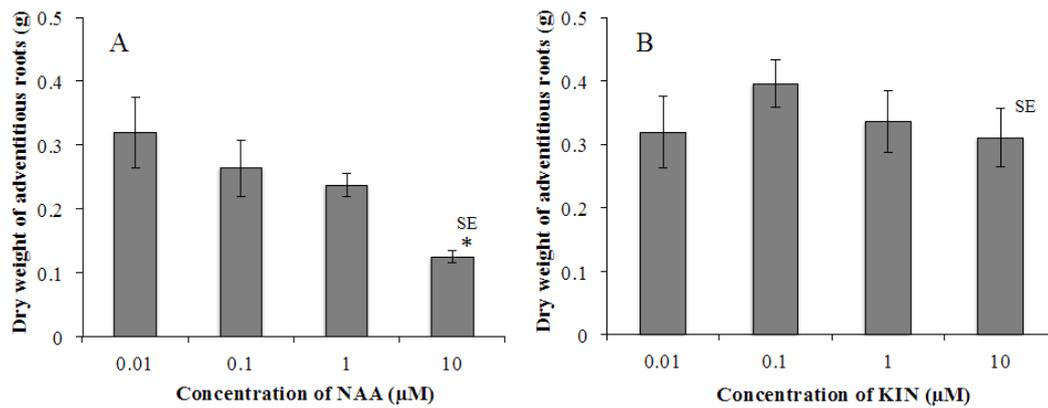


Figure 1 Effects of NAA (A) and KIN (B) on the growth of adventitious roots. Differences of the dry weight on various concentration of phytohormone were compared using *t*-test ($*P < 0.05$). Error bars in (A) and (B) indicate standard error (SE).

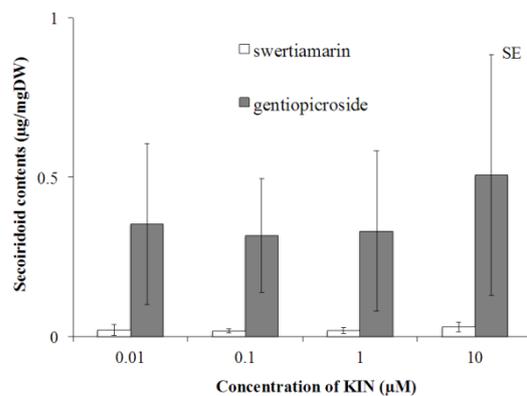


Figure 2 Effects of KIN on the secoiridoid production in adventitious roots. Error bars in graph indicate standard error (SE).

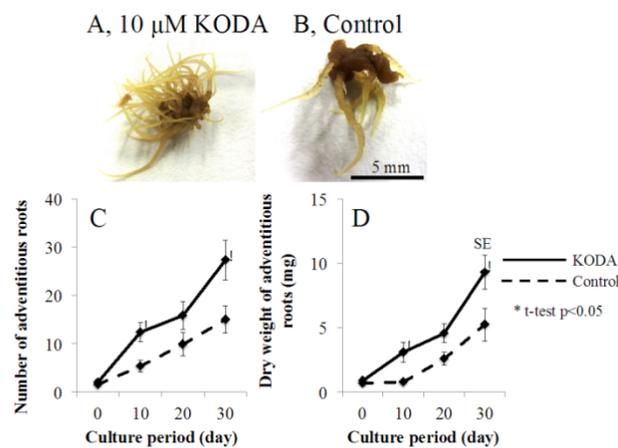


Figure 3 Effects of KODA on redifferentiation of adventitious roots from calli in liquid culture. Representative samples of 10 μM KODA-treatment (A) and control (B) in 30 day-cultures are shown. The number of adventitious roots was counted after lyophilized, and the dry weight of it was measured. Time courses of the number (C) and the dry weight (D) of adventitious roots in liquid culture were compared between control and 10 μM 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).

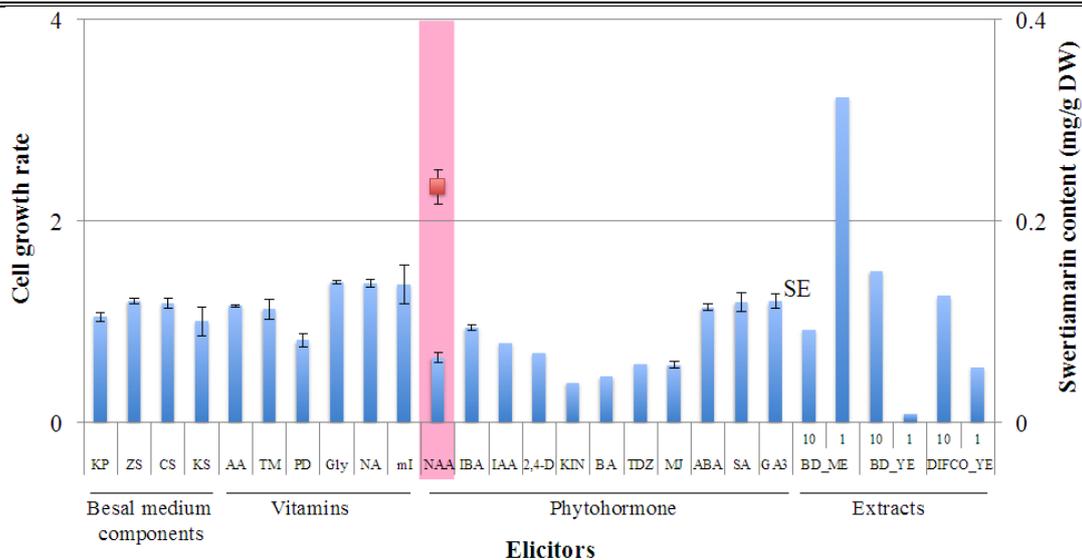


Figure 4 Effects of treatment of various compounds and extracts on cell growth rate and swertiamarin production. Blue bar graph shows cell growth rate, and red marker shows swertiamarin content. Error bars indicate standard error (SE).

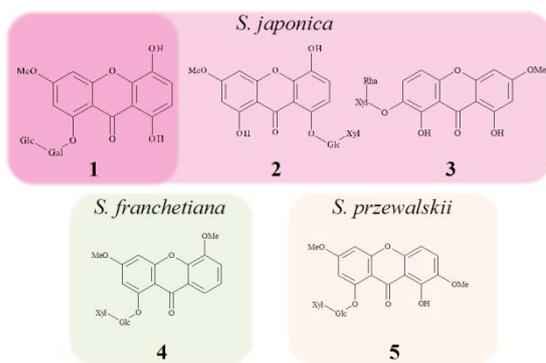


Figure 5 Structures of xanthone diglycosides isolated from Swertia plants. 1-O-galactoylucosylbellidifolin (1) was isolated from adventitious roots of *S. japonica*. 8-O-primeverosylbellidifolin (2) and 1,8-dihydroxy-2-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-6-methoxyxanthone (3)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

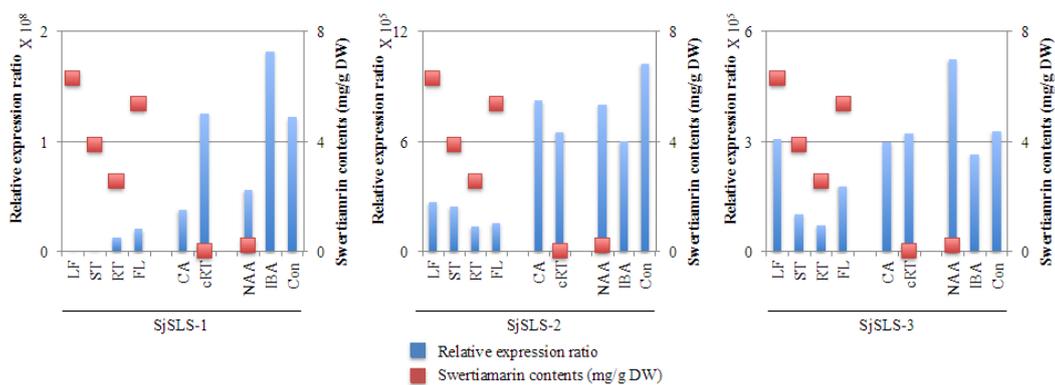


Figure 6 Comparison of relative expression ratio of SjsLS-1, SjsLS-2 and SjsLS-3.

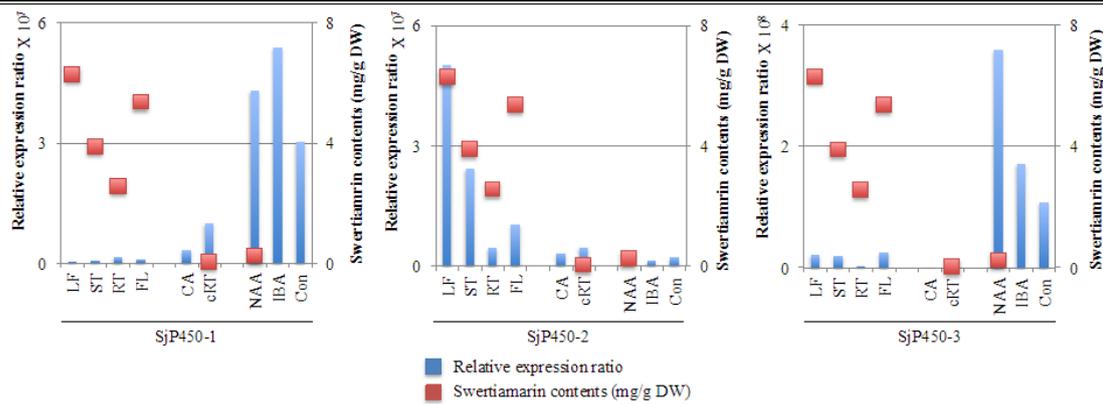


Figure 7 Comparison of relative expression ratio of Sjp450-1, Sjp450-2 and Sjp450-3.

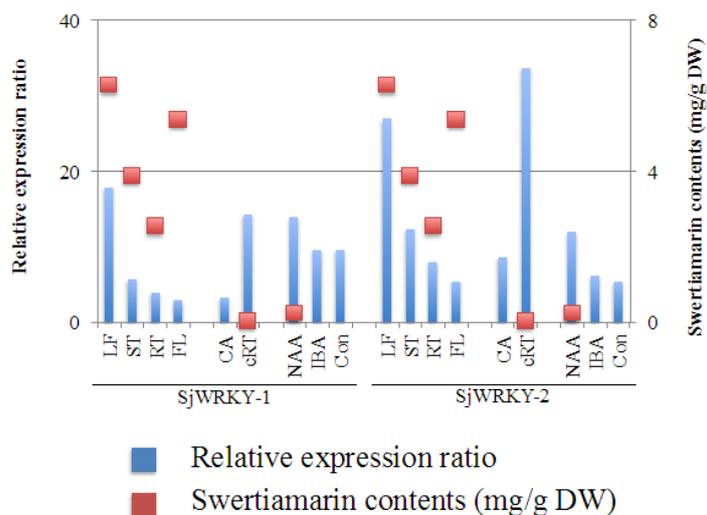


Figure 8 Comparison of relative expression ratio between SjWRKY-1 and SjWRKY-2.

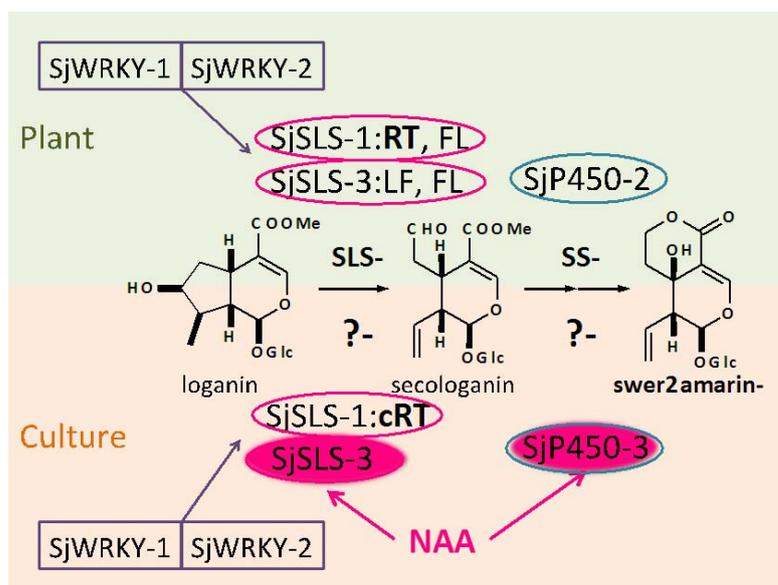


Figure 9 Summary of effects of tissue and hormone regulator on differential gene expression in the predicted secoiridoid biosynthesis.

論文審査結果要旨

本研究は、これまで組織培養の事例がほとんどない薬用植物センブリを対象に、組織培養によって有用成分であるセコイリドイドの swertiamarin (SW) や gentiopicoside (GE) の大量生産系構築を目的としている。研究は、カルスおよび不定根の効率的組織培養条件の解明、大量生産に適した細胞懸濁培養系の確立、培養物特有成分の単離構造決定、および次世代シーケンサーを用いたセコイリドイド生合成経路の解明から構成されている。

センブリ培養物は液体培養において低濃度の植物ホルモンの組み合わせによって不定根が分化し、SW と GE を産生した。そこで、不定根による有用物質産生に最も効率的な培養条件を解明するために、発根促進作用をもつ KODA と各種植物ホルモンを培地に添加して培養し、比較を行った。その結果、 10^{-6} M の KODA 添加がカルスからの不定根分化を促進し、SW と GE の産生は高濃度の kinetin で促進され、NAA で阻害された。組織培養物における KODA の不定根分化促進効果は本研究で初めて明らかとなった。

つぎに、より効率的な培養生産が可能な細胞懸濁培養の確立を試み、1/8 倍濃度 B5 培地に $NAA 10^{-5}$ M, kinetin 10^{-6} M を加えた培養条件で安定した培養系が実現できた。さらにセコイリドイド産生を促進する条件をスクリーニングし、NAA 処理で SW が産生されることを明らかにした。細胞懸濁培養系における SW 産生は本研究において初めて実現された。

センブリのカルスと不定根は天然植物体には含まれない培養物特有成分を産生した。そこで培養物の二次代謝系解明の一環として最も産生量の多い成分を単離し、1-O-galactoglucosylbellidifolin と構造決定した。センブリ属培養物からキサントン配糖体を見出したのは本研究が初めてであり、また、1 位に二糖が結合した化合物もセンブリ属では初めて見つかった。

最後に、遺伝子工学的手法によって物質生産性向上をはかるため、カルスおよび不定根から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる *de novo* RNA-seq 解析で、セコイリドイド産生への関与が予想される遺伝子を特定した。解析の結果、発現量に差がある遺伝子はそれぞれ半数がカルスと不定根に特有であり、不定根特有遺伝子の中では、細胞壁生成に機能する Proline rich protein が高い発現比を示し、更にセコイリドイド生合成への関与が予想されるセコロガニン合成酵素 (SLS)、シトクローム P450 遺伝子 (P450)、WRKY 転写調節因子 (WRKY) を特定した。さらに、SW 産生パターンが異なる数種のサンプルから RNA を抽出し、半定量 PCR で $\Delta\Delta Ct$ 法により相対発現比を算出して SW 産生パターンと比較し、セコイリドイド産生に関与すると予想される複数の SLS, P450 を見出し、2 つの WRKY 転写調節因子が SW 生合成の制御に関与することを示唆する結果を得た。

本研究により、これまで研究例がほとんどなかったセンブリについて実用的培養手法や二次代謝に関する多くの新規知見が得られ、薬用植物の組織培養による成分大量生産系構築に至る方法論を示した点で意義深い研究となった。

博士学位論文公開審査会は 2015 年 5 月 27 日におこなわれ、その後、審査員 5 名による審査の結果、論文の内容は博士の学位論文として十分であり、公開審査会における発表及び質疑応答も十分な内容であったため、博士の学位を授与するに妥当であると判断した。