

平成30年6月7日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18886

研究課題名(和文) アルツハイマー病治療薬創製を志向した新規天然物リガンド生物合成システムの確立

研究課題名(英文) Establishing a new natural product ligand biosynthesis system for producing therapeutic agents for Alzheimer's disease

研究代表者

浅野 孝 (ASANO, TAKASHI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：10552888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は原因不明の疾病で完治が不可能であるため、症状の進行を遅らせるための薬の開発が数多く行われており、複数のアルカロイドの有効性が報告されている。本研究では、ヒガンバナアルカロイドとキノリチジンアルカロイドに注目し、効果的なアルツハイマー病治療薬を創り出す基盤として、キノリチジンアルカロイド生合成遺伝子を過剰発現した毛状根培養系を確立し、さらに、ヒガンバナ科植物の球根りん片からアルカロイド生産植物内生菌を単離することができた。

研究成果の概要(英文)：The cause of Alzheimer's disease is still unclear, so it cannot be completely cured. Most drug development is focused on delaying the progression of symptoms, and researchers have demonstrated the effectiveness of multiple alkaloids in this capacity. This study was focused on Amaryllidaceae and quinolizidine alkaloids. We established hairy root cultures that overexpresses quinolizidine alkaloid biosynthesis genes to provide a foundation for the production of effective therapeutic agents for Alzheimer's disease. We were also able to isolate alkaloid-producing endophyte from the bulb scales of a plant in the family Amaryllidaceae.

研究分野：天然医薬資源学

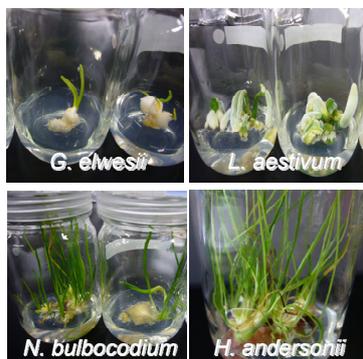
キーワード：毛状根 植物内生菌

1. 研究開始当初の背景

日本における高齢化問題は深刻なものとなっており、それに付随して問題となっている疾患として『認知症』があげられる。その中でも『アルツハイマー型認知症』の割合は近年増加しており、患者数は世界で2,000万人以上と言われている。アルツハイマー病の原因は未だ不明であり、完治も不可能であるため、いかに症状の進行を遅らせるかが重要である。しかし、症状の進行を劇的に抑えられる特効薬は未だ存在せず、様々なアプローチでのアルツハイマー病治療薬開発が急務な課題であると言える。

アルツハイマー病の治療としては、脳内のアセチルコリンレベルの低下を防ぐことを目的として、「アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害薬」の塩酸ドネペジル (商品名: アリセプト) やガランタミン臭化水素酸塩 (商品名: レミニール) などが日本国内で保険適応を受けて使用されている。このアルツハイマー病治療薬として重要な役割を果たしている『Galanthamine』は、天然植物由来アルカロイド成分であり、ヒガンバナ科植物に広く含有することが報告されている。『Galanthamine』はAChE阻害作用に加えてニコチン性アセチルコリン受容体に対するアロステリック活性リガンド作用を併せ持つことが明らかにされているため、ヒガンバナ科に含有されるアルカロイド (ヒガンバナアルカロイド) は新規アルツハイマー病治療薬開発において重要な化合物群であると考えられる。また、ヒガンバナアルカロイドとは異なり、免疫系に作用することによりアルツハイマー病の認知機能障害に対する改善効果が期待される『Matrine』に代表されるキノリチジナルカロイドも、重要な化合物群であると考えられる。

無菌植物体



カルス



本研究グループは、従来からヒガンバナ科植物の培養細胞系を用いたアルカロイド生産に着目し研究を進めており、4種のヒガンバナ科無菌植物体 (*Galanthus elwesii*、*Leucojum aestivum*、*Narcissus bulbocodium*、*Habranthus andersonii*) に Galanthamine、Lycorine、Crinine の3タイプのヒガンバナアルカロイドが植物種及

び部位毎に特徴を持って蓄積していることを明らかにしている。さらに、*N. bulbocodium* 無菌植物体の小球からカルスを誘導し、このカルスにはアルカロイドがほとんど含まれていないことを確認している。

2. 研究の目的

本研究では、毛状根及び再生植物体を研究の根幹に据え、そこに代謝物と遺伝子発現の解析を相乗的に組み合わせることにより、以下の点を明らかにすることを目的とする。

- (1) アルツハイマー病に効果を示すアルカロイドの効率的生産を可能にする形質転換体培養系を確立する。
- (2) アルツハイマー病に効果を示すアルカロイドの生合成関連候補遺伝子の発現を制御した毛状根及び再生植物体の代謝物変動解析を行うことにより、生合成に関与する遺伝子の機能及び中間体の構造を明らかにする。
- (3) 生合成機構の改変に基づく非天然型化合物をも含めた天然物リガンドの自由自在な生物合成システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) *Galanthus elwesii*における形質転換方法の確立

G. elwesii 無菌植物体からカルスを誘導した後、超音波を利用したアグロバクテリウムの感染により、形質転換体の誘導を行う。

(2) ヒガンバナ科無菌植物体のトランスクリプトーム解析によるアルカロイド生合成遺伝子の探索

N. bulbocodium において、アルカロイドを蓄積する無菌植物体とアルカロイドをほとんど含まないカルスを材料として、次世代シーケンサーを用いた発現遺伝子の網羅的解析を行う。

(3) ヒガンバナ科植物におけるアルカロイド生産内生菌の探索

カルスや毛状根等の植物細胞系に代わる新たなアルカロイド生物合成システムとして、*N. bulbocodium* の球根りん片を材料に、ヒガンバナアルカロイド生産植物内生菌の探索を行う。

(4) ルピナス属植物における毛状根培養系の確立

キノリチジナルカロイドの生合成研究基盤構築のため、ホソバルピナスを用いて、超音波を利用した方法による毛状根の誘導を行う。

(5) ホソバルピナスにおけるキノリチジンアルカロイド生合成遺伝子過剰発現毛状根の解析

キノリチジンアルカロイドの生産制御のため、生合成経路の上流に位置し、リシンをカダベリンに変換する酵素であるリシン脱炭酸酵素 (LDC) の遺伝子を過剰発現させた毛状根の誘導及び解析を行う。

4. 研究成果

(1) *G. elwesii* 無菌植物体を地上部、小球、根に切り分けた後、各切片をカルス誘導用固形培地 (MS、3%ショ糖、5 μ M 2,4-D、0.5 μ M または 5 μ M BA、0.2%ゲルライト、pH 5.7) に置床し、25°C、暗所下で培養した結果、約 2 週間後に小球と根よりカルスを誘導することができた。次に、*G. elwesii* の小球及び根より誘導したカルスを切り出し、*A. rhizogenes* 15834 の懸濁液 (1/2MS、3%ショ糖、0.02% SILWET L-77、100 μ M または 200 μ M アセトシリンゴン) に浸け、30 秒間超音波処理を行った。そして、上記の *A. rhizogenes* 懸濁液を予め湿らせたろ紙の上にカルスを置き、5 分間真空処理を行った後、共存用固形培地 (1/2MS、3%ショ糖、100 μ M または 200 μ M アセトシリンゴン、0.3%ゲルライト、pH 5.7) に置床し、25°C、暗所下で 3 日間共存培養を行った。次に、共存培養を行ったカルスを除菌用固形培地 (1/2MS、3%ショ糖、200 mg/L クラフォラン、100 μ M または 200 μ M アセトシリンゴン、0.3%ゲルライト、pH 5.7) に移し、25°C、暗所下で 6 週間以上培養して除菌を行った。最後に、カルスから再生した小球を継代用固形培地 (MS、3%ショ糖、10 μ M NAA、0.5 μ M カイネチン、0.2%ゲルライト、pH 5.7) に移して培養を行った結果、再生植物体を得ることができた。再生植物体の根からゲノム DNA を抽出し、PCR 法を用いて *A. rhizogenes* 由来の *rol* 遺伝子の有無を調べることにより、再生植物体が形質転換体であることを確認出来た。

(2) *N. bulbocodium* のカルス及び無菌植物体の地上部と根それぞれから RNA を抽出した後、ライブラリー調製を行い、Illumina 社製次世代シーケンサー (HiSeq 1000) を用いて RNA-Seq 解析 (リード長 100 bp、ペアエンド法) を行った。得られたリードは試料毎にアセンブルプログラム Trinity を用いて Contig 配列を作成した後、Blast 検索によりアノテーション情報を取得した。また、Bowtie を使用してリード配列のマッピングを行うことにより、遺伝子発現定量を行った。その結果、根で優位に発現する遺伝子としてヒガンバナアルカロイド生合成に関与するチロシン脱炭酸酵素のホモログ遺伝子を抽出することができた。

(3) *N. bulbocodium* のりん片を中性洗剤希釈液にて洗浄後、70%エタノールで 1 分間、5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 5 分間、さらに 70%エタノールで 30 秒間の順序で殺菌処理を行った。殺菌したりん片から 1 cm 四方の切片を得て、水ゲルライト培地 (1.5%ゲルライト) に置床し、30°C、暗所下で培養した。その結果、約 40 日後に 1 切片から菌体を分離させることができた。得られた菌体を、クロラムフェニコール (100 mg/L) 含有ポテトデキストロース寒天培地に移植し、継代培養を行なった。次に、菌体をポテトデキストロース液体培地に移植し、28°C、200 rpm で 4 日間振盪培養した後、菌体のみを収穫し、70%エタノールを用いて成分抽出を行なった。得られた抽出液を精密質量が測定可能な LCMS-IT-TOF を用いて分析した結果、Galanthamine と同じ精密質量を持つが、保持時間が異なるピークを検出することが出来た。

(4) ホソバルピナスの種子を、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて殺菌後、1/2MS 固形培地 (1%ショ糖) に置床し、20°C、16 時間明期、8 時間暗期で 4 日間培養することにより、無菌植物体を得た。得られたホソバルピナスの無菌植物体から幼根のみを切り出し、*A. rhizogenes* 15834 の懸濁液 (1/2MS、3%ショ糖、0.02% SILWET L-77、200 μ M アセトシリンゴン、2.4 μ M NAA) に浸け、30 秒間超音波処理を行った。そして、*A. rhizogenes* 懸濁液を予め湿らせたろ紙の上に切片を置いて真空処理を行った後、20°C、暗所下で 3 日間共存培養を行うことにより感染を成立させた。次に、共存培養を行った切片を、メロペネム (50 mg/L) を含む除菌用固形培地に移し、25°C、暗所下で約 10 週間培養して除菌を行った。その結果、ホソバルピナスの幼根から、継代可能な不定根を誘導できた。この継代可能なホソバルピナス不定根からゲノム DNA を抽出し、PCR 法を用いて *rol* 遺伝子の存在を検討した結果、得られた不定根が毛状根であることを確認出来た。

(5) 1/2MS (1%ショ糖) 固形培地に置床し、20°C、16 時間明期、8 時間暗期で 4 日間培養し、得られた無菌植物体から幼根のみを切り出した。この幼根の切片を、ホソバルピナス由来 LDC 遺伝子の ORF を含む過剰発現用バイナリーベクターを導入した *A. rhizogenes* 15834 の懸濁液 (1/2MS、3%ショ糖、0.02% SILWET L-77、200 μ M アセトシリンゴン、2.4 μ M NAA) に浸けた。そして、30 秒間の超音波処理、さらにろ紙上に移して 5 分間の真空処理を施した後、20°C、暗所下で 3 日間共存培養を行って感染を成立させた。共存培養後の切片は、メロペネム (50 mg/L) を含む除菌用固形培地に移し暗所下で約 11 週間培養して完全に除菌を行った後、1/2MS (3%

ショ糖) 固形培地で約 5 週間、さらに 1/2MS (3%ショ糖、1 mg/L ジベレリン A3) 固形培地で約 1 ヶ月間継代培養することにより毛状根を 7 クローン得た。得られた毛状根について、半定量的 RT-PCR による目的遺伝子の発現解析と、LCMS-IT-TOF によるカダベリンの分析を行った結果、LDC の発現が大きく上昇した毛状根において、カダベリンの蓄積が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 浅野孝
植物と微生物の共生によるアルカロイド生合成研究の新展開
ファルマシア (日本薬学会), **53**, 1113 (2017)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 中林亮、Amit Rai、森哲哉、西澤具子、橋本恵、浅野孝、須藤浩、豊岡公德、鈴木秀幸、斉藤和季
次世代型統合メタボロミクスによるアスパラプチン生合成の解明
第 59 回日本植物生理学会年会 (札幌)、2018 年 3 月 30 日
- ② 佐々木万里、浅野孝、加賀由莉奈、山崎真巳、斉藤和季、藤井勲
ラッセルルピナスにおける毛状根培養系の確立
日本薬学会第 138 年会 (金沢)、2018 年 3 月 27 日
- ③ 菅原明莉、浅野孝、藤村優、藤井勲
ニチニチソウにおける植物内生糸状菌の探索
日本薬学会第 138 年会 (金沢)、2018 年 3 月 27 日
- ④ 浅野孝、菅原明莉、谷口敦哉、竹澤信也、藤井勲
ハナトリカブトにおける植物内生糸状菌の探索
日本薬学会第 138 年会 (金沢)、2018 年 3 月 27 日
- ⑤ 浅野孝、菅原明莉、谷口敦哉、藤井勲
クララにおける植物内生糸状菌の探索
第 56 回日本薬学会東北支部大会 (青森)、2017 年 10 月 21 日
- ⑥ 浅野孝、及川栞里、佐々木万里、山崎真巳、斉藤和季、藤井勲
ホソバルピナスにおけるキノリチジンアルカロイド生合成遺伝子過剰発現毛状根の解析
日本生薬学会第 64 回年会 (千葉)、2017 年 9 月 9 日

- ⑦ 浅野孝、及川栞里、佐々木万里、山崎真巳、斉藤和季、藤井勲
ホソバルピナスにおける毛状根培養系の確立
第 35 回日本植物細胞分子生物学会 (さいたま)、2017 年 8 月 29 日
- ⑧ 及川栞里、加賀由莉奈、浅野孝、山崎真巳、斉藤和季、藤井勲
ホソバルピナスにおける毛状根培養系の確立
日本薬学会第 137 年会 (仙台)、2017 年 3 月 26 日
- ⑨ 谷口敦哉、浅野孝、藤井勲
ヒガンバナ科植物におけるアルカロイド生産内生菌の探索
日本薬学会第 137 年会 (仙台)、2017 年 3 月 26 日
- ⑩ 浅野孝、大信田真生、小野寺蓮、中山貴博、藤井勲
ヒガンバナ科無菌植物体のトランスクリプトーム解析によるアルカロイド生合成遺伝子の探索
日本生薬学会第 63 回年会 (富山)、2016 年 9 月 25 日
- ⑪ 浅野孝、大信田真生、小野寺蓮、藤井勲
ヒガンバナ科無菌植物のトランスクリプトーム解析
日本薬学会第 136 年会 (横浜)、2016 年 3 月 28 日
- ⑫ 浅野孝、中山由加里、加賀由莉奈、齋藤晴香、藤井勲
ヒガンバナアルカロイド生産植物 *Galanthus elwesii* における形質転換方法の確立
日本生薬学会第 62 回年会 (岐阜)、2015 年 9 月 11 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 孝 (ASANO, TAKASHI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号: 10552888