

ウスバサイシンにおけるアリストロキア酸の蓄積機構の解明

研究者氏名	講師 寺坂 和祥
日本所属機関	名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学
中国研究者氏名	教授 袁 丹
中国所属機関	瀋陽薬科大学中薬学院

要 旨

生薬サイシン（細辛）は、温裏祛寒薬として小青竜湯や麻黄附子細辛湯など汎用性の高い漢方処方に配合される重要な生薬の一つであり、その基原は、ウマノスズクサ科に属するウスバサイシンまたはケイリンサイシンの根もしくは根茎である。ウスバサイシンの地上部には重篤な腎機能障害を引き起こすアリストロキア酸が含有されており、日本薬局方では純度試験で地上部の混入を規制している。アリストロキア酸は、チロシンを出発原料とするベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイドであるが、その生合成や蓄積に関わる知見はほとんどなかった。そこで本研究では、ウスバサイシンにおけるアリストロキア酸蓄積機構を解明することを目的とした。まず、ウスバサイシン植物体の葉部の HPLC 分析を行った結果、アリストロキア酸 I が含まれることが明らかとなった。続いて、この葉部由来の培養細胞系を作出するため、カルス誘導を行った結果、カルス培養系を確立した。さらに、ベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイド生合成系の酵素遺伝子のクローニングを試み、ホモロジーベースのクローニング法により、チロシン脱炭酸酵素と相同性を有する遺伝子断片を得た。

Key Words アリストロキア酸、ウスバサイシン、植物培養細胞、遺伝子クローニング

緒 言：

生薬サイシン（細辛）は、ウマノスズクサ科の多年草であるウスバサイシン（*Asarum sieboldii*）（Fig.1）およびケイリンサイシン（*Asarum heterotropoides*）の根および根茎を基原とする生薬である。サイシンは、沈静、鎮痛、解熱、鎮咳、去痰作用を持ち、汎用性の高い漢方処方である麻黄附子細辛湯や小青竜湯等に配合される重要な生薬の一つである。中国では、細辛の用部は全草であり、中国市場においてウスバサイシンは地上部を含むものとして流通している。ところが、地上部には腎障害を起こすアリストロキア酸（aristolochic acid）が含まれることが報告されている。これまでに中国由来の生薬に含まれるアリストロキア酸により、世界各地で腎障害の発生が報告されており、CHN（Chinese-herb nephropathy）もしくは AAN（Aristolochic acid nephropathy）と呼ばれている⁽¹⁾。また、バルカン地方にみられたバルカン腎症もアリストロキア酸が原因であるとされている。そこで、日本では地上部は使用されず、日本薬局方においても純度試験により地上部の混入を規制している。



Fig. 1 ウスバサイシン植物体

アリストロキア酸は、チロシンを出発物質とするベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイドの構造を有している。ベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイドは植物アルカロイドの1つの大きなグループを形成し、この中には、モルヒネやベルベリン等の現在有用とされている医薬品材料として重要な化合物も多い。ベンジルテトラヒドロイソキノリンアルカロイドの生合成経路は、2分子のチロシンを出発物質として、脱炭酸されて生成するドパミンと、アミノ基転移反応を経て生成する4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドが縮合して生成する(S)-ノルコクラウリンを共通の前駆体としている。その後、水酸化とメチル化を受けて生成する(R)-レチキュリンからはモルヒネが、(S)-レチキュリンからはベルベリンが生成さ

れる。これらの生合成経路は化合物の有用性から多くの研究がなされてきた⁽²⁻⁵⁾。しかしながら、(S)-ノルコクラウリンから数段階を経て生成する (R)-オリエンタリンを前駆体とするアリストロキア酸の生合成についての知見はほとんどない (Fig. 2)。

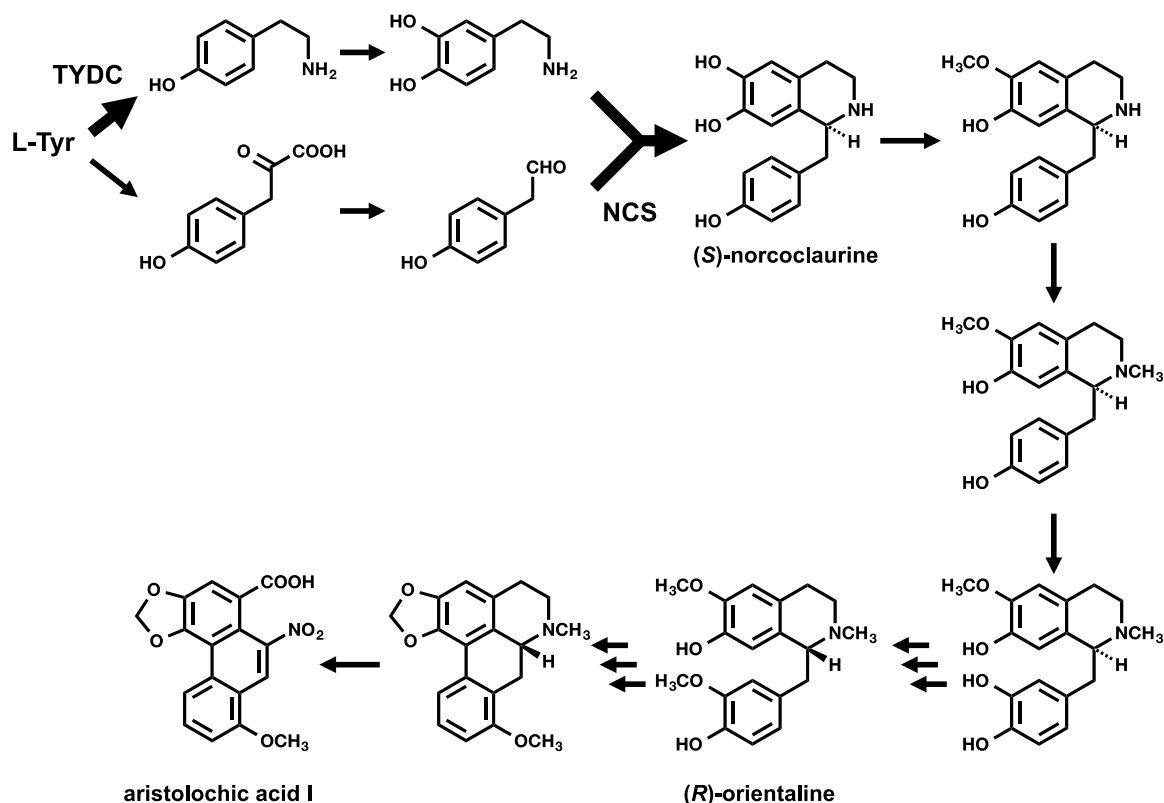


Fig. 2 アリストロキア酸の推定生合成経路

TYDC, チロシン脱炭酸酵素

NCS, ノルコクラウリン合成酵素

また、アリストロキア酸はウスバサイシンの地上部にしか含有されないことから、アリストロキア酸の植物体内での分布の制御は生合成もしくは輸送の段階で行われているものと考えられるが、詳細は不明であり、研究もほとんどなされていない。そこで、本研究では、ウスバサイシンを材料として、アリストロキア酸の蓄積機構の解明を目指した。

実験方法：

1. 植物材料

ウスバサイシン植物体は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターより分与していた。室温 (20~25℃)、14 時間明期 - 10 時間暗期の植物培養棚で生育維持した。

2. ウスバサイシン植物体葉部のメタノール抽出液の HPLC 分析

ウスバサイシン葉部 0.11g (新鮮重) を液体窒素中で凍結粉碎し、メタノール 1 mL + 1 M HCl 100 μL を加え、30 分間超音波抽出を行った後、遠心分離した。上清を取り、濃縮乾固した後、MeOH 500 μL で再溶解し 10 μL を分析に用いた。

3. 植物体葉部からのカルス誘導

ウスバサイシンの葉部を切り取り、水洗後 70%エタノールに 30 秒間浸し、滅菌水で 6 回すすいだ。クリーンベンチ内で次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度: 8.5~13.5%) : 水 = 1 : 2 の混合液に 12 分間浸した後、滅菌水で 6 回すすいだ。オートクレーブ済のキムタオルで表面の水気を取り、滅菌済のメスで 1 cm 角程度に切り、培地に静置し、25℃で培養した。

4. ウスバサイシンからの遺伝子クローニング

ウスバサイシンの葉部 0.2 g (新鮮重) より、Plant total RNA Mini (VIOGENE) を用いて total RNA を抽出した。

3'-末端の増幅に用いた cDNA は、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いて、5'-末端の増幅に用いた cDNA は、SMARTer[®]RACE 5'/3' kit (TaKaRa Bio) を用いて添付プロトコールに従って cDNA を合成した。

3'-末端の増幅には、複数の植物種の TYDC および NCS のアミノ酸配列を比較し、保存された配列から TYDCs_Fw1 (5'-ACNCAYTGGCARWSICCNAAAYT-3')、TYDSs_Fw2 (5'-CAYGTNGAYGCNGCNTAYGC-3')、TYDCs_Fw3 (5'-GAYTAYAARGAYTGGCARAT-3')、NCSs_Fw1 (5'-GTNTTYGARAARYTIGAYGTNAT-3')、NCSs_Fw2 (5'-ATGATMGARGGNGGNTAYYTIGAYAT-3') を用いて、PCR 反応を行い、増幅された DNA 断片の配列を解析した。

結 果：

1. ウスバサイシン植物体に含まれるアリストロキア酸の分析

ウスバサイシン植物体の地上部にはアリストロキア酸が含まれているとされるが、植物体の生長段階や生育条件との関係は明らかではない。本研究で遺伝子源とする植物体にアリストロキア酸が含まれていない場合、生成に関与する遺伝子の発現も低い可能性が高く、遺伝子の単離に適さない。そこで、まずウスバサイシン植物体の葉部のメタノール抽出液を調製し、HPLC で分析を行った。その結果、アリストロキア酸 I、II の標品の保持時間および吸収スペクトルから、本研究で用いたウスバサイシン植物体の葉部には、微量ではあるがアリストロキア酸 I が含有されていた (Fig. 3)。

2. ウスバサイシン葉部のカルス誘導と生育条件の探索

ウスバサイシンには上胚軸休眠種子と呼ばれる特性があり、植物体が種子を飛散させる状態になっていても、種子内部の胚は十分に成熟していない。したがって、種子を得ても、発芽させるには追熟処理が必要となる。そのため、研究を行うにあたり継続的に植物材料を得るには、培養細胞系を用いる方が簡便であると考えた。そこで、ウスバサイシンのカルス誘導を行うこととした。ウスバサイシン葉部の表面殺菌を行った後、植物ホルモンの NAA および BA を 1~100 μ M の間で濃度を変化させた、MS 培地または LS 培地に静置した。その結果 100 μ M の NAA と 1 μ M の BA を含む LS 培地においてカルスの形成が確認出来た (Fig. 4)。

3. TYDC および NCS 遺伝子の cDNA クローニング

ウスバサイシンからのカルス誘導に想定以上に時間がかかったことから、アリストロキア酸輸送体の性質を検討し、候補となる輸送体を絞り込むことは難しいと考え、アリストロキア酸生合成酵素遺伝子の単離を行うこととした。ウスバサイシンからのアリストロキア酸生合成酵素遺伝子の単離にあたり、データベースに配列情報がほとんどなかったことから、ホモロジーベースのクローニングを行うことにした。まず、モルヒネやベルベリン生合成の研究から、比較的配列情報の多かった TYDC と NCS をターゲットとすることにした。TYDC は L-チロシンからチラミン、もしくは L-DOPA からドパミンを合成する反応に関与する酵素でありチロシン由来のアルカロイド生合成の初発段階に関わる重要な酵素である。NCS は 4-

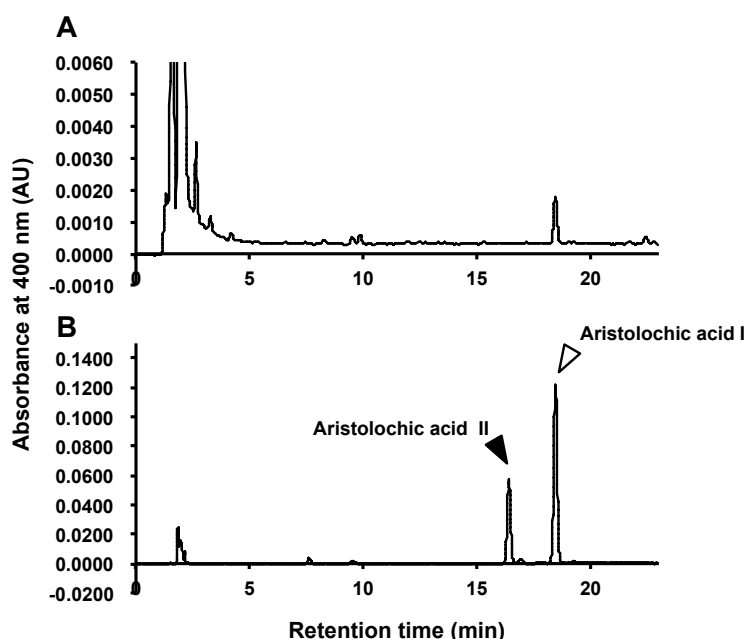


Fig. 3 ウスバサイシン葉部メタノール抽出液のHPLC分析
ウスバサイシン植物体の葉部をメタノール抽出し、HPLCで分析した。
A, ウスバサイシン植物体葉部のメタノール抽出液
B, アリストロキア酸 I, II



Fig. 4 ウスバサイシン葉部より誘導したカルス
ウスバサイシン植物体の葉部を表面殺菌し、
切断した後、LS培地に置床した。25℃暗黒
下で培養し、約4週間おきに継代した。ス
ケールバーは1 cm。

ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドとドパミンからノルコクラウリンを生成する反応を触媒する酵素で、ベンジルテトライソキノリンアルカロイドの基本骨格形成に重要な役割を果たしている。これらの酵素はアリストロキア酸生合成に特異的ではないと考えられるものの、ベンジルテトライソキノリンアルカロイド生合成経路に特異的であることから、生合成調節に関する重要な情報が得られると考え、まずはこれらの酵素遺伝子の単離を行うこととした。

ウスバサイシン植物体の葉部から抽出した total RNA を元に cDNA を調製し、その cDNA を鋳型として degenerate primer を用いた 3'-末端側の増幅を試みた。その結果、目的のサイズに増幅が見られ、このバンドを単離し、配列を確認したところ、既知の TYDC と相同性のある 1 種類の遺伝子配列が得られた。引き続いて、得られた 3'-末端側の配列を元にプライマーを設計し、5'-末端側の増幅を試みたものの、現在までのところ、配列は得られていない。一方、NCS については保存配列が少なく 3'-末端側も得られていない。

考 察：

本研究では、ウスバサイシンにおけるアリストロキア酸の蓄積機構について明らかにするために、まず適切な植物材料の確保について検討した。本研究で使用したウスバサイシンは基原の正しいものであり、葉部にアリストロキア酸も含有されていたものの、培養細胞系確立のためのカルス誘導が難しかった。最終的には、カルス培養系はできたものの、その後の解析には十分ではなく、アリストロキア酸含量の定量にも至っていない。カルス誘導は、植物体の状態に依存することから、今後は、様々な生育段階のウスバサイシン植物体を用いることで、より多くの培養細胞ラインを作出できると思われる。植物材料の確保が困難だったことから、当初計画を変更し、少量の植物材料からでも可能である、アリストロキア酸生合成系の酵素遺伝子のクローニングを試みた。その結果、TYDC の 3'-末端側断片が得られ、これはケシ科の植物またはウマノスズクサ科植物由来の TYDC と高い相同性を有していた。しかし、未だ 1 種類の配列しか取れておらず、5'-末端側の単離にも至っていない。配列相同性を利用したクローニングは効率よく、また網羅的に目的遺伝子の配列を得られる方法であり、またモルヒネを生合成するケシにおいては 10 種類以上の TYDC が存在することから⁶⁾、より多くの cDNA が得られることを期待していたが、本研究では、1 種類しか単離できていない。この理由として、1 つに primer 設計がよくなかったことが考えられる。今後保存配列の選択を変更することと、degeneracy の数を変更することによる primer 設計の見直しと、PCR 条件を改善することで、より多くの断片を得たい。また、別の理由として、ウスバサイシン植物体の材料に課題があったと考えられた。ウスバサイシン植物体として、今回使用したものは比較的に未成熟のものであり、アリストロキア酸含量も十分でなかった可能性がある。生育段階とアリストロキア酸含量の関係は未解明であるため、今後、様々な生育段階のウスバサイシン植物体を入手し、アリストロキア酸含量を定量することで、より良い材料を得られると考えられる。また、本研究で確立したウスバサイシン培養細胞を用い、培養条件を変えることでアリストロキア酸生成量に変化があれば、これも遺伝子単離の材料として有用なものになると思われる。

参考文献：

1. Debelles FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int.*, **74**, 158-69 (2008).
2. Sato F, Tsujita T, Katagiri Y, Yoshida S, Yamada Y. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: norcoclaurine 6-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 125-131 (1994).
3. Morishige T, Tsujita T, Yamada Y, Sato F. Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23398-23405 (2000).
4. Samanani N, Facchini PJ. Purification and characterization of norcoclaurine synthase. The first committed enzyme in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, **277**, 33878-33883 (2002).
5. Yamada Y, Kokabu Y, Chaki K, Yoshimoto T, Ohgaki M, Yoshida S, Kato N, Koyama T, Sato F. Isoquinoline alkaloid biosynthesis is regulated by a unique bHLH-type transcription factor in *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol.*, **52**, 1131-41 (2011).
6. Facchini PJ, Penzes-Yost C, Samanani N, Kowalchuk B. Expression patterns conferred by tyrosine/

dihydroxyphenylalanine decarboxylase promoters from opium poppy are conserved in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, **11**, 69-81 (1998) .

作成日 : 2016 年 3 月 13 日