

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

薬用植物の遺伝的・形質的多様性の極長期保存技術構築に関する研究

主任研究者 吉松 嘉代 国立医薬品食品衛生研究所・筑波薬用植物栽培試験場・主任研究官

研究要旨 ベラドンナ毛状根について、超低温保存後再生した毛状根の諸形質（生育、トロパンアルカロイド含量、遺伝的安定性）を詳細に調べ、未保存対照群との比較を行った。

分担研究者氏名・所属施設及び所属施設における職名
下村 講一郎 国立医薬品食品衛生研究所
筑波薬用植物栽培試験場
育種生理研究室長

幅とランダムプライマーを用いたゲノムDNAのRAPD分析を行った。その結果、保存後再生した毛状根クローンには未保存対照群と同様にT-DNAが検出され、RAPD分析でも、両者に違いは認められなかった。

A. 研究目的

熱帯多雨林地帯をはじめ地球上に分布する多様性に富んだ植物資源は、現代医療でも完治が難しいとされるアレルギー等の各種疾患や新たに見出される感染症等に有効な次世代の新薬開発原料として重要であり、欧州、米国等の先進国で特に注目されている。しかしながら、アジア、アフリカ地域での急激な人口増加、大気汚染、森林伐採の継続ならびに大気中二酸化炭素の増加による地球温暖化にともなう世界的な環境破壊および砂漠化により、地球上の植物の遺伝的多様性が失われつつある現状にあり、これらの多様性の維持および保存技術の確立は緊急性の高い課題である。本研究では、最新技術によるこれらの多様性の保存法の構築を行う。

B. 研究方法

国内外の種々の薬用植物を材料に、培養条件（温度、栄養培地、植物生長調節物質等）を検討し、組織培養による植物種および多様な形質を持った植物の維持法の確立を行う。また、同様に培養方法を改良し、それらを有効利用するための大量増殖および種苗生産技術を確立する。そして大量に得られた組織培養物を材料に、極長期保存技術として現在最も有望視されている液体窒素温度（-196℃）における超低温保存技術の構築のため、ガラス化法による超低温保存法について検討する。また、確立した組織培養系および超低温保存後の組織培養物の薬用成分について、HPLC法による定量定性分析を行い、未知の化合物については、成分の単離同定を行う。

C. 研究結果

平成10年度においては、日本産アグロバクテリウムの遺伝子（T-DNA）を導入したベラドンナ毛状根のガラス化法による超低温保存を実施し、保存期間（1日、1週間、1ヶ月間および3ヶ月間）が解凍後の再生率に与える影響を調べた。その結果、いずれも63-96.3%の高い再生率が得られることが判明した。また、解凍後再生した毛状根を数代に渡って継代培養し、各継代時の生育、アルカロイド含量を調べた。生育は、液体培地での継代初期から速やかに回復し、未保存対照群とほぼ同様な重量の増加が認められた。しかし、アルカロイド含量は、液体培養3代目までは保存後再生した毛状根クローン間でばらつきが認められた。継代4及び5代目では、未保存対照群とほぼ同様のアルカロイド含量が得られた。さらに、保存後再生した毛状根のゲノムDNAを抽出し、PCR法によるT-DNA断片の増

D. 考察

超低温保存を含む極長期保存技術の確立において最も重要なことは、保存前の諸形質が保存後も変化しないことである。今年度において、ベラドンナ毛状根を材料に、保存処理をしていない毛状根と保存後再生した毛状根の諸形質を比較検討し、ガラス化法による超低温保存が毛状根の諸形質に与える影響を調べた。その結果、生育と遺伝的性質は変化がないことが確かめられた。トロパンアルカロイド生産能は、回復するまでに少なくとも4代以上の継代期間が必要であるが、解凍後約半年たてば、保存前と同様の特性に復帰することが判明した。

E. 結論

毛状根については、今回確立したガラス化法による超低温保存法が、毛状根の持つ諸形質を極長期に保存する技術として使用できることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代、中尾伸子、西孝三郎、下村講一郎、"オウレン毛状根培養によるプロトベルベリン型アルカロイド生産"、第16回日本植物細胞分子生物学会、平成10年7月24日
- 2) 吉松嘉代、下村講一郎、矢崎一史、"ガラス化法によるムラサキ培養細胞の超低温保存"、日本生薬学会第45回年会、平成10年9月5日
- 3) Yoshimatsu, K., Touno, K., Shimomura, K., "Cryopreservation of medicinal plant resources-retention of biosynthetic capabilities in transformed cultures", JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 1998, Tsukuba, Japan, 20th October, 1998.
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

薬用成分の評価に関する研究

分担研究者 下村 講一郎 国立医薬品食品衛生研究所・筑波薬用植物栽培試験場・育種生理研究室長

研究要旨 ベラドンナ毛状根（超低温保存後再生した根及び未保存対照群）の液体培養を行い、各継代時における新鮮及び乾燥重の増加を調べた。また、乾燥根からアルカロイド画分を抽出し、HPLC法によるトロパンアルカロイド（5種）の同時定量を行った。

A. 研究目的

薬用成分生産研究に繁用される薬用植物の毛状根培養は、挿入されたアグロバクテリウム由来の遺伝子（T-DNA）により、種々の異なった薬用成分生産能を有するクローンが得られることが知られている。超低温保存を含む極長期保存技術の確立において最も重要なことは、保存前の諸形質が保存後も変化しないことである。そこで、ベラドンナ毛状根クローンを用い、超低温保存後再生した毛状根と未保存対照群のトロパンアルカロイド生産能を調べ、変化の有無について検討した。

B. 研究方法

ガラス化法により1ヶ月間超低温保存したベラドンナ毛状根を解凍、洗浄し、1/2MS固形培地で培養した。固形培地で計3回継代培養し、毛状根の伸長と分枝を観察した後、1/2MS液体培地に移植し培養した。液体培養を繰り返し、各継代時における新鮮及び乾燥重量の増加を測定し、さらに、アルカロイド画分の抽出とHPLC法によるトロパンアルカロイド（6β-ヒドロキシヒヨスチアミン、7β-ヒドロキシヒヨスチアミン、スコポラミン、ヒヨスチアミン、リットリン）の同時定量を行った。

C. 研究結果

固形培地での再培養時における毛状根の生育（伸長及び分枝）は、未保存対照群とほぼ同様で、また、液体培地における重量増加もほぼ同じであった。未保存対照群の毛状根には4種のトロパンアルカロイド（6β-ヒドロキシヒヨスチアミン、スコポラミン、ヒヨスチアミン、リットリン）が、検出され、主アルカロイドはヒヨスチアミン（約0.35%乾燥重）であった。超低温保存後再生した毛状根も主アルカロイドはヒヨスチアミンであったが、その含量は液体培養3代目までは、大きなばらつき（0.05-0.38%乾燥重）が認められた。しかし、液体培養4-5代目では、ほぼ未保存対照群と同レベルとなった。

D. 考察

超低温保存後再生したベラドンナ毛状根の生育は速やかに回復したが、トロパンアルカロイド生産能の

回復には少なくとも4代以上の液体培地での継代培養が必要であった。今回の結果から、超低温保存した毛状根を再び種々研究に利用するためには、少なくとも4代以上の継代培養（4ヶ月以上）した後、利用すべきであることが判明した。他の植物種についても、薬用成分生産能の回復までに要する期間を調べる必要があると思われる。

E. 結論

超低温保存後再生した毛状根は、一定期間継代培養したあとであれば、再び薬用成分生産研究に使用可能であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
 - 1) 吉松嘉代、中尾伸子、西孝三郎、下村講一郎、”オウレン毛状根培養によるプロトベルペリン型アルカロイド生産”、第16回日本植物細胞分子生物学会、平成10年7月24日
 - 2) 吉松嘉代、下村講一郎、矢崎一史、”ガラス化法によるムラサキ培養細胞の超低温保存”、日本生薬学会第45回年会、平成10年9月5日
 - 3) Yoshimatsu, K., Touno, K., Shimomura, K., "Cryopreservation of medicinal plant resources-retention of biosynthetic capabilities in transformed cultures", JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 1998, Tsukuba, Japan, 20th October, 1998. (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他