

ツカイトウキの典型的な特徴を有していた。そのため今後、「ホツカイトウキはどこから来たのか？」を探る重要な遺伝資源である。

3. ヤマトトウキに外部形態的特徴が酷似の系統「# 04」は、DNA 解析の結果からも栽培ヤマトトウキと非常に近縁であった。北海道におけるトウキ栽培の歴史的背景から、栽培種の移出であると考えられる。過去の栽培ヤマトトウキが、一種の隔離保存状態で維持された貴重な試料であると考えられる。

4. 川野ら (J. Jpn. Bot., 1963) は日高山系での調査から *A. acutiloba* subs. *lineariloba* form. *lineariloba*, *A. acutiloba* subs. *lineariloba* form. *lanceolate* を規定した。今回の我々の DNA 分析から両亜種を区別できる可能性が示唆された。しかしながら本調査では検体数が少なく確固とした推断におよぶことはできなかった。亜種内においても変異があるものと思われ、両種の分布域の関連など今後の調査が必要と考えられる。

5. 標本資料を参考に行った今回の調査では、一部に現在の自生が確認出来なかったものがあつた。とくに北海道南西部、渡島半島では道路整備にともなう開発工事の結果、植生が失われていた。また *A. acutiloba* subs. *lineariloba* を確認した胆振支庁、穂別町の自生地では蛇紋岩の採石のため崩壊が進み生育地が消滅の危機に瀕していた。このような遺伝資源の保全を考慮し今後の自然保護を計画することが大切な課題である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

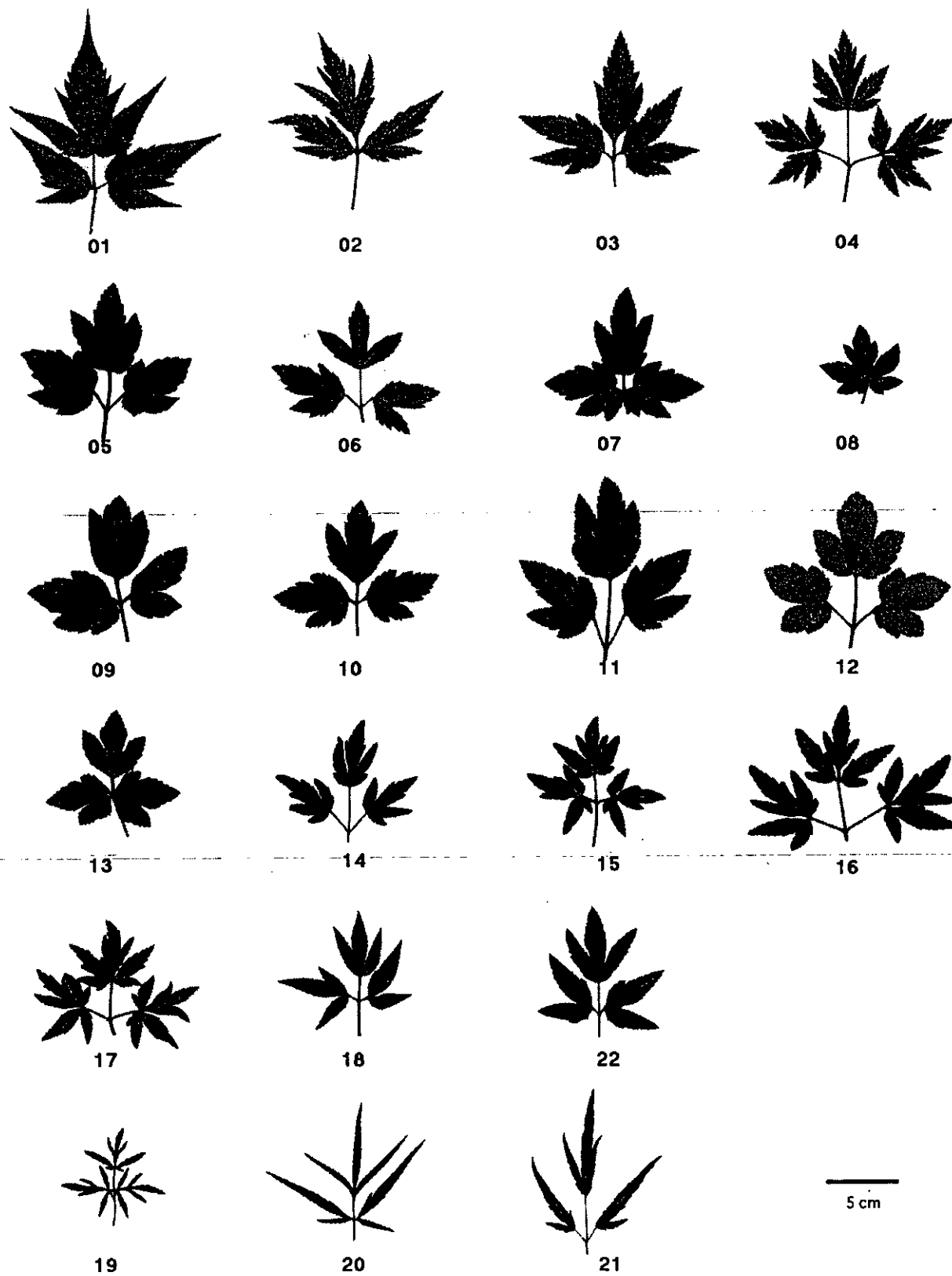
1). 吉田尚利, 高上馬希重, 山田和也,

栗原孝吾, 飯田修, 熊谷健夫, 畠山好雄, 神田博史, 李宜融, 関田節子, 佐竹元吉: トウキの基原植物の研究 (3), 日本生薬学会第 46 回年会, 1999 年 9 月 17~18 日, 大阪

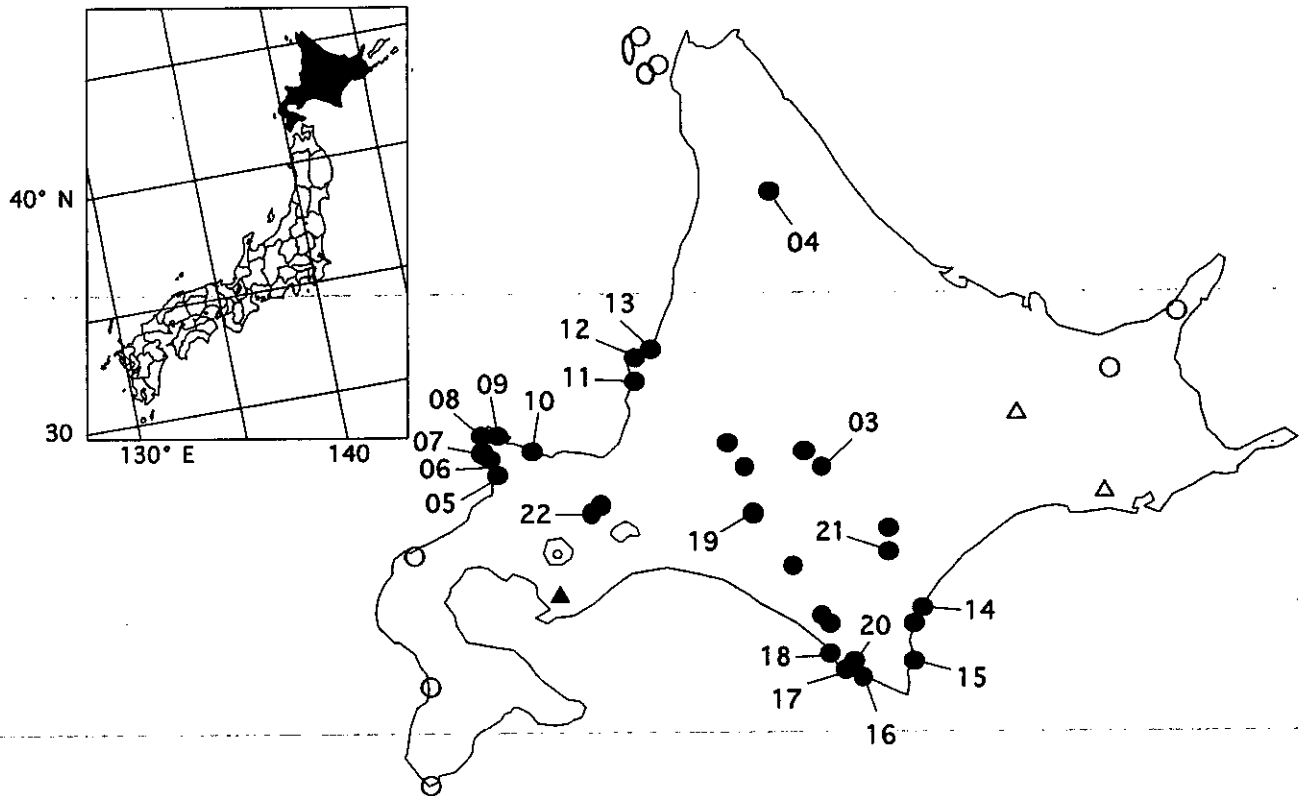
2). 高上馬希重, 山田和也, 栗原孝吾, 飯田修, 熊谷健夫, 畠山好雄, 吉田尚利, 神田博史, 李宜融, 関田節子, 佐竹元吉: トウキの基原植物の研究 (4), 日本生薬学会第 46 回年会, 1999 年 9 月 17~18 日, 大阪

#### F. 知的所有権の取得状況

なし

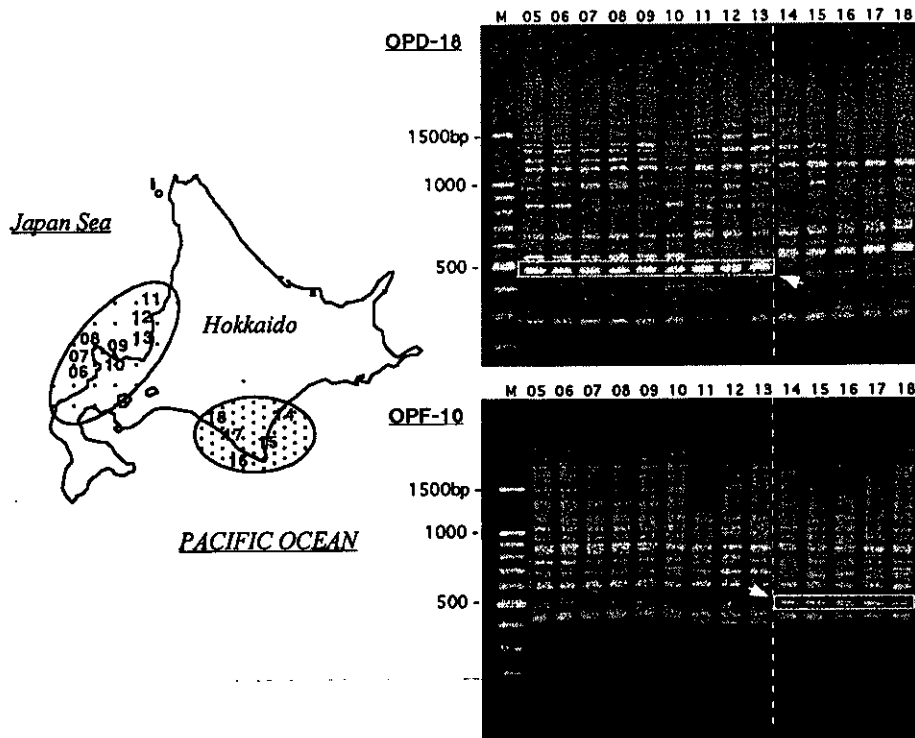


**Fig. 2** Leaves of plant samples in the present study. Each numbers corresponds to Table I and Fig. 1.

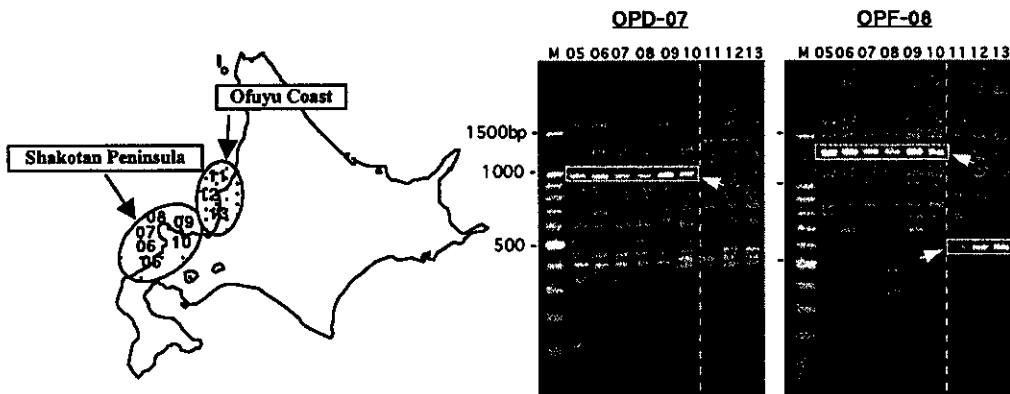


**Fig. 1** Distribution of the plant samples.

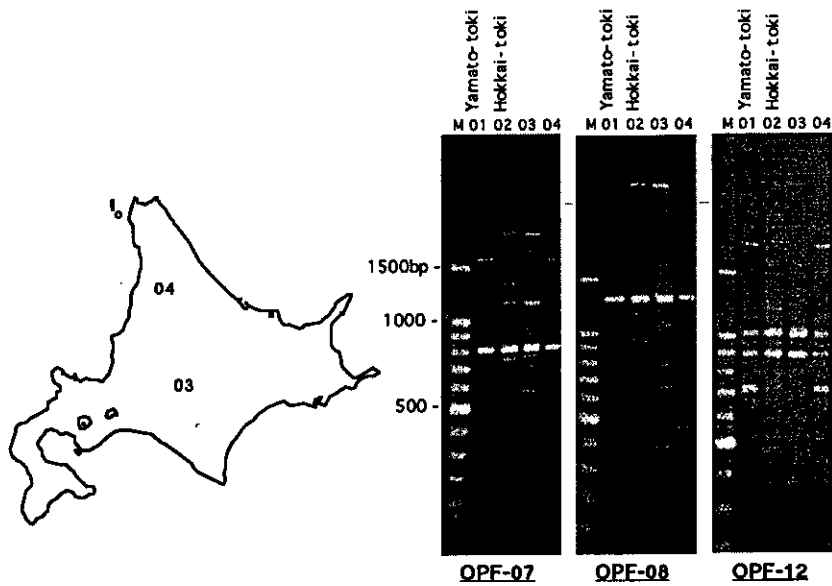
Solid circles ● : confirmed existence, Open circles ○ not confirmed existence, Solid triangles ▲ : confirmed specimen correct, Open triangles △ : confirmed specimen incorrect, Numbers : Plant samples used in DNA analysis. The leaves of these samples were shown in Fig. 2. See table I for details.



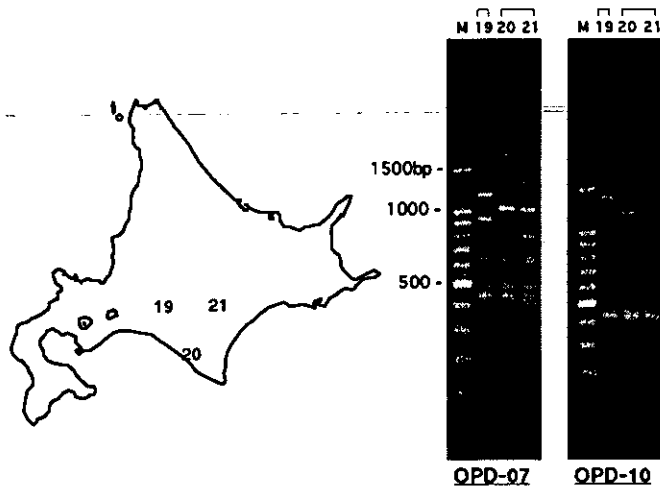
**Fig. 3** Comparison of RAPD profiles between "Japan Sea type" and "Pacific Ocean type". Data using the primer OPD-18 and OPF-10 were shown. Each numbers corresponds to Table I and Fig. 1. M : 100 bp ladder size marker.



**Fig. 4** Comparison of RAPD profiles between "Shakotan Peninsula type" and "Ofuyu Coast type". Data using the primer OPD-07 and OPF-08 were shown. Each numbers corresponds to Table I and Fig. 1. M : 100 bp ladder size marker.



**Fig. 5** Comparison of RAPD profiles between the cultivated strains "Shakotan Peninsula type" and "Ofuyu Coast type". Data using the primer OPD-07 and OPF-08 were shown. Each numbers corresponds to Table I and Fig. 1. M : 100 bp ladder size marker.



**Fig. 6** Comparison of RAPD profiles among "Serpentine barren type". Data using the primer OPD-07 and OPF-10 were shown. Each numbers corresponds to Table I and Fig. 1. M : 100 bp ladder size marker.

## 分担研究報告

### 国内産「黄連」の基原植物オウレン(*Coptis japonica*)の分子生物学的検討

分担研究者 神田博史 広島大学医学部附属薬用植物園助教授

#### 研究要旨

現在流通する漢薬「黄連」は日本産と中国産に大別され、日本産黄連は大きく産地によって越前黄連、因州黄連、丹波黄連の3種に分けられる。また栽培方法の違いにより畑栽培の畑黄連と林間栽培の山黄連に区別される。3産地で栽培されるオウレンはいずれもセリバオウレン *C. japonica* Makino var. *dissecta* Nakai とされているが外部形態的あるいは化学成分的差異が報告されている。これら3産地間での差異は表現型なのか本質的なものなのか、これを明らかにするため分子生物学的検討を行った。同時に流通品漢薬「黄連」にも応用を検討した。RAPD解析において、明らかな種間変異、種内変異であるか結論は得られなかったが、数種の primer において3種の間にも多型が観察された。

#### A. 研究目的

生薬「黄連」は神農本草経の上品に収載され、苦味健胃、止瀉、鎮静、消炎薬とされる代表的な漢薬である。その基原は第13改正日本薬局方においてはオウレン *Coptis japonica* Makino 又はその他同属植物(キンボウゲ科、*Ranunculaceae*)の根をほとんど除いた根茎であるとされている。*Coptis japonica* の変種にはキクバオウレン *C. japonica* var. *japonica* Satake、セリバオウレン *C. japonica* var. *dissecta* Nakai、コセリバオウレン *C. japonica* var. *major* Satake があり、同属植物としては黄連 *C. chinensis* Franch., 三角葉黄連 *C. deltoidea* C.Y.Cheng, 峨嵋黄連 *C. omeiensis* C.Y.Cheng, 雲南黄連 *C. teeta* Wall. などがある。しかし、中国産 *C. teeta* に関しては *C. t. eetoides* C.Y.Cheng とする説もあり、分類学上の問題が残されている。市場には国内産地によって加賀、越前、丹波、因州などの名がある。越前黄連は福井県大野市を中心とする地区でセリバオウレン *C. japonica* var. *dissecta* が林間栽培されている。因州黄連は鳥取県智頭町を中心とする地区でセリバオウレン *C. japonica* var. *dissecta* が林間栽培されている。丹波黄連は兵庫県山南町を中心とする地区でセリバオウレン *C. japonica* var. *dissecta* が畑栽培されている。過去に見られた加賀黄連に代表されるキクバオウレン *C. japonica* var. *japonica* は現在市場では見られない。

富山医科薬科大学和漢薬研究所の小松かつ子等は日本産 *C. japonica* (Thunb.) Makino の3変種キクバオウレン、セリバオウレン、コセリバオウレンとミツバオウレン *C. trifolia* 及び中国産の *C. chinensis*, *C. deltoidea* の地下部を用い、PCR法により18S rRNA 遺伝子領域の塩基配列を決定し、*C. japonica* の3変種及び *C. deltoidea* の塩基配列は一致するが *C.*

*trifolia* 及び *C. chinensis* はそれぞれ異なる塩基配列であったと報告している。

国内3産地で栽培されるオウレンはいずれもセリバオウレン *C. japonica* var. *dissecta* とされているが外部形態的あるいは化学成分的差異が報告されている。これらの差異は表現型なのか本質的なものなのか、これを明らかにするため分子生物学的手法の開発と流通品漢薬「黄連」への応用を目的とした。

#### B. 研究方法

##### オウレン及び生薬「黄連」の RAPD 分析

サンプルの生組織(葉)からCTAB法によりトータルDNAを抽出した。1地域につき多数の個体が検体として存在するためおおまかな見当をつけるため、まず地域ごとの個体のDNAをバルク化し、その段階で多型の検出が可能であろう primer の探索を行なうこととした。バルク調製はPCR使用濃度の  $5\text{ng}/\mu\text{l}$  に調製した各産地の個体DNAを当量ずつ混合した。Primerは10merのものを20種使用した。生薬ではRNAは既に壊れているためDNA抽出ではRNase処理はしなかった。更に、High Pure Products Purification Kitを用いてDNAの精製を行なった。続いて、Hoefer DyNA Quant 200 FLUOMETERを用いてDNAの濃度測定をした後、泳動を行った。

#### C. 研究結果、考察

バルク化による解析においてNo.5と29の primer が有効であることが明らかとなった。種内変異の範囲であるか否かは明らかではないが、3種の間にも多型が明瞭に観察された。生薬の場合は切れ切れになった短いDNA断片が抽出されたためRAPD解

析は不可能と思われた。

#### **E. 結論**

栽培地における個体変異が想像されたため地域ごとに個体の DNA をバルク化し、その段階で多型の検出が可能であろう primer の検索を行なった。今回の実験では No.5 と 29 において 3 種の間にも明瞭な多型が観察されたが、それぞれの primer について 1 回ずつしか PCR を行なっていないため、再現性を見るために更に数回 PCR を行なう必要があると思われる。

#### **F. 研究発表**

論文発表並びに学会発表ともになし

# 研究成果報告書

ヒトゲノム、遺伝子治療研究事業  
モノクローナル抗体を用いた薬用植物の鑑定に関する研究

分担研究者 正山征洋 九州大学大学院薬学研究科教授

## 研究要旨

最も頻繁に配合されるニンジン（人参）、サイコ（柴胡）、カンゾウ（甘草）、ダイオウ（大黄）等の活性成分であるトリテルペン系配糖体に体するモノクローナル抗体(MAb)を作製し、超高感度の定量系を確立した。また、MAbを用いた新しい検出法としてwestern blottingを開発した。

## 研究目的

上述の4種属植物の主活性成分に対するMAbを作製し、それらを用いた超微量定量法の確立と、低分子化合物に体しては旧来類を見ない全く新しい検出法であるwestern blottingの開発を主目的としている。

## 研究方法

### 1. MAbの作製と超高感度アッセイ系の構築

Ginsenoside Rb1(G-Rb1)-キャリアータンパクをマウスに免疫し、ミエローマ細胞と融合し、MAb産生ハイブリドーマをスクリーニング、クローニングする。選抜マイブリドーマを培養して抗G-Rb1MAbを得る。このものを用いてELISAを構築する。同様にglycyrrhizin(GC), saikosaponin a(SSa), sennoside A(SA)に体するMAbを作製し、ELISAを開発する。

### 2. Westen blotting法の開発

G-Rb1, GC, SSaをTLCにて展開し、ブロッキング液を添加後、熱によりPVDF膜へ転写する。膜を過ヨウ素酸酸化後、BSA等のタンパクと処理して結合体を作成。MAbと反応し、2次抗体、基質を添加して発色する。

## 研究結果

作成した抗R-b1、抗GR、抗SSa、抗SAMAbを用いてそれぞれのELISAを構築した。4種の化合物に対して極めて特異的かつ感度が高く、ngオーダーでの検出定量が可能となった。

一方、western blotting法の開発に成功した。本法によると人参の場合アグリコンであるダンマラン骨格を有する配糖体のみが検出可能となり、それぞれのPanax属植物のパターンから、各々の種を簡便に鑑



別することが出来ることが明らかとなった。

GCに付いても同一アグリコンのみが検出出来、構造の異なるアグリコンから構成される配糖体は一切発色しない事を確認した。

### 結論

各種人参の分類を成分的に行う多くの試みがなされてきたが、多大の努力が払われたにもかかわらず判然としない部分が残っていたのは事実である。本研究で開発したwestern blotting法とELISAにより簡便で確実な鑑定が可能となった。また、人参や甘草、柴胡配合漢方製剤中G-Rb1やGC、SSa等薬理活性を持つマーカ化合物をアッセイすることにより原料の品質管理が可能であることを示した。

### 発表論文

1. H.Tanaka, N.Fukuda, Y.Shoyama, Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rb1 and its characterization, Cytotechnology, 29, 115-120(1999).
2. N.Fukuda, H.Tanaka, Y.Shoyama, Western blotting for ginseng saponin, ginsenosides using anti-ginsenoside Rb1 monoclonal antibody, Biol.Pharm.Bull., 22, 219-220(1999).
3. S.Shan, H.Tanaka, Y.Shoyama, West

ern blotting method for the immunostaining detection of glucuronides of glycyrrhetic acid using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody, Biol.Pharm.Bull., 22, 221-223(1999).

4. L.Xuan, H.Tanaka, Y.Xu, Y.Shoyama, Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization, Cytotechnology, 29, 65-70(1999).
5. W.Putalun, H.Tanaka, Y.Shoyama, Rapid separation of solasodine glycosides by an immunoaffinity column using anti-solamargine monoclonal antibody, Cytotechnology, 31, 151-156(1999).
6. H.Tanaka, W.Putalun, Y.Shoyama, Western blotting of steroidal alkaloid glycosides using monoclonal antibody against solamargine, Liq.Chrom. & Rel. Technol., 22, 1503-1512(1999).
7. Y.Shoyama, H.Tanaka, N.Fukuda, Monoclonal antibodies against naturally occurring bioactive compounds, Cytotechnology, 31, 9-27(1999). (Review)

8. 正山征洋、合成化学と生薬学との接点—天然活性化合物に対するモノクローナル抗体と生合成酵素、有機合成化学協会誌、57、708—719(1999)。(総説)

9. 正山征洋、生薬成分の生化学的分析法の開発、日本防菌防かび学会編、21世紀の生薬・漢方製剤、179—192頁、繊維社企画出版、1999年

## 分担会計報告書

ヒトゲノム、遺伝子治療研究事業  
モノクローナル抗体を用いた薬用植物の鑑定に関する研究

分担研究者 九州大学大学院薬学研究科教授 正山征洋

以下の通り配分金額を使用致しましたのでご報告致します。

消耗品費 500,000円

合計 500,000円

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
（分担）研究報告書

薬用植物資源の保存及び保護に関する研究

（分担）研究者 畠山 好雄 筑波薬用植物栽培試験場長

研究要旨 生物多様性の維持は地球的規模の環境保全、遺伝子資源の保存と利用の観点からも最重要課題である。栽培試験場においては、薬用植物資源の収集・保存を行っており、筑波試験場では現在、生植物の形で1000系統、種子として5500点の系統を維持している。保存種子の中、特に重要と思われる系統については発芽試験および特性調査を行い、内外での活用を図るとともに、品種育成の資料とする。

A. 研究目的

保存種子は定期的に更新を図らねばならない。そのために、一定量の系統の発芽検定および特性調査を行う必要がある。今年にはケシ・ハブソウ・ハトムギ・ケイガイ等35系統を圃場で発芽試験および特性検定、キキョウ・ロベリア・ツリガネニンジン・マルバニンジン・カリガネソウの5種を20℃恒温条件で発芽試験を行った。

B. 研究方法

恒温条件発芽試験については、1990年8月3日に10℃、-1℃、-20℃に貯蔵したキキョウ・ロベリア・ツリガネニンジン・マルバニンジン・カリガネソウ5種の種子を発芽試験器20℃条件下で行った。

C. 研究結果

35系統については特性調査の結果、形質変化の見られない株から種子を採取し、更新を行なった。5種の発芽試験では、カリガネソウ・ツリガネニンジンの発芽率低下が大きく、ロベリアは-20℃の貯蔵で低下を来した。

D. 考察

キキョウは3種類の貯蔵条件とも高い発芽率を維持し、ロベリアは極低温貯蔵で低下し、ツリガネニンジンには10℃貯蔵が低いことから、発芽力の維持は種特有の性質かと思われる。

また、特性調査は種別の特性表を作成する必要性を感じた。

E. 結論

系統保存は発芽試験と特性調査を平行して実施するのが望ましい。圃場における系統保存は交雑の可能性が高く、対策が必要である。種子の発芽特性は種特有の性質であり、近縁植物でも貯蔵条件—長期保存後の発芽は異なる反応を示した。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム研究事業）  
分担研究報告書

ベトナム南部地域の桂皮資源に関する調査研究

分担研究者 本多義昭（京都大学大学院薬学研究科 教授）

〈研究要旨〉 ベトナム南部地域に特産する桂皮の基原植物の栽培状況、生薬市場の現状等について、現地調査を行い、分析用サンプルを入手した。

A. 研究目的

我が国で輸入、消費される桂皮は、産地によりその品質に大きな差異がある。なかでもベトナム産の桂皮は、中国産やセイロン産のものに比べて精油含量が格段に高く、生薬としての味もよいことで知られている。しかしながら、これらの品質の差異が基原によるものなのか、生育環境によるもののかなどは明らかでない。さらに、高品質のベトナム産桂皮の産出量は年々減少傾向にあり、資源の枯渇が心配されている。そこで本研究では、ベトナム産桂皮の産出地の現状を調査し、高品質桂皮の継続的な安定供給をめざした対策を提起する。

B. 研究方法

南ベトナム、ホーチミン市にて生薬市場の調査を行った。また、ベトナム産桂皮のうち、MN (Mien Nam = 南部) 桂皮と称されるものの主産地であるダナン市西方にて、栽培用種子採取用の林を調査した。さらにタム・キー市では、集荷、選別、若干の加工、および製品の輸出業を行っている工場を訪れ、現在我が国には輸入されていないMN桂皮の生産の現状について調査した。ダラート市では、YB桂皮の産地から取り寄せたというCinnamomumの栽培地を観察した。精油含量、主要成分の構成などを、中国産桂皮、セイロン桂皮など、現在我が国で扱われている各種の桂皮と比較するため、それぞれの調査地点でサンプルを入手した。

C. 研究結果

ホーチミン市、チョロン街にある生薬問屋を訪ねて廻ったが、1995年に調査したときに比べ、扱い量は減少している様子であった。生薬類の多くは中国からの輸入品で占められ、ベトナム産は多くなかった。

ダナン市の桂皮の種子採取用の林は、人民委員会の管理下にあるものであったが、林全体が奇妙な寄生病に冒されており、現地では硫酸銅溶液の分霧などの対策を講じているが、一向に効果がない、ということであった。観察したところ、寄生病に感染していない木は1本もなく、感染が進んで枯死している木もあった。地元の人民委員会、また、ダナン市

の環境自然保護局からも、この桂皮の寄生病の鑑定と治療および防御方法の解明を要請された。なお、この林の樹種は、*Cinnamomum cassia*であろうと思われるが、詳しい同定作業は現在進行中である。

MN桂皮の加工工場では、様々なグレードの桂皮が選別、箱詰めされており、この選別階級はベトナム国が定める基準によるものであった。生産量については、1994年までは野生のものも採取できたこともあり、年間600トンほどあったが、現在では200トンまで減少しているということで、製品の大半は台湾向けの輸出品であり、価格は上昇傾向であるが、利益は少ないということであった。

各国産の桂皮との比較品質評価は、今後順次行う予定である。

D. 考察

現在、我が国に輸入されるベトナム桂皮は、YB (Yen Bai = 県名) およびQN (Quan Ngai = 県名) と称されるもので、いずれも北ベトナム産のものである。今回調査したMNは我が国には輸入されていないが、YBやQNよりも精油含量が多く、味もよかった。

基原については、ダナンで見たMNのものと同ダラートのYBのものとは比較できるが、両者は葉の形態は非常によく似ていたものの、*Cinnamomum*属は果実の形態が同定の決め手となるため、現段階では種名を特定することはできていない。

E. 結論

ベトナムの桂皮は生産量が減少しつつあり、特に高品質なものは採取できなくなりつつある。さらに寄生病の発生など不安材料が散見され、今後、資源枯渇に直面する恐れが捨てきれない。早急な寄生病対策と適地における栽培拡大が必要不可欠と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし 2. 学会発表 なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし 2. 実用新案登録 なし  
3. その他 なし

## 分担研究報告書

### ネパール王国の暖帯域に産する薬用植物資源に関する研究

分担研究者 御影 雅幸 金沢大学薬学部教授

#### 研究要旨

ネパールの暖温帯域における薬用植物資源調査を行った。その結果、よく自然が保存されている地域では植物種が豊富で、漢方生薬として利用可能な種をはじめ、多くの薬用資源植物があることが明らかになった。

#### A. 研究目的

ネパールのヒマラヤ地域は植物地理学的に「日華区系」に区画され、わが国と共通する植物群が多く生えている。これまで、ヒマラヤの温帯域より上部の薬用植物については多くの調査がなされてきたが、低地の亜熱帯～暖温帯域の調査はほとんどなかった。本研究ではネパールの暖温帯域に産する薬用植物資源を調査することを目的とした。

#### B. 研究方法

分担者らによって 1999 年 8 月に西ネパールの暖温帯域に位置するパンチェシ (Panchase) 山、シクリス (Siklis) 山およびタマギ (Tamage) 村周辺で採集された 548 点の植物を同定整理し、中国伝統医学ならびにインド伝統医学で薬用として利用可能な植物資源を検討した。

#### C. 研究結果

種レベルまで同定できた植物は 250 数種であった。とくにパンチェシ山は神聖な地域として自然がよく保全されており、植物種が豊富で薬用利用可能な植物が多く見られた。わが国との共通種はそれほど多くはないが、属レベルの関連植物は多く、とくに民間薬として利用可能な植物が多く見受けられた。

漢方生薬あるいは日本民間薬との共通種として、ヒユ科の *Achyranthes bidentata*、シソ科の *Prunella vulgaris*、ユリ科の *Paris polyphylla*、ヒカゲノカズラ科の *Lycopodium clavatum*、オオバコ科の *Plantago major* var. *asiatica*、タデ科の *Rumex nepalensis* などがあった。

また、代用可能と考えられる植物として、メギ

科の *Mahonia napaulensis*、キキョウ科の *Codonopsis viridis*、ツユクサ科の *Commelina maculata*、カヤツリグサ科の *Cyperus cyperoides*、オトギリソウ科の *Hypericum williamsii*、クスノキ科の *Cinnamomum tamara*、タデ科の *Bistorta amplexicaulis*、ウラボシ科の *Lepisorus clathratus*、セリ科の *Bupleurum hamiltonii*、ミカン科の *Zanthoxylum oxyphyllum* などがあった。

インド医学で利用される薬物として、メギ科の *Berberis chitria*、アカネ科の *Rubia manjith*、マメ科の *Bauhinia purpurea*、*Bauhinia variegata*、ユリ科の *Asparagus racemosus* などがあった。

#### D. 考察

今回の調査地は東西に長いネパール王国のほぼ中央に位置する場所であり、地域的にはネパールを代表できる場所であり、他の暖温帯域も類似した植生であると考えられる。また緯度的にはわが国の沖縄本島とほぼ同じであり、両地域に産する植物は互いに栽培可能であろう。

#### E. 結論

ネパールには 24,000 種を越える植物種が分布すると考えられている。本研究によりネパールは暖温帯域でも植物資源が豊富であることが確認できた。今後は亜熱帯域をも含めて、未利用な薬用資源の開発研究が望まれる。

#### F. 研究発表

成果の一部を「第 31 回ヒマラヤ植物研究会総会」(1999 年 12 月 18 日：於東京大学総合研究博物館)にて口頭発表した。

## 分担研究報告書

### 幻覚性キノコ（マジックマッシュルーム）の成分研究

分担研究者 関田節子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

#### 研究要旨

近年、若年層を中心に浸透し始めている幻覚性キノコ（マジックマッシュルーム）の起源種の同定、分類を目的として菌の培養及び成分検索を行った。

#### A. 研究目的

マジックマッシュルームと呼称される幻覚性キノコはシビレタケ・ヒカゲタケ類のキノコが主であり、これらのキノコに含有されるシロシピン、シロシンが脳の中樞神経に作用して、幻覚を引き起こすと考えられている。しかしシビレタケ類、ヒカゲタケ類ともにシノニムが多く、分類の難しいグループの一つとなっている。そこでこれら幻覚性キノコの化学的な同定・分類法の確立を目的として各種マジックマッシュルームの成分検索を行い、含有成分の比較検討を試みる。

#### B. 研究方法

渋谷で購入したマジックマッシュルームをPDA培地で培養し、さらに滅菌したトウモロコシに接種し、菌を蔓延させた後、滅菌したバーク堆肥を覆土し、子実体を形成させた。生長した子実体を収穫し、凍結乾燥後、メタノールで抽出した。溶媒を留去し、得られたエキスを定法により、酢酸エチルで分配し、酢酸エチル抽出エキスを作成した。

本エキスについてシリカゲルカラムクロマトにより分離、精製を行い、クロロホルム-メタノー

ル（10：1）の溶出分画より無色針状結晶を分離した。

#### C. 研究結果

収穫した子実体について鑑定を行った結果、シビレタケ属（*Psilocybe*）菌であることが判明した。しかし、胞子の形態確認には至らず、種名までは同定できなかった。

単離された化合物については NMR を用いた構造解析を行った結果、炭素数 28 のエルゴステロール誘導体と推定された。構造の詳細に関しては現在、検討中である。

#### D. 考察

今回、成分検索を行った菌株が属するシビレタケ属は胞子紋が紫黒色で、モエギタケ科に分類される。現在までに 220 種ほど報告され、世界中に分布している。これらのうち幻覚性のものは約 1 / 4 にあたる 50 数種類である。日本では 9 種確認されているが、幻覚性のものは触ったり、傷つけたりすると青変する *Cerlecentes* 節に分類されるものに限定されている。

本菌株も触ると青変する特徴が有しており、幻

覚性成分が含有されている可能性が非常に高いと推測され、塩基性条件下での抽出・分離による成分検索を行う必要があると考えられた。

#### E. 結論

マジックマッシュルームと呼称される幻覚性キノコの培養法を検討し、その子実体形成に成功した。さらに子実体の成分検索を行い、結晶性化合物を単離した。今後は菌に関しては種の同定を確実にすると同時に他のマジックマッシュルームについても培養法の検討並びに成分検索を行う予定である。さらに今回、単離した化合物に関してもその類縁体を含めて、詳細な構造解析を行う予定である。

#### F. 研究発表

なし



# 酵素活性を有す植物由来 Trichoderma 株の長期継体による生物性状の維持に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 高鳥浩介 鈴木明子  
成田紀子 菊池 裕

## 要 旨

植物に普遍的分布をとる Trichoderma 株を新鮮分離、継代維持することによる生物性状変化を4年間にわたり観察した。供試した Trichoderma10 株はいずれも植物由来であり、初代時は著しく孢子産性活性は高かった。これを毎月 Trichoderma 発育に適した寒天培地で継代したところ分離1年後および2年後でもほぼ集落性状、孢子産性活性とも変化認められず、生物学的には変性を示さなかったが、3年後では、一部に菌糸を優勢とする株がみられ、さらに4年後ではより孢子産性能の低下がみられ、こうした株の代謝活性能に変化がより顕著となりつつある傾向を認めた。

### A. 目的

Trichoderma は自然界に広く分布し、さまざまな二次代謝産物を産性することからその有用性が注目されている。

我々は、こうした有用性をもつ天然資源の一つとして真菌の維持管理をおこなっているが真菌は継代保存する間に変異 (Mutation) や菌糸形成による細胞退化などの老化 (エイジング) をおこす頻度が高く、そのため維持する方法の改良および生物性状のチェックが定期的になされなければならない。真菌のうち Trichoderma もその代表的なものであり、自然界での分布生息から分離し、人工培養基で管理することにより、生物性状の不活性化が認められる傾向にある。しかし、その不活性化あるいは老化現象はどの期間で認められるかを明確に示した報告は我々の知る限り報告がない。そこで、まず植物由来 Trichoderma を分離し、人工培地で継代管理することによる、生物性状の変化を経年的に観察することとした。

今回は3年継代保存による生物性状変化について報告する。

### B. 材料および方法

- 1) Trichoderma : 植物由来 10 株
- 2) 使用培地 : ポテトデキストロース  
寒天 (PDA) 培地
- 3) 継代維持

初代分離した Trichoderma を毎月 PDA 斜面培地に継代し、25℃、1週間活性培養をおこなった。釣菌は斜面部で明瞭な色調を有す中央または下方 1/3 周辺からとした。これは孢子継代のためである。

現在4年継代管理中であり、1～3年後に加え4年後の生物性状を以下の方法で確認した。

### 4) 生物性状確認方法

一定期間継代維持した Trichoderma から 0.05% Tween80・生理食塩水にて孢子懸濁液約  $1 \times 10^6$  /ml を作製した。10  $\mu$ l を PDA 平板培地各3枚に塗抹し、25℃培養で7日間おこなったのち以下の項目に従って観察した。

#### 【集落性状】

1. 表面性状
2. 色調
3. 孢子性状
4. 発育性
5. 裏面性状
6. 色素産性

#### 【継代性状】

1. 菌要素の確認
2. 菌糸体性状
3. 孢子性状
4. 孢子量
5. 色調
6. 特殊器官の形成性

### C. 結果および考察

植物由来 Trichoderma10 株について継代1～4年後での生物性状は表1に示す通りであった。

Trichoderma10 株の集落性状は初代分離時すでに差異が認められた。すなわち Trichoderma の典型的な暗緑色集落に限ら

ず黄緑色あるいは菌糸密な灰白色であったりする株があり、また、色素として黄色色素産性や全く色素産性能の欠損した株とさまざまであった。色素産性能は4年後でも変化なく、これは二次代謝物産性を意味するものであり、少なくとも活性は維持されたままである。集落は綿状を呈することが多いが、なかには、ピロッド状、粉状となり集落全域または、辺縁部のみに胞子産性する株などが認められた。集落変化は比較的短年で確認され粉状から綿状へと変わりつつあり3~4年後では多く綿状集落となってきた。また胞子産性能も同様で、分離して1年までは胞子産性能は著しく強かったが、3~4年になるにつれ、明らかに産性能が低下してきた。

この結果から数年後と1口には無胞子性集落となるものと推察される。いずれにしても *Trichoderma* の胞子形成は内生型であり、内生的に胞子を放出するいわゆるフィアロ型である。この型により多量の内生胞子が産性されることにより胞子間が密着する粘液物質を産性し、これが、*Trichoderma* のもつ特異的な二次代謝産物である。*Trichoderma* の代謝産物として特に繊維質分解酵素(セルラーゼ)が知られており、植物繊維はそのために分解され朽ちるとされている。集落裏面をみると *Trichoderma* 株差として色素産性の有無がある。本菌の同定には必ずしも色素産性は重視されるものではないが、産性する場合は黄色色素がほとんどである。今回の10株でも分離時に2株で色素をみたが、継代により1年後で7株に、また2年後で5株に3年後で3株にキサントニン系黄色色素が認められた。継代による色素産性の有無はどのような二次代謝産物の変化なのか現状では明らかにされていない。この研究が進展した段階で生物学的性状二次代謝産物の変化についても研究する必要がある。

集落性状から一部湿性菌要素が観察されることがあり、明らかに粘液物質を産性していることが認められる。このように湿性集落や胞子塊状形態が長期にわたり安定していることが *Trichoderma* として重要である。継代3年後での集落をみると暗緑色系から、明緑色、さらに灰白色となり、明らかに胞子産性が弱くなってきている。これは、多くの菌糸性真菌にみる老化現象と似るものであり、*Trichoderma* でも同様の変化がおりつつあるものと思われた。

*Trichoderma* 10株を同一条件で継代維持し、3年間にわたる集落性状ならびに胞子産性の変化をみてきたが、その結果をみる限り2年後では比較的安定していたがさらに長期にわたると胞子産性能が低下し、代謝物産性能にも変化がみられることも予想され、本菌の保存に対しより注意を払う必要がある。

#### D. 結論

植物に普遍的分布をとる *Trichoderma* 株を新鮮分離、継代維持することによる生物性状変化を4年間にわたり観察した。供試した *Trichoderma* 10株はいずれも植物由来であり、初代時は著しく胞子産性活性は高かった。これを継体したところ分離2年後でもほぼ集落性状、胞子産性活性とも変化が認められず、生物学的には変性を示さなかったが、さらに長期の3~4年後では胞子産性能が低下し、さらに集落性状でも菌糸化の傾向がみられるようになってきた。これは *Trichoderma* の代謝活性能に変化があらわれはじめてきたものと推察された。

#### E. 研究発表

なし

表 1 植物由来 Trichoderma 10 株の生物性状変化

菌株	性状	初代		継代		" 2 年後		" 3 年後		" 4 年後	
		分離時	分	1 年後	代	後	後	後	後	後	後
M# 5081-1	Mac	黄緑色孢子	黄緑色孢子	黄緑色孢子	黄緑色孢子	黄緑色孢子	黄緑色孢子	黄緑色孢子	黄緑色孢子	黄緑色孢子	黄緑色孢子
M# 5081-2	Mic	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子
M# 5081-3	Mac	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子
M# 5081-4	Mic	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子
M# 5081-5	Mac	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子
M# 5081-6	Mic	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子
M# 5081-7	Mac	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子
M# 5081-8	Mic	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子
M# 5081-9	Mac	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子	暗緑色孢子
M# 5081-10	Mic	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子	胞子

Mac : 集落性状      Mic : 形態性状