

図1. 北海道、筑波、種子島薬用植物栽培試験場における栽培マオウの経時変化

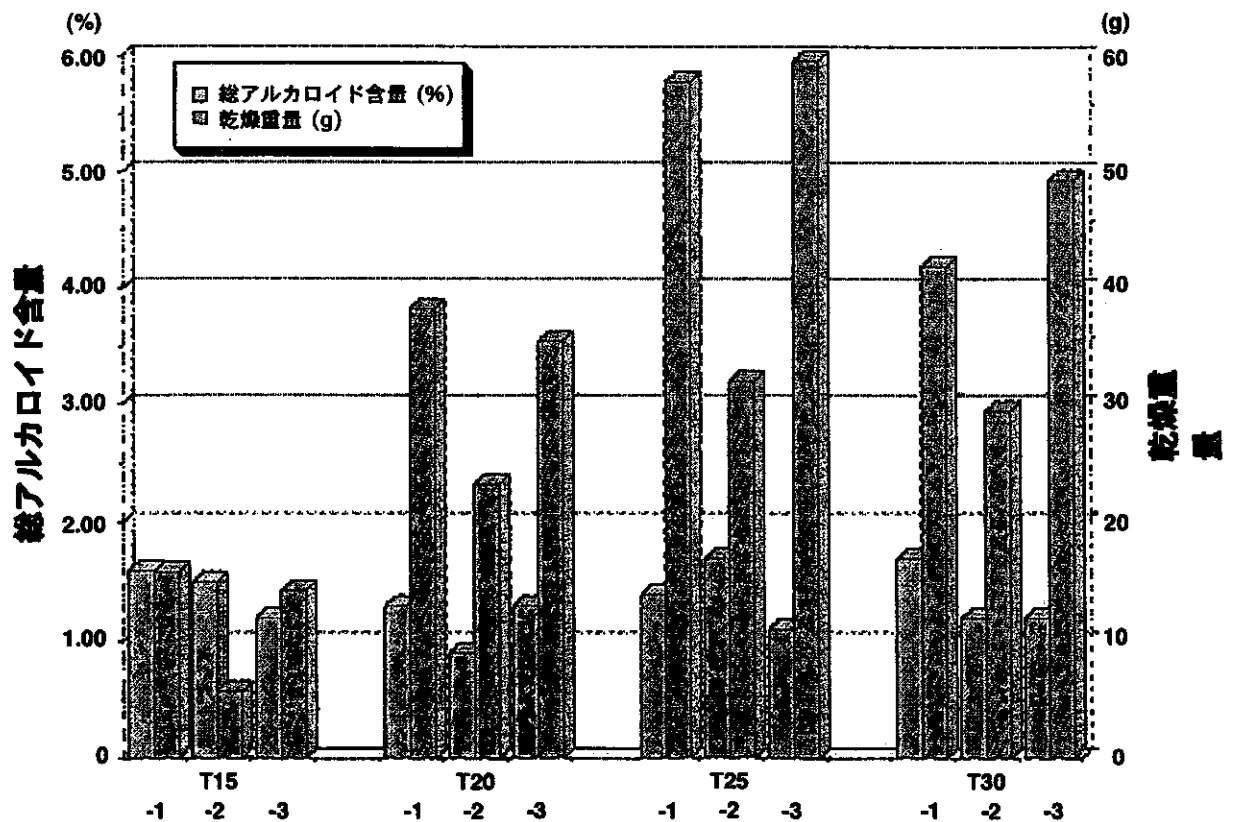


図2. ファイトトロンを用いた温度変異に伴う総アルカロイド含量と成長量

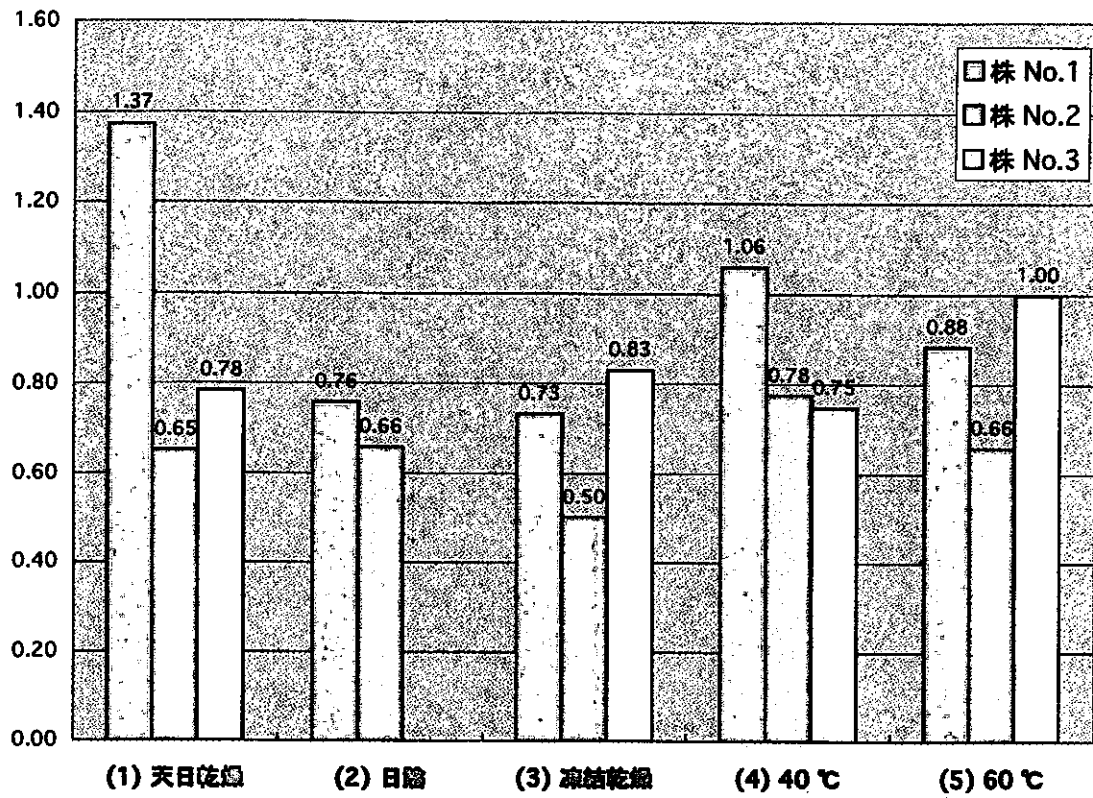


図3 生薬マオウ調整のための乾燥条件による総アルカロイド含量

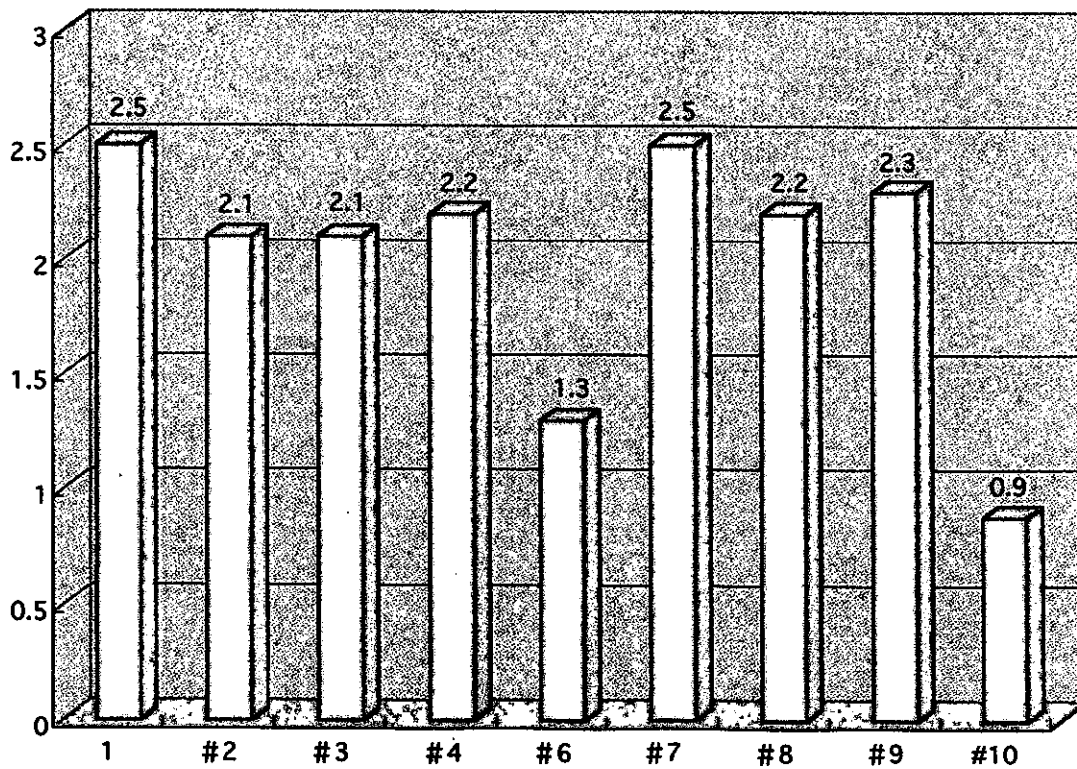


図4 モンゴルで栽培された *E. sinica* の総アルカロイド含量

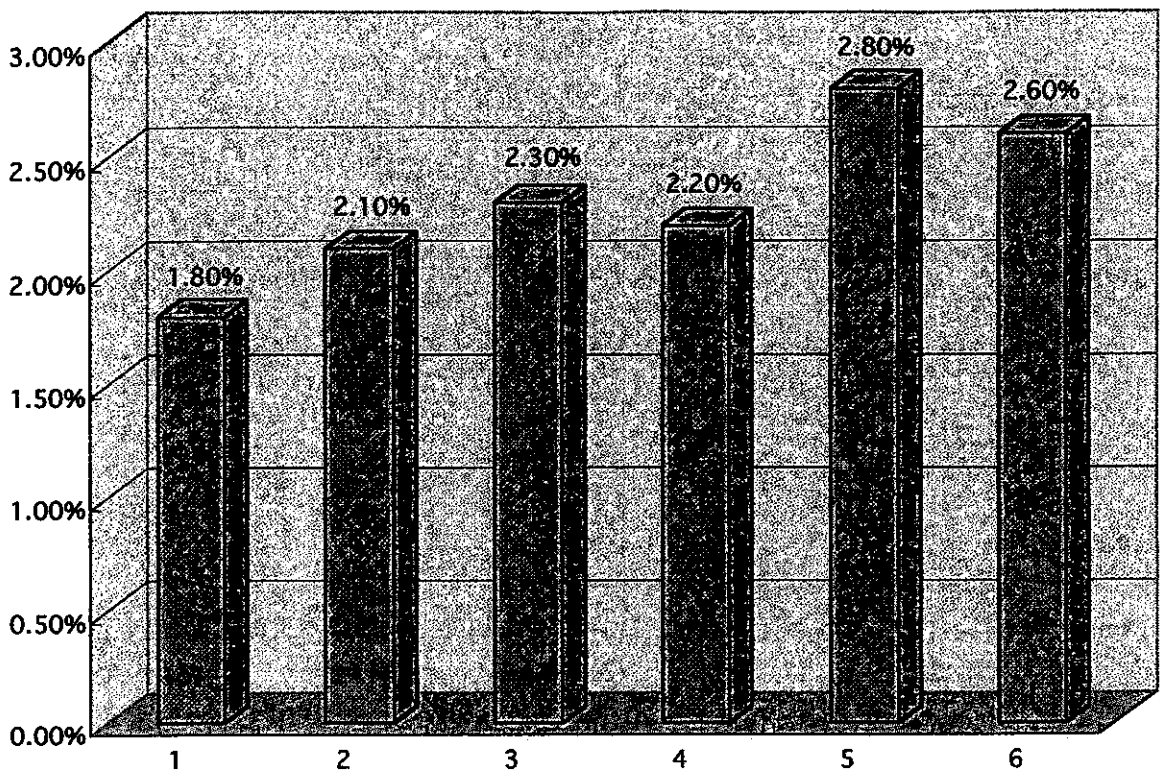


図5 ネパールのマオウ *E. gerardiana* の総アルカロイド含量

シュート培養による薬用植物の長期保存法に関する研究

協力研究者 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

薬用植物資源を極長期に保存するための超低温保存方法確立のため、トウキ形質転換および非形質転換シュートを材料に、ガラス化法による超低温保存のための種々条件を調べた。また、GC-MS分析による保存後の植物の評価を行った。

**A. 研究目的**

薬用植物資源を極長期に保存するための超低温保存方法の確立

シュートの評価のため、アセトン抽出物のTLC分析およびガスクロマトグラフィー質量（GC-MS）分析を行った。

**B. 研究方法**

材料植物の種子は、奈良県で栽培されているヤマトトウキ (*Angelica acutiloba*) 種子を用いた。材料は、2,4-D 0.1 mg/lとzeatin 0.5 mg/lを添加した1/2MS固形培地で毛状根<sup>1)</sup>を培養して再生させた形質転換植物体および種子を無菌的に発芽させ、植物ホルモンの無添加固形培地で継代培養している非形質転換植物体を用いた。約3mm長のシュートを調製し、ガラス化法による超低温保存の基本操作（凍害防御剤を含む培地での前培養→脱水前処理→ガラス化液による脱水処理→液体窒素中での保存）を表1に示す各種条件で行った。ガラス化液はGamborgB5基本培地で調製したPVS2（30% w/vグリセリン+15% w/v エチレングリコール+15% w/v DMSO+0.4 Mシヨ糖）を用い、2 mL容のクライオチューブ中に処理を行ったシュートと1 mlのガラス化液を入れ液体窒素中で保存した。解凍は、4 0℃の温浴中で1分間行い、1 Mシヨ糖を含む培地で20分間洗浄後、再培養を行った。超低温保存後再生したシ

TLC展開溶媒: *n*-hexane-acetone=7:3

**精油成分の抽出**

液体窒素で凍結後碎断した新鮮試料(100-1000 mg) にアセトン5mlを加え、超音波洗浄器で30分間抽出を行った。試料を含む抽出液を遠心分離後、上清を取り、窒素ガスで蒸発乾固した。抽出物を適量のアセトンで再溶解後、GC-MS分析に供した。

GC-MS条件 [協力：山川 隆（東大院農）]

装置：Shimadzu GCMS-QP5050

カラム：DB-WAX 0.25 mm i.d.x30 m (J & M Scientific, USA, CA)

カラム温度プログラム：50℃（2分）→10℃/分→230℃（5分）

カラム流量：3.3 mL/分（180.0 kPa）

気化室温度：230℃、インターフェース温度：230℃、イオン化（EI）：70 eV

### C. 研究結果

非形質転換シュート (NS) および形質転換シュート (TS) を表 1 に示す各種条件で超低温保存を行ったときの再生率を図 1 (非形質転換) および図 2 (形質転換) に示した。非形質転換シュートでは、ショ糖とグリセリンの両方を含む培地 (5%–5%) で前培養後、脱水前処理無しで 20 分間のガラス化液処理 (25℃) を行ったときに最も高い再生率 (46%) が得られた。一方、形質転換シュートにおいては、ショ糖とグリセリンの両方を含む培地 (7.5%–7.5%) で前培養後、脱水前処理無しで 25 分間のガラス化液処理 (25℃) を行ったときに最も高い再生率 (18%) が得られた。いずれの再生シュートも健全な植物体に生育した (図 3)。

トウキシュートアセトン抽出物の TLC 分析の結果を図 4 に示した。トウキ非形質転換シュートには主成分としてフタリド類の ligustilide が含まれている。形質転換シュートにも主成分として ligustilide が検出され、他の成分のパターンもほぼ非形質転換シュートと同じであった。超低温保存後再生した形質転換シュートにも未保存対照の形質転換シュートとほぼ同じパターンで成分が検出された。

トウキシュートアセトン抽出物の GC-MS 分析結果を図 5 に示した。非形質転換シュートにはフタリド類の butylidenephthalide と ligustilide が検出された。形質転換シュートにもこれらの化合物が検出されたが、それらの構成比が若干異なっており、形質転換シュートでは ligustilide に対する butylidenephthalide の割合が非形質転換シュートよりも減少していた。超低温保存後再生した形質転換シュートは、未保存対照の形質転換シュートと同じパターンを示した。

### D. 考察

トウキシュート培養 (非形質転換および形質転換) は、ガラス化法による超低温保存が可能で、脱水前処理は必ずしも有効ではなかった。非形質転換シュートと形質転換シュートでは超低温保存のための最適処理条件が異なっており、個々に条件設定が必要であることが示唆された。TLC および GC-MS 分析の結果、超低温保存後再生した形質転換シュートのフタリド類パターンは、未保存対照シュートと同じであった。形質転換シュートの再生率の向上が今後の課題である。

最近、モデル植物であるシロイヌナズナやイネの全塩基配列及び遺伝子が明らかになってきており、得られた遺伝情報を如何に利用し活用するか、また、遺伝子機能についての情報取得 (ポストゲノム) が課題となっている。薬用植物についても、今後、モデル植物の遺伝情報を基に、あるいは薬用植物の遺伝情報を基に、有用遺伝子の機能解析・活用が行われるものと思われる。

ポストゲノムを効率的に遂行するためには、研究で得られた多数の組換え植物細胞の継代・維持の労力を省くため、超低温保存を行うことが必要となる。本研究結果から、トウキ形質転換体の超低温保存が可能となり、トウキのポストゲノム研究の一助になると期待できる。また、遺伝子改変植物の有効性・安全性評価を行う上で特に重要なのが、本来のゲノムを有する原植物の保存である。トウキは各地で栽培されているが、近縁植物と容易に交配し、形質が変化しやすいことが問題となっている。本研究より、トウキ原植物の極長期保存が可能となったことは、遺伝資源の確保に貢献するものと思われる。

表 1. 実験条件

実験 番号	材料 (培養条件)	前培養培地	前培養条件	脱水前処理 (Loading)	PVS2 処理	保存期間 (LN 中)	洗浄条件	再培養条件
1	NS (20℃、暗所)	0.15 M suc + 0.6 M gly 0.3 M suc + 1.2 M gly	20℃ 暗所、1日間	0.5 M suc + 2 M gly 25℃、20分間	25℃ 20分間	1日間	1 M suc 25℃、20分間 (1/16濃度まで希釈)	22℃ 照明
2	NS (22℃、照明)	0.3、0.5、0.7 M suc 10、20、30 % PVS3	20℃ 暗所、1日間	0.4 M suc + 2 M gly 25℃、20分間 または無処理	25℃ 20分間	5時間	1 M suc 25℃、20分間 (1/8濃度まで希釈)	22℃ 弱光
	TS (22℃、照明)	0.3、0.5、0.7 M suc 10、20、30 % PVS3	20℃ 暗所、1日間	0.4 M suc + 2 M gly 25℃、20分間 または無処理	25℃ 20分間	5時間	1 M suc 25℃、20分間 (1/8濃度まで希釈)	22℃ 弱光
3	NS (20℃、暗所)	0.5 M suc + 2,4-D (0.1 mg/L)	22℃ 照明、3日間	0.4 M suc + 2 M gly 25℃、20分間	25℃ 10、20、30分間	2時間	1 M suc 25℃、20分間 (1/2濃度まで希釈)	22℃ 照明
4	NS (20℃、暗所)	5、10、15 % PVS3	22℃ 照明、1日間	無処理	25℃ 25分間	4時間	1 M suc 25℃、20分間	22℃ 照明
	TS (22℃、照明)	5、10、15 % PVS3	22℃ 照明、1日間	無処理	25℃ 25分間	4時間	1 M suc 25℃、20分間	22℃ 照明

LN : 液体窒素、NS : 非形質転換シュート、TS : 形質転換シュート、suc : ショ糖、gly : グリセリン  
PVS3 : 50 % w/v sucrose + 50 % w/v glycerol  
5 % PVS3: 2.5 % w/v sucrose + 2.5 % w/v glycerol  
10 % PVS3: 5 % w/v sucrose + 5 % w/v glycerol  
15 % PVS3: 7.5 % w/v sucrose + 7.5 % w/v glycerol  
20 % PVS3: 10 % w/v sucrose + 10 % w/v glycerol  
30 % PVS3: 15 % w/v sucrose + 15 % w/v glycerol

図1. 超低温保存後のトウキ非形質転換シュートの再生率

図2. 超低温保存後のトウキ形質転換シュートの再生率

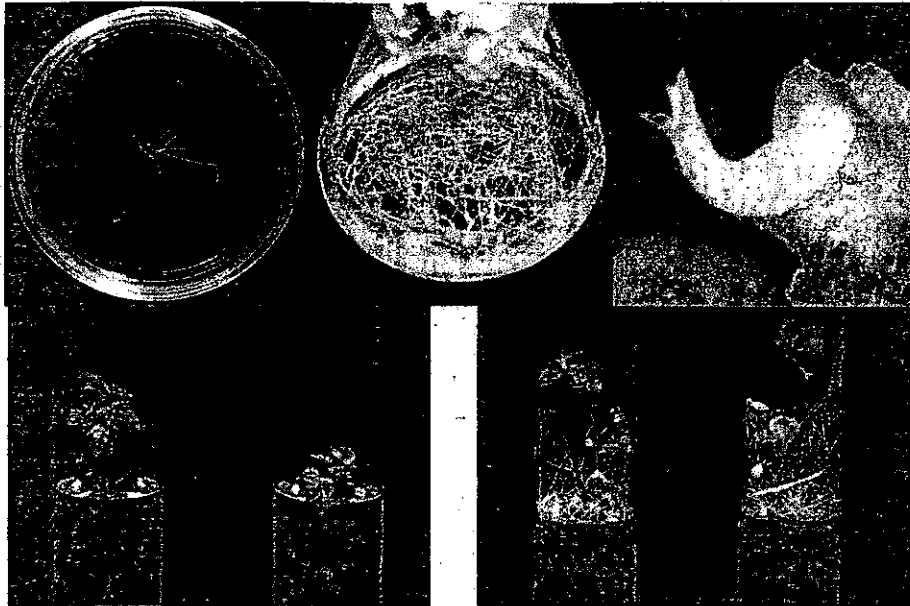
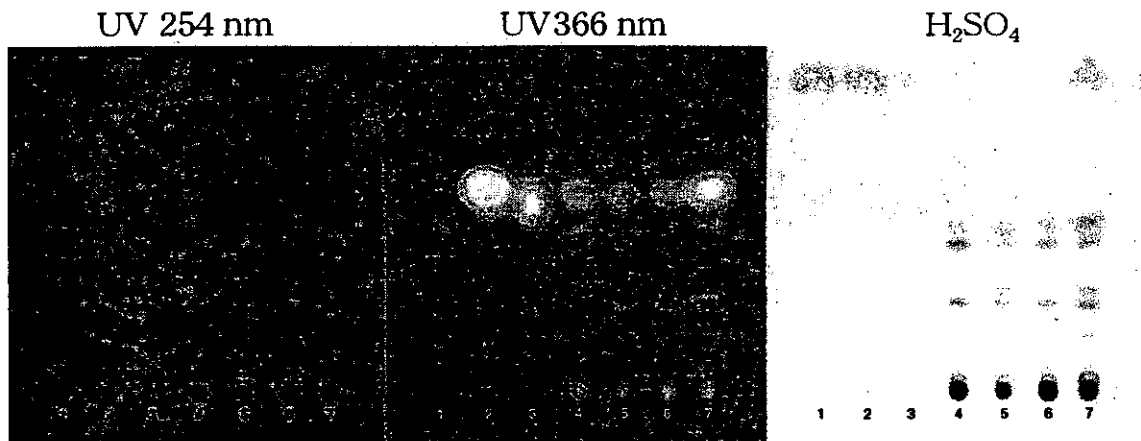


図3. トウキ組織培養物

上左: *Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724 株を胚軸に感染させて誘導した毛状根。上中: 毛状根の液体培養。上右: 毛状根切片を 2,4-D 0.1 mg/l と zeatin 0.5 mg/l を添加した 1/2MS 固形培地, 25℃, 暗所で培養して誘導した不定胚。  
下左: 非形質転換シュート未保存対照 (左) と超低温保存後 (右)。下右: 形質転換シュート未保存対照 (左) と超低温保存後 (右)



1. Butylidenephthalide rich fraction
2. Ligustilide rich fraction
3. Ligustilide and unidentified compound fraction
4. 非形質転換シュート新鮮葉のアセトンエキス
5. 形質転換シュート新鮮葉のアセトンエキス
6. 超低温保存後再生した形質転換シュート新鮮葉のアセトンエキス (clone-1)
7. 超低温保存後再生した形質転換シュート新鮮葉のアセトンエキス (clone-2)

図4. トウキシュートアセトン抽出物のTLC分析

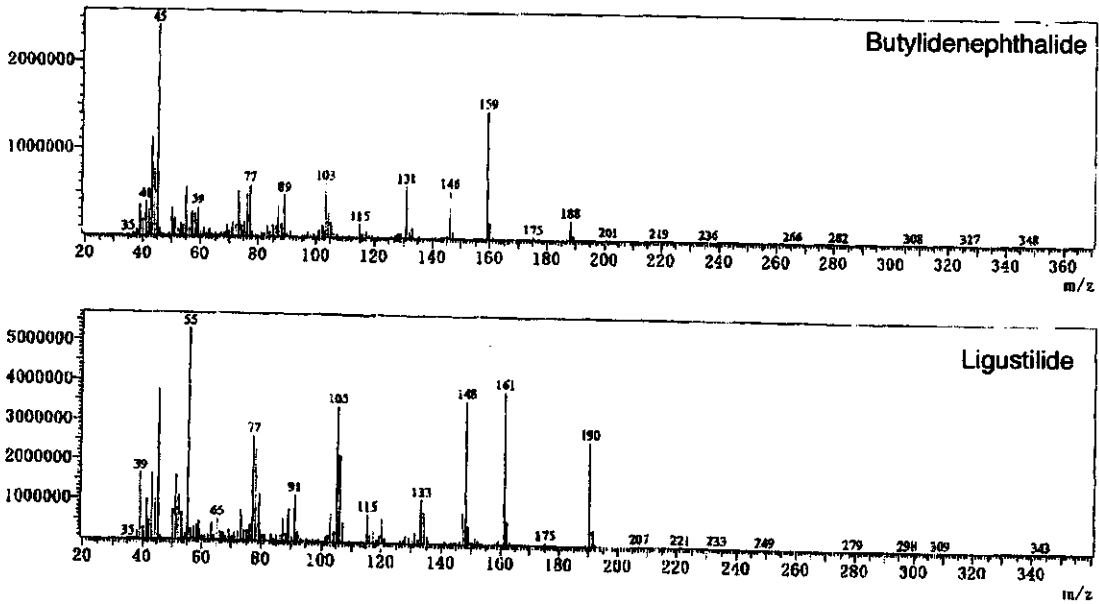
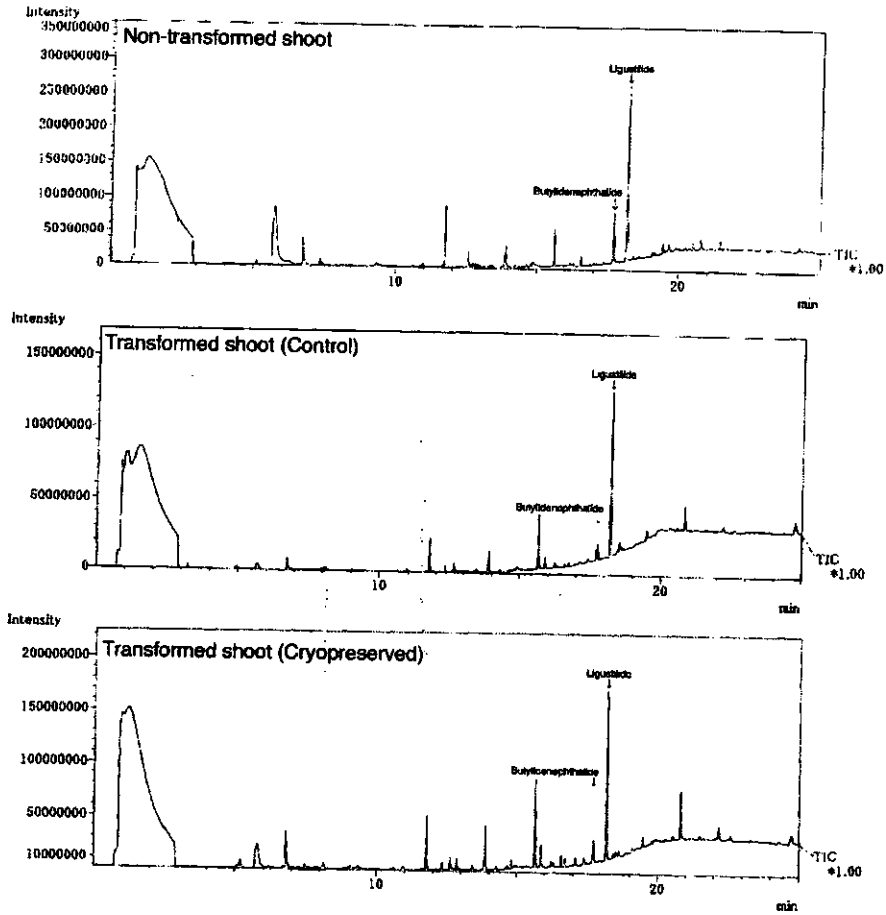


図5. トウキシュートアセトン抽出物のガスクロマトグラム (上3段) およびフタリド類の質量分析結果 (下2段)



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐竹元吉, 川原信夫, 飯田修ら		佐竹元吉	薬用植物栽培指針・生薬品質評価, part9	薬事日報社	東京	2001	

### 論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
三木栄二、金井弘夫、近藤健児、岡田稔、関田節子、佐竹元吉	標本に基づく薬用植物の生育状況変遷の推定	植物研究雑誌	75	347-359	2000
柴田敏郎, 吉田清人, 鈴木邦輝, 本間 尚治郎	「第2回薬用植物に関するワークショップー北方先住民族の有用植物とその利用法についてー」記録集	北国研究集録	5	1-44	2001
柴田敏郎, 成毛 哲也, 鈴木邦輝, 三浦 忠一, 本間 尚治郎	「第3回薬用植物に関するワークショップー北方先住民族の有用植物とその利用法について、その2ー」記録集 印刷中	北国研究集録	6	1-47	2002
W.Putalun, H.Tanaka, Y.Shoyama	TLC immunostaining of steroidal alkaloid glycosides	Encyclo.Chromatog.		849-851	2001
H.Tanaka, Y.Shoyama, For	skolin purification using an immunaffinity column combined with an anti-forskolin monoclonal antibody	Encyclo. Chromatog.		352-354	2001
S.J.Shan, H.Tanaka, J.Hayashi, Y.Shoyama	Western blotting of glycyrrhetic acid glucuronides using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody	L.Liq.Chrom.Rel.Tech nol.,	24 (10)	1491- 1499	2001
Noriko Fukuda、 Hiroyuki tanaka、and Yukihiro Shoyama	Double staining of western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Pg1 monoclonal antibodies	Biol.Pharm.Bull	24(10)	1157- 1160	2001
H.Tanaka, L.J.Xan, S.Morimoto, Y.Shoyama, R.Isobe, K.Nojima	Direct determination of naturally occurring biologically active compound-serum albumin conjugate by MALDI-Mass	Spectroscopy	15	1-18	2001
O.Morinaga, S.Nakajima, H.Tanaka, Y.Shoyama	Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA	Analyst	126	1372- 1376	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
W.Putalun, H.Tanaka, Y.Shoyama	Distribution of solasodine glycosides in Solanum khasianum fruiting stage determined by ELISA and western blotting	Natural Med.,	55(5)	243-246	2001
S.J.Shan, H.Tanaka, Y.Shoyama	Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and a new eastern blotting for glucuronides of glycyrrhetic acid	Anal.Chem.	73 (24)	5784- 5790	2001
MIKAGE Masayuki and TAKAHASHI Akira	A field research on <i>Ephedra</i> plants in Inner-Mongolia, China	<i>Newsletter of Himalayan Botany,</i>	31	1-7	2003