

厚生労働科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

遺伝子非組み替え・組み替え植物の内部形態に関する研究

分担研究者 酒井英二 岐阜薬科大学 薬草園研究室

植物組織培養技術の進歩とともに、植物の遺伝子についても解明が進み、我々に有用かつ重要な情報をもたらしている。個体識別を目的とした遺伝子による種の鑑定技術もその一つとしてあげられる。また、有用遺伝子を別の植物に導入する遺伝子組み換え技術も、育種分野新技術として注目を集め一部では実用化されている。この種の概念を越えたこの遺伝子組み換え植物に関しては賛否両論があり、薬用植物の分野では実用化は今のところされていない。しかし、園芸植物、飼料作物に関しては、既に市場に流通するまでになっており、技術的には完成されたものになりつつある。

今後、遺伝子組み換え薬用植物が流通するようになった場合を想定して、形態からその区別が可能であるかについて、検討を行った。

A. 研究目的

遺伝子組み換え技術は、園芸植物や飼料作物、更には食料生産を支える技術として日常化しつつある。優良系統の育種に関して、この新しい技術は飛躍的な貢献を示しているが、一方で従来の植物種の概念からかけ離れた植物が生まれることとなり、この急激な変化については賛否両論がある。

遺伝子組み換え植物と非組み替え植物とを区別する方法としては、例えばダイズについてはDNA抽出方法とPCR条件が検討されある程度方法が確立されている。

今回、遺伝子非組み替え・組み替え薬用植物を形態的に区別することが可能かどうかを検討する目的で、予備実験として栽培植物と野生植物の形態の比較を試みた。

B. 研究方法

薬用植物の多くは、野生品採取により供給されてきたが、近年の消費量の増大や自然保護の立場から一部の薬用植物につい

ては栽培化が進められている。例えば、トウキ、サイコなどは殆どが栽培品になっているが、栽培品と野生品の両方が生薬市場品として流通しているものも幾つかある。そのなかで今回はオウゴンを実験材料とした。栽培、野生の明らかなサンプルについて、同程度の太さの根を約1cm切り取り、ぬるま湯に1時間浸漬した後、氷結法により厚さ約20 μ mの横切片を作成しプレパラートとした。また、2、3の市場品についても同様にプレパラートを作成した。

C. 研究結果

最外にコルク層があり、繊維や石細胞が点在する点では、栽培品、野生品ともに共通しているが、導管の配列について相違が観察された。栽培品では、導管は放射状に配列しているのに対して、野生品では環状に連なる傾向があり、複数の環が観察された。この特徴をもとに、市場品を観察したところ、野生品、栽培品が確認できた。

また、野生品と思われる中心部に穴のあいたものについては、内部にもコルク層が形成されていた。

D. 考察

例えば、トウキは日本では栽培品のみであり、1年間育苗した後に舟形に定植するという栽培方法が確立している。これにより、多数の側根がある生薬トウキの形状が形作られており、野生品とは外観が明らかに異なっている。サイコに関しては、土壌の通気状態により木部の占める割合に違いが生じ、しなやかさに影響を与えていることが報告されている。またシコンに関しては、施肥栽培することで短期間に肥大するが、表皮に亀裂が入り枯死するものが多く、また色素生産量が低いことが報告されている。

今回観察をおこなったオウゴンについては、外観上の違いはあまり認められないが、内部構造に大きな違いが観察された。この相違は、直径が同程度でも生育年数が異なることに基因しているものと考えられる。そこで、栽培品について経時的に内部形態を調査する必要がある。

今回、栽培植物と野生植物由来の生薬の内

部形態について相違点を明らかにできた。多くの薬用植物は野生品由来であり、遺伝子組み換え薬用植物は栽培品となることから、形態的に区別する可能性が示唆された。

ただし、今回得られた知見は、栽培化することで現れる相違点であり、遺伝子導入によりどのような変化が組織にあらわれるかは、現状では不明である。

E. 結論

生薬オウゴンは、野生品と栽培品で明らかな構造の相違が確認され、両者を明瞭に区別することができた。

将来生産される遺伝子組み換え薬用植物と野生品植物とを形態的に区別する可能性が示唆された。

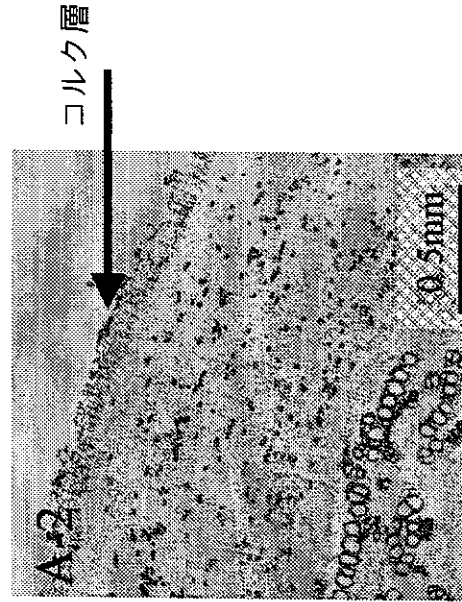
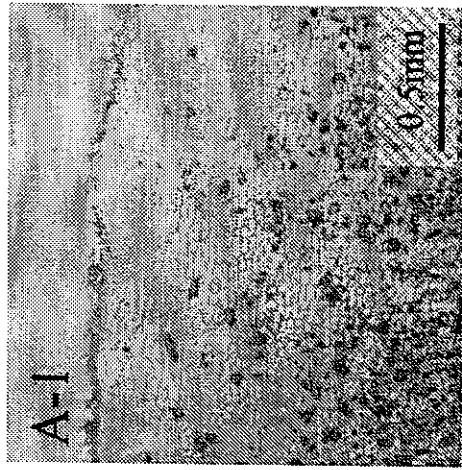
F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

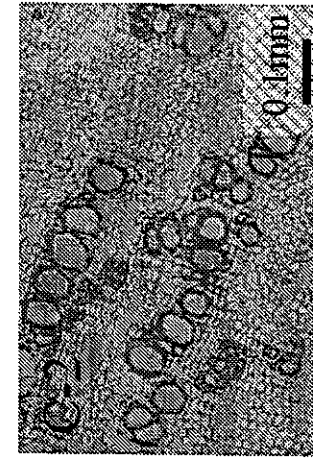
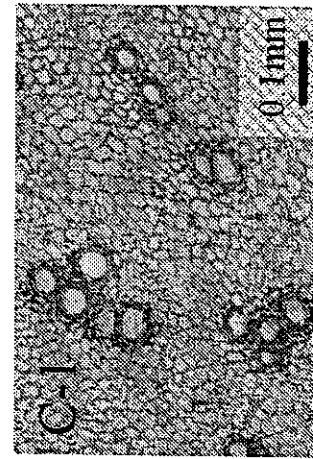
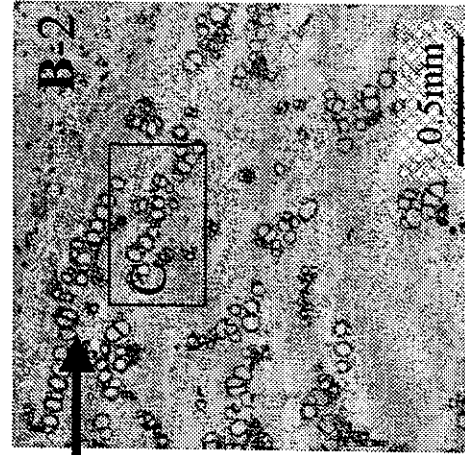
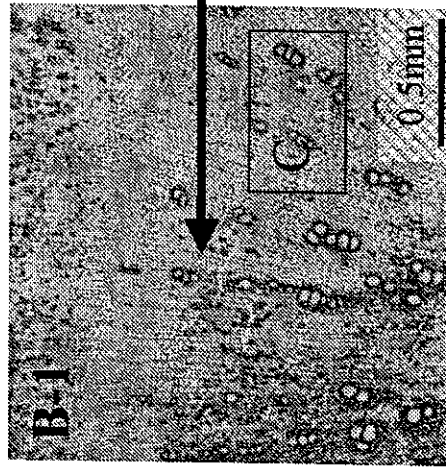
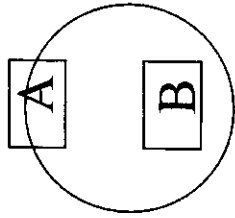
G. 知的所有権の取得状況

なし

オウゴンの内部形態



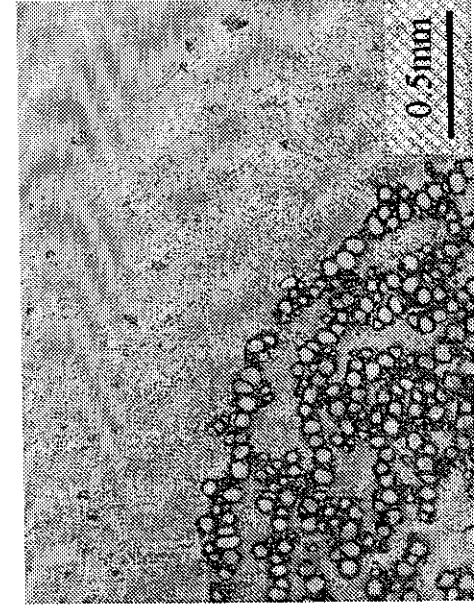
根の横切面



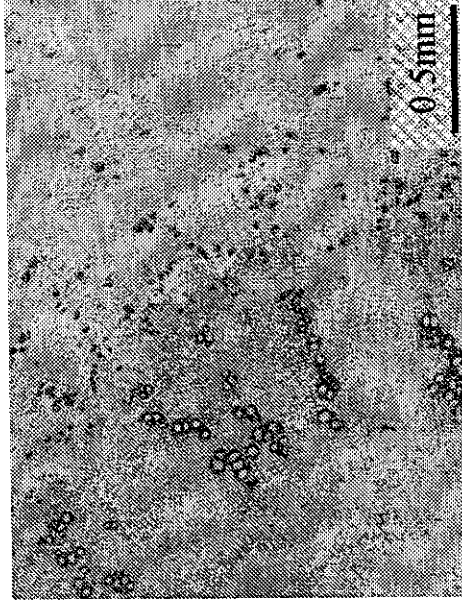
1:栽培由来 (H4.5.22)

2:野生由来 (H6.1.24)

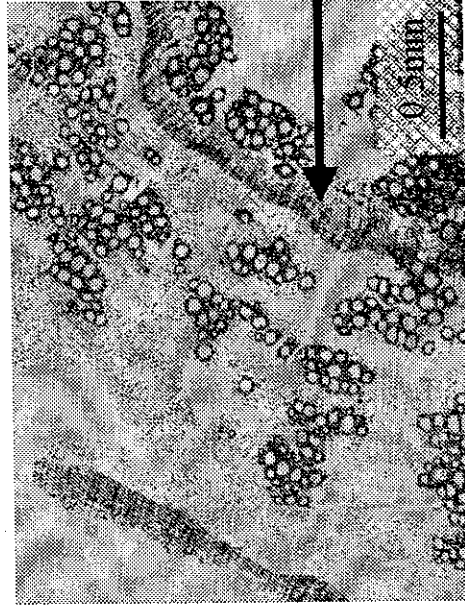
市場品オウゴンの内部形態



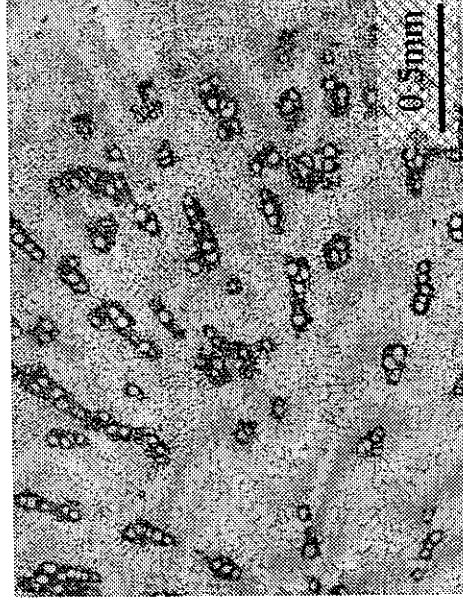
山東省 (H6.1.24)



河北省 (H4.5.22)



天津市 (H5.2.12)



武漢 (H5.6.22)

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究）
分担研究報告書

遺伝子組み替え植物の系統的保存と野生植物との交配防除法の研究

分担研究者 佐竹 元吉 お茶の水女子大学生生活環境研究センター

遺伝子組替え植物が環境に適合し、自然生態系を乱すことなく増殖させるためには、植物の生殖様式と深く関わっている。今回、維管束植物（シダ、裸子植物、種子植物）の生殖様式からこの問題点の解明を試みた。

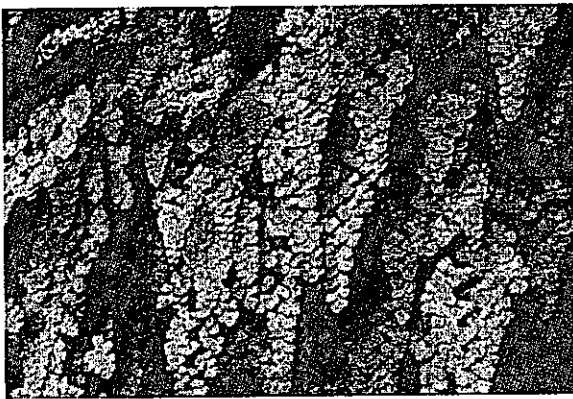
生殖様式の中でも花粉を運搬する風や動物が植物ごとに特異に進化して、それぞれの生育環境下で適応していることを長期間に渡る国内外の植物の観察と先人の詳細な観察とから、本研究テーマの遺伝子組み替え植物の系統的保存と野生植物との交配防除法を述べてみる。主に参考にした本は Kugler¹⁾ の *Einführung in die Blumentologie*（花生態学）である。

I シダ植物の生殖

シダ類に関しては、胞子の世代と胞子から前葉体になる時に性器が出来て半数体の世代になる。この時が他との交配が起こりうる時期である。前葉体は水分の多い環境で成育するので水分環境の制御と類縁胞子が近くにないことが肝要である。シダの胞子は風に乗ってどのくらい遠くへ飛ぶのか正確の情報はないが、シダの成育環境を歩き廻った経験から述べてみると、あまり遠くまでは飛ばないのではないと思われる。三重県尾鷲市の谷間で一休み

している時、谷の一角に生えているシロヤマシダ *Diplazium hachijoense* の胞子が目の前を層をなして、黄色の煙のように流れ始めた。風のない日中の昼時にしか見られない現象である。日本でシダ類の種類が多いと言われる鹿児島県紫尾山及び鹿児島県屋久島でも同様なことが観察された。交雑種が多く知られているノコギリシダ属 *Diplazium*、イヌワラビ属 *Athyrium*、イノデ属 *Polystichum* 等は同一種の分布は小さな谷ごとに違いがあり、谷を越えることはあまりない。広く分布しているミゾ

シダ、リョウメンシダ、フモトシダ等は環境適応性が良く、前葉体に適している水分の豊富な環境条件があげられる。シダの分布と遺伝的な個体変異を研究してもらいたい種に世界的に分布しているハコネシダ属ホウライシダ *Adiantum capillus-veneris* がある。



A. capillus-veneris L.

ホウライシダは地中海から太平洋諸島まで広く分布しているが日本の多くは野生ではなく栽培植物が逃げ出して野生化したものと田川らは記載しているが、この意見に一理ある点は江ノ島の分布である。ここには日本最初の温室が作られ世界の植物が持ち込まれた。当然 *Adiantum* 類も持ち込まれ、それが逃げ出し、これが鎌倉から横浜の海辺の薄暗い谷間に成育していると考えられることも出来る。しかし、相模川に面した相模原台地の岩壁に生えているものはどう見ても野生種と考えられる。周りに見られる植物は丹沢箱根要素イワニンジン *Angelica hakonenensis*、イワギボウシ *Hosata capitata*、ウラハグサ

Hakonechloa macra が並んで成育している。ここに生えているということは海岸性植物であるので、かつてこの付近まで海岸線があった時代の生き残りと考えられる。もし、この植物が野生であるならば江ノ島等相模湾に見られるものは同じグループといえることになる。形態学、成分特性及び遺伝的類似性から野生植物か外来種かの検討を待ちたい。

シダ類で遺伝子組み替え植物が出来たときには胞子の厳重な管理が不可欠ではあるが、胞子は高湿度条件でのみ前葉体を作るので、この点を注意すれば保存と野生植物と交配は可能である。

II 被子植物の生殖様式

被子植物は花が咲き、実を作って子孫を残している。花は被子植物の繁殖器官で、目立つ花と目立たない花とがある。花被がきれいな色の植物は虫を誘うために進化したものである。花被が目立たないイネやタケは、花粉を風が運んでくれるのできれいに飾る必要はない。

花の寿命：開花の時間が決まっている植物がある。決められた時間に数時間咲いているものがあり、朝咲くのはアサガオ、昼咲くのはヒルガオ、夕方咲くのはユウガオやユウスゲ夜咲くのはゲッカビジンやヤコウボク、イネの花粉はほんの1時間ぐらいしか飛び出さない。ハンニチバナ科やイチニチバ

ナ科と科名を代表するものもある。世界最大の花序を持つ *Puya raimondi* は 50 年—100 年に一度咲き、数千の花は下から順番に、1 個が 1 週間位咲き続ける。同じことがリュウゼツランでも知られている。一つの花で寿命の長いのはラン科の *Cymbidium* のように 1 ヶ月間位咲き続けているものもある。野生植物の代表のカタクリは約 2 週間で、ヤマユリは 1 週間である。花の寿命は遺伝的に決まっているようであるが、受粉が花を閉じるのに重要な因子であることは、Ashman & Schoen²⁾ 及び Proctor & HARDE³⁾ らの論文で見られる。

受粉様式：風媒花は世界の植物種の約 2—30 % で、残りのほとんどが虫媒花である。虫媒花以外に鳥や哺乳動物も花粉を運ぶことがある。鳥は嘴の長いハチドリがその代表である。桜の花に来るウソは花の蜜をガク筒から咬み切るので受粉の役割はしない。

植物の雌雄性：花には両性花があるが、雄性異株 (ad) と雄性同株 (am)、雌性異株 (gd) 雌性同株 (gm) がある。生殖には無配生殖 (ap)、閉花 (kl)、単性生殖 (parth)、自家和合 (sf) と自家不和合 (sst) がある。

花と花粉運搬様式：歴史的に見ると第一期は C.K.Sprengel⁴⁾ の花の構造と受精における自然界の公開 (図 1) で花の形、色、模様、香、蜜、両性の成育と花粉昆虫の種類との関連を述べている。第二期はダーウイン(1809-1882)

の送粉機構の記述で、ランは自家受精をさけるために昆虫の種類と花粉と柱頭の成熟をずらしていると観察している。第三期は実験的な研究で昆虫学者の V.Frisch⁵⁾ と植物学者の Knolls⁵⁾ が中心でその後の発展の基礎を作った。

受精：受精には花粉を送り込む結果、受精が行われる。自家不和の花は自家の花粉は同一花の柱頭では発育しない性質がある。

花の構造：裸子植物は多少むき出しの胚珠を持つ心皮をもっている。被子植物は雌蕊を形成し、柱頭、花柱と胚

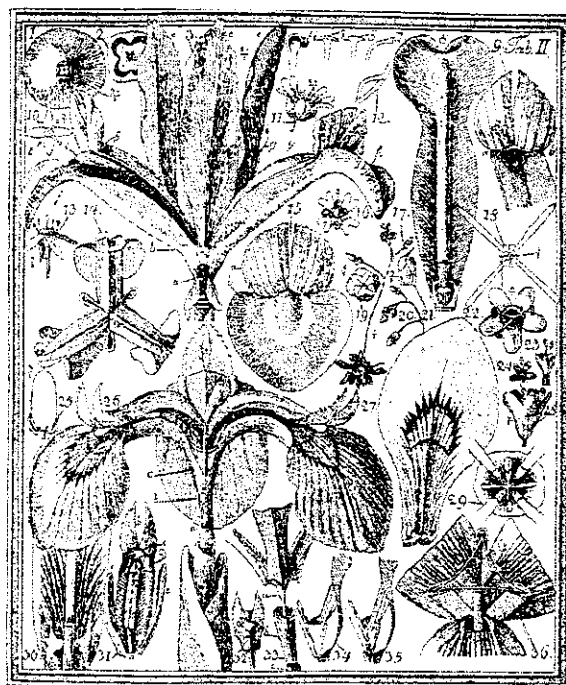


図 1. スプレングル著「花の構造および受精における自然界の秘密公開」から引用した見出し図版。

珠を含む子房からなる。

花被は色々の針葉樹のような鱗片状

の単純なものから、被子植物の複雑な多様性のものまで見られる。雄蕊は花糸と葯から成り、葯は二つの葯室からなり、各室は二つの花粉囊を持っている。(図2) 色々な雄蕊 (図3) がある。

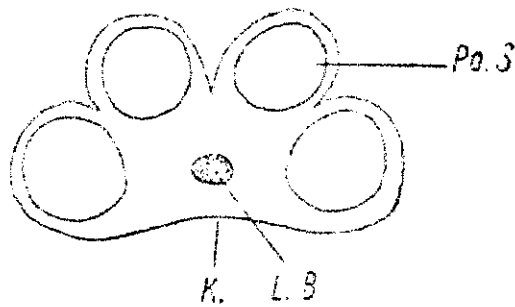


図2. 一つの雄しんの横断面
K: 葯隔, L.B: 維管束, Po.S: 花粉囊

被子植物では胚珠は心皮で覆われているので、柱頭で受粉する。柱頭は多様性がある。(図4)

花柱の長さで2種または3種の花が区別されるサクラソウ属植物がある。

(図5) レンギョウでは長花柱と短花柱があり、花粉発芽阻害物質としてクエルシトリンとルチンが取り出されている。短花の柱頭はクエルシトリンを分解するがルチンは分解できないと考えられる。

花はバラのような放射対称性の花からトリカブトのような左右対称性花(2対称面背腹性花)までである。背腹性花が蜜に集まって花序を形成する代表がセリ科である。キク科は周辺に背腹性花があり、中央部に放射対称性花があるエキナケア属やノコギリソウ属のも

のもある。

花の諸器官の展開は萼、花冠、雄蕊、雌蕊の順である。

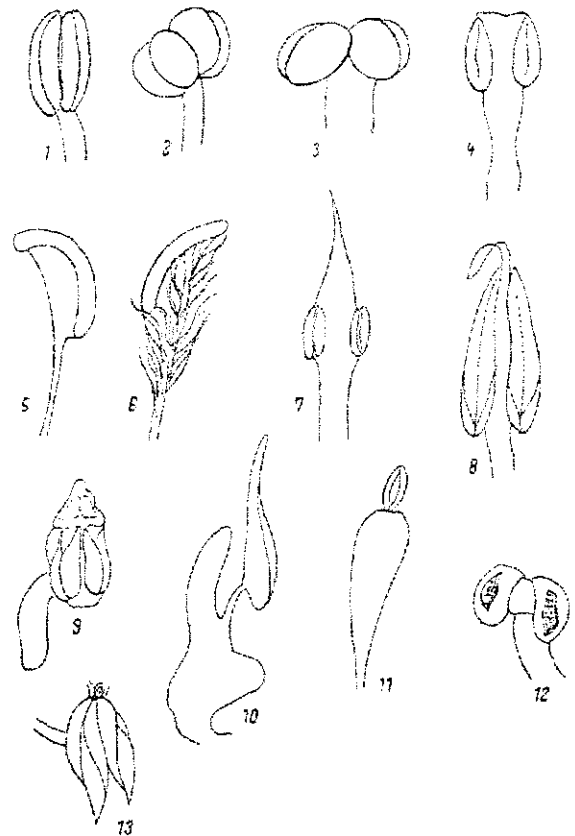


図3. 種々の雄しん

1. ホソバハマナデシコ, 2. *Hypericum punctatum*
3. ミズイモ, 4. *Berberis vulgaris*
5. 6. *Verbascum thapsiforme*
7. *Asarum europaeum*, 8. イワカガミダマシ
9. ニオイスマレ, 10. ルリジサ
11. *Anthyllis vulneraria* (マメ科)
12. *Thymus serpyllum*, 13. *Stachys palustris*

雄蕊の展開と雌蕊の成熟がほとんど同時に起こるものには両生同期成熟(ニリンソウ属、ウマノアシガタ属)がある。これとは異なり雌蕊の成熟が雄蕊の展開と異なるものを両生異期成熟とよぶ(ホタルブクロ属)。

雌蕊と雄蕊の成熟で、雌蕊先熟（トウダイグサ科、クリスマスローズ属、アネモネ）、雄蕊先熟（ナデシコ科、アオイ科、セリ科、キキョウ科、キク科）と呼んで区分できる。

単性花は同一の花に片方の性が欠けているものである。これには二つの場合がある。雌雄同株のものはモミ属、トウヒ属、マツ属、シラカバ属、ブナ属、ウリ属などである。雌雄異株の植物はイチイ属、ビャクシン属、ヤナギ属などがある。

両性花と単性花が同一株や別の株に見られるものもある。(1) 両性一雄性同株（セリ科）、(2) 両性一雌性同株（キク科）、(3) 三性同株（マクワウリ）、(4) 両性一雄性異株（イブキトラノオ属）、(5) 両性一雌性異株（ハコベ属）、(6) 三性異株（セイヨウトネリコ）、(7) 両性一雌性同株と異株（イブキジャコウソウ属、ハッカ属）、(8) 両性一雄性同株と異株（ダイコンソウ属）がある。(9) 混合型とすべきものに、セリバオウレンがある。この花は両性花株、両性一雄性同株、雄性花株と雌性花株が見られる。その他の同属植物については観察していない。閉鎖花は成熟期に展開して生殖器官を開放する開放花と異なり、常に開放しない花である。スマレ属やヒメハギ属の花弁は退化している。花粉囊の中の花粉数は少なくなるものもあるが、受精し種子を作る。

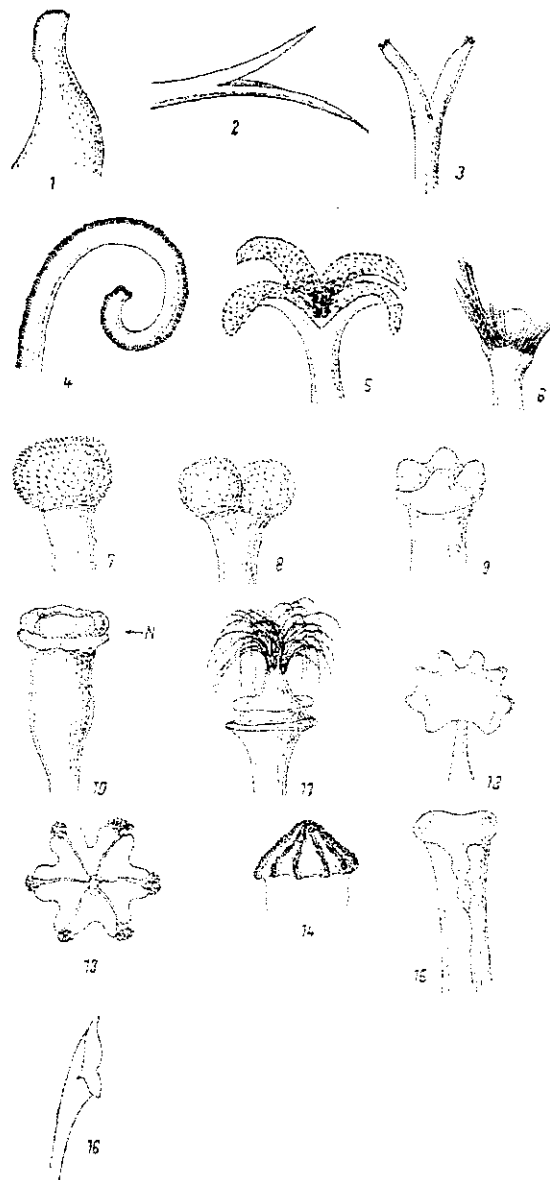
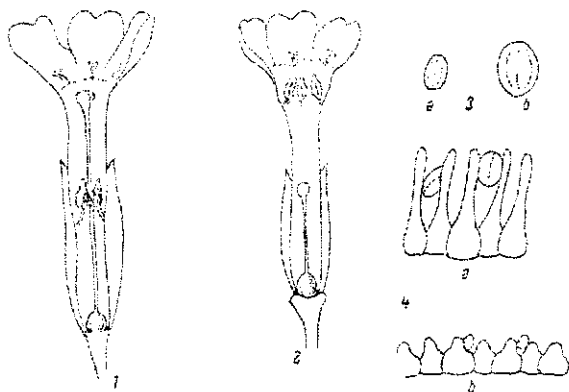


図4. 柱頭の種々

1. *Adonis aestivalis*, 2. *Salvia pratensis*
3. *Senecio spathulaefolius*
4. ホソバハマナデシコ, 5. オオアカバナ
6. *Lupinus polyphyllus*, 7. *Thesium bavarum*
8. *Orobanche caryophyllacea*, 9. ハイデソウ
10. *Berberis vulgaris*, 11. *Vinca minor*
12. *Corydalis cava*, 13. *Asarum europaeum*
14. *Papaver dubium*, 15. ルリヒエンソウ
16. ヒメハギ属一種

自家受精：葯が柱頭の上にある花は花粉が落下するので自家受粉しやすい。



Primula affinis

1. 花の側面、2. 花冠管、3. 花房、4. 雄蕊、5. 柱頭、6. 花柱、7. 胚珠、8. 柱頭、9. 花柱、10. 胚珠

図5

はじめ葯は柱頭の下にあるが後に花糸が伸長して、同じ高さになるものもある（アブラナ科、ナデシコ科）。花冠が日周期的リズムで花冠が閉じるとき、葯が押されて、柱頭に接触することもある（リンドウ科、ラン科）。リベリアコーヒーは開花前に花粉を自家の中でまき散らすので、開花期の柱頭は既に受粉されている。

自家受粉は高山、高原砂漠などの厳しい環境条件では多くみられる。

III 花粉の移動方式

花粉を運ぶ方法に水中送粉（多くの水草で見られる）、風媒花（風の強い地方の植物は風媒花で、Knuth, P.⁷⁾ はドイツの顕花植物の 21.5 % が風媒花である。ある島（Hakkigen）では 47 % が風媒花である。動物介在型送粉は多くは昆虫で、その他に鳥、コウモリ、ネズミ類などがある。水中送粉は今回省略す

る。

① 風媒花

風媒花は花粉が軽く空中を浮遊するので、柱頭への受粉率は悪いので、柱頭が受精可能な胚珠は1個に退化したものがある。（シラカバ属、アカザ科、カヤツリグサ科、ブナノキ科、イネ科、タデ科、ガマ科、ヤナギ科）

風媒花の花の構造による分類

(1) 不動型花：花が茎にしっかりと固定されているもの。花粉は風で花粉囊から吹き出され、雌性花序に運ばれる（マツ属、モミ属、カラマツ属）。イチイ属は雌雄異株で、雄花は6-8の花粉囊をもつ多雄蕊、雌花は長い管状珠孔を備えただ一個の胚珠を有する。裸子植物の中で、風媒花のものに地中海の *Ephedra campylopoda* は両性花と雌性花とがあり、両性花の雌の花の先端に蜜を出す管があり、昆虫を引きつけて受粉させている。南西アフリカの *Velvechia* は蜂が花粉を運ぶとされている。

(2) 花糸型花：花は茎に固定されているが、葯が大きく長い繊細な花糸に付いていて、風が花粉をまき散らすタイプである（イネ科、タデ、ガマ科、ヤナギ科、カヤツリグサ科）。ライムギの花粉の伝達距離は長く、600 m 離れた土地での品種交配が3%あったという研究もある。

(3) 花序型：雄花が尾状に垂れ下がっている穂状花序を形成する。ヤナギ

科、カバノキ科、クルミ科に見られる。

(4) 花型：(3) に類似して花も下垂するが、尾状花序的には成らない。雌雄異株のアサ科のアサ *Cannabis sativa* の雄花は複総状花序に配列して、雌花は穂状花序に類似した配列をする。トネリコ属もこれに属する。

(5) 弾発型花：雄花は開花の時に爆発するように花粉を吹き出すものである。イラクサ科の *Urtica dioica* の雄花の花糸は内側に巻いているが、開花時に弾発して花粉を放出する。

② 動物媒介受粉

風媒花は花粉が花に達するのが偶発的なこととは逆に、動物が目的を持って行動することによって花粉が運ばれる点が異なる。動物は蜜や花粉を栄養素として求めてくる。

(1) ほ乳動物による送粉：哺乳動物は大型のため豊富な食料のある熱帯・亜熱帯地方が有利である。飛行性を有するホエザル、キツネザルも花粉を運ぶ。リス類もデイコの花粉を運ぶ。リス類はアダンの堅い鱗片葉をかみ碎き受粉させる。ハツカネズミやクマネズミはリュウゼツランの花粉を運ぶ。オーストラリアのバンクシア *Banksia* 属植物はフクロヤマネやミツクイが花粉を運ぶ。コウモリの中でも舌が長くなったヒナコウモリが花粉を運ぶ。

(2) 鳥類による送粉：鳥類は哺乳動物より大きな役割がある。特にハチドリは有名である。アンデスの世界最大

の花序を持つ *Puya raimondii* もハチドリが花粉を運んでいる。花鳥の嘴は花にあわせて変異が多い。

1) ブラッシ状花：蜜が多く、雄蕊も多いユーカリ属に代表される。

2) かご状：ヤマモガシ科のプロテアの花序は高さ 10 cm、直径 5 cm；ンドキワタがある。

3) 鐘状花：強烈な色を帯びたものが多く、中央部の鐘状部分に生殖器官を有する。アオイ科のフヨウでは蜜が基部にある。

4) 筒状花：花は細長い。ユリ科のアロエ、ナス科の *Nicotiana glauca* などである。*N. glauca* は同様にアナナス科の *Puya raimondii* の筒状花にもハチドリが花粉を運搬しているのを見たことがある。

5) 弾発花：外部からの接触で花が突然開花し、花粉を弾発するものがある。この例として、ミャンマーのヤドギリ科 *Loranthus longifolia* がある。

6) 旗状花：赤色の花で、蜜は花の奥にある。デイゴ、アマリリス、ストレッチア（極楽鳥花）がこれである。

(3) 虫による花粉総分 虫媒花：

1) 何故昆虫が来るのかは食料として蜜や花粉の収集が主である。

(a) 蜜は花によって構成成分(ショ糖、ブドウ糖、果糖等)や密度も異なる。分泌の絶対量と分泌時間も異

なるものもある。花の蜜は蜜染で分泌される。蜜腺は花粉が付きやすい部分や柱頭に受粉しやすい部分に付属している。センブリ属 *Swertia* では蜜腺の上に毛が生えている。蜜腺は花以外の場所にも見られる。

- (b) 花粉はタンパク質、炭水化物、脂肪、ビタミン等を含む。
- (c) 食毛及び即食用組織は *Verbascum lychnitis* の雄蕊の毛には糖分が含まれる。バニラの唇弁上に横に並んだ鱗片上の組織で、ミツバチ類が食べる。
- (d) 昆虫の性欲の満足も観察される。良い花の香りで集まった昆虫が花の上で交尾することも観察される。
- (f) 産卵場所として、多肉の果実はハチ類が好む場所である。イチジク *Ficus carica* は雄株の花に入り、花粉をつけて雌雄同株の花で受粉をするが同時に産卵も行う。現在のイチジクは単為結果を行うので、無種子の果実を生産する。

1) 花の刺激方法

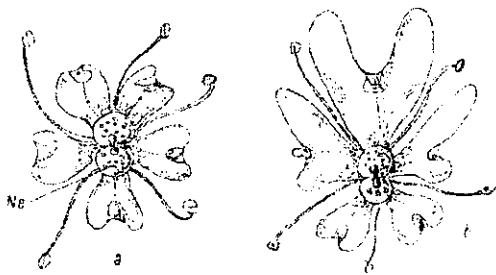
- (a) 視覚刺激：色彩（鮮明な色で花を際立てている。花の色素はアントシアン類、フラボン類、カロチノイドなどである。）、形（平面型と

立体形がある。左右対称と放射対称、大きさの違い、花序が一つの花を現すものなどがある。）

- (b) 化学的刺激：香料（インドール臭、アミノ臭、フェノール臭、パラフィン臭、テルペン臭等がある。香りは花被の表面から出るものが多い。夜咲くマツヨイグサ類は夜間に強い香りをだす。）

2) 蜜のある場所

- (a) 花盤にあるもの：セリ科植物に見られる。ミシマサイコの黄色の花盤は多くの種類の昆虫が集まる。この昆虫を狙ってスズメバチ類が飛来する。
- (b) センブリは花被の内側にあり毛で覆われるもの。ハウノキの花被葉は多数の雄蕊と雌蕊を取り囲んでいるが全面に蜜腺が分布している。
- (c) ロート上の花では蜜腺は最も奥にある。タバコやニチニチソウに見られる。
- (d) トリカブト属植物の花はガク片が花弁状になり、上部の兜状の内部に2個の杯状の蜜葉がある。蜜腺は柄の上部のみぞにある。主にハナマルバチ属が花粉を伝播する。
(図6)



4. 3. 1) *Hebecloni sphonum* Kunz.

1) 花の中心

2) 花の基部

Ne: 蜜腺

図 6

(e) エンゴサク属の蜜腺は距の部分に含まれる細長くなった花被の先端にあり、長い嘴のあるハナマルバチ属が飛来する。(図 7, 8)

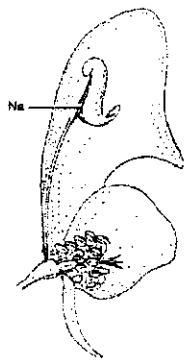
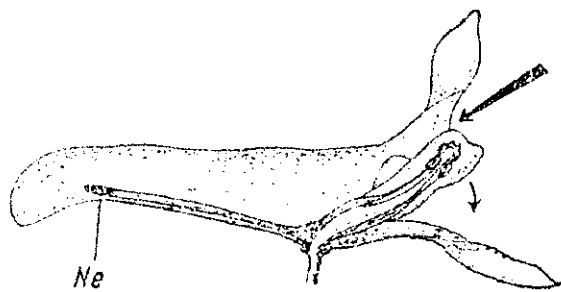


Abb. 299: *Aconitum napellus*

図 7



Coriaria carn. Ne: 蜜腺

図 8

3) 香りで見える種内変異

サラシナショウマは亜高山帯から低地まで広区分している植物であるが、Pellmyr⁸⁾ はサラシナショウマ *Cimicifuga simplex* に来る昆虫が高度の違いで異なることを見出し、その成分と昆虫の関連を調べた。

タイプ 1 は 1300 m 以上に生える植物はヒメマルハンバチが来て、タイプ 2 は 1000 m 以下の林の中ではタテハチョウが来て、タイプ 3 は 1000 m 以下で開花期が遅く日陰の高湿な場所のものは時々トラマルハンバチが訪れる。(図 9)



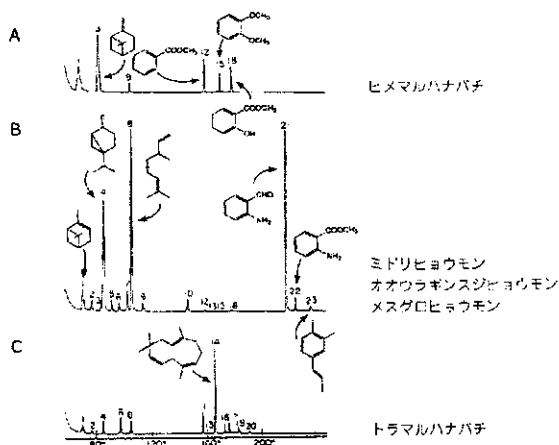
サラシナショウマ *Cimicifuga simplex*

タイプ 1 は β ピネン、安息香酸メチル、1,2-ジメトキシベンゼン、サルチル酸メチルが主であった。タイプ 2 は強い香りがし、サビネン、trans- β -オシメン、アントラニクアルデヒド、イソオイゲノールが主であった。タイプ 3 はフムレンが主であった。タイプ 1 に 2 の成分を添加するとタテハチョウの訪問が増加した。

この研究は類似した地域でも花の香

りが異なることが知られているラン類でも見られると思われる。低地から高山まで分布する植物の研究には大変興味ある実験と思われる。例えば、トウキは海岸形から高山型までであるのでこのような見方で観察することも興味を持たれる。遺伝子の変異がどのレベルで観察されるかも是非検討してもらいたい。

図 9



終わりに

植物の変異は周辺の動物を巻き込みながら進化している。種の進化は新しい遺伝子の配列が見つけ出されると思う。遺伝子組み換え植物体を保存し、自然界との交配を防ぐためには、今まで述べてきたような植物の特徴を正確にとらえることが大切である。個々の植物の注意深い観察から交配方法、隔離方法や保存方法が見出されると思われる。

引用文献

- 1) Kugler; Einführung in die Blütenologie, Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1955)
- 2) Ashman & Schoen ; How long should flower live? Nature, **372**:788-791 (1994)
- 3) Proctor & HARDE ; Effect of pollination success on floral longevity in the orchid *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) American Journal of Botany **82**:1131-1136 (1995)
- 4) C.K.Sprengel; Das entdeckte Geheimnis der Nature in Bau und Befruchtung der Blume, 1793, Faks.-Druck 1893
- 5) V.Frisch; Der Der Farbensinn und Formensinn der Biene. Zool. Jb. Phys. Abt. 35 (1915)
- 6) Knolls: Insekten und Blue. Abh.zool. Bot. Ges.Wien 12 (1926)
- 7) Knuth, P.: Handbuch der Blütenbiologie, Leipzig 1898 (1905)
- 8) Pelmyr, O. 1986. Tree pollination morphs in *Cimichifuga simplex*, incipient speciation due to inferiority in competition. *Oecologia* **68**:304-307

協力研究報告書

ヨーロッパの薬用植物種の導入と栽培法及び生態系への影響に関する研究

協力研究者 後藤勝実 京都薬科大学附属薬用植物園

昨今、ヨーロッパ生薬が医薬品としての使用に加え、健康食品として用いられる風潮が広まり市場での需要が増してその重要性、話題性が高まっている。昨年に引き続き、薬用植物園などの展示圃場、栽培実験圃場での栽培植物の種子の確保に関して、いままでの栽培経験から難採種性の種についてその種子の確保に関して報告する。今年度は難採種性の植物種としてルリジシャを選び、同時に生殖様式と環境との関わりについて検討した。

A. 研究目的

ルリジシャ (*Borago officinalis* L. ムラサキ科)

ルリジシャはムラサキ科の一年草で、北アフリカ原産であるが、古くよりヨーロッパに導入され現在は広くヨーロッパに分布している。薬用としての利用は多岐にわたり茎、葉、あるいは乾燥させた花は浸剤として、発汗剤・鎮静剤として用いられ、同様の部位を煎剤として鎮痛剤にその他、手浴・足浴用剤に新鮮な地上部を用い、細かく刻んだ新鮮な地上部をハップ剤として火傷の治療に、そのしぼり液は利尿剤に用いられる。

栽培は困難ではないが、根が非常に細く直根であり移植が困難であるため、ベッドに直播し発芽後間引きによって管理するか、育種用のポットに数粒播種し発芽後本葉が展開した後に間引き、一株にして根鉢を崩

さぬようにベッドに移植し栽培管理する。

採種は他の植物と同様に完熟を待って行うと非常に困難である。その理由に種子の構造があげられる。ルリジシャの種子は下向きの萼筒から落下する。完熟すれば黒く熟し、未熟な時は緑色を呈するが落下すれば十分熟していると考え。そこでこの種子の落下後の状況を明らかにし、採取法と環境への影響を検討した。

B. 研究方法

栽培圃場の整備、施肥条件、栽培管理、播種条件、播種時期、採種時期など）種子保存条件などに関しては昨年度の報告書に準ずるものである。

C. 研究結果

本植物の種子はエライオソーム*を有しているため、落下した種子はアリ（本園で

はクロヤマアリ)にその巣穴に運ばれほとんど採種が不可能であった。これを防ぐために、種子が形成されまだ完熟していない未熟な状態で萼筒内の花盤に着床している状態の時に採種し、室内で後熟させそれを保存している。それらの種子の発芽能力は完熟後に採種し播種したものとその発芽率には大きな差異はみられなかった。この採種方法で毎年採種することができ、所定の栽培箇所での展示栽培が可能になった。

*エライオソーム (elaiosome) アリを誘引する物質 (オレイン酸などの脂肪酸、グルタミン酸などのアミノ酸、ショ糖などの糖) を含んだ種子の付属体で形態的には珠皮に由来し、種子が発生時に胎座 (たいざ) に付着していたへそと呼ばれる部分にできる。

このエライオソームの付いた種子をアリが見つけて巣へ運ぶ。運ばれた種子は、巣の中でエライオソームの部分だけが食べられ、そのあとの種子は、巣の中のゴミ捨て場に捨てられたり、巣の外へ土と一緒に捨てられたりする。いずれにしても種子は発芽能力を失うことなく、運ばれたことになり、アリにとっても、栄養に富むエライオソームを獲得できるので、双方が利益を得ることになり、アリと植物は双利共生の関係にあるといえる。このような方法で、種子を散布する植物をアリ散布植物と呼ぶ。

日本におけるアリ散布植物としては、スミレ属、イチリンソウ属、フクジュソウ属、ミスミソウ属、キケマン属、クサノオウ属、エンレイソウ属、カタクリ属などに200種類くらいはあると考えられている。



ルリジサ



種子を運ぶアリ



種子を運ぶアリ

薬用植物の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 氏名 野口博司 静岡県立大学薬学部

カルコン合成酵素（CHS）スーパーファミリーを形成するⅢ型ポリケタイド合成酵素の中には、近年、マロニル CoA のみを基質としてナフタレンなどカルコン以外の骨格を構築する酵素が報告され注目を集めている。クロモンやアントラキノンなど複数のポリケタイドを生産する薬用植物である大黃（*Rheum palmatum*）より、新規酵素遺伝子の探索を行った。これまでジケタイドの骨格を構築するベンザルアセトン合成酵素について知られていたが、ここでは新たに単離に成功した新規 CHS 様クローンの機能解析について報告する。

391 個のアミノ酸配列からなる ORF をコードする新規クローンは、これまで同様に、CHS スーパーファミリー酵素において保存されているアミノ酸配列に基づく PCR クローニングにより単離された。CHS とはアミノ酸レベルで 50%程度の相同性しか示さないが、CHS 活性中心を構成するアミノ酸残基 C164, F215, H303, N336 はすべて保存されている。CHS との相同性に基づくモデリングにより、CHS とほぼ同様な立体構造と活性部位キャビティの大きさを共有することが示された。さらに、大腸菌および酵母における遺伝子発現を行い、酵素機能を検討したところ、マロニル CoA のみを基質としてヘプタケタイド及びオクタケタイドなど複数の生成物を与えることがこれまでに確認された。この酵素活性は C164S の部位特異的変異導入により消失した。

A. 研究目的

漢方で緩下剤などとして用いられる代表的な薬用植物である大黃は、スチルベン誘導体やアントラキノン類、ナフタレン誘導体、フェニルブタノイドなどを豊富に含有する。高等植物に普遍的に存在し、フラボノイドの生合成に関わるカルコン合成酵素（CHS）以外にも、同じく1分子のクマロイルCoAと3分子のマロニルCoAからレスベラトロールを合成するスチルベン合成酵素（STS）の他に、脱炭酸を行い開始基質に対してメチル基を縮合することになるベンザルアセトン合成酵素（BAS）のが確認され、更には1分子の

アセチルCoAと7分子のマロニルCoAからアントラキノンの骨格を合成する酵素など、反応機構を異にする複数のポリケタイド合成酵素の存在まで期待された。そこで、これらポリケタイド合成酵素のクローニングとその機能解析を目的とした。

B. 研究方法

本学薬用植物園で栽培されている大黃 *Rheum palmatum* 苗の葉及び根より、それぞれAGPC法を用いてtotal RNAを抽出し、逆転写反応により1st strand cDNAを作成した。これを鋳型として、カルコン合成酵素やスチルベン合成酵素におい

てよく保存されている領域の配列をもとに設計されたイノシンを含む縮重入りのプライマーCHS-112S, CHS-380Aを用いてPCRを行った。800 bp付近にバンドが出現することが予想されたが、アガロースゲル電気泳動の結果、バンドは検出されなかった。そこで、このPCRの反応液の少量を鋳型として、プライマーCHS174S, CHS-368Aを用いてnested PCRを行った。予想された600 bpのバンドが出現したのでこれを精製し、pT7Blueにサブクローニングし、塩基配列の解析を行ったところ、葉より2種、そして根より3種のそれぞれ微妙に異なる配列を持つ、5種の約600 bpからなるcDNAコア配列を得た。これらクローンを順にleaf 1, leaf 2, root 3, root 4, root 5と名付け、夫々3'末端については、コア配列に基づいて作成した特異的プライマーと、ポリAを持つアダプタープライマー-RACE32を用いて、nested PCRを行う3'-RACE法により配列の解析を行った。5'末端については、まず、RNAの逆転写を、コア配列に基づく特異的プライマーを用いて行い、次にターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ(TdT)によりポリAからなるアンカー配列を付加した後、特異的プライマーとRACE32を用いて、nested PCRを行う5'-RACE法により配列の解析を行った。3', 5'末端においてそれぞれ2個のクローンについて配列決定を行い、根よりとれたクローンroot 5について、全長配列を決定した。

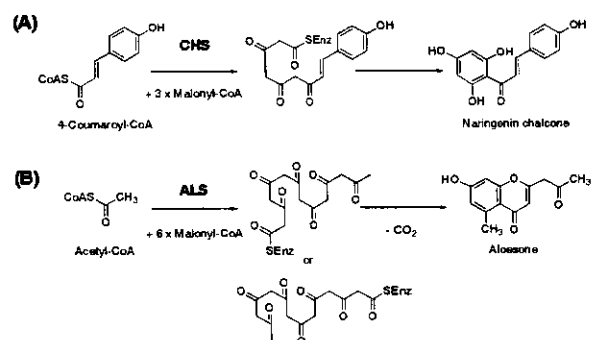
5つのクローンの内、leaf 1, leaf 2, 及びroot 5については、CHSスーパーファミリーにおいて保存されているF215(CHSにおけるナンバリング)を欠損していた。夫々の全長ORFのC末端にヒスチジンタグを付加した融合タンパクとして大腸菌内で異種発現を行い、Niキレートカラムを通過させた分画を精製酵素として酵素反応に用いた。組換え酵素の存在をSDS-PAGEにて確かめた。

酵素反応は、アセチルCoA、クマロイルCoAとマロニルCoAを精製酵素と共に

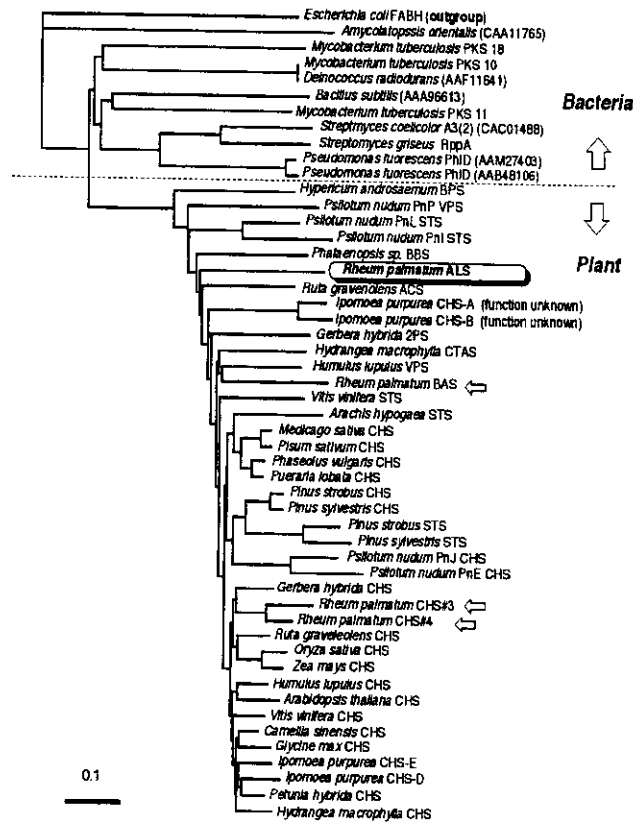
30 °C、20分以上インキュベートすることにより行い、塩酸の添加により反応を停止し、酢酸エチルで反応生成物を抽出し、逆相のHPLCによる分析を行ったところ、コントロールと比較して酵素反応の進行が確認され、酵素反応生成物を得た。既にleaf 1, leaf 2については、ベンザルアセトン合成酵素をコードしていることが判明していた。I. Abe, Y. Takahashi, H. Morita, and H. Noguchi ; Benzalacetone synthase: a novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum*, *Eur. J. of Biochem.*, 268, 3354-3359 (2001)

C. 研究結果

今回新たに遺伝子配列からはカルコン合成酵素スーパーファミリーに属しながらどのような活性を持つ酵素をコードしているか不明なroot 5について検討した。種々の開始基質とポリケタイド鎖伸長基質を用いて検討を行った。先ずLC-ESIMSによる詳細な分析を行ったところ、アロエの成分であるaloesone (ca 0.5 mg)と思われる結果を得た。



物理分光データは次の通りであった。UV: λ_{max} 243, 259, 291 nm. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9.55 (1H, s, 7-OH), 6.59 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 6-H), 6.56 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, 8-H), 6.01 (1H, s, 3-H), 3.83 (2H, s, 1'-H), 2.63 (3H, s, 5-Me), 2.19 (3H, s, 3'-Me). EI-MS *m/z* (rel. int.): 232 (M⁺, 81), 190 (100), 161 (21), 151 (46), 43 (76)



D. 考察

本クローンは高等植物より単離され、性状の確認された唯一のマロニルCoAのみを利用して、ポリケタイドを生合成する酵素をコードしている遺伝子である。これまでアサガオの *chs-a*, *b* がアセチルCoA、マロニルCoAを基質として芳香環を有するポリケタイドを合成する酵素をコードしていることが分かっており、キク科のパイロン合成酵素遺伝子も含めてカルコン合成酵素スーパーファミリーに属する酵素遺伝子は、ポリケタイド合成酵素一般をコードする可能性が予想されたが、これまでキク科では芳香環は形成されず、アサガオの *chs-a*, *b* の場合は、クロモンを形成するものの、本来の基質と考えて良いかどうか疑問も大きかった。ダイオウにおける aloesone の生合成は検討されたことはない。しかしダイオウの成分としては顕著なものではないものの、既に微量単離されたという報告もあり (西岡、柏田私信)、本植物の成分の構成全体を勘案して、この生合成活性は本

遺伝子の生理的な機能として考える上でかなり高い蓋然性を有しているといっても良いと思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Ikuro Abe, Yoriko Utsumi, Satoshi Oguro and Hiroshi Noguchi; The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide, *FEBS Letters*, 562, Issues 1-3, 171-176 (2004)

2. 学会発表

阿部郁朗、内海依子、佐野幸恵、小黑聡、野口博司、大黃由来新規III型ポリケタイド合成酵素の機能解析 日本薬学会第124年会 (大阪) 31-P2-440 (2004)

F. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし