

溶液(3 mg/mL)とその2倍量の Freund's Complete Adjuvant とをソニケーターを用いて乳化させたものを免疫源とした。免疫は2週間おきに行い、免疫源 0.05 mL を足蹠へ2回に分けての投与と、背中皮下へ数回に分けての投与を交互に行った。採血は2回目以降の各免疫の一週間後に眼窩より行った。また、血清の抗体価は、それぞれのサイロシンハプテンを OVA に結合させたものを固相抗原として用い、二次抗体には horseradish peroxidase(HPR) が結合した抗マウス IgG 抗体を、その酵素基質として過酸化水素水、呈色反応試薬として ABTS {2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt} を用い、414 nm にて吸光度を測定する系により求めた。

3. 細胞融合および抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニング

マウスに計4回の免疫を行った後、血清の抗体価が高いマウスを選び、最終免疫として腹腔内に抗原の PBS 溶液(250 μ g/mL)を 0.2 mL 投与した。最終免疫から3日後(中2日間)に脾臓を取り出し、脾細胞とマウスミエローマ細胞(NS-1)とを50%ポリエチレングリコールを用いて細胞融合した。細胞融合後、24 well プレートに蒔いて培養を行い、HAT 培地によりハイブリドーマを選別した。次に抗体価が高い well のハイブリドーマを3段階希釈により BriClone(約10%)を含む HT 培地に 3 cell/mL の細胞懸濁液とし、96 well プレート(100 μ L/well)にて培養することによりクローニングを行うこととした。

4. サイロシングルクロナイドの合成

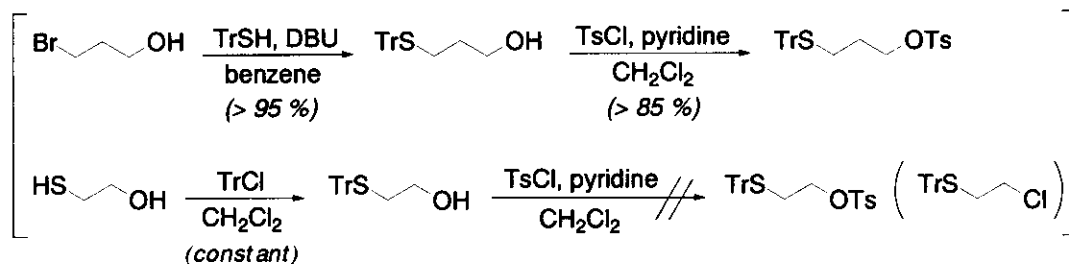
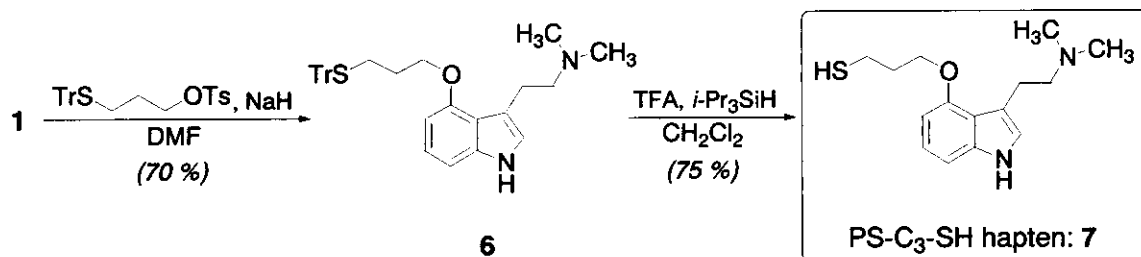
先に述べたように、サイロシン(1)およびサイロシピン(2)は生体内において代謝されてサイロシングルクロニド(3)と

なる。マジックマッシュルーム服用者の尿中には3が含まれるものと考えられ、3の標品を合成することは尿中代謝物を分析する上で必要である。種々の薬物のグルクロナイドの合成法が報告されている。グルクロン酸部分をフェノール性水酸基に結合させる方法として、トリクロロアセトイミデート法、臭化糖カップリング法、過エステルカップリング法、1-ヒドロキシ糖カップリング法などがある。今回は、Brown らによるモルヒネグルクロナイドの合成手法を参考にして、サイロシン-O- β グルクロナイドの合成を検討した。

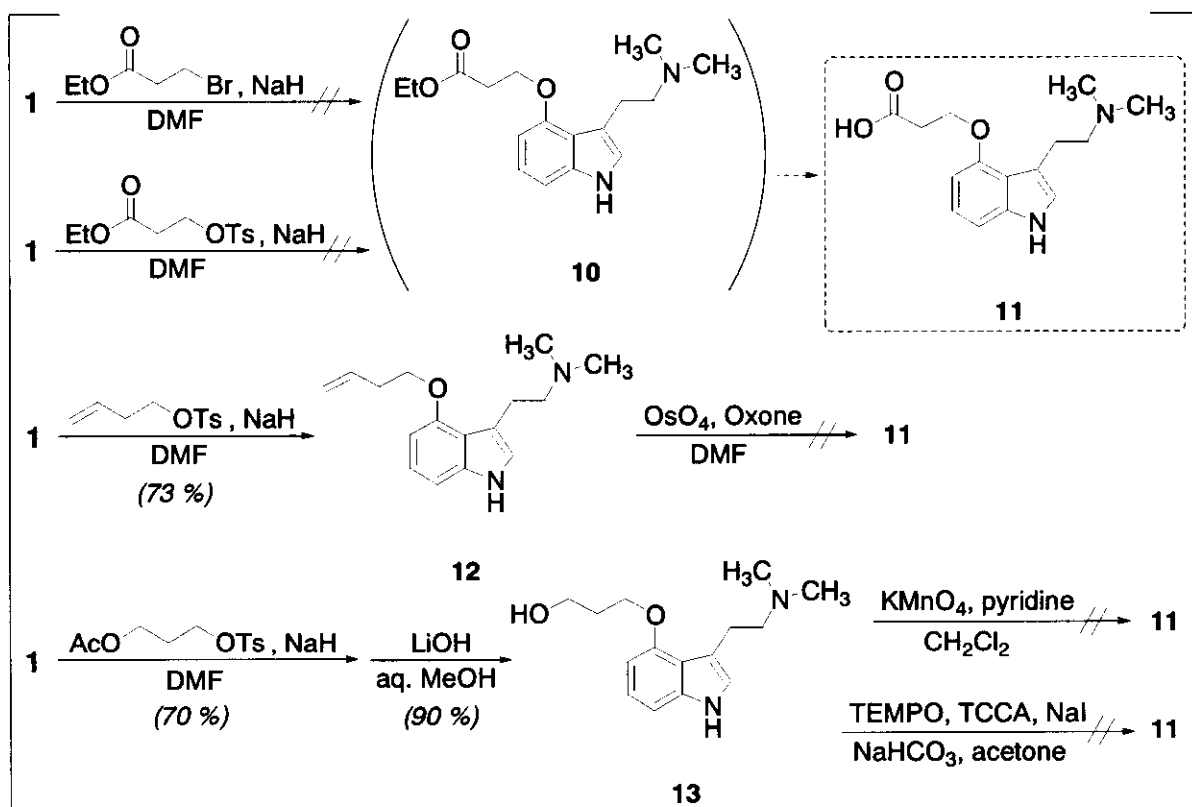
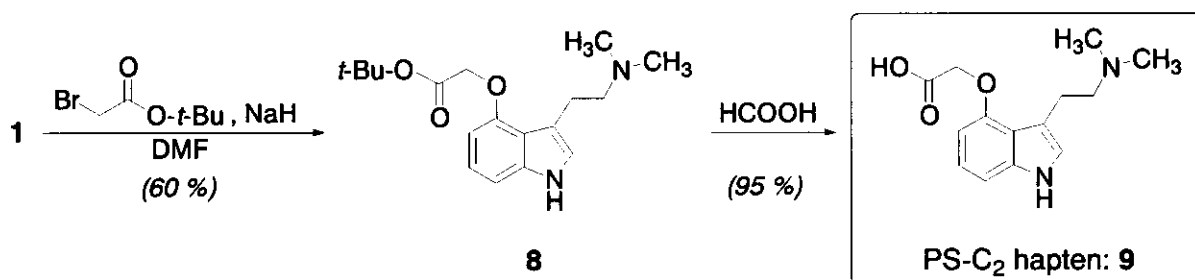
C. 研究結果

1. サイロシンをモチーフとした新規ハプテンの合成と抗原の調製

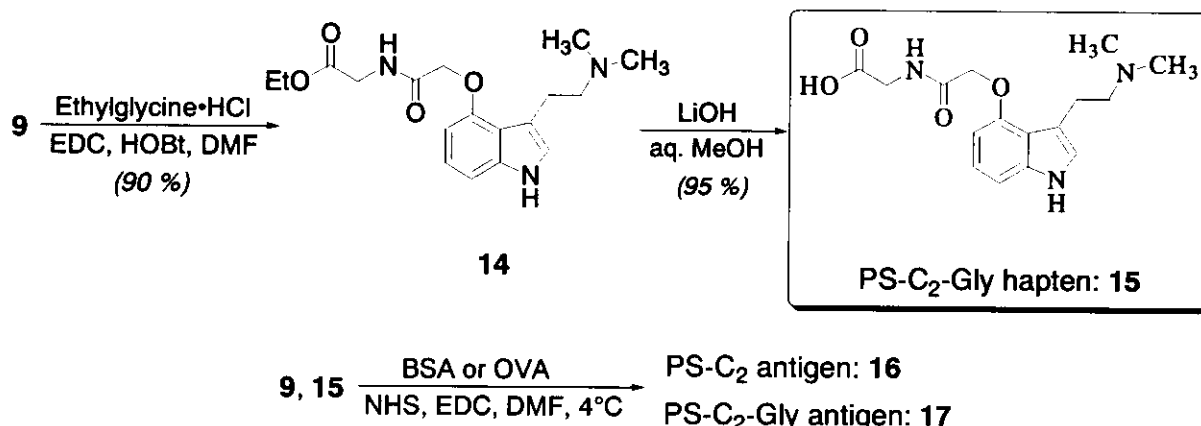
昨年度の研究において、サイロシン(1)の4位フェノール性水酸基に、トシル基を脱離基として無水ジメチルスルホオキシド中にて水素化ナトリウムを用いて反応させることによりスペーサー部分をエーテル結合させる手法を見出しており、サイロシンハプテン(4)を合成することに成功している。さらに4を、*N*-hydroxy-succinimide(NHS)および EDC により活性化エステルとした後にキャリアタンパク質と結合させ、抗原(5)へと導くことに成功している。今回も、サイロシンの4位フェノール性水酸基にスペーサー部分を同様の手法によりエーテル結合させることにした。まず、末端にチオール基を有する炭素数2および3のスペーサー誘導体を調製することを試みた(スキーム1)。しかし、脱離基としてトシル基を有する炭素数2のスペーサー部分は合成することができなかった。炭素数3のスペ



スキーム1. チオール基を有するサイロシンハプテンの合成



スキーム2. 新規サイロシンハプテンの合成



スキーム 3. 新規サイロシンハプテンの合成と抗原の調製

一サーは定法によりサイロシンに結合させて6を与え、脱保護により炭素数3のチオール基を末端に有するハプテン(7)を与えた。次に、炭素数2および3のカルボン酸スペーサーを有するハプテンの合成を試みた(スキーム2)。まず、炭素数2のカルボン酸末端ハプテン(9)は定法により8を経て合成することができた。しかし、炭素数3のカルボン酸末端を有するハプテン(11)は、定法では合成できなかった。そこで、末端に二重結合を有する12や、水酸基を有する13を経て合成することを試みたが、結局、望みの11を得ることができなかった。次に、9を用いてスペーサー内にペプチド結合を有するハプテンを合成した(スキーム3)。9にエチルグリシンを縮合させることにより14を得て、脱保護することにより15を得た。このようにして得られたハプテンの内、今回は9および15をキャリアタンパク質に結合させて抗原(16、17)を調製することにした。前回と同様に、NHSおよびEDCにより9および15を活性化エステルとした後にBSAまたはOVAと反応させた(スキーム3)。HPLC分析により、BSAまたはOVAとは異なる

新たなピークを反応液に見出すことができたため、目的とする抗原(16、17)が生成したものと判断した。反応液を10% MeOH-PBS、PBS、および脱イオン水2回にて透析を行い、凍結乾燥することにより16および17を白色粉末として得た。

2. マウスへの免疫および抗体価測定
 図4に16および17を免疫源として免疫したマウス血清の抗体価の推移を示す。35日目にIgMによるものと思われる抗体価の山が見られるが、16に比べ17による免疫ではその山が小さく、また、49日目における抗体価も17の方が幾分低めであった。次にサイロシンに対する特異性を調べるため、これらの49日目に採取した血清のサイロシンによる競合阻害試験を行った(図5)。残念ながら、前回とほぼ同様にサイロシンに対する特異性はあまり強くないことが明らかとなった。

3. 細胞融合および抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニング
 サイロシンによる競合阻害試験の結果、それぞれの抗原を用いた中で比較的に特異性が見られた、PS-C2-No.5とPS-C2-Gly-No.4のマウスをハイブリドーマ作成に用いることにした。これらマウ

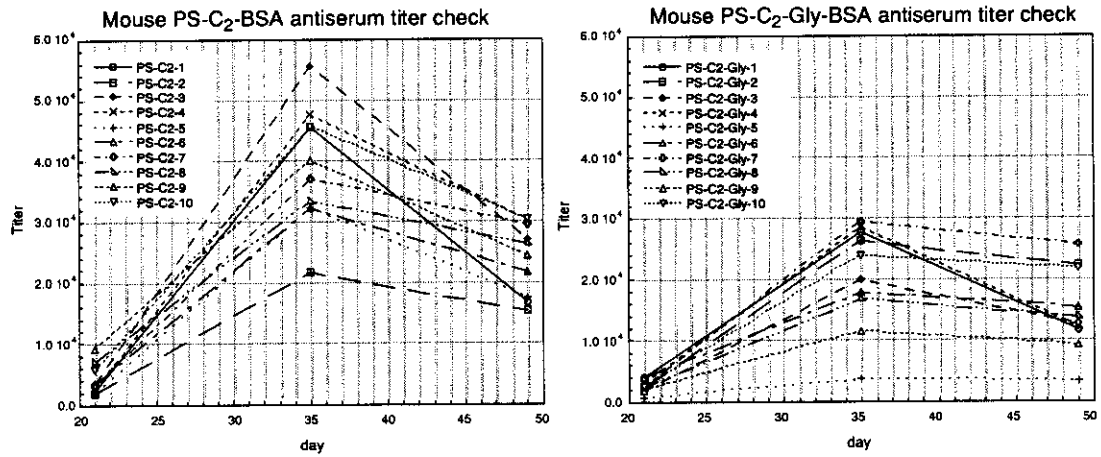


図 4. 免疫後の抗体価の上昇

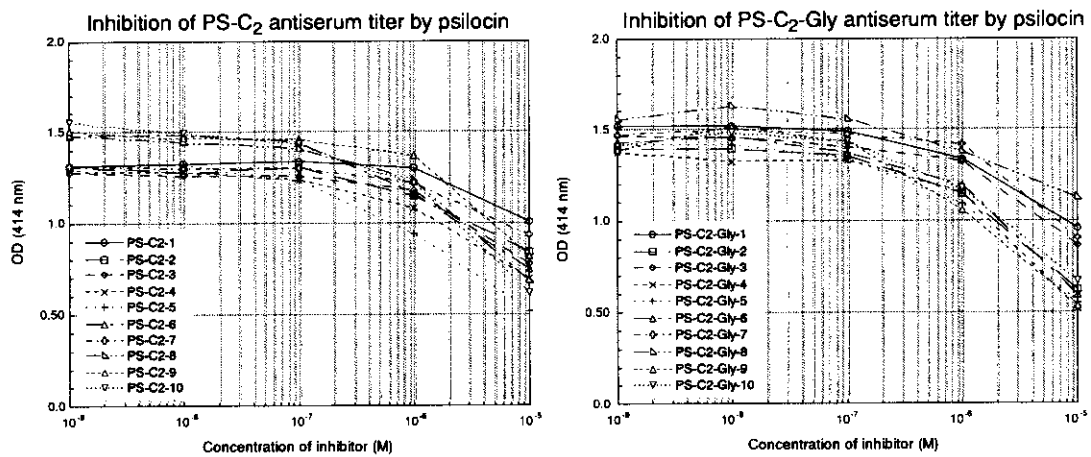


図 5. マウス抗サイロシン血清のサイロシンによる競合阻害 (49日目)

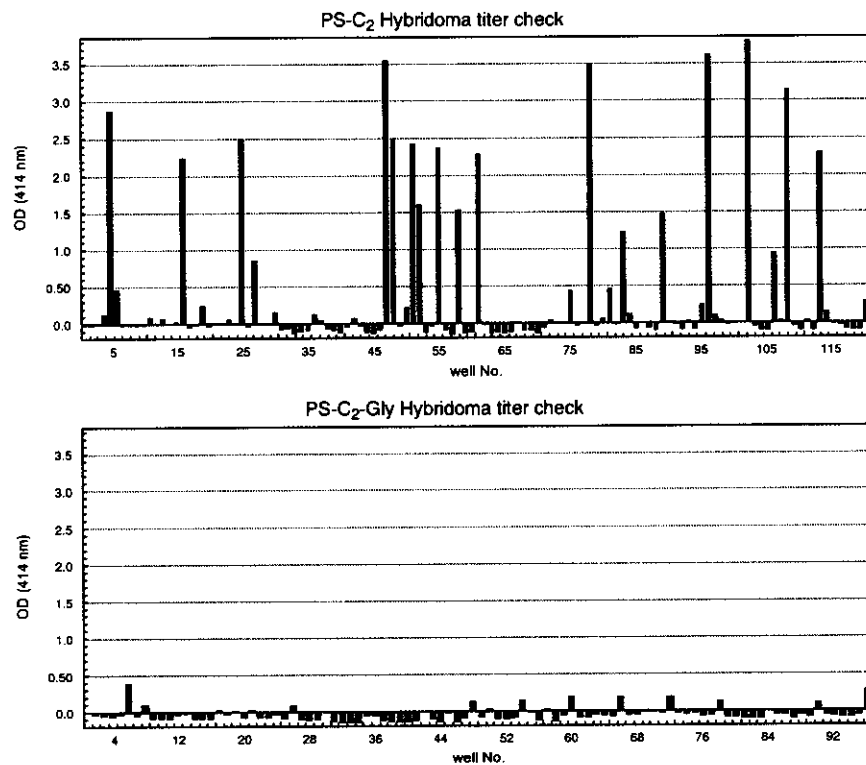


図 6. ハイブリドーマの選択

スに最終免疫を行い、それぞれの脾臓を摘出し、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞(NS-1)とを50%ポリエチレングリコールを用いて細胞融合し、PS-C2-No.5からは5枚、PS-C2-Gly-No.4からは4枚の24wellプレートを作成した。HAT培地にて培養を行い、約二週間後に各wellの抗体価を確認した(図6)。PS-C2-No.5由来のハイブリドーマには、約18のウェルで抗サイロシン抗体の生産が確認できたが、PS-C2-Gly-No.4由来のものでは有意な生産が確認できるものは残念ながら無かった。(昨年度の抗原5を免疫源として用いた場合にも、PS-C2-Gly-No.4由来ものとはほぼ同様に高い抗体価を示すハイブリドーマは得られず、クローニングまで行ったが得られたクローンは感度も特異性も低かった。)現在、PS-C2-No.5由来のハイブリドーマの中から抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニングを進めている。

4. サイロシングルクロニドの合成

Brownらによる、2,3,4-トリ-O-イソブチルリル-1-O-トリクロロアセトイミドイル- α -D-グルコピランウロネートを用いて、サイロシンのグルクロン酸誘導体合成を試みた(スキーム4)。しかし、サイロシンとのカップリングでは10~25%という低い収率で14を与え、また、C-グルクロニドを含むいくつもの副生成物を生じた。反応条件を変えてみたが、劇的な変化は全く見られなかった。更に、14を副生成物から分離する為には、HPLCによる分取しか方法がなかった。次に14をアルカリ性条件下で脱保護を行い、目的とするサイロシングルクロニドを得た。しかし、このステップでも副生成物が多少生じ、生成物の化学的性質

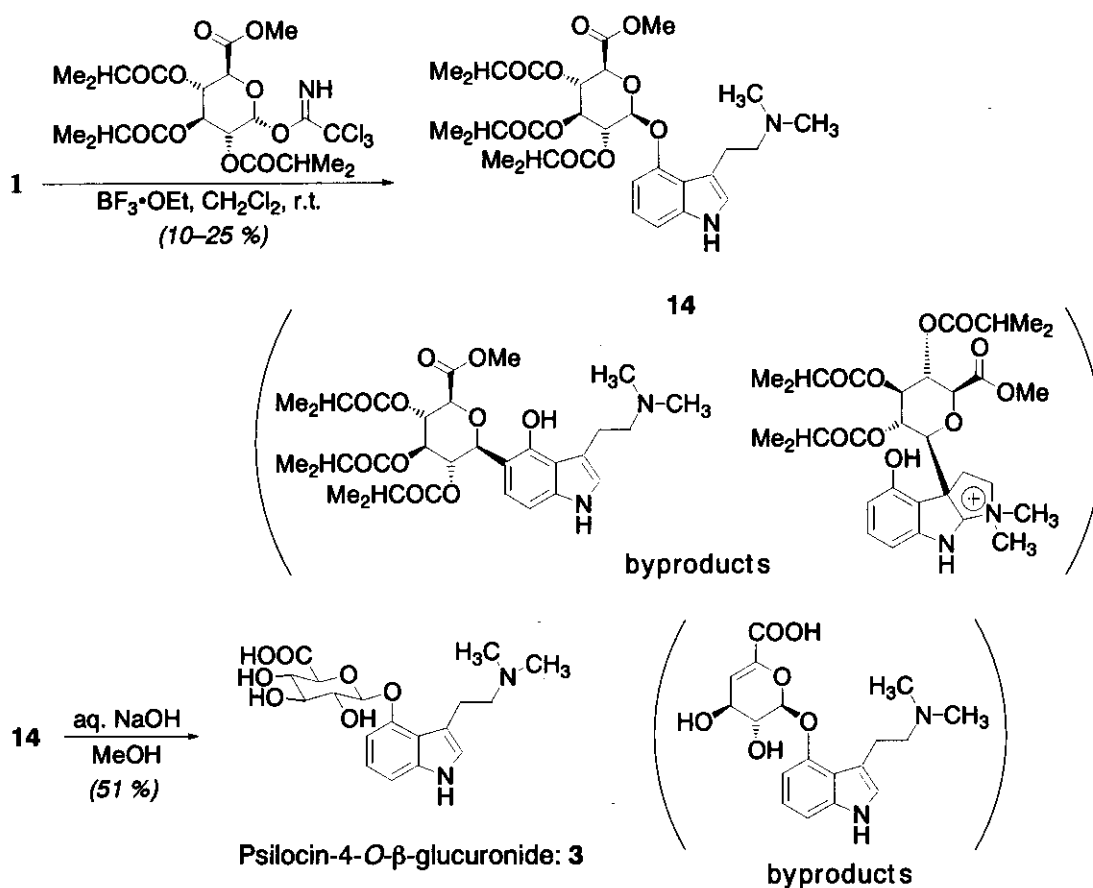
上やはり分取HPLCに頼るしか無かった。

D. 考察

今回新たに設計したサイロシンのハブテンは、抗体価は上がったものの、やはりサイロシンによる競合的阻害は弱いものであった。化合物の安定性を考えて、サイロシンの4位水酸基にスペーサーをエーテル結合によりつなげ、キャリアタンパク質と結合させる方法で抗原を製作してきたが、この4位水酸基がフリーであることがサイロシンを認識させることにおいて重要であるのかもしれない。今回2種のハブテンを用いて免疫を行ったが、スペーサーが短いハブテンでは、免疫されたマウス脾臓細胞の細胞融合により、高い抗体価を示すハイブリドーマが得られた。現在クローニングを行っているが、感度が高いクローンが得られることが期待される。また、サイロシングルクロニドの合成では、収率が大変低いものの、目的とするグルクロニドが合成できた。しかし、副生成物が多く、分離条件等にも課題が多い。

E. 結論

今回、サイロシンをモチーフとした安定なハブテンを新たに合成し、それを基にサイロシンを認識する抗体を得るべく、マウスに免疫を行った。その免疫源に対する血清中の抗体価は十分に上がったが、残念ながらサイロシンを特異的に認識するものではなかった。また、一種のハブテンにより免疫されたマウス脾臓の細胞融合により、抗サイロシン抗体価が高いハイブリドーマが得られている。今後、抗サイロシンモノクローナル抗体生産株のクローニングを行い、ハイブリドーマ



スキーム4. サイロシン-4-O-β-グルクロニドの合成

を確立すると共に、モノクローナル抗体の精製、さらにその抗体を用いたサイロシン検査に用いる誘導体を検討したい。サイロシングルクロニドの合成では、一応、目的とする化合物が合成できたが、収率の向上、分離精製条件の検討などの課題が残っている。

Concise large-scale synthesis of psilocin and psilocybin, principal hallucinogenic constituents of “Magic mushroom”, *J. Nat. Prod.*, **66**, 885—887, 2003.

学会発表

1. 代田 修、菊池 裕、合田幸広、日本生薬学会第50年会(2003).

F. 参考文献

1. O. Shirota, W. Hakamata, Y. Goda, *J. Nat. Prod.*, **66**, 885—887, 2003.
2. R. T. Brown, N. E. Carter, S. p. Mayalarp, F. Scheinmann, *Tetrahedron*, **56**, 7591—7594, 2000.

G. 研究発表

論文発表

1. O. Shirota, W. Hakamata, Y. Goda,

分担研究報告書

ケシ属植物の遺伝的・形態的・植物化学的特性に関する研究

分担研究者 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 本研究は、不正流通薬物であるヘロイン及びモルヒネ系麻薬の製造原料となるケシ及びケシ属植物について、植物の遺伝的・形態的・植物化学的特性を明らかにし、ケシ及び麻薬原料植物の鑑別・判定に役立てようとするものである。本年度は、筑波試験場圃場で保存栽培を行っているオニゲシ、ハカマオニゲシおよびそれらのF1交配種について形態観察とアルカロイド分析を行った。その結果、イソテバインを主アルカロイドとするオニゲシとテバインを主アルカロイドとするハカマオニゲシの交配種は全てテバインを含有し、花は両親の中間型であった。さらに、ケシ属植物の遺伝子組換えのための不定胚誘導条件を検討した。また、ケシ、オニゲシからタンパク質を抽出し、イムノブロットによるイソキノリンアルカロイド生合成酵素の1種である 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase (4'OMT)の検出を行った。また、オニゲシにおけるアルカロイド生合成遺伝子の単離を目的に、norcoclaurine 6-O-methyltransferase の部分配列をPCRにより増幅し、配列を決定した。

研究協力者

佐藤文彦 京都大学大学院生命科学研究
科統合生命科学専攻 教授

A. 研究目的

モルヒネの製造原料となるケシ (*Papaver somniferum*) は、コデイン、テバイン、パパベリン、ノスカピン等の医療上重要なアルカロイドを含有する。ケシは世界各地で栽培され、草形、花色、花卉、アルカロイド含量及び組成が異なるものがあることが知られている。他方、モルヒネ、コデイン、テバインは麻薬に指定されており、また、モルヒネは強い麻薬であるジアセチルモルヒネ(ヘロイン)の製造原料となるため、ケシ及びテバイン製造原料となるハカマオニゲシ (*P. bracteatum*) は、日本において栽培が厳し

く規制されている。しかしながら、近年、花形(一重咲や八重咲)、花色(白、紫、赤、桃等)が異なったケシ (*P. somniferum*) が鑑賞用として誤って栽培される例が後をたたない。また、最近のバイオテクノロジーの発達により、植物が本来有していた二次代謝物生合成能を改変させることが可能になっており、ケシ属植物も例外ではない。そこで、本研究では、国内外の *P. somniferum*、*P. setigerum*、*P. bracteatum*、*P. orientale*、*P. pseudo-orientale* の種子を導入し、それらの特性を調べると共に、モルヒネ、コデイン、テバイン、オリバピン等のモルフィナンアルカロイド生成能を調べる。また、これらの植物の遺伝子組換えを行い、挿入遺伝子が形態及びアルカロイド生成能に与える影響を調べる。これらの研究は、ケシの来歴を推測

する上で重要な知見を得られるものと期待される。

更に、ケシアルカロイド生合成制御機構を解明し、生産機能を分子生物学的に解析するための基盤として、ケシにおけるアルカロイド生産能の多様性を明らかとし、ケシアルカロイド生産能解析のための基礎的知見を得ることをも目的とする。このような基礎的知見の確立により、極微量の植物試料から植物種あるいは品種を特定できる判別法が確立できると期待できる。

B. 研究方法

1) 材料植物

ケシ属植物の形態観察およびアルカロイド分析には、筑波試験場圃場で保存栽培を行っているオニゲシ [*Papaver orientale* L.、*P.pseudo-orientale* (Fedde) Medv.]、ハカマオニゲシ (*P.bracteatum* Lindl.)及び1994年に柴田らにより作出された *P. pseudo-orientale*(筑波保存系統)と *P. bracteatum* Lindl.(ドイツ産、筑波保存系統)の F1 交配種を用いた。植物組織培養による不定胚形成には、ケシおよびオニゲシ種子を用いた。また、遺伝子組換えによるアルカロイド組成および含量の変化の比較のため、ケシ同様にイソキノリンアルカロイドを生産するオウレン圃場栽培株も不定胚誘導の材料とした。また、生合成酵素の発現解析には、筑波試験場ファイトトロン内で栽培したケシ、オニゲシ (*Papaver orientale* L.、POL2)、および培養庫内で組織培養しているケシシユート培養、オウレン細胞培養(高ベルベリン生産株)、同圃場栽培株およびハナビシソウ培養細胞を用いた。

2) 形態観察

ハカマオニゲシ、オニゲシおよび F1 交配種の花(5月)に花色、花卉数、花卉の斑点の有無、苞葉の有無を調査し、写真撮影を行った。

3) アルカロイド分析

ハカマオニゲシ、オニゲシおよび F1 植物の未熟果実に傷を付けて得られる乳液を適量の 50%メタノール溶液 500 μ l に溶解し、HPLC 分析および TLC 分析を行った。

4) 不定胚誘導

ケシ、オニゲシ種子およびオウレン葉柄を常法により殺菌後、種々条件で培養し不定胚を誘導した。

5) イムノプロット

材料植物より、簡便法によりタンパク質を抽出後、SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、抗 4'OMT(オウレン培養細胞由来)抗体を用いた同酵素タンパク質の検出を行った。

6) オニゲシのアルカロイド生合成遺伝子の単離

材料植物より、常法によりゲノム DNA を単離し、既に報告されているケシの norcoclaurine 6-O-methyltransferase の配列を元に設計したプライマーを用いて PCR 増幅したのち、pT7blue ベクターにサブクローニングし、塩基配列決定を行った。

C. 研究結果

1) オニゲシ、ハカマオニゲシおよび F1 交配種の花の形態

P. orientale、*P. pseudo-orientale* および *P. bracteatum* 観察の結果、花色、花卉の斑点の特徴および苞葉の有無により、3種の植物の判別は可能であった。しかし

Ppseudo-orientale (PPO)と *P. bracteatum* (PB)の F1 交配種は、形態的に両親の中間型で、親植物との区別は困難であった。

2)オニゲシ、ハカマオニゲシ及び F1 交配種の乳液中に含まれるアルカロイド

例外的な個体が存在するものの、各々の主アルカロイドは、*P. orientale* はオリパビン、*Ppseudo-orientale* はイソテバイン、*P. bracteatum* はテバインであった。F1 交配種では個体によって主アルカロイドが異なっており、イソテバインを主とするものとテバインを主とするものがあった。すべての F1 交配種乳液中にテバインが検出された。

乳液中のアルカロイドを TLC 分析した結果、HPLC での分析結果とほぼ一致した。

3) ケシ、オニゲシおよびオウレンの不定胚誘導

ケシ、オニゲシおよびオウレンの、不定胚を形成しながら増殖・分化する培養系を確立した。

4) ケシ、オニゲシおよびオウレンにおける生合成酵素の解析

すでにオウレン細胞培養から単離したイソキノリンアルカロイド生合成酵素を用い、ケシにおける酵素の発現解析を試みた。

ケシ (*P. somniferum*) の植物体あるいはシュート培養物、ならびにオニゲシ (*P. orientale*) 植物体よりタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により分離したところ、オウレン細胞培養と同程度のタンパク質の分離が認められた。しかし、オウレン細胞培養における検出と同様に、抗 4'OMT 抗体を用いた同酵素タンパク質の免疫化学的検出をおこなったが、シグナルを検出することができなかった。

そこで、オニゲシ植物体、オウレン植物体ならびに培養細胞を材料として、再度タンパク質抽出を行ない、4'OMT の検出を行なった結果、微かに、オニゲシ植物体で、オウレンとほぼ同一の分子量を示すタンパク質バンドを検出した。

また、ケシ科のハナビシソウ培養細胞を用いてアルカロイド含量と 4'OMT の発現を解析した。その結果、4'OMT タンパク質量とアルカロイドの生産性の相関は低いことが判明した。

5)オニゲシのアルカロイド生合成遺伝子の単離

ケシの *norcoclaurine 6-O-methyltransferase* 遺伝子情報をもとに、そのオニゲシ相同遺伝子の単離を PCR 法により試みた。その結果、未だ、予備的ではあるが、ケシとは異なる部分配列をもつ断片が単離されてきた。この配列がオニゲシの *norcoclaurine 6-O-methyltransferase* であるのか、またオニゲシの分子マーカーとして有効であるかは、今後の解析が必要であるが、ケシとオニゲシの遺伝的分化を示すものではないかと期待している。

D. 考察

今回観察した *P. orientale* は、学名 *P. orientale* として種子交換により外国から導入し、播種して栽培したものである。しかし、*P. pseudo-orientale* は、筑波で保存栽培を行っている系統(交配親)と外国から種子導入し、文献記載に従って筑波試験場で同定された3種の外国系統を用いたが、外国から種子導入した植物はすべて導入元での学名が異なっており、*P. orientale* および *P. bracteatum* であるとされていた。*P. bracteatum* は筑波で保存栽培を行っている系統とチェコから種子導

入し文献記載に従って筑波試験場で同定された系統を用いた。*P. pseudo-orientale* と同様に、導入元での学名の混乱があり、導入時の学名は *P. pseudo-orientale* であった。

以上のように、外国の植物園においてもこれら3種の植物の分類には混乱が生じており、同ロットで導入された種子においても多様な植物が出現する要因のひとつになっていると思われる。

P. bracteatum と *P. pseudo-orientale* の交配種の花は変化に富んでおり、形態的に片親と区別するのは困難であった。しかし、すべての植物の乳液においてテバインとイソテバインが検出されることで、両者との区別が可能であった。

ケシ、オニゲシ、オウレンの遺伝子組換え技術はこれまでほとんど報告されていない。これらの植物について不定胚を経由する植物再生系を確立し、これらの植物の遺伝子組換えの基盤技術を確立した。

ケシに特異的なモルフィナン型アルカロイドとオウレンが生産するプロトベルリン型アルカロイドの生合成経路は、前半の生合成経路が共通である。そこで、生合成系前半の重要酵素であるオウレン由来の 3'hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase(4'OMT)に対して作製している抗体を用い、ケシ属植物における酵素の発現解析を試みた。

しかし、オウレン培養細胞にくらべ、オニゲシならびにオウレン植物体における 4'OMT タンパク質の存在量は極めて限られており、抗体を用いた検出は困難と考えられた。

本実験と平行して、ケシ科のハナビシソウ培養細胞を用いてアルカロイド含量

と 4'OMT の発現を解析した結果、4'OMT タンパク質量とアルカロイドの生産性の相関は低いことが判明した。このことは、必ずしも、アルカロイド生合成系すべてが同様に活性化され、アルカロイド生合成に寄与しているわけではなく、律速段階があることが示唆された。

本研究とは、別の実験から、ハナビシソウのアルカロイド生合成系では 4'OMT よりも前段階になる norcoclaurine 6-O-methyltransferase が律速していることが明らかになりつつある。従って、今後は、同遺伝子を対象として、生合成系遺伝子の発現と生合成活性の相関を解析することが望ましいと考えられる。

最近、Facchini のグループにより、オウレンの遺伝子情報を元に、ケシの生合成遺伝子が単離されていることから、これらの遺伝子情報を元に、ケシ属植物における相同配列を PCR により増幅し、その塩基配列を決定することを試みた。その結果、ケシとオニゲシでその共通する生合成酵素 norcoclaurine 6-O-methyltransferase と想定される遺伝子配列が単離され、その配列に違いがあったことより、これら2種間で遺伝的分化が生じていることが示唆された。今後、その確認をすすめるとともに、さらに多くの生合成遺伝子を単離し、比較解析していきたいと考えている。

E. 結論

オニゲシ、ハカマオニゲシおよびオニゲシとハカマオニゲシの F1 交配種の形態とアルカロイドを調べ、特徴一覧を作成するとともに、データベースを作成した。また、ケシ、オニゲシ遺伝子組換えの基礎となる不定胚培養系を確立した。

さらに、ケシのアルカロイド生産能解析の分子基盤のための基盤的知見を得ることを目的に、ケシ、オニゲシよりタンパク質を抽出し、イムノプロットによるイソキノリンアルカロイド生合成酵素の1種である 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase(4'OMT)の検出を行った。その結果、オウレン由来の抗4'OMT抗体を用いたイムノプロットではケシの4'OMTを検出するのが困難であることが判明した。一方、ケシの遺伝子配列をもとに、オニゲシの相同遺伝子の部分配列を単離し、これら植物種間で塩基配列の違いが存在することを示唆する結果を得た。

分担研究報告書

ケシ属植物の遺伝的・形態的・植物化学的特性に関する研究

分担研究者 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 本研究は、不正流通薬物であるヘロイン及びモルヒネ系麻薬の製造原料となるケシ及びケシ属植物について、植物の遺伝的・形態的・植物化学的特性を明らかにし、ケシ及び麻薬原料植物の鑑別・判定に役立てようとするものである。本年度は、筑波試験場圃場で保存栽培を行っているオニゲシ、ハカマオニゲシおよびそれらのF1 交配種について形態観察とアルカロイド分析を行った。その結果、イソテバインを主アルカロイドとするオニゲシとテバインを主アルカロイドとするハカマオニゲシの交配種は全てテバインを含有し、花は両親の中間型であった。さらに、ケシ属植物の遺伝子組換えのための不定胚誘導条件を検討した。

A. 研究目的

モルヒネの製造原料となるケシ (*Papaver somniferum*) は、コデイン、テバイン、パパベリン、ノスカピン等の医療上重要なアルカロイドを含有する。ケシは世界各地で栽培され、草形、花色、花弁、アルカロイド含量及び組成が異なるものがあることが知られている¹⁾。他方、モルヒネ、コデイン、テバインは麻薬に指定されており、また、モルヒネは強い麻薬であるジアセチルモルヒネ(ヘロイン)の製造原料となるため、ケシ及びテバイン製造原料となるハカマオニゲシ (*P. bracteatum*) は、日本において栽培が厳しく規制されている。しかしながら、近年、花形(一重咲や八重咲)、花色(白、紫、赤、桃等)が異なったケシ (*P. somniferum*) が鑑賞用として誤って栽培される例が後をたたない。また、最近のバイオテクノロジーの発達により、植物が本来有していた

二次代謝物合成能を改変させることが可能になっており、ケシ属植物も例外ではない。そこで、本研究では、国内外の *P. somniferum*、*P. setigerum*、*P. bracteatum*、*P. orientale*、*P. pseudo-orientale* の種子を導入し、それらの特性を調べると共に、モルヒネ、コデイン、テバイン、オリバピン等のモルフィナンアルカロイド生成能を調べる。また、これらの植物の遺伝子組換えを行い、形態及びアルカロイド生成能に与える影響を調べる。これらの研究は、ケシの来歴を推測する上で重要な知見を得られるものと期待される。

B. 研究方法

1) 材料植物

ケシ属植物の形態観察およびアルカロイド分析には、筑波試験場圃場で保存栽培を行っているオニゲシ [*Papaver orientale* L.(導入元：イギリス、チェコ)、

P. pseudo-orientale(Fedde) Medv.(導入元: イギリス、ドイツ、ハンガリー)、ハカマオニゲシ(*P. bracteatum* Lindl.) [導入元: ドイツ(筑波保存系統)、チェコ] 及び 1994 年に柴田らにより作出された *P. pseudo-orientale*(筑波保存系統)と *P. bracteatum* Lindl.(ドイツ産、筑波保存系統)の F1 交配種²⁾を用いた。植物組織培養による不定胚形成には、ケシ(一貫種及びオーストラリア産)およびオニゲシ(イギリス産)種子を用いた。また、遺伝子組換えによるアルカロイド組成および含量の変化の比較のため、ケシ同様にイソキノリンアルカロイドを生産するオウレン圃場栽培株も不定胚誘導の材料とした。

2) 形態観察

ハカマオニゲシ、オニゲシおよび F1 交配種の花(5月)に花色、花卉数、花卉の斑点の有無、苞葉の有無を調査し、写真撮影を行った。

3) アルカロイド分析

ハカマオニゲシ、オニゲシおよび F1 植物の未熟果実に、アヘン採取用の切傷刀を用いて傷を付け、浸出する乳液を試験管にとり、適量の 50%メタノール溶液 500 μ l に溶解した。抽出液をウルトラフリー-MC(MILLIPORE、0.45 μ m フィルターユニット)で遠心ろ過後、上清 10~20 μ l を直接 HPLC に注入した。HPLC 条件は、前報と同様である。さらに、TLC 分析を行い、HPLC 分析との比較を行った。TLC 条件は、Merck 社シリカゲルプレート(Kieselgel 60 F254)を用い、各抽出物をスポットして溶媒(トルエン:アセトン:エタノール:28%アンモニア=20:20:3:1)で展開後、UV(254nm)照射およびドラージェンドルフ試液を噴霧して検出される化合物を調べた。

4) 不定胚誘導

ケシおよびオニゲシ種子を 75%エタノール溶液に 1 分間浸し、滅菌水で洗浄後、2%次亜塩素酸溶液(1 滴/30 ml の Tween 20 を含む)中で 10 分間殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した。殺菌後の種子を植物ホルモン無添加 1/2MS 固形培地または素寒天培地(0.5%ショ糖および 0.5%寒天)に播種し、20 $^{\circ}$ C、14 時間照明下で培養した。無菌発芽した実生を子葉、胚軸、幼根に分割し、NAA 1mg/L と Kin 2mg/L を添加した MS 固形培地に植え付け、20 $^{\circ}$ C、暗所で培養し不定胚を誘導した。同様にセリバオウレン葉柄を殺菌後、0.5cm 長に調整し、NAA 1mg/L と Kin 2mg/L を添加した改変 WP 培地(10mg/L グルタミン含有)に植え付け、20 $^{\circ}$ C、暗所で培養し不定胚を誘導した。

C. 研究結果

1) オニゲシ、ハカマオニゲシおよび F1 交配種の花の形態

P. orientale(イギリス産 13 個体、チェコ産 9 個体)、*P. pseudo-orientale*(イギリス産、ドイツ産、ハンガリー産各 1 個体および筑波保存系統 2 個体)、*P. bracteatum*(ドイツ産、チェコ産各 1 個体)および *P. pseudo-orientale*(PPO)と *P. bracteatum*(PB)の F1 交配種(PB σ x PPO ϕ : 3 個体、PPO ϕ x PB σ : 8 個体)の花の特徴を観察した結果を表 1 にまとめた。例外的な個体が存在するものの、花色、花卉の斑点の特徴および苞葉の有無により、3 種の植物の判別は可能であった。F1 植物は、形態的に両親の中間型であった。

2) オニゲシ、ハカマオニゲシ及び F1 交配種の乳液中に含まれるアルカロイド

P. orientale(イギリス産 13 個体、チェコ

産 21 個体)、*P. pseudo-orientale*(イギリス産、ドイツ産、ハンガリー産各 1 個体および筑波保存系統 2 個体)、*P. bracteatum*(ドイツ産、チェコスロバキア産各 1 個体)および *P. pseudo-orientale* と *P. bracteatum* の F1 交配種(PB♂ x PPO♀: 3 個体、PPO♀ x PB♂: 8 個体)の未熟果実から得られた乳液のアルカロイド分析結果を表 2 にまとめた。例外的な個体が存在するものの、各々の主アルカロイドは、*P. orientale* はオリパビン、*P. pseudo-orientale* はイソテバイン、*P. bracteatum* はテバインであった。F1 交配種では個体によって主アルカロイドが異なっており、イソテバインを主とするものとテバインを主とするものがあつた。すべての F1 交配種乳液中にテバインが検出された。

3)オニゲシ、ハカマオニゲシおよび F1 交配種の花の形態と乳液中のアルカロイド

P. orientale、*P. pseudo-orientale*、*P. bracteatum*、*P. pseudo-orientale* と *P. bracteatum* の F1 交配種(PB♂ x PPO♀、PPO♀ x PB♂)の代表的個体および例外的個体の花の写真と乳液の HPLC クロマトグラムを図 1 に示した。*P. orientale* は、花の下に苞葉がなく、花卉に斑点がないかあつても目立たない淡橙—濃橙の 4—6 枚の花弁の花を持ち、乳液中にはオリパビンとテバインが検出されるものがほとんどであつたが、2 個体(POL13、13-95-O-27)では花卉に明瞭な濃紫の斑点が認められ、それらの乳液中にはオリパビン、テバインとともにイソテバインが検出された。

表 1 オニゲシ、ハカマオニゲシおよび F1 植物の花の特徴

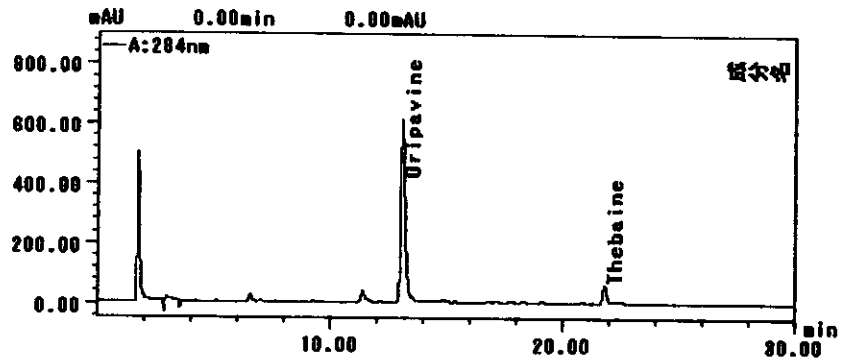
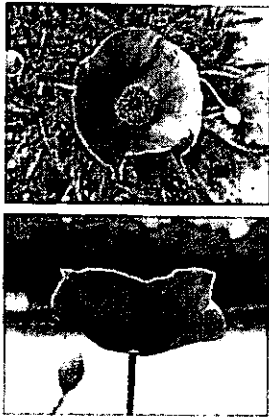
植物	花色	花卉の斑点	花卉数	苞葉
<i>Papaver orientale</i>	淡橙—濃橙	無または有(朱—薄紫)	4—6	無
<i>Papaver pseudo-orientale</i> (PPO)	濃橙	有(濃紫)	4—6	無又は有
<i>Papaver bracteatum</i> (PB)	深紅	有(黒紫)	5—6	有
PB♀ x PPO♂	朱	有(黒紫)	6	有
PPO♀ x PB♂	朱—濃橙	有(黒紫)	4—6	有又は無

表 2 オニゲシ、ハカマオニゲシおよび F1 植物の乳液中に含まれるアルカロイド

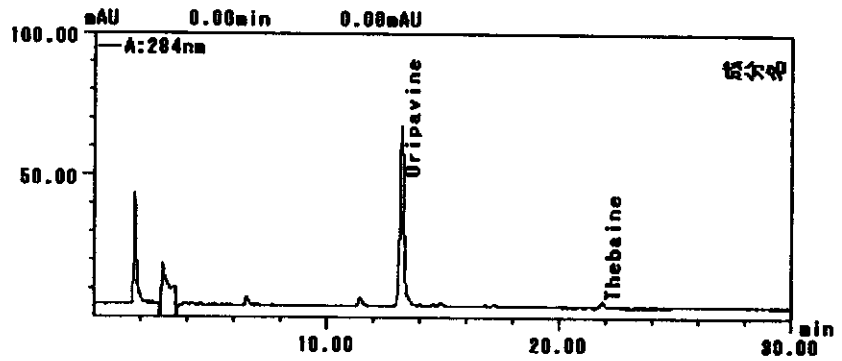
植物	主アルカロイド	その他のアルカロイド
<i>Papaver orientale</i>	オリパビン	テバイン、イソテバイン
<i>Papaver pseudo-orientale</i> (PPO)	イソテバイン	
<i>Papaver bracteatum</i> (PB)	テバイン	
PB♀ x PPO♂	テバイン又はイソテバイン	
PPO♀ x PB♂	テバイン又はイソテバイン	オリパビン

図1. オニゲシ、ハカマオニゲシ及びF1交配種の花の形態と乳液中のアルカロイドのHPLCクロマトグラム その1

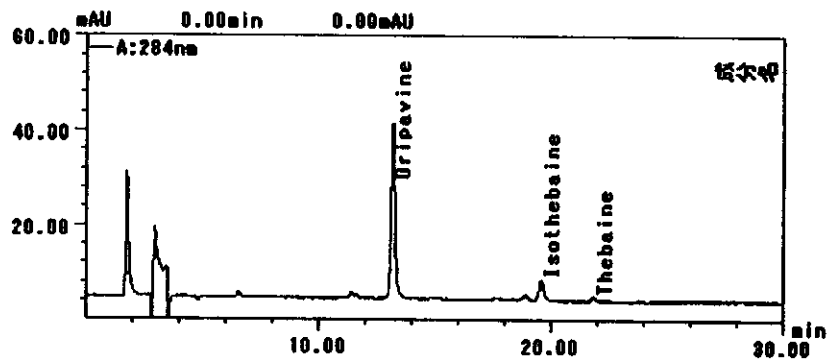
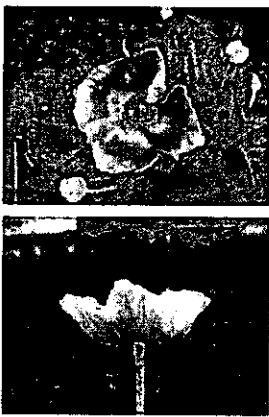
Papaver orientale L. : POL1 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL2 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL3 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL4 導入元 : University of London

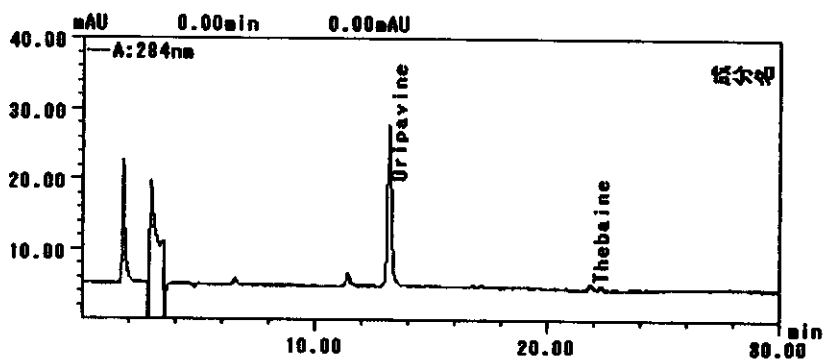
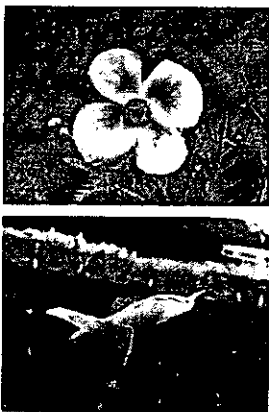
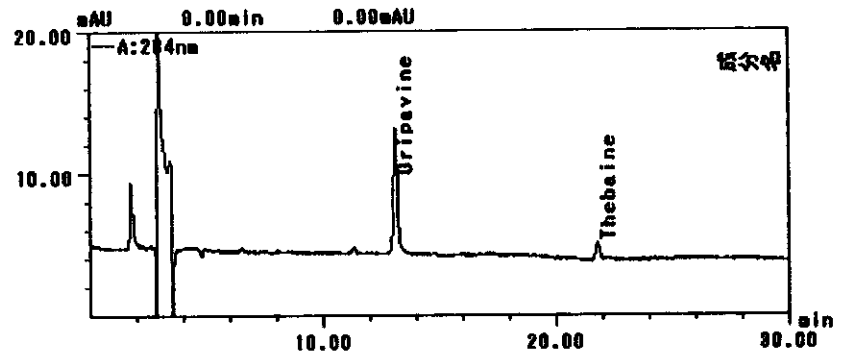
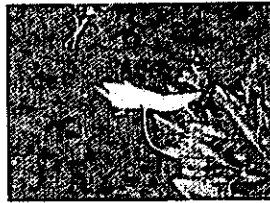
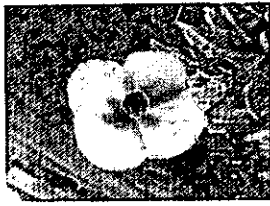
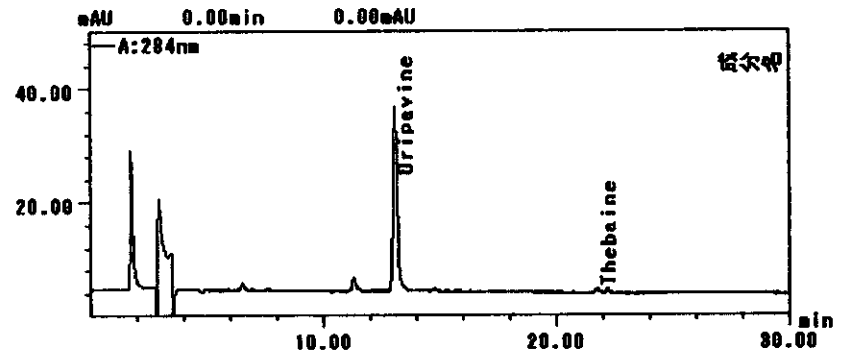
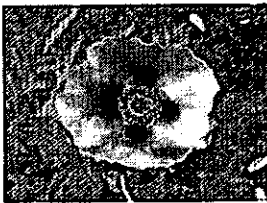


図1. オニゲシ、ハカマオニゲシ及びF1交配種の花の形態と乳液中のアルカロイドのHPLCクロマトグラム その2

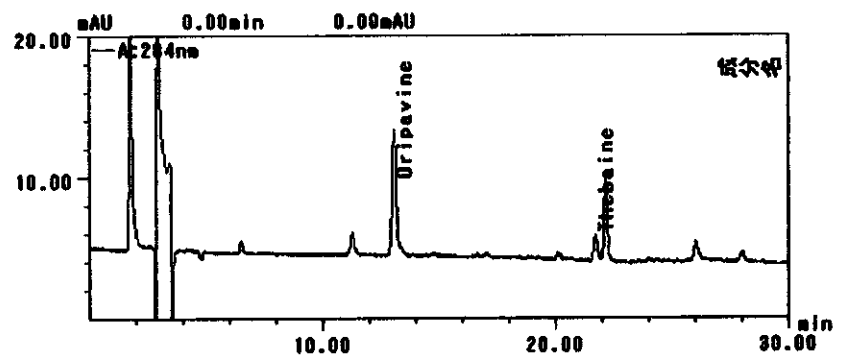
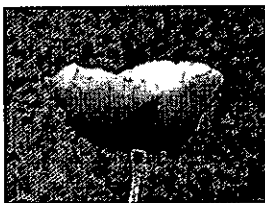
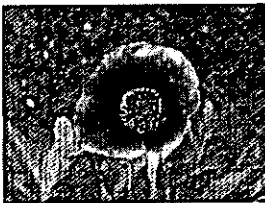
Papaver orientale L. : POL6 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL7 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL8 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL9 導入元 : University of London

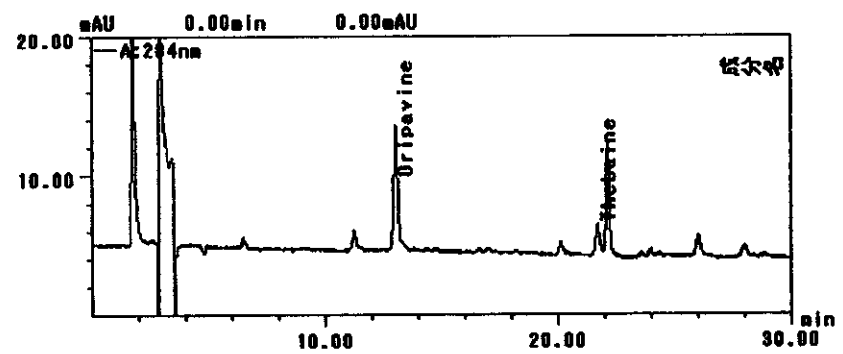
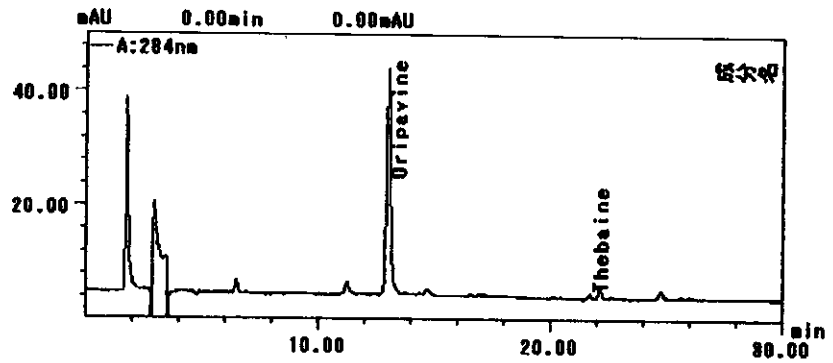
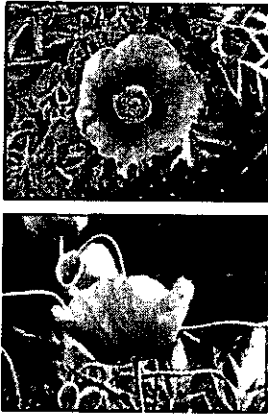
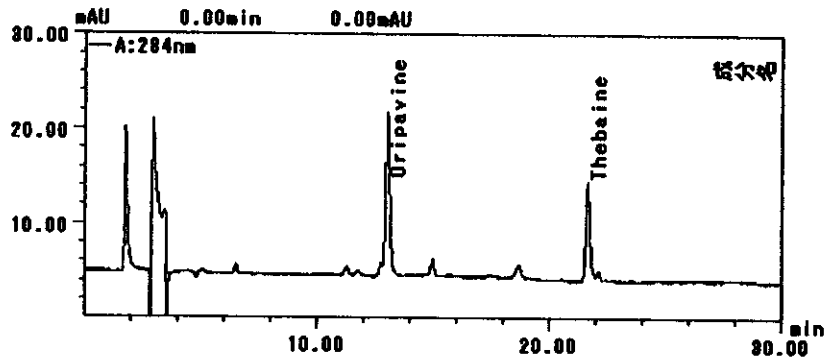
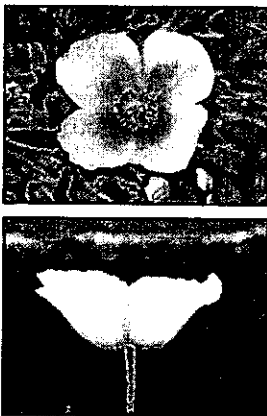


図1. オニゲシ、ハカマオニゲシ及びF1交配種の花の形態と乳液中のアルカロイドのHPLCクロマトグラム その3

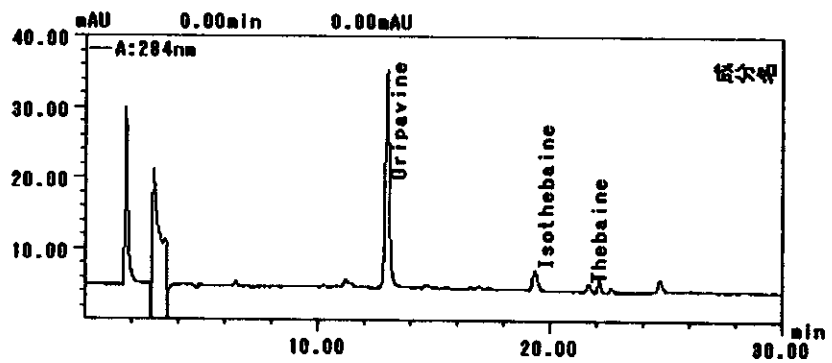
Papaver orientale L. : POL10 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL11 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL12 導入元 : University of London



Papaver orientale L. : POL13 導入元 : University of London

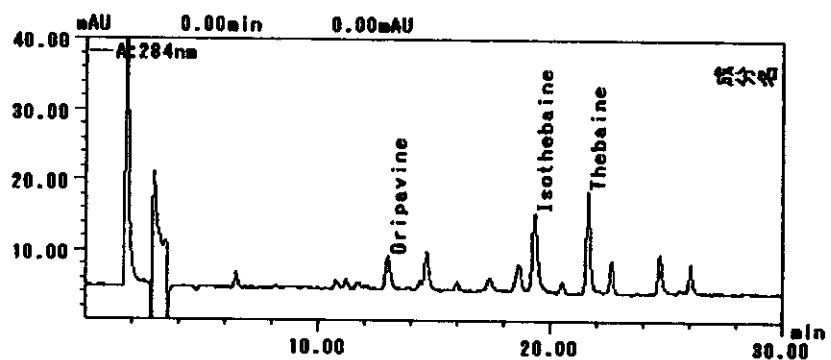
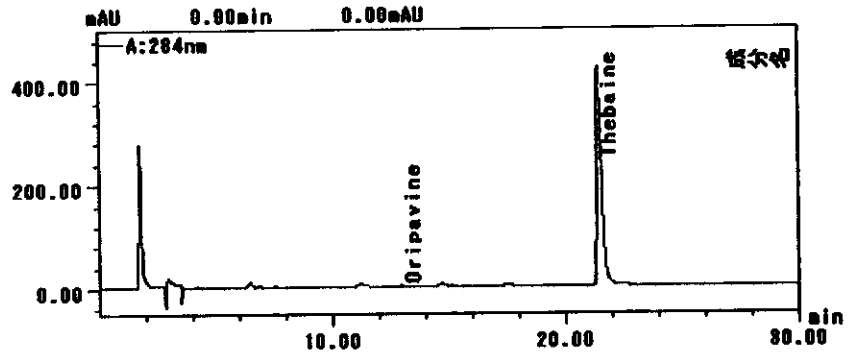
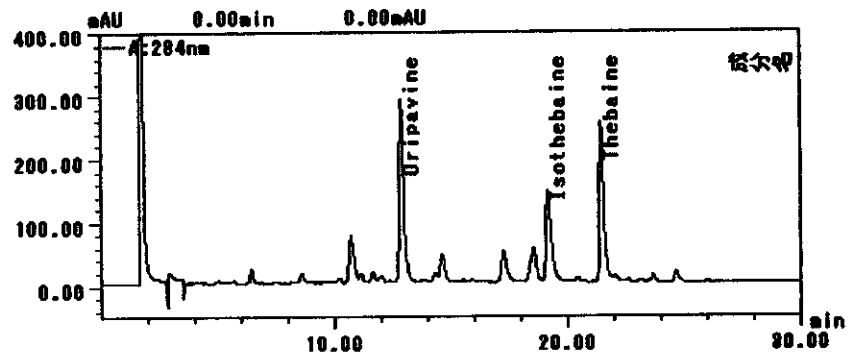


図1. オニゲシ、ハカマオニゲシ及びF1交配種の花の形態と乳液中のアルカロイドのHPLCクロマトグラム その4

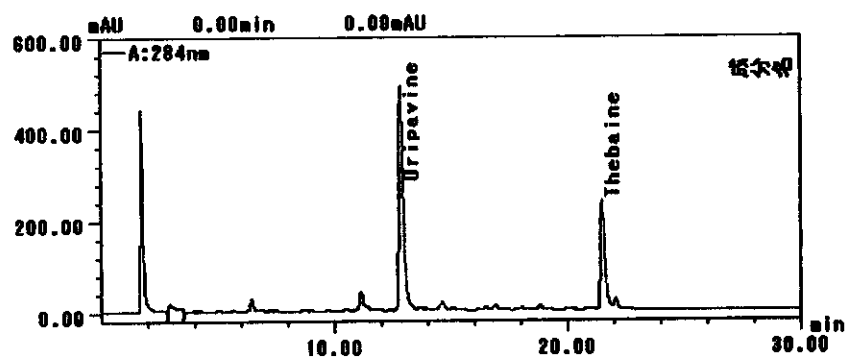
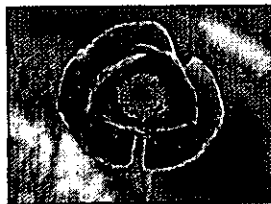
Papaver orientale L. : 13-95-O-22 導入元 : Czechoslovakia



Papaver orientale L. : 13-95-O-27 導入元 : Czechoslovakia



Papaver orientale L. : 13-95-O-36 導入元 : Czechoslovakia



Papaver bracteatum Lindl. : 1-4 PB-7 導入元 : Germany

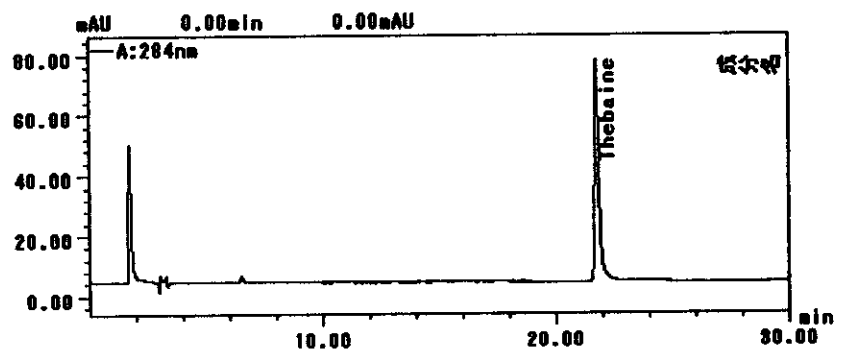
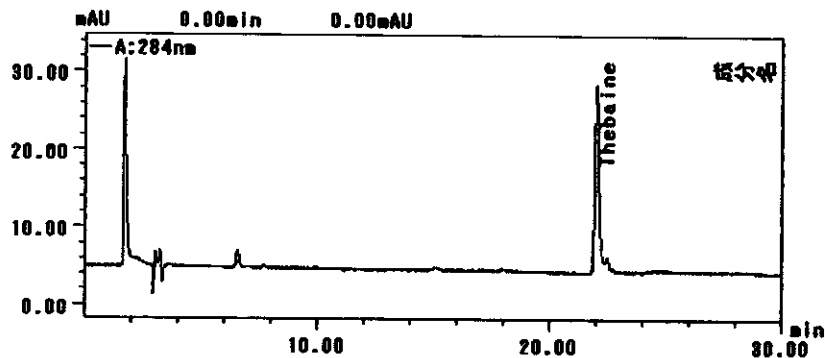
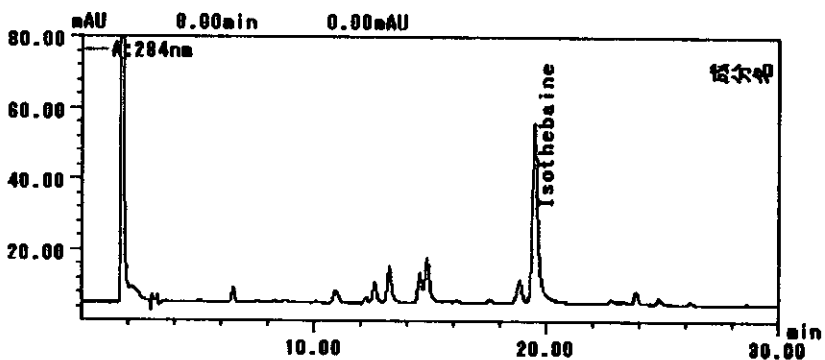
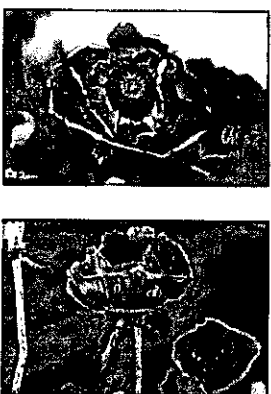


図1. オニゲシ、ハカマオニゲシ及びF1交配種の花の形態と乳液中のアルカロイドのHPLCクロマトグラム その5

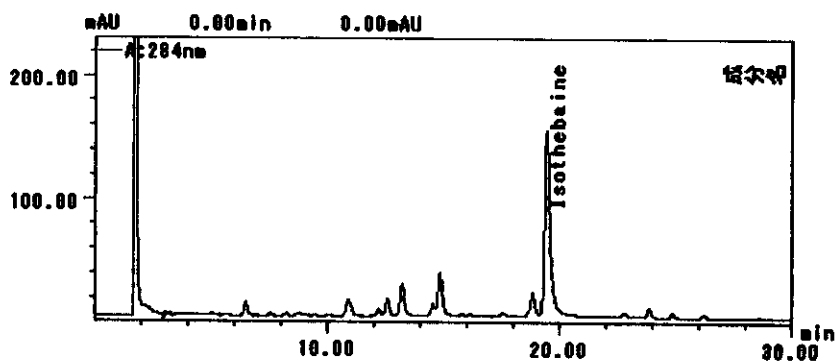
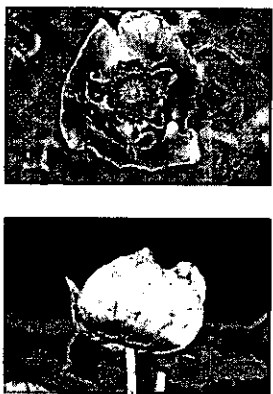
Papaver bracteatum Lindl. : 14-95 PB-11 導入元 : Czechoslovakia



Papaver pseudo-orientale (Fedde) Medv. : 90-488 PPO 導入元 : England



Papaver pseudo-orientale (Fedde) Medv. : 204-92 PPO 導入元 : Germany



Papaver pseudo-orientale (Fedde) Medv. : 130-95 PPO-14 導入元 : Hungary

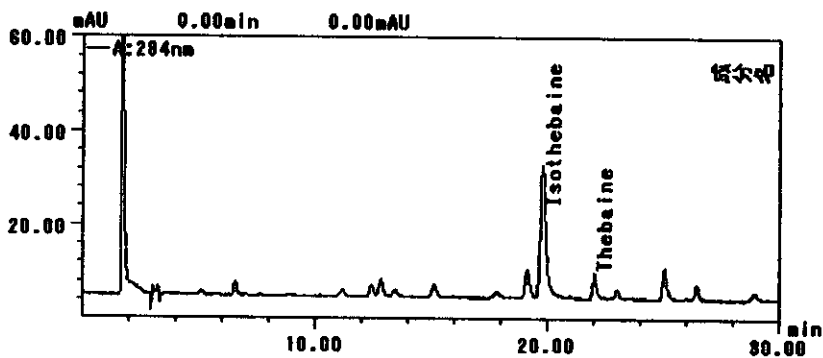
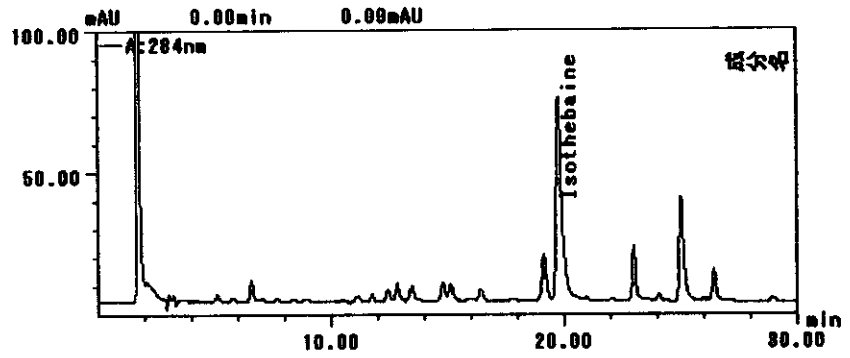
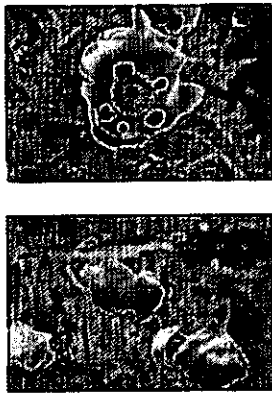
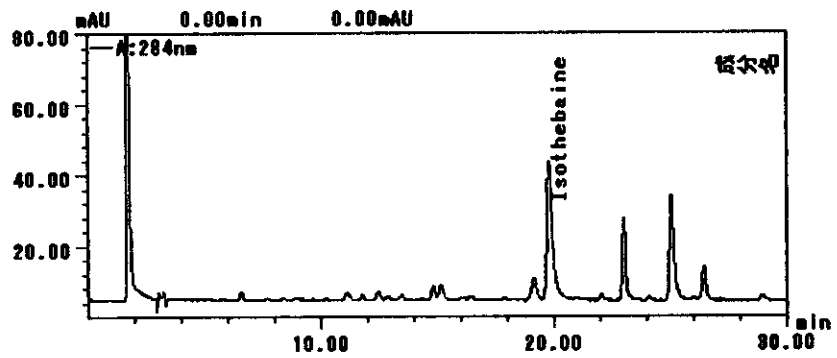
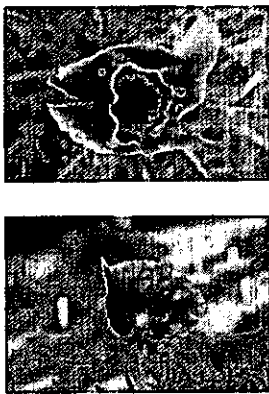


図1. オニゲシ、ハカマオニゲシ及びF1交配種の花の形態と乳液中のアルカロイドのHPLCクロマトグラム その6

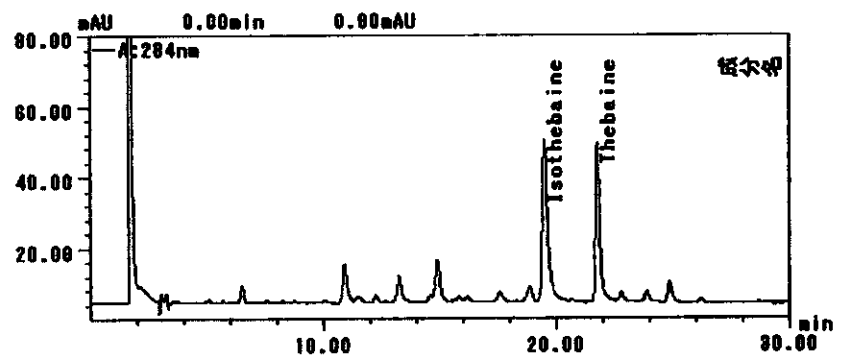
Papaver pseudo-orientale (Fedde) Medv. : 2-5 PPO R♂ self-1 導入元 :



Papaver pseudo-orientale (Fedde) Medv. : 2-5 PPO R♂ self-2 導入元 :



PBxPPO交配種 : 1-1 PB x PPO-8 導入元 :



PBxPPO交配種 : 1-2 PB x PPO-9 導入元 :

