

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

遺伝子組換え薬用植物の環境に与える
影響に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

(H15-ゲノム-001)

主任研究者 木内 文之

平成17(2005)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響に関する研究 ————— 1
木内文之

II. 分担・協力研究報告

1. 遺伝子改変植物の作出と二次代謝物生合成能改変に関する研究 —— 13
吉松嘉代, 河野徳昭
2. 遺伝子組換え植物の環境に与える影響に関する研究 ————— 23
大塚 譲
3. 薬用植物の有用成分生合成酵素遺伝子解析に関する研究 ————— 29
野口博司
4. 遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響に関する研究 ————— 33
水上 元
5. マルバダイオウの成分に関する研究 ————— 37
淵野裕之, 高橋真理依
6. 麻黄のエフェドリン生合成遺伝子改変と環境に与える影響に
関する基礎的研究 ————— 41
関田節子, 代田 修, 中根孝久
7. 抗ソラマルジン小型化抗体遺伝子のナス科植物への導入と
ステロイドアルカロイド配糖体含量への影響 ————— 44
正山征洋
8. 高倍数性薬用植物に含まれる外来ゲノムの実態調査に関する研究 —— 47
高野昭人
9. 中国産マオウの遺伝子多型の研究 ————— 52
垣内信子, 御影雅幸
10. RAPD 法によるマオウ属植物 F1 種子の雑種検定
並びに「カラスビシャク」の栽培に関する研究 ————— 57
飯田 修, 菱田敦之
11. 組換え植物の作出に関する研究及び生態系に及ぼす影響 ————— 62
鎌田 博
12. 遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響に関する研究 ————— 68

	後藤勝実	
13.	薬用植物における雄性不稔制御因子の探索と解析 佐藤文彦	73
14.	遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響に関する研究 柴田敏郎, 熊谷健夫	79
15.	オオツツラフジの栽培に関する研究 鈴木幸子, 浜野朋子	82
16.	<i>Panax</i> 属植物の遺伝資源的保存と三七人參 (<i>Panax notoginseng</i>) の生産性に関する研究 神田博史	88
17.	内部形態による遺伝子組換え薬用植物と非組換え体との比較 酒井英二	90
18.	薬用植物の繁殖に関する研究 香月茂樹	96
19.	遺伝子組み替え植物の栄養器官の系統的保存と 野生遺伝子の導入の法の研究 佐竹元吉	101
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	109
IV.	研究成果の刊行物・別刷	113

遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響に関する研究

主任研究者 木内 文之 国立医薬品食品衛生研究所 筑波薬用植物栽培試験場 場長

研究要旨 遺伝子組換え技術の急速な発展により、多様な遺伝子組換え植物の作出が可能となり、薬用植物についてもその応用が期待されている。遺伝子組換え薬用植物を開発し、実用化するためには、標的とする薬用植物に適した組換え技術を確認し、作出した組換え体については遺伝子組換えによる成分変化を的確に検証し、実用栽培のための環境への影響を評価する必要がある。また、薬用植物は作物としての栽培法が確立していないものが多いため、その生育特性を調べて栽培法を確立する必要がある。本研究では、これらに関する研究を総合的に行うことにより、遺伝子組換え薬用植物を国民の健康に役立てるための実用化に向けた基礎作りを進める。

今年度は、昨年度に引き続き薬用植物分野における有用形質の付加および有用二次代謝産物の生合成能の改変を目標とした遺伝子組換え体作出の基盤技術の確立と、環境影響評価実験に用いるモデル植物作成のための研究を行った。ペラドンナをモデル材料として日本産毛根病菌を用いた形質転換を行い、毛状根クローンを誘導するとともに、この毛状根から多数の再分化個体（遺伝子組換え体）を育成した。次年度には、特定網室や隔離圃場での栽培を行い、花粉飛散性、交雑性、土壌微生物への影響等の環境影響評価を実施する予定である。また、セリバオウレンを材料として、レポーター遺伝子を用いた効率的遺伝子組換え体作出法の検討ならびに輸送タンパク遺伝子を導入した組換え体について超低温保存法を適用してその評価を行った。更に、マルバダイオウを材料として、植物ポリケタイド生合成に関わる遺伝子を導入した遺伝子組換え体の効率的作出法について検討するとともに、パン酵母由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）遺伝子をペラドンナに組込んだ組換え体の作出を行った。

遺伝子組換えが薬用植物成分に与える影響に関しては、ニチニチソウの配糖化酵素遺伝子を導入したシロイヌナズナ培養細胞及び植物個体を作成し、形質転換培養細胞ではcurcuminの配糖化能を獲得したことに加えて、野生型細胞に比較して著しく多量のconiferinが蓄積していることを見いだした。この結果は、遺伝子組み換え薬用植物の安全性評価においては、その二次代謝プロファイルの解析が必要であることを示している。

野生薬用植物の遺伝的多様性並びに交雑性に関しては、北海道に自生する高倍数性タンポポ植物について、核リボソームDNAのinternal transcribed sequence (ITS) 領域のPCR-RFLP分析による外来ゲノムの実態調査を行った結果、雑種起源と考えられる個体が多数確認され、これらが中国大陸産タンポポおよびセイヨウタンポポ等、外来種に特徴的なゲノムをもっていることが示唆された。また、雌雄異株

である栽培マオウについて、RAPDマーカーを用いた交雑性の検出法を開発し、これを用いて同系統の雄株が周囲に存在しないマオウ（EP-13、雌株）のF1種子に外来DNAが存在し、同属他系統の植物と交雑していることを示した。さらに、栽培薬用植物の環境への逸出の実態を、京都薬科大学附属薬用植物園周辺で調査し、逸出の要因を考察した。

また、環境影響評価項目の設定とデータの取得・解析方法を検討するため、ペラドンナ等をモデル材料として、花粉の寿命、花粉を媒介する主たる昆虫の同定、自殖性の程度、AFLP法に基づく遺伝子多様性の解析等を行った。さらに、遺伝子組換え薬用植物の環境への拡散を防止する一手段として、薬用植物に不稔性を付与することを目的に花芽形成遺伝子の単離と解析を試みた。

さらに、カキドオシ、オオツヅラフジ、*Panax*属植物の栽培と栽培品バクモンドウの内部形態に関する研究を行うとともに、遺伝子組換え薬用植物の繁殖法の一つとしての接ぎ木繁殖法について検討した。さらに、ウイキョウ、オミナエシ、オオツヅラフジ、カラスビシャク、ヨロイグサの5品目について、これまでの栽培試験結果をもとに、栽培歴と種苗特性表等をまとめ、栽培と品質評価指針を作成した。

分担研究者

飯田 修

国立医薬品食品衛生研究所
筑波薬用植物栽培試験場 室長

大塚 譲

お茶の水女子大学
生活環境研究センター 教授

香月 茂樹

国立医薬品食品衛生研究所
種子島薬用植物栽培試験場 場長

鎌田 博

筑波大学 教授

神田 博史

広島大学 助教授

酒井 英二

岐阜薬科大学 助手

佐竹 元吉

お茶の水女子大学
生活環境研究センター 教授

佐藤 文彦

京都大学大学院生命科学研究科 教授

柴田 敏郎

国立医薬品食品衛生研究所

北海道薬用植物栽培試験場 場長

正山 征洋

九州大学大学院薬学研究院 教授

鈴木 幸子

東京都健康安全研究センター
薬用植物園 主任

関田 節子

徳島文理大学香川薬学部 教授

野口 博司

静岡県立大学 教授

瀧野 裕之

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

水上 元

名古屋市立大学 教授

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 室長

研究協力者

垣内 信子

金沢大学 助教授

河野 徳昭

国立医薬品食品衛生研究所

筑波薬用植物栽培試験場 研究員
熊谷 健夫
国立医薬品食品衛生研究所
北海道薬用植物栽培試験場 室長
後藤 勝実
京都薬科大学 講師
代田 修
徳島文理大学香川薬学部 助教授
高野 昭人
昭和薬科大学 講師
高橋 真理依
国立医薬品食品衛生研究所
筑波薬用植物栽培試験場
中根 孝久
昭和薬科大学 助手
浜野 朋子
東京都健康安全研究センター
菱田 敦之
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
御影 雅幸
金沢大学 教授

A. 研究目的

近年の遺伝子組換え技術の飛躍的な発展により、多様な遺伝子組換え植物の作出が可能となりつつあり、既に農薬耐性や機能性を改変した農作物が開発されている。一方、地球上の生物多様性を保全しつつ、これを持続的に利用することの必要性が世界的に認識され、遺伝子組換え生物の野外開放系での使用に際し、自然生態系としての生物多様性に対する影響を事前に評価することを取り決めた国際条約（生物多様性条約カルタヘナバイオセーフティ議定書）が締結され、これを担保するための国内法（遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律：カルタヘナ担保法）が平成16年2月19日より施行されている。薬用植物においても遺伝子組換え技術を用いた薬用成分の意図的改変等の基礎研究が活発に行われるようになり、農薬耐性薬用ニンジン

の作出も発表されている。遺伝子組換え植物を開発し、実用化するためには、いくつかのステップをクリアする必要がある。薬用植物は、一般の農作物と異なり作物としての栽培法が確立していないものが多いため、まずその生育特性を調べ、栽培法を確立する必要がある。次に、遺伝子の導入や組換え植物の育成は、植物種によってかなり異なるため、標的とする薬用植物に適した方法の確立が必要である。更に、遺伝子組換えによって成分がどう変化したかを、的確に検証する必要がある。特に薬用植物の場合、期待通りの成分変化が起こっているかのみではなく、意図しない成分変化をチェックすることが、安全性の観点から重要である。最後に、環境への影響評価が必要である。この手続きは生物多様性条約に基づいた、いわゆるカルタヘナ担保法等で定められているが、実際の評価項目については植物ごとに適切なものを決める必要がある。

そこで本研究では、遺伝子組換え薬用植物を作出して遺伝子組換えが薬用植物の成分全体にどのように影響するかを評価するとともに、遺伝子組換え薬用植物を野外で栽培する場合にどのような項目について環境影響評価を実施することが適切であるかを、非遺伝子組換え薬用植物を用いて検討するとともに、遺伝子組換え薬用植物によって影響を受けるとされる国内自生薬用植物の生育・栽培並びに増殖特性を調査し、遺伝子組換え薬用植物の環境への影響を最小限にするための研究の基礎資料を作ることを目的とした。このような研究は農作物については行われているが、総合的な研究は未だその事例が少なく、薬用植物については明確な報告がない。本研究を実施することで、遺伝子組換え薬用植物の実用化に向けて検討すべき課題が明確になると同時に、野外栽培に際して実施すべき環境影響評価のための具体的評価項目を決定できるものと期待される。薬用植物は、漢方製剤の原料などとして国民の健康に大きく貢献しており、遺伝子組換え薬用植物への対応は、今後の厚生労働行政に必

要不可欠である。直面する問題点の科学的検証を積み重ねることにより、新しい技術を正確な知識による判断で利用することが可能になり、これらの下に管理された薬用植物資源は、生薬、生薬製剤、漢方製剤として、また新薬開発の資源として医療に貢献することが期待される。

B. 研究方法

【遺伝子組換え薬用植物の作出と成分変化の評価】

(1) 遺伝子組換え薬用植物のモデルとして、自然界でも生じる遺伝子組換えであり、カルタヘナ担保法上の規制を受けない毛根病菌による遺伝子組換え体を、ベラドンナを用いて作成した。また、薬用植物の効率的な作出法を検討するとともに、得られた組換え体の成分変化を調べ、環境に対する影響評価の基礎とするために、レポーター遺伝子 (GUS) を組込んだ *Rhizobium radiobacter* を用いて条件を変えてセリバオウレンに感染させ、組換え体を作成するとともに、その超低温保存条件を検討した。また、同様の手法で、マルバダイオウ、ベラドンナ等に、ベンザルアセトン合成酵素 (BAS)、スチルベン合成酵素 (STS)、プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 遺伝子を組込んだ組換え体の作出を検討した。(大塚、鎌田、吉松、河野、野口)

(2) 遺伝子組換えによる成分変化を明らかにする基礎として、昨年明らかにできなかったマルバダイオウの茎の成分について、LC-MSを用いて検討するとともに、*Physalis minina* L.の組織培養系を確立して、そのソラジニン配糖体含量を定量し、マオウの成分についても検討した。また、遺伝子組換え薬用植物のモデルとしてニチニチソウの配糖化酵素を *Rhizobium radiobacter* を用いてシロイヌナズナに組み込み、形質転換細胞における成分代謝能の変化を分析した。(瀧野、高橋、正山、関田、代田、中根、水上)

【野生薬用植物の遺伝的多様性と遺伝子組

換え薬用植物が環境に与える影響】

(1) 遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響として、野生植物への組換え遺伝子の拡散が考えられる。そこで、野生薬用植物として北海道に分布する高倍数性のシコタンタンポポ並びに中国の *Ephedra* 属植物の遺伝的多様性を調べるとともに、ニンジン並びにモデル薬用植物としてのベラドンナについて、非遺伝子組換え植物の生態特性、花粉飛散性、交雑特性、遺伝子多様性等を調べた。また、雌雄異株である栽培マオウを用いて、RAPD マーカーを用いた交雑性の検討を行った。更に、組換え体の圃場からの逸出の可能性に関しても、薬用植物園での栽培植物の逸出を調査した。(高野、御影、垣内、鎌田、飯田、菱田、後藤)

(2) 組換え遺伝子の環境への拡散を防ぐ一つ的手段として組換え体の不稔化が有効であることから、不稔因子の解明を目的に、花器官の発達に関与する植物ホルモンであるエチレンの生成に関わる転写因子 (ERF3, ERF4) の RNAi 発現抑制ベクターを作成し、これを *Rhizobium radiobacter* に導入してタバコを形質転換し、その効果を観察した。(佐藤)

【薬用植物の栽培特性等】

(1) 遺伝子組換え薬用植物を作成して栽培するためには、各薬用植物についての標準的な栽培法が確立されている必要がある。今年度は、ウイキョウ、オオツツラフジ、オミナエシ、カラスピシヤク、ヨロイグサについて、試験栽培の結果をとりまとめた。また、カキドオシの繁殖並びに栽培法を検討した。さらに、遺伝子組換え薬用植物の育成並びに効率の良い増殖法の一つとして、接ぎ木法による繁殖をハマセンダン、カンラン、センダン、イスノキ、ヤマザクラ、ウメ、モモ、イヌザンショウ、タチバナの9種の樹木を台木として用いて検討した。(飯田、香月、熊谷、佐竹、柴田、鈴木、浜野)

(2) 遺伝子組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うための

実験として、バクモンドウの栽培品の内部形態を検討した。中国産のバクモンドウをぬるま湯に1時間浸漬した後、氷結法により厚さ約20 mmの横切片を作成し、プレパラートとした。(酒井)

C. 研究結果

【遺伝子組換え薬用植物の作出と成分変化の評価】

(1) ベラドンナ無菌植物体の葉切片に日本産および外国産の*A. rhizogenes*を感染させて毛状根を多数発生させ、この毛状根を抗生物質を含むMS固形培地上で培養して無菌の毛状根クローンを得た。この毛状根について、BA (0.5 mg/l) とIAA (1 mg/l) を含むMS固形培地で培養して不定芽を得、この不定芽を植物ホルモン無添加のMS固形培地に移植して不定根を誘導しつつ再分化植物体を得た。現在までに、189の毛状根クローンのうち18クローンにおいて再分化植物体が得られている。この再分化植物体については、全て外来遺伝子 (T-DNA) が導入されていることを確認した。現在この再分化植物体を、土を用いて鉢栽培するために順化中である。

セリバオウレン (*Coptis japonica* Makino var. *dissecta* Nakai) の若葉を殺菌後調製した葉柄切片を、NAA 1 mg/l + Kin 2 mg/l添加WPG(WPGNK)固形培地で16日間前培養した後、レポーター遺伝子 (β -glucuronidase, GUS) をサブクローニングしたバイナリーベクターを保有する*Rhizobium radiobacter* PMP90株と2日間共存培養することにより、効率良く形質転換体を得られた。また、オウレン植物生体内においてイソキノリンアルカロイドの能動輸送に関わると推定されるタンパクCjMDR1のcDNA *Cjmdr1*のコード領域全長を、植物の高発現型プロモーター(EL2-35S)下流に組込んだバイナリーベクターを有する*R. radiobacter* PMP90株を感染させることにより得られた不定胚及び不定根を以下の条件で超低温保存した後再培養した。

前培養 (0.2 M sucrose, 1 M glycerol, 20 °C,

dark, 2 days) →ガラス化液処理 (PVS2, 23 °C, 10 min) →液体窒素中に保存→解凍 (40 °C 水浴, 1 min) →洗浄 (1 M sucrose, 25 °C, 10 min) →再培養 (WPGNK, 20 °C, dark)

その結果、不定根からは再生が認められなかったが、不定胚からは再生率40%で再生が認められ、超低温保存後再生した不定胚と未保存対照のゲノムPCRの結果、超低温保存後の不定胚中に組換え遺伝子が安定に存在することが判明した。また、Northern解析の結果、再生体においても*Cjmdr1*の著しい発現の低下が認められ、未保存のセンスクローンにおける発現様式と同様であることを確認した。

また、マルバダイオウ(*Rheum rhaponticum* L.)と、ベラドンナ(*Atropa belladonna*)へのダイオウ(*Rheum palmatum* L.)のフェニルブタンノイド類生合成の鍵酵素であるベンザルアセトン合成酵素(BAS)、ピーナツ(*Arachis hypogaea*)由来スチルベン合成酵素(STS)遺伝子の導入では、無菌的に発芽したマルバダイオウの芽生えの子葉および胚軸の切片並びにベラドンナの*in vitro*培養植物の葉の切片を、MS固形培地上暗所で一晩前培養したものに、BASおよびSTS、さらにポジティブコントロールとして β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子を植物の高発現型プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流にそれぞれ配置したバイナリーベクターを導入した*R. radiobacter* LBA4404株を感染させた。マルバダイオウにGUSを導入した場合においては、胚軸に感染させた場合の方が子葉に感染させた場合より効率良くカルス化が起こった。また、不定芽が形成されたのは胚軸を材料とした場合の1例のみであった。BASまたはSTSを導入した系列についても不定芽形成率は低く、STSでは胚軸に感染させた場合のみ不定芽形成が見られ、BASでは不定芽形成には至らなかった。

一方、PDI遺伝子のベラドンナへの組込みでは、PDI遺伝子を組込んだアグロバクテリウムと共存培養したベラドンナ組織片から

カルスが得られており、今度遺伝し導入の確認並びに組換え植物の再生を行う予定である。

(2) ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) の UDP-glucosyltransferase (CaUGT2) 遺伝子を組込んだアグロバクテリウムを用いて、花芽の浸漬によるシロイヌナズナの形質転換個体の作成を行い、CaUGT2遺伝子が発現している13個体を得た。今後T2個体について二次代謝プロファイルを検討する予定である。一方、同じアグロバクテリウムによって形質転換されたシロイヌナズナカルスは、curcuminを投与すると5つの代謝産物を与えたが、その一つは、curcuminがCaUGT2によって配糖化された後、シロイヌナズナが本来持っているmalonyltransferaseによってアシル化されたものであった。また、形質転換細胞と野生型細胞の成分を比較したところ、形質転換細胞に特異的に蓄積している成分が見られ、最も多量に蓄積するのはconiferyl alcoholが配糖化されたconiferinであった。また、マルバダイオウの茎の成分のLC/MS/MS分析により、rhapontin, deoxyrhapontigenin, resveratrol, piceidの存在を明らかにし、ベンザルアセトン合成酵素の導入により、茎に於いてもlindleyinの生成が期待できることがわかった。

【野生薬用植物の遺伝的多様性と遺伝子組換え薬用植物が環境に与える影響】

(1) 北海道各地で採集した高倍数性のシコタンタンポポについて、ITS領域をユニバーサルプライマーで増幅後、制限酵素Taq Iで切断してPCR-RFLP分析を行ったところ、351bpのバンドを持つ本州の在来種二倍体タンポポと同様のバンドパターンを示す在来種型 (aタイプ)、288bpと351bpの両方のバンドを持つ雑種型 (bタイプ)、bタイプの288bpのバンドの位置が少しずれている雑種型 (cタイプ) の3つのタイプが見られた。北海道産タンポポ188個体について検討した結果、aタイプが137個体、bタイプが23個体、cタイプが28個体であった。これらのうち雑種個体と考えられた5個体について、葉緑体DNA、trn T - trn F間を3つの区間にわけ6個の

プライマーを使用してダイレクトシークエンスして塩基配列を決定し、それらの配列をカントウタンポポ、エゾタンポポ、セイヨウタンポポ、アカミタンポポ、タカサゴタンポポ、モウコタンポポの塩基配列を比較検討した結果、5個体中の1個は、セイヨウタンポポやアカミタンポポと同様の塩基配列特徴を有し、他の4種は本州の在来種二倍体タンポポとほぼ同様の塩基配列をもっていた。

中国で採集した野生*Ephedra*属植物標本の核DNAのITS1 および 2、葉緑体DNA *trnL/F* の塩基解析の結果、これらはFig. 1の様な類縁関係にあることがわかった。

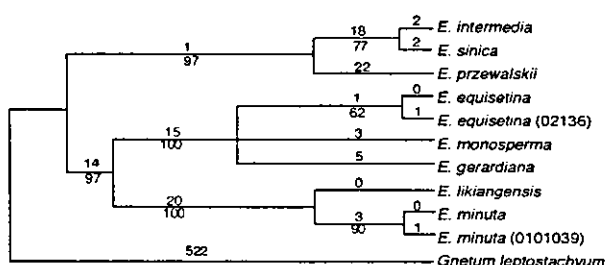


Fig. 1 中国産野生*Ephedra*属植物8種の近縁関係

これらは *E. intermedia*, *E. sinica*, *E. przewalskii* (グループ1), *E. equisetina*, *E. monosperma*, *E. gerardiana* (グループ2) および *E. likiangensis* と *E. minuta* (グループ3) に分けられ、ITS1の塩基配列により識別が可能であった。また、グループ1の *E. sinica* と他の2種はtrnL/F領域の塩基配列に変異があることから、*E. sinica*の識別が可能であった。

筑波薬用植物栽培試験場のEP-13系統の *E. intermedia* について調べたところ、マオウ園に隣接した圃場Aでは、これより離れた位置にある圃場B及び標本園に比べ明らかに成熟した果実が多かった。圃場B及び標本園では、開花後果実の形成は見られたが成熟過程で落果するものが大半であった。発芽率は、圃場A 68.0%, 圃場B 40.7%, 標本園52.2%であり、概ね50%前後の発芽率を示した。発芽試験で得られた子葉から鋳型DNAを調製し、RAPD法によるF1種子の雑種検定を行った結果、EP-13系統とそのF1種子についてDNAタイピングができることが示された。

F1種子には、親株であるEP-13系統には存在しないRAPDマーカーが見られ、親株とは明らかに異なるDNAタイプを示した。

非組換えベラドンナ個体を用い、自殖による種子形成の程度を検討したところ、他株（花）受粉に比較して果実あたりの種子形成数は少ないものの、他株（花）受粉時と同程度の結実率が得られ、ベラドンナにおいては、他株（花）受粉が主であるが、自株（花）受粉も行うことが明らかとなった。一方、ベラドンナは、花の構造から虫媒花であると考えられることから、2004年5-6月に筑波薬用植物栽培試験場の野外栽培圃場において訪花昆虫の調査を行った。その結果、3種類のハナバチの訪花が確認され、最も訪花頻度が高いものはコマルハナバチ (*Bombus ardens*) であり、これが主たる花粉媒介昆虫と予想された。また、FDA (fluorescein diacetate) とPI (propidium iodide) を用いた2重染色法により、ベラドンナの花粉の寿命（生存率）をスライドグラス上、25℃、湿度60%の条件下で測定した結果、開葯から5日目までは生存率がゆっくりと低下し、最終的に130時間後に0%となった。

ベラドンナの遺伝子多様性の解析手法としてAFLP (amplified fragment length polymorphism) 法の活用を検討した。多型的なフラグメントを検出するための2次選択プライマー対を決定するため、64対のプライマー対を検討し、検出されたフラグメントの多い順に5組を選択した。欧州6カ所および国内2カ所の研究所から分譲していただいたベラドンナ種子から無菌発芽個体を育成し、各分譲種子集団につき16個体の若い本葉からDNeasy Plant Mini Kitを用いてDNAを抽出し、上述した5組のプライマー対を用いたAFLP分析でヘテロ接合度を調査したところ、各集団のヘテロ接合度は0.099から0.169と集団によって若干異なり、全体としての平均は0.133であった。

京都薬科大学付属薬用植物園周辺を調査した結果、花椒、テンダイウヤク、クチナシ、アオモジ、ジギタリスの逸出が見られ、ジギ

タリスを除くと、いずれも鳥類による種子の運搬が原因として考えられた。

(2) 形質転換により作成したERF3ir、ERF4ir導入株のノザン解析の結果、解析した全てのpART-ERF3ir導入株においてERF3の発現抑制が生じていることを認めた。一方、pART-ERF4irを導入した場合は、ERF4ir-17において十分なERF4発現抑制を認めた。形質転換体での遺伝子発現抑制に伴う効果を観察するために、これらの形質転換体を鉢上げし、その開花に及ぼすERFの発現抑制の効果を観察した。その結果、ERF4ir-17では、葯が解裂する前に開花している花が複数観察され、その中には葯が成熟途中であるにもかかわらず開花したと思われるものや、葯が茶色になっても開かないものが含まれていた。しかし、全体の7割程度の花器は正常な発達をしていたので、それら正常な花から種子を採取した。一方、ERF3ir導入株においてはこの異常は観察されなかった。

さらに、自殖により得られたT1世代の植物体について、同様に葯の観察を行った結果、ERF4ir-17のT1植物体でT0世代と同様に一部の花器における葯の開裂異常が起こることが観察された。

【薬用植物の栽培特性】

(1) カキドオシ (*Glechoma hederacea* L. subsp. *grandis* Hara) の挿し木繁殖並びに遮光と施肥を検討した。採集した株より、3節を付けた太い茎、2節を付けた太い茎、3節を付けた細い茎及び茎の先端部を挿し穂として検討を行ったが、16日後の発根状況はいずれも98-100%と良好であった。また、日当たりの良好な環境に適しており、化学肥料の施用効果が顕著に認められた。地上部の無機成分含有率は、N ; 1.6-3.0%、P₂O₅ ; 0.5-0.9%、K₂O ; 3.1-5.6%、CaO : 1.8-2.2%、MgO : 0.3-0.7%であった。

樹木の挿し木繁殖に関しては、ハマセンダンを台木とした場合、生薬オウバクの基原植物であるキハダの活着率は100%近くであり、生育も旺盛であった。また、ゴシュユ、ホンゴシュユの活着率も100%で、生育も良く、

ホンゴシュユでは接ぎ木翌年に開花結実が見られた。

オオツヅラフジの葉型には多くのパターンが観察され、大きく4型に分類された。I型の葉は全縁の(切れ込みのない)葉または一部浅裂の葉で、1年生の登はん茎のみで観察され、II型は浅裂の葉で、2年生の登はん茎から新梢が伸び始める時期に観察された。III型は楓のような深裂の葉で、登はん茎及び匍匐茎の両方で観察され、IV型は小さく不整形で、匍匐茎のみで観察された。オオツヅラフジの登はん茎のシノメニン含量には大きなばらつきがあり、1%から全く含まないものまで様々であった。一方、マグノフロリンはすべての登はん茎に含まれており、野生種では0.75~2.70%、栽培品では0.62~4.81%で、栽培品で含有量が高い傾向が見られた。

ウイキョウ、オミナエシ、オオツヅラフジ、カラスビシャク、ヨロイグサについては、試験栽培並びに特性調査等の結果をまとめ、「薬用植物栽培と品質評価 Part 11」として出版の予定である。

(2) 中国で栽培されたバクモンドウの長さ、径の実測値はそれぞれ0.6~4.1 cm、0.2~0.9 cmで、中華人民共和国薬典(薬典)の長さ1.5~3.0 cm、径0.3~0.6 cmの範囲に当てはまらないものが多く確認できた。特にGAP生産されたとされる産地の商品では、径が0.6 cmを超えるものが3割を超えていた。第14改正日本薬局方(日局)では長さ1~2.5 cm、径0.3~0.5 cmとなっており、薬典よりも小さい範囲を規定しているため、径だけを見ても8割が範囲を超えることになる。内部形態については、バクモンドウは第十二改正(1991年)で記載が追加され、薬典同様に表皮の存在が示唆されているが、実際の商品では表皮は確認できず、原生木部の数も11~21個で、薬典の16~22、日局の約20よりも少ない場合が多く確認できた。

D. 考察

日本産および外国産の毛根病菌によって形質転換した多数の毛状根クローンを得る

ことができ、この毛状根から再分化した植物体を得た。形質転換効率(毛状根の出現率)は菌の系統によって大きく異なったものの、日本産の菌株を用いた場合であっても多数の毛状根クローンを得ることができ、さらに、このクローンからの再分化植物体を多数得ることができたため、次年度はこの日本産の菌株で形質転換したベラドンナ形質転換体を用い、特定網室栽培および隔離圃場栽培を実施する予定である。

リゾビウムの感染条件を詳細に検討することにより、高い形質転換効率で組換えセリバオウレンの作出に成功した。今回得られたgus組換えセリバオウレン植物体は、GUS活性染色により容易に検出できることから、遺伝子組換え薬用植物が環境に与える影響を評価するための実験系を開発する上でのモデル植物としての利用が可能である。

マルバダイオウの場合、今回試みた感染条件では、子葉よりも胚軸を感染材料とした方がカルス化率が高かった。標的遺伝子の植物ゲノムDNAへの導入については未確認であるが、LBA4404/STS株を感染させた系統において不定芽の発生率が高いことから、STSによる代謝物が植物成長調節物質様作用を示していることも考えられ、興味深い。

ニチニチソウの配糖化酵素を導入したシロイヌナズナでは、マロニル化されたcurcumin配糖体の生成が見られた。この結果は導入遺伝子の産物であるCaUGT2によってcurcuminがcurcumin monoglucosideに変換された後に、シロイヌナズナのmalonyl-transferaseによってアシル化されたことを示しており、異種植物の遺伝子を導入することによって、導入遺伝子と遺伝子のレシピエント側の植物種が本来持っている遺伝子の両者の機能によって構造的に新しい化合物が生成する可能性を示唆している。また、形質転換細胞において蓄積が見られたconiferinの前駆体であるconiferyl alcoholは、形質転換細胞、野生型細胞のいずれにおいても蓄積はほとんど検出できず、通常はligninなどへと活発に変換されているものが、形質転換細胞で

発現した酵素によって配糖化されることにより、ligninにいたる代謝の流れからいわば引き抜かれて液胞中に蓄積したものと考えられる。

北海道で採集したタンポポのPCR-RFLP分析では3種類のバンドパターンが観察され、bおよびcタイプの個体は、外来種起源のゲノムを持っている可能性が高いと考えられた。PCR-RFLP分析で雑種起源と考えられた5個体の葉緑体DNAの*trn T - trn F*間塩基配列を決定した結果、5個体中1個体は、セイヨウタンポポやアカミタンポポと同源性の高い塩基配列をもっていた。これまで、セイヨウタンポポと在来種タンポポとの種間雑種は、有性生殖を行う二倍体の在来種タンポポを母親として、セイヨウタンポポの花粉が受精して雑種形成されると考えられてきたが、母系遺伝するとされる葉緑体DNAの遺伝子配列がセイヨウタンポポに非常に類似した個体を認めたことは、新しいタイプの雑種形成の可能性を示すものといえる。このように日本に自生している薬用植物の中には、外来種との交雑が進んでいるものがあり、その現状を調査することは、遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響を評価する上で、重要な資料となると考えられる。

試験場内に雌株しか植えられていないマオウの系統（EP-13）から得られた成熟果実の種子は、RAPDマーカーによるDNAタイピングで親株とは異なる多様なDNAタイプを示した。これはEP-13系統と外来DNAとの交雑があったことを示すものであり、これを用いることにより、マオウの交雑性の検定や交雑を防ぐのに必要な隔離距離の評価が可能である。

一方、ベラドンナについてAFLP法による遺伝子多様性の解析手法を決定することができた。ベラドンナの遺伝子多様性は比較的低い結果となったが、これはベラドンナが他殖ばかりでなく、一定の頻度で自殖をすることによるものではないかと考えられる。この点については、さらに多くの集団における遺伝子多様性を決定することで明確な解答が得

られるものと期待される。また、本年度の研究により、ベラドンナの花粉の寿命を決定する方法が確立されるとともに、花粉媒介昆虫を同定することができた。

エチレンシグナル伝達の転写因子のうち、ERF4の発現を抑制することにより、開花には影響せず、葯の解裂を部分的に阻害することが可能であったが、その効果は部分的であった。このことから、エチレンシグナル伝達においてERFが重複して機能している可能性、あるいは、全く別のシグナル伝達系がERF4の機能を相補している可能性が考えられる。現時点で得られている葯の解裂抑制の効果は限られていることから、本遺伝子とともに、新たに開花あるいは花粉形成に関与する遺伝子の単離が必要と考えられる。

接ぎ木による繁殖法は、従来は種々の制約（季節、管理方法など）があったものの、パラフィルムの使用により大幅に緩和され、活着率も向上した。また、落葉樹の接ぎ木の多くは早春に行うことが通例となっていたが、夏期においても実施可能であることが確認できた。しかし、薬用植物においては、異種の台木を使用した場合利用部位の成分が、共台の場合と相違ないのかを検討する必要がある。

中国では近年優良栽培基準（GAP）に従った薬用植物の栽培が進められているが、内部形態的な観点からはGAP生産された生薬とそれ以外を区別することは出来なかった。現段階で植物分類学上は同一種とされているが、以前よりその種の分類について話題になっている産地のものについては、若干の形態的差違が認められた。同一種であっても遺伝子の違いが種内変異程度の微細な形態の違いとして現れると推察され、外部形態および内部形態の相違を明らかにすることは、遺伝子組換え薬用植物と非組換え体を区別する手がかりになると考えられる。

E. 結論

遺伝子組換え薬用植物の作出に関しては、今年度セリバオウレンの高効率遺伝子組換

え体作出法およびレポーター遺伝子を用いた遺伝子組換え体の検出法,そして組換え体の超低温保存法に関する有用な結果が得られた。これらは、薬用植物分野における遺伝子導入から遺伝子組換え植物体の選抜および再生,そして形質転換体の評価,さらに有用組換え体の長期保存に関する重要な知見であり、遺伝子組換え薬用植物の実用化へ向けた基盤技術の確立に欠くことのできないものである。

遺伝子組換えによる成分変化に関しては、シロイヌナズナの形質転換細胞において内生的な代謝産物プロファイルの変化が認められ、代謝酵素遺伝子の導入によって本来意図した代謝系とは別に、意図していない代謝産物のレベルも変動することを、実験的に示す結果となった。従って遺伝子組換え薬用植物の安全性評価に当たっては、metabolic profilingの手法を活用して、できるだけ広範な代謝産物の変化を検討することが重要である。また、このような成分変化は、アレロパシー等の形で周辺植物、土壤微生物、昆虫等に影響を与える可能性があり、成分変化を的確に評価することは、環境影響評価の基礎資料としても重要である。

野生薬用植物の遺伝的多様性に関しては、今年度タンポポ、ベラドンナ、マオウについて、核遺伝子情報に基づいた遺伝的多様性の検定法を検討した。この方法は、野生薬用植物の遺伝的多様性の調査ばかりでなく、遺伝子組換え植物の近縁植物との交雑性を検定するのに重要な方法となるものと考えられる。また、タンポポについては今までの常識では考えられない雑種形成の過程を経ていると考えられる個体も見つかっており、遺伝子組み換え薬用植物を作出した際に起こりえる環境への影響を考える上で貴重な資料となるものと思われる。

環境への影響評価に関しては、モデル薬用植物について、花粉を介した遺伝子拡散や遺伝子多様性の解析手法の検討を進めている。カルタヘナ担保法では花粉飛散以外にも、他植物への影響(アレロパシー試験)や土壤微

生物相への影響評価等についても検討することが求められており、この点については、現在、遺伝子組換え農作物に適用されている試験方法について検討している。次年度は、毛状根からの再分化植物体(形質転換ベラドンナ)の特定網室試験、隔離圃場試験の中で、実際のデータを取得し、解析する予定である。また、組換え遺伝子の拡散防止法の一つとしての開花制御による不稔化は、根を用いる薬用植物に於いて、その品質を向上させる観点からも重要であり、今後の展開に期待が持てる。

以上のように、今年度の研究では、昨年度の研究結果を受けて遺伝子組換え薬用植物を実用化するために必要となる様々な項目を検討し、基礎的な成果を上げつつある。これらの成果を踏まえ、次年度はさらに具体的な項目に関する検討を予定しており、その成果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Changfeng Long, Nobuko Kakiuchi, Akira Takahashi, Katsuko Komatsu, Shaoqing Cai, Masayuki Mikage, Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non-coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of *Ephedra* plants in China, *Planta Medica*, **70** (11), 1080-1084 (2004).
- 2) Changfeng Long, Nobuko Kakiuchi, Guoyue Zhong and Masayuki Mikage, Survey on resources of *Ephedra* plants in Xinjiang, *Biol. Pharm. Bull.*, **28** (2), 285-288 (2005).
- 3) 姉帯正樹, 熊谷健夫, 柴田敏郎: 白止の調製法と化学的品質評価(第5報) 保存中におけるフロクマリンの減少, *Natural Medicines*, **58**, 209-213 (2004).
- 4) Yasuhisa Kaminaga, F. Pinar Sahin, Hajime Mizukami, Molecular cloning and characterization of a glucosyltransferase catalyzing glucosylation of curcumin in cultured *Catharanthus roseus* cells, *FEBS Letters*, **567**, 197-202 (2004).

- 5) K. Yoshimatsu, H. Sudo, H. Kamada, F. Kiuchi, Y. Kikuchi, J. Sawada and K. Shimomura, Tropane alkaloid production and shoot regeneration in hairy and adventitious root cultures of *Duboisia myoporoides* - *D. leichhardtii* hybrid, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(8), 1261-1265 (2004).
- 6) S. Oguro, T. Akashi, S. Ayabe, H. Noguchi, and I. Abe, Probing Biosynthesis of Plant Polyketides with Synthetic *N*-Acetylcysteamine Thioesters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325** (2), 561-567 (2004).
- 7) I. Abe, Y. Utsumi, S. Oguro, H. Morita, Y. Sano, H. Noguchi, A Plant Type III Polyketide Synthase that Produces Pentaketide Chromone, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(5), 1362-1363 (2005).

2. 学会発表

- 吉松嘉代, 河野徳昭, 木内文之, ケシ形質転換体の形態およびアルカロイド成分変異, 第22回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(秋田) 要旨集pp. 138 (2Bp06) (2004年8月9-10日)
- 吉松嘉代, 土反伸和, 木内文之, 佐藤文彦, 矢崎一史, オウレンの分種育種の効率化, 第22回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(秋田) 要旨集pp. 117 (2Ap05) (2004年8月9-10日)
- Kayo Yoshimatsu, Noriaki Kawano, Fumiyuki Kiuchi; "Aberrant morphology and altered composition of opium alkaloids in *Rhizobium* transformed opium poppy cultivated in a phytotron"; German-Japan Seminar on Molecular Regulation of Plant Secondary Metabolism (Kazusa Academia Park, Japan) Abstract book P20 (2004年9月20-23日)
- 河野徳昭, 吉松嘉代, 木内文之, ケシの *Rhizobium* 形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索, 日本薬学会第125年会(東京) 要旨集4 pp. 127 (31-0652) (2005年3月29-31日)
- 吉松嘉代, 土反伸和, 河野徳昭, 木内文之, 佐藤文彦, 矢崎一史, 組換え薬用植物の作出法に関する研究-組換えオウレンの作出と超低温保存, 日本薬学会第125年会(東京) 要旨集4 pp. 126 (31-0644, W2-1) (2005年3月29-31日)
- 隆長鋒, 垣内信子, 御影雅幸, 中国産マオウ属植物の研究(4) 核内 DNA の解析, 日本生薬学会50回年会, (2003年9月, 東京)
- 近藤直子, 隆長鋒, 垣内信子, 御影雅幸, 高橋志保子, 中国産マオウ属植物の研究(5) 栽培地における草質茎のアルカロイド含量と形態の変異, 日本生薬学会50回年(2003年9月, 東京)
- 隆長鋒, 垣内信子, 御影雅幸, 中国産マオウ属植物の研究(10) 核及び葉緑体 non-coding DNA の解析, 日本薬学会124回年会(2004年3月, 大阪)
- 御影雅幸, 近藤直子, 吉沢千絵子, 垣内信子, 陳虎彪, 高橋晃, 安田和弘, 高橋志保子, 中国産マオウ属植物の研究(12) 内蒙古産マオウ属植物のアルカロイド, 日本生薬学会第51年会(2004年9月, 神戸)
- 中島育美, 隆長鋒, 伏見直子, 垣内信子, 御影雅幸, 中国産マオウ属植物の研究(11) マオウの栽培種と幼苗の越冬について, 日本生薬学会第51年会(2004年9月, 神戸)
- 北海道産 *Taraxacum* 属植物の分類学的検討, 日本薬学会第124年会(2004年4月, 大阪)
- 北海道産 *Taraxacum* 属植物の多様性, 第36回種生物学シンポジウム(2004年12月, 土浦)
- 夏地智之, 中元志穂, 伊福健太郎, 佐藤文彦, RNAi法を用いたエチレン応答性転写因子(ERF)の発現抑制, 第27回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアランド(2004年12月)
- 熊谷健夫, 柴田敏郎, 姉帯正樹: ヨロイグサの栽培に関する研究(1) 1年生栽培における栽植密度が生育収量及び成分含量に及ぼす影響, 日本生薬学会北海道支部第28回例会(2004年5月8日, 札幌) 講演要旨集 p.28.

○ 柴田敏郎, 中西大樹: セリ科植物分果の形態と分果中にみられる油管の分布について (第1報), 日本生薬学会北海道支部第28回例会 (2004年5月8日, 札幌) 講演要旨集 p.28.

○ 鎌田博: 遺伝子組換え農作物・食品の安全性の考え方と課題, 日本農芸化学会2004年度大会シンポジウム「食の質的改善をもたらす21世紀型遺伝子組換え作物」(広島大学) 2004年3月31日 (招待講演)

○ 江口郁恵, 梅原三貴久, 小野道之, 鎌田博: 野生ニンジンおよび栽培ニンジンにおける遺伝子多様性の解析, 日本植物学会第68回大会 (日大藤沢) 2004年9月12日

○ H. Kamada: Genetically modified organisms (including foods/food additives) -Detection methods of GMO and its internationally harmonized use-. International Workshop on Detection Methods for Genetically Modified Organisms, Yokohama, Nov., 25-26, 2004 (invited opening speech)

○ I. Eguchi, M. Umehara, M. Ono and H. Kamada: Proposal to investigate gene flow and gene diversity using carrot (*Daucus carota* L.). Korea Conference on Innovative Science and Technology 2004 - GM Crops and Foods -Potential, Safety & Environmental Impact. -Potential, Safety & Environmental Impact-

Gyeongju, Korea, Nov. 9-12, 2004 (invited speech)

○ 小黒聡史, 阿部郁朗, 野口博司: 植物由来ポリケタイド合成酵素のクローニングと機能解析, 第39回天然物化学談話会(淡路島), 要旨集 2004年7月22日

○ 渡辺達也, 阿部郁朗, 野口博司: 植物由来ポリケタイド合成酵素の基質特異性と非天然型ポリケタイドの創出, 第39回天然物化学談話会(淡路島), 要旨集 2004年7月22日

○ 阿部郁朗, 内海依子, Lou Weiwei, 小黒聡史, 渡辺達也, 野口博司: 大黃由来芳香族ヘプタケタイドの骨格を構築する新規III型ポリケタイド合成酵素の構造機能解析, 日本生薬学会第51回年会(神戸), 要旨集 p. 133, 2004年9月10日

○ 阿部郁朗, 渡辺達也, 内海依子, 野口博司: 長鎖脂肪酸 CoA エステルに対する植物ポリケタイド合成酵素の基質特異性の検討, 日本生薬学会第51回年会(神戸), 要旨集 p. 135, 2004年9月10日

G. 知的財産権の出願・登録状況

「新規糖転移酵素, 及びそれを利用したクルクミン配糖体の製造」(神永靖久, 水上元, 清水亮輔, 森脇将光) 特願 2004-131967 (2004)

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

遺伝子組換え薬用植物の作出と二次代謝物生合成能改変に関する研究

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 育種生理研究室長

協力研究者 河野徳昭

国立医薬品食品衛生研究所 筑波薬用植物栽培試験場 育種生理研究室研究員

過去に実施例の少ない薬用植物分野における有用形質の付加および有用二次代謝産物の生合成能の改変を目標とした遺伝子組換え体の作出に関わる基盤技術の確立のため、組換え体作出法の開発、組換え体の保存法の開発、そして組換え体の評価法の開発に関わる研究を行ったので報告する。

まず、セリバオウレンを材料として、レポーター遺伝子を使用した効率的遺伝子組換え体作出法の検討ならびに輸送タンパク遺伝子を導入した組換え体について超低温保存法を適用しその評価を行った。また、遺伝子組換え薬用植物の遺伝子レベルにおける評価を行うため、アヘンアルカロイドの成分変異等の形質変異を示すリゾビウム属細菌によるケシの形質転換体について、その原因遺伝子の解析を行った。さらに、従来の薬用植物に新たな二次代謝産物生合成能を付加するため、マルバダイオウを材料として、植物ポリケタイド生合成に関わる遺伝子を導入した遺伝子組換え体の効率的作出法について検討を行った。

A. 研究の目的

近年、植物における遺伝子組換え技術は長足の進歩を遂げ、スイス連邦工科大学(ETH)において開発されたベータカロチンに富む“ゴールデンライス”や、サントリー(株)の花色改変技術による「青いバラ」などに代表されるように、穀類や花卉分野を中心とした農作物において、その具体的な成果が現れてきている。

しかしながら、薬用植物分野においてはその安定供給、大量供給に対する需要の高さにかかわらず、遺伝子組換え技術を実際に応用し産業化などに結実した例は少ない。そこで、薬用植物分野における有用形質の付加および有用二次代謝産物の生合成能の改変を目標とした遺伝子組換え体の作出のため、それらの基盤技術となる、遺伝子組換え薬用植物の作出法および保存法、そしてその周辺環境に与える影響を含めた組換え体の化合物レベルおよび

遺伝子レベルにおける評価法の開発を目標とし、下記の実験を行った。

1. セリバオウレンの効率的な組換え体作出法の開発及び組換え体の超低温保存法の検討

ベルベリンは抗細菌、抗炎症、抗アメーバ赤痢活性を示す薬用植物の重要な活性成分のひとつであるが、その複雑な構造のため全合成は困難である。一方、すでに多数がクローニングされているベルベリンの生合成に関わる生合成遺伝子(群)の遺伝子情報を利用し、それらをベルベリン生産植物において過剰発現させ二次代謝経路を賦活化させた、ベルベリン高生産型の遺伝子組換え体の作出が期待される。

そこで、ベルベリン生産植物のひとつであり、これまでに有効な組換え体作出法が報告されていないセリバオウレンを材料として、レポータ

一遺伝子を用いた効率的な組換え体作出法の検討・開発を行った。また、遺伝子組換え植物の作出には一般に時間と多大の労力がかかるため、ひとたび作出された組換え体を新規薬用資源としていかに保存していくかは重要な課題である。そこで、セリバオウレンの遺伝子組換え体の長期保存を目的とした超低温保存法の検討および、保存植物体から再生した植物組織の形質について調査を行った。

2. ケシのリゾビウム形質変異体における原因遺伝子の探索

ケシはモルヒネをはじめとするアヘンアルカロイド類を生産する重要な薬用植物のひとつである。ケシのリゾビウム感染による形質転換体(T-DNA 挿入形質変異体)は花卉の形状の異常などの形態変異、ならびにアヘンアルカロイドの成分変異が認められた。これらの形質変異はリゾビウム由来の T-DNA のケシゲノム DNA への挿入に因るものと予想されたため、アヘンアルカロイド生合成経路に関わる遺伝子(群)の解明を視野に入れ、その挿入部位近傍のゲノム DNA の塩基配列解析による遺伝子レベルの評価を行った。また、外来遺伝子であるリゾビウム T-DNA のケシゲノム DNA への組込みのパターンを解析することにより、周辺植物(環境)への外来遺伝子の伝播等の影響を調査する上での基礎情報を得ることを目的とした。

3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

既存の薬用植物の有する二次代謝産物の生合成能を活用し、その二次代謝産物もしくは生合成中間体をさらに基質として利用することはポストゲノム時代の新規薬用植物資源開発の一手法として有望であると考えられる。本研究においては、比較的栽培の容易なマルバダイオウ(*Rheum rhaponticum* L.)にダイオウ(*R.*

palmatum L.)由来のベンザルアセトン生合成酵素を導入し、フェニルブタノイド類の生産能を付加させることを目標とし、まず効率的形質転換法について検討を行った。

B. 研究の方法

1. セリバオウレンの効率的な組換え体作出法の開発及び組換え体の超低温保存法の検討

1-1. レポーター遺伝子を用いた効率的組換え体作出法の検討

レポーター遺伝子(β -glucuronidase, GUS)をサブクローニングしたバイナリーベクターを保有する *Rhizobium radiobacter* PMP90 株を用い、下記の各種条件下セリバオウレン(*Coptis japonica* Makino var. *dissecta* Nakai)に感染させた。セリバオウレン圃場栽培株の若葉を常法により殺菌後、葉柄切片を調製して植物ホルモン無添加 WPG(WPGHF)固形培地上 9 日間前培養した後、3 日間 *Rhizobium* との共存培養(実験 1)、あるいは殺菌後の葉柄切片を NAA 1 mg/l + Kin 2 mg/l 添加 WPG(WPGNK)固形培地で 16 日間前培養した後、2 日間共存培養(実験 2)、あるいは殺菌直後の切片を菌液に 60 分間浸漬(実験 3)することにより感染処理を行った。感染直後の除菌は Claforan 500 mg/l 添加 WPGNK 固形培地を用いた。

除菌完了後のカルス及び不定根は、組換え体選択用ハイグロマイシン(25 mg/l)を含む WPGNK 固形培地、20 °C、暗所で培養して選抜を繰り返し、GUS 活性染色(反応液:0.5 mg/l X-glu in 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.3, 37 °C, 一晚)により、組換え遺伝子(GUS)の確認を行った。

1-2. オウレン組換え体の超低温保存法の検討

オウレンの組換え不定胚及び不定根を材料

に、非形質転換不定胚で確立したガラス化法による超低温保存法を一部改変し超低温保存を行った。

実験に用いたオウレン組換え体は、ベルベリン生産性オウレン培養細胞からクローニングされた、オウレン植物生体内においてイソキノリンアルカロイドの能動輸送に関わると推定されるタンパク CjMDR1(*Coptis japonica* multidrug resistance 1, DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AB043999)¹⁾の cDNA *Cjmdr1* のコード領域全長を、植物の高発現型プロモーター(EL2-35S)下流に組込んだバイナリベクターを有する *Rhizobium radiobacter* PMP90 株を感染させることにより得られた不定胚及び不定根であり、適用した超低温保存の条件は、下記のとおりである。

前培養(0.2 M sucrose, 1 M glycerol, 20 °C, dark, 2 days)→ガラス化液処理(PVS2, 23 °C, 10 min)→液体窒素中に保存→解凍(40 °C水浴, 1 min)→洗浄(1 M sucrose, 25 °C, 10 min)→再培養(WPGNK, 20 °C, dark)

超低温保存後再生した不定胚は、ゲノム PCR により導入遺伝子(*hpt*)の確認を行い、また、Northern 解析により、*Cjmdr1* mRNA の発現様式を調べ、未保存のものと比較した。

2. ケシのリゾビウム形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索

ケシ(*Papaver somniferum* L. var. *Ikkanshu*)の *Rhizobium rhizogenes* MAFF03-01724株の感染による形質転換体の再生植物体(*in vitro* plantlet)²⁾を材料とした。

2-1. T-DNA挿入部位ならびにコピー数の精査

In vitro 培養植物体の葉より DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を制限酵素、*KpnI*, *EcoRV*, *PvuII* でそれぞれ消化し、自己閉環ライゲーション

させ自己閉環ゲノム DNA ライブラリーとしてインバース PCR(IPCR)の鋳型に用いた。また、平滑末端を生じる *EcoRV*, *PvuII* で消化したものについては、アダプターを付加し、アダプター付加ゲノム DNA ライブラリーとしてアダプターライゲーション PCR(AL-PCR)に用いた。

IPCR は、*Rhizobium rhizogenes* strain MAFF03-01724 plasmid pRi1724 の塩基配列(DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AP002086)よりデザインした、T-DNA の 5'側末端(Left Border: LB)および3'側末端(Right Border: RB)に特異的なプライマーを用い、T-DNA に接する配列未知のゲノム DNA 方向へ伸長反応を行い、T-DNA に接するケシゲノム DNA の増幅を行った。なお、PCR は特異性を上げる為 nested PCR により行った。特異的に増幅された PCR 産物は T-vector にクローニングし、ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)による塩基配列解析に供した。また、AL-PCR においては、アダプター配列特異的なプライマーおよび上記の LB、RB 特異的なプライマーを用い、T-DNA に接する配列未知のゲノム DNA 方向へ PCR を行い隣接ケシゲノム DNA の増幅を行った。なお、PCR(nested PCR)および塩基配列解析はインバース PCR 時と同様の手法で行った。

2-2. ケシ由来WRKY遺伝子のクローニング

上記実験により得られた T-DNA のゲノム DNA 挿入部位近傍クローンについて、BLAST 相同性解析を行ったところ、LB 側 1 クローン(LB1)において、T-DNA の 5'末端部より上流 694 bp の位置にシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来の WRKY 遺伝子ファミリーのひとつである WRKY4 遺伝子と高い相同性を示す、ORF の一部の存在が明らかとなった。そこで、LB1 の部分配列特異的なプライマーを用いた

IPCR および AL-PCR により、さらに 5' 上流側の配列情報を得、次に以下の RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により全長 cDNA のクローニングを行った。

圃場に播種後約 2 週間の植物体全草 (子葉が展開した状態、fresh weight 0.18 g) より QIAGEN RNeasy® Plant Mini Kit を用いて抽出した total RNA 1 µg を鋳型として、WRKY 様遺伝子の部分配列特異的なプライマーを用い SuperScript II により 1 本鎖 cDNA を逆転写合成した。この 1 本鎖 cDNA を鋳型にしてさらに WRKY 特異的プライマー 2 セットを用い nested-PCR により約 1.0 kbp の PCR 産物を得、これを T-vector にクローニングし塩基配列を解析し、全長 cDNA (*PsWRKY1*) を構成すると予想される部分配列情報を得た。

全長 cDNA 増幅のため、Total RNA 1 µg を鋳型として oligo-d(T) プライマーを用い SuperScript II により 1 本鎖 cDNA (ss-cDNA) プールを調製し、*PsWRKY1* cDNA の 5' 末端および 3' 末端近傍の塩基配列特異的に設計したプライマーを用い、PCR を行った。なお、これらのプライマーにはのちの発現用ベクターもしくは植物形質転換用ベクターへのサブクローニングを念頭におき、両端に制限酵素 *EcoRV* サイトを付加した。PCR の結果、約 1.6 kbp の増幅産物が得られたので、T-vector にクローニングし塩基配列解析を行った。

3. 既存薬用植物に対する新規二次代謝産物生産能付加に関する研究

材料植物は、ラポンチシンなどのスチルベン誘導体を含むマルバダイオウ (*Rheum rhaponticum* L.) と、コントロールとしてベラドンナ (*Atropa belladonna*) を選択した。マルバダイオウ種子を 75% エタノール、次いで 3% 次亜塩素酸ナトリウム (Tween 20 添加) 水溶液で滅菌処理し、固形培地 (0.5% sucrose, 0.5% agar) 上に

無菌的に播種し、20 °C 明条件下発芽した芽生えの子葉および胚軸の切片を用いた。ベラドンナは MS 固形培地 (3% sucrose) 上で維持されている *in vitro* 培養植物の葉の切片を用いた。いずれの切片も MS 固形培地 (2% sucrose, NAA 1 mg/L, BA 10 mg/L, Gelrite) 上でマルバダイオウは 20 °C、ベラドンナは 25 °C 暗所で一晩前培養したものをリゾビウム感染に用いた。

導入遺伝子は、マルバダイオウの植物ポリケチド類の生産物プロファイル改変を目標とし、静岡県立大のグループによりクローニングされたダイオウ (*Rheum palmatum* L.) のフェニルブタノイド類生合成の鍵酵素であるベンザルアセトン合成酵素 (BAS: EMBL/DDBJ/GenBank accession No. AF326911)³⁾、そして、Schröder らによりクローニングされたピーナツ (*Arachis hypogaea*) 由来スチルベン合成酵素 (STS: 同 L00952)⁴⁾ を選択した。これら、植物由来二次代謝産物生合成遺伝子および、ポジティブコントロールとして β-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を植物の高発現型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流にそれぞれ配置したバイナリーベクターを、*Rhizobium radiobacter* LBA4404 株に導入し、植物への感染に用いた。

また、同時に、リゾビウム感染条件がカルスおよび不定芽形成率に与える影響についても検討を行うため、希釈したリゾビウム菌液に 1 時間浸漬した植物組織片を MS 固形培地 (NAA 1 mg/L, BA 10 mg/L) 上で一晩共存培養した場合 (感染条件 I) と、MS 液体培地 (NAA 1 mg/L, BA 10 mg/L) に植物組織片とリゾビウム菌液を加えて一晩共存培養した場合 (感染条件 II) におけるカルスおよび不定芽形成の割合についても調査を行った。

各条件で感染後の切片を、植物成長調節物質 (NAA 1 mg/L, BA 10 mg/L)、そしてリゾビウム除菌用にクラフオランを添加した MS 培地 (2%

sucrose)に植付け、マルバダイオウは 20 °C、ペラドンナは 25 °C、いずれも暗所で培養した。感染約 4-6 週後にカルス化が認められたので、形質転換体の選択のため上記クラフォラン添加培地にカナマイシンを加えた培地に植え継ぎ、引き続き暗条件で培養を行い、感染約 14 週後にカルスまたは不定芽の形成率について調査した。

C. 研究結果

1. セリバオウレンの効率的な組換え体作出法の開発及び組換え体の超低温保存法の検討

1-1. レポーター遺伝子を用いた効率的組換え体作出法の検討

リゾビウム菌感染方法とセリバオウレン形質転換率を表 1 に示した。実験 2 の感染方法が、カルス形成、形質転換効率ともに良好であった。得られた形質転換カルス及び不定根の GUS 活性染色結果を図 1 に示した。

1-2. オウレン組換え体の超低温保存法の検討

Cjmdr1 センス形質転換体を材料に超低温保存を行ったときの再生率を表 2 に示した。不定根からは再生が認められなかったが、不定胚からは再生率 40%で再生が認められた。超低温保存後再生した不定胚と未保存対照のゲノム PCR (図 2) の結果、超低温保存後の不定胚中に組換え遺伝子 (*hpt*) は安定に存在することが判明した。また、Northern 解析 (図 3) の結果、再生体においても Cjmdr1 の著しい発現の低下が認められ、未保存のセンスクローンにおける発現様式と同様であることを確認した。

2. ケシのリゾビウム形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索

2-1. T-DNA挿入部位ならびにコピー数

IPCR および AL-PCR 法により、リゾビウム T-DNA の LB と接するゲノム部分を含むクローン 1 種 (LB タイプ)、そして T-DNA の RB およびそれに接するゲノム部分を含むクローン 4 種 (RB タイプ) が得られた (図 4)。また、T-DNA がタンデムに結合した結合部の境界配列と考えられる RB と LB が結合したクローンが 2 種得られた。(RB と LB がタンデムに結合したものは、その後、形質転換体ゲノム DNA を鋳型として RB と LB 特異的プライマーを用いた PCR により、さらに 3 種存在することが明らかになった。) T-DNA の RB および LB が T-DNA の *orf13* に相当する部分配列と結合したクローンも RB 側、LB 側それぞれ 2 種得られたが、その生成理由および意義は不明である。以上の結果は、本形質転換体においてはゲノム上の少なくとも 4ヶ所においてリゾビウム由来 T-DNA の挿入が起っていることを示唆するものである。

2-2. ケシ由来 WRKY 遺伝子 (*PsWRKY1*) のクローニング

LB クローン、RB クローンの各ゲノム DNA 部分の配列について BLAST 相同性解析を行った結果、LB1 において、T-DNA の 5' 末端部より上流 694 bp の位置にシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の WRKY 遺伝子ファミリーのひとつである WRKY4 遺伝子と高い相同性を示す、ORF の一部が存在していた。WRKY 遺伝子ファミリーは DNA 結合タンパクをコードし、転写調節因子として植物生体内において種々の遺伝子の発現調節に関わっていると予想されている。ケシにおいても本 WRKY 様遺伝子がアヘンアルカロイド生合成関連遺伝子群の発現調節や形態変異に関与している可能性があるため、本遺伝子の機能解析を目指し全長 cDNA のクローニングを行った。

全長 cDNA 増幅の結果、約 1.6 kbp の増幅産物が得られたので、まず T-vector にクローニング