

ていると考えられる (図1)。

そこで、薬用としては不適とされるが、少なくとも葉柄については古くから食用とされ、栽培は生薬大黄より比較的容易であること、また消炎作用物質は含まないがその前駆体となる物質は生産していると考えられることから、消炎作用物質生産のキーとなる酵素を遺伝子導入することにより、消炎作用を有する薬用植物あるいは機能性食品の新規開発が期待される。これにより、瀉下作用を有さない消炎効果を得られるほか、生薬大黄よりも生産しやすいという利益がもたらされる。すでにダイオウからベンザルアセトン合成酵素遺伝子がクローニングされており [Abe I., Takahashi Y., Morita H., Noguchi H., *Eur. J. Biochem.* (2001), **268**, 3354-3359]、これをマルバダイオウに導入することにより、消炎作用物質 lindleyin が根茎および葉柄、またはいずれかで生産・蓄積されるこ

とが期待される。

昨年は遺伝子導入による成分変化の検討の前段階として、遺伝子導入前の植物の成分精査ならびに成分比較のために適当な分析法の検討を行った。その結果ベンザルアセトン誘導体を感じ度よく検出する条件を設定し、マルバダイオウの根茎について主要成分として3種のスチルベン配糖体を検出し、葉柄については rhapontin を認めた。

今回、マルバダイオウの葉柄について rhapontin 以外のスチルベン配糖体の検出を試みるため、rhapontin のマスマスペクトルを測定し、主要なプロダクトイオンと同じ分子量のイオンを産する化合物 (分子イオン) の探索を葉柄のメタノールエキスを用いて行った。また、lindleyin についても同様に同じプロダクトイオンを持つ化合物の探索を行った。

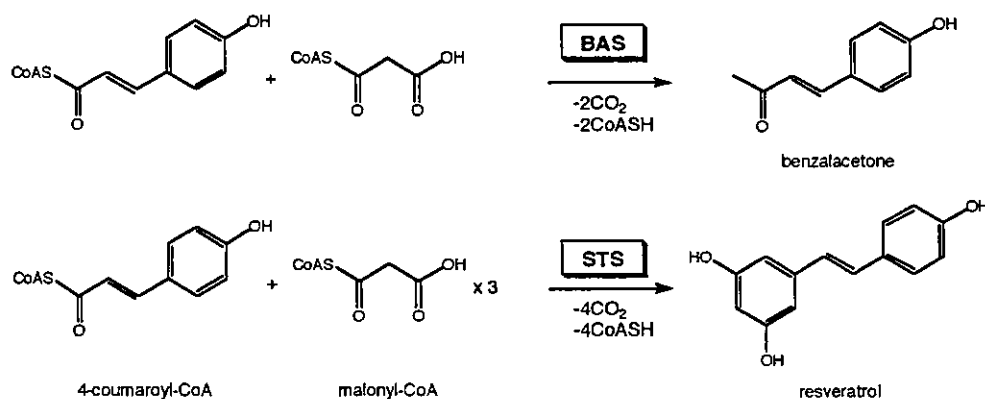


図1 BAS:benzalacetone synthase
STS: stilbene synthase

B. 研究方法

実験には筑波薬用植物栽培試験場標本園で栽培しているマルバダイオウ (*Rheum rhaponticum* L.) の風乾した葉柄を用いた。粉末 220g に 1.2 L のメタノールを加えて室温で 4 日間抽出し、ろ過後減圧濃縮を行い、メタノールを加えて 1 mg/ml の濃度に調整した。分析には、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を付けた Agilent 1100 HPLC システムに API 3000 (MS/MS) 装置を接続した LC-MS システムを用い、吸光度でモニターするとともにマスマスペクトルおよびマスマスマスペクトルをプロダクトイオン、プレカーサーイオンの各イオンスキャンモードで測定した。なお、マスマスペクトルの測定はすべてネガティブモードで行った。LC の条件は以下の通り：カラム、Mightysil ODS RP-18, 150 x 3 mm (3 mm)；溶媒、酢酸-アセトニトリル；グラジエント、0 min (10% アセトニトリル) - 20 min (60% アセトニトリル) - 25-35 min (100% アセトニトリル) - 40-50 min (10% アセトニトリル)；流速、0.150 ml/min；検出：PDA (240-600 nm)、MS (m/z 150-700)。

さらに、スチルベン配糖体の含有率が少ないことから、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール) により、メタノールエキ

スの分画を行った。その結果メタノールエキス 10g よりフラクション 1 (クロロホルム/メタノール = 20/1) 0.5g、同 2 (20/1) 2.0g、同 3 (5/1) 0.5g、同 4 (2/1) 1.4g、同 5 (1/1) 0.2g、同 6 (メタノール) 2.7g およびメタノール不溶物 3g を得た。

C. 研究結果

D. 考察および結論

標品 rhapontin (419) のプロダクトイオンピークを測定したところ、主に 257、240 に認められた。これらのピークにつき、各フラクションについて同じプロダクトイオンを有するピークを探索したところ、フラクション 1 より共通のプロダクトイオン 240 を有する分子イオンピーク 269、フラクション 3 より rhapontin 419 のピークを検出した。マルバダイオウはスチルベン誘導体として数種の化合物を含有することが報告されているが、これらの分子イオンピークの探索を行ったところ、フラクション 1 から deoxyrhapontigenin (1)、resveratrol (2)、フラクション 3 から piceid (3) の分子イオンに相当するピークが得られ、溶出時間からみても妥当であった。また、メタノールエキスにおいてもこれらの分子イオンピークが検出できるかどうか試験したところ、resveratrol に

については検出されなかった。以上よりメタノールエキスを6つのフラクションに分けたものについていくつかのスチルベン誘導体を検出したが、それらはフラクション1および3に集中し、フラクション3においては配糖体を検出した。さらに、これらのピークは分画前のメタノールエキスでも resveratrol 以外は検出することが分かった。

また、標品 lindleyin (477) についてプロダクトイオンピークを測定したところ、主に 313、169 に認められたが、これらと共通するプロダクトイオンを有するピークはエキス中および各フラクションにおいて観測されなかった。

昨年の結果より、導入を予定しているベンザルアセトン合成酵素の直接の産物である *p*-hydroxybenzalacetone およびその誘導体である lindleyin はマルバダイオウの根茎および葉柄に全く検出されず、遺伝子導入による上記物質の生産の成否の判別は容易であ

ることが示されている。また今回の結果から、数種のスチルベン誘導体のピーク面積を測定することにより、遺伝子導入によって基質の競合する化合物の生合成に変化が及んだか否かを判断することができる。またこの場合、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画によって粗精製し、より精密に成分変化を追うことも可能であるが、LC/MS/MS による分析においてはメタノールエキスでも問題ないことが分かった。

F. 健康危機情報

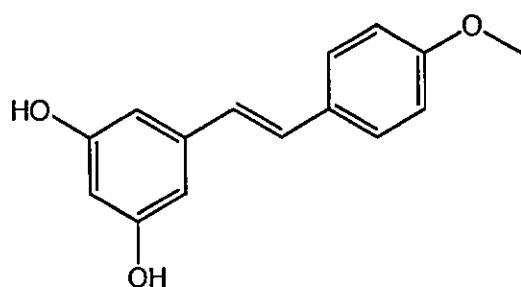
特に問題なし

G. 研究発表

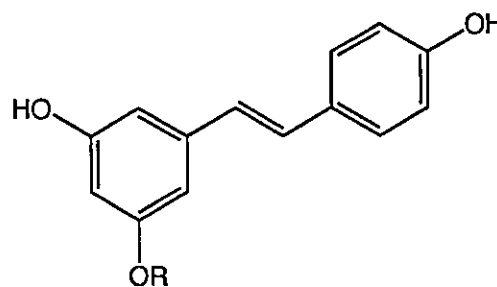
1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし



deoxyrhapontigenin (1)



R = H : resveratrol (2)
R = Glc : piceid (3)

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

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

分担研究者 関田 節子 徳島文理大学香川薬学部 教授
協力研究者 代田 修 徳島文理大学香川薬学部 助教授
中根孝久 昭和薬科大学 助手

研究要旨 組み換えが予想される薬用植物の特定成分に関わる遺伝子を解明し、組み換え時に生成する成分を検出することを目的として、そのモデル薬用植物として麻黄を選び、エフェドリン生合成遺伝子の解明を目指し、その基礎となる組織培養法の確立を検討した。

A. 研究目的

近年、日本において漢方薬の重要な構成生薬である麻黄や甘草の中国からの輸入が環境保全を理由に禁止されるなど、生物多様性条約による野生遺伝資源の国境を越えた移動に厳しい制限が加えられつつある。また、植物などの生物遺伝資源は地球温暖化などの環境の変化による影響で減少の一途にあり、保存・保護の対応が急務となっている。この地球上には、まだその利用価値を見出せていないものを含め、絶滅に瀕している薬用遺伝資源も多数ある。これらの薬用遺伝資源の保存・保護には遺伝子組み換え技術が重要であると考えられてきた。一方で、遺伝子操作技術が一般化しつつある状況下で、海外では害虫や除草剤に耐性を持つような遺伝子を組み込んだ組み換え作物の花粉や種が風で周囲に飛び回り、自然や生態系に悪影響を及ぼすという問題が具体的に浮き彫りになってきている。遺伝子組み換え技術の薬用植物への応用は、海外での薬剤耐性薬用ニンジン作出の報告などが成され、今後もその件数は増えるものと容易に推測される。このような中、組み換え生物の輸入手続きを定める生物多様性条約の遂行を目的としたカタルヘナ議定書の批准

に備え、我が国においても「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」が施行されている。

本研究では、カタルヘナ議定書の遵守のために、組み換えが予想される薬用植物の特定成分に関わる遺伝子を解明し、組み換え時に生成する成分を検出することを目的として、モデル薬用植物として麻黄を選び、その基礎的研究を行うこととした。そこで今年度は、麻黄のエフェドリン生合成遺伝子の解明を目指し、その基礎となる組織培養法の確立を検討した。

B. 研究方法

カルス誘導実験に用いる麻黄を選択するに先立ち 13 種類の植物体について ephedra アルカロイドの含有量を検討した。測定法は第 14 改正日本薬局方のマオウ定量法に従い HPLC 法で行った。

麻黄種子からのカルス誘導を目的に、以下の実験を行った。種子は、昭和薬科大学薬用植物園高野昭人講師より分与された *Ephedra gerardiana* を用いた。

滅菌操作: 種子を 70 % エタノールにて 1 分間攪拌後、エタノール溶液を除き、滅菌蒸留水にて洗浄した。続いて、次亜塩素酸ナトリ

ウム溶液(有効塩素濃度 2.5%)にて 20 分間滅菌後、次亜塩素酸ナトリウム溶液を除き、滅菌蒸留水にて洗浄し、培地に置床した。

培地:Murashige & Skoog 寒天培地に、オーキシシン(1-ナフタレン酢酸:NAA)及びサイトカイニン(6-ベンジルアデニン:BA)の比率を変えた3種の培地を作成し、6-well プラスチックプレートに 6 mL ずつ分注した。

[NAA-BA (1.0 mg/L : 0.1 mg/L)、NAA-BA (0.5 mg/L : 0.5 mg/L)、(0.1 mg/L : 1.0 mg/L)]

培養条件:12 時間明期 - 12 時間暗期、温度 25 °C。

C. 研究結果と考察

13 種のマオウ植物体の ephedra アルカロイド含有量を表に示す。

<i>Ephedra</i> species	ephedrine content (%)
<i>E. ciliata</i>	3.1 - 3.5
<i>E. procera</i> var. <i>erythrocarpa</i>	0.8 - 2.6
<i>E. minuta</i>	1.7
<i>E. procera</i>	n. d. - 3.8
<i>E. campulopoda</i>	n. d. - 3.1
<i>E. microsperma</i>	n. d. - 1.6
<i>E. regeliana</i>	n. d.
<i>E. altissima</i>	n. d.
<i>E. fragilis</i>	n. d.
<i>E. distacya</i>	0.6 - 1.3
<i>E. intermedia</i>	1.2 - 2.7
<i>E. gerardiana</i>	0.7 - 2.2
<i>E. equisetina</i>	n. d. - 3.8

麻黄のカルス誘導およびシュート培養・微細繁殖(micropropagation)については、1970年代から試みられており、エフェドリン生産の向上など目指して、今なお研究が進められて

いる。初期には、インドの Ramawat, K. G. らにより、*E. gerardiana* と *E. foliata* から誘導したカルスを用いた組織培養の基礎的な研究が行われている。それによると、炭水化物栄養源としてはショ糖が良く(*Indian J. Experimental Biology*, **15**, 524-527, 1977)、窒素栄養源としてはクエン酸アンモニウム-硝酸カリウム(1 : 4)を用いて、400 mg N/L の濃度満足いく成長が得られたとしている(*Phytomorphology*, **29**, 16-25, 1979)。エフェドリン生産に関わるアミノ酸の影響については、L-フェニルアラニンにより最大収量が得られ(*Phytochemistry*, **18**, 484-485, 1979)、成長因子の影響については、カイネチン(0.5 mg/L)と IBA(10 mg/L)により最大生産量が見られたとしている(*Indian J. Experimental Biology*, **17**, 227-228, 1979)。また、インドの Shukla, R. M. は、*E. foliata* カルス培養時の光の影響によるエフェドリン生産を考察しており、赤色光を用いたときに最大収量が得られ、それに続いて青色光、橙色光、緑色、遠赤色、白色の順であったし、青色光を用いたときにカルスの成長が一番良かったと報告している(*Indian Drugs*, **17**, 392-393, 1980)。アイルランドの O'Dowd, N. A. らは、カルス誘導に関わる植物成長因子について、*E. andina*、*E. distachya*、*E. equisetina*、*E. fragilis* var. *campylopora*、*E. gerardiana*、*E. intermedia*、*E. majori* ssp *procera*、*E. minima*、*E. saxatilis* の9種を用いて検討を行っている(*Plant cell, Tissue and Organ Culture*, **34**, 149-155, 1993)。その結果、改良 MS 培地に、0.025 mM のカイネチンと 5.0 mM の 2,4-D 若しくは NAA を添加することによって全ての種でカルスが誘導されることが明らかとなり、また、IAA や IBA ではその誘導は芳しくなかったが、IBA はいくつかの種で誘導されたカルスの成長保持に有効であったという。また O'Dowd, N. A. らは、11種類のエフェドラに

ついて微細繁殖 (micropropagation) を検討している (*J. Horticultural Science*, **68**, 1013-1020, 1993)。 *E. fragilis* については、MS 培地にショ糖 3 %、IBA 0.05 mM と、0.0 - 0.5 mM のカイネチン、ゼアチン、又は BA を加えた条件で培養を行い、サイトカイニンの濃度増加によってシュートの生成が増加するが、シュート長は減少することを見出している。また、IBA を 2,4-D に置き換えた場合は、カルス化が起こり、シュート生成は妨げられたとしている。さらに、他の10種のシュート培養については、IBA 0.05 mM とカイネチン 0.05 mM の条件下で成長し、IAA の添加は健康的な発根を与えたとされる。 *E. equisitina*、 *E. gerardiana*、 *E. minima*、 *E. saxatilis* については、1/2 MS 培地にショ糖 1 %、IAA 0.5 mM を用いたシュート生成と発根との一段階プロトコルにより微細繁殖が成功したとしている。最近では、ロシアの Velicho, N. A. が、エフェドリン生産種である *Ephedra momosperma* S. A. Meyer から誘導したカルスを用いて、カルスの成長とアルカロイド含有量が良い培養培地の探索を行い、NAA と BA が必要であるこ

とを報告している (*Biotekhnologiya*, **5**, 59-64, 2002)。

このような文献情報を基に、オーキシンとして NAA を、サイトカイニンとして BA を用い、その比率を変えることによる麻黄種子からのカルス誘導能の検討を開始し、現在進行中である。

E. 結論

カルタヘナ条約の遵守のために組換えが予想される薬用植物の特定成分に関わる遺伝子を解明して検出に対処すると共に、組換え体が生成する成分を検出することを目的に、基礎となる組織培養法の確立を行った。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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
ステロイダルアルカロイド配糖体含量への影響

分担研究者 正山征洋 九州大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨 *Solanum khasianum* へ抗ソラマルジン小型化抗体遺伝子を挿入することにより、ソラソジン配糖体含量が約3倍に上昇することをこれまでに明らかにした。この結果に基づき同じナス科植物である *Physalis minima* Linn. に抗ソラマルジン小型化抗体遺伝子を導入する前段階として、野生型のアグロバクテリウム・リゾゲネスによる感染を行い毛状根を形成させた後、最適培養条件の検討を行った。加えて、種々の培養条件における毛状根中のソラソジン配糖体含量についても調査した。

A. 研究目的

既に我々は、*Solanum khasianum* へ抗ソラマルジン小型化抗体遺伝子を挿入することにより、ソラソジン配糖体含量が約3倍に上昇することを明らかにしており、この結果に基づき同じナス科植物である *Physalis minima* Linn. に既に作製している抗ソラマルジン小型化抗体遺伝子を導入した遺伝子組み換え薬用植物の作出を企図した。本年度は、まずその前段階として野生型のアグロバクテリウム・リゾゲネスを感染させ毛状根を形成させた後、最適培養条件並びに毛状根中のソラソジン配糖体含量について調査した。

B. 研究方法

1. *P. minima* の組織培養系の確立

P. minima の種子を 10% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理した後、Murashige-Skoog 培地 (MS 培地) に播種し、無菌の幼植物体を得た。3 週間培養

した後に得た幼植物体の葉、茎にアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes* 15834) を感染した後、セフトキシムを含有する 1/2 MS 培地に移し除菌後、培養することで毛状根を形成させた (図1)。

2. 毛状根最適培養条件の検討

得られた毛状根を各種成長ホルモン添加培地及び蔗糖濃度を変えた液体培地で 18 日間、暗黒下培養し、毛状根の増殖率とソラソジン配糖体の量を経時的に分析した。

3. 総ソラソジン配糖体含量の定量

抗ソラマルジンモノクローナル抗体を用いた競合的 ELISA により定量した。まず、ソラマルジン-HSA コンジュゲートをイムノプレートに固相化した後、プレートをブロッキングした。続いて、種々の濃度に希釈したサンプル溶液ならびに抗ソラマルジンモノクローナル抗体を加

え競合反応を行った後、酵素標識二次抗体を加え、続いて基質を加え発色させた。種々の濃度のソラマルジン濃度を標準物質として得られた吸光度を基に検量線を作成し、未知サンプル中の総ソラソジン配糖体含量を作成した検量線を用い算出した。

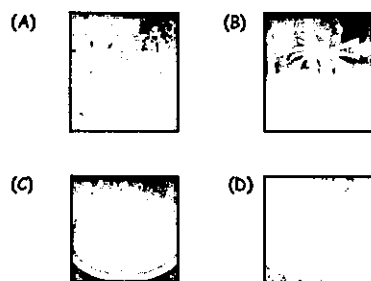
C. 研究結果と考察

まず、1/2 MS 培地を用い、蔗糖濃度 3%、暗黒下で培養した結果、毛状根は経時的に増加し、乾燥重量は 18 日目に最高に達した。また、単位重量当たりの総ソラソジン配糖体含量も経時的に増加し 18 日目に最高値を示した (120 $\mu\text{g/g}$ dry wt.)。続いて添加する蔗糖濃度を種々に変化し、毛状根重量並びにソラソジン配糖体産生に与える影響を調査した結果、蔗糖濃度 8% の条件が最も乾燥重量が高く又ソラソジン配糖体含量も高く、640 $\mu\text{g/mg}$ dry wt.であった(図2)。次に添加ホルモンの影響を調べた結果、培地にナフタレン酸(NAA)とベンジルアデニン(BA)各 1 mg/l を添加した条件下で培養することで、ホルモン無添加培地に比べ約 3 倍のソラソジン配糖体を生産することが明らかとなった(図3)。

D. 結論

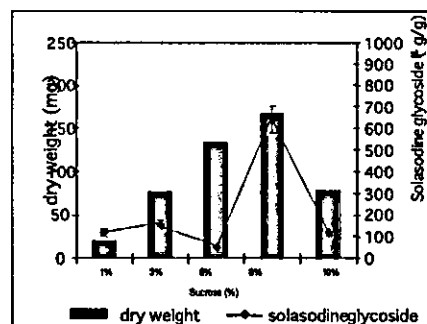
抗ソラマルジン小型化抗体遺伝子導入によるソラソジン配糖体高含有 *Physalis minima* Linn. 作出研究において、小型化抗体を導入する前段階として、野生型のアグロバクテリウム・リゾゲネスによる感染を行い、毛状根を形成させた後、最適培養条件の検討を行った。その結果、常法により効率よく毛状根を誘導できることが判明し、最適培養条件としては 8% の蔗糖、植物ホルモンとし

て 1 mg/l NAA, 1 mg/l BA を添加した 1/2 MS 培地が最適であることを明らかにした。今後、既に作製している抗ソラマルジン小型化抗体遺伝子を *P. minima* Linn. に導入した後、遺伝子組み換え葉用植物の環境に与える影響に関する研究を推進して行く計画である。



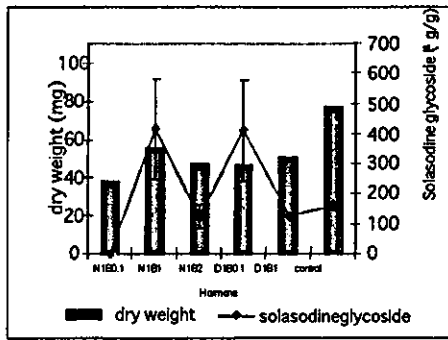
Three-week-old seedlings of *P. minima* (A), development of hairy root from wounding site (B), hairy root (C) and shoot production from hairy root (D).

図1. *P. minima* 幼植物体の形成と毛状根の誘導



Effects of sucrose concentration on solasodine glycoside production in hairy root of *P. minima*.

図2. *P. minima* 毛状根培養系への蔗糖添加による乾燥重量並びに総ソラソジン配糖体産生に及ぼす影響



Effects of hormone component on solasodine glycoside production in hairy root of *P. minima*.

図3. *P. minima* 毛状根培養系への各種ホルモン添加による乾燥重量並びに総ソラソジン配糖体産生に及ぼす影響

E. 健康危険情報
特になし。

F. 研究発表

(ア) 発表論文

- Putalun W, Prasarnsiwamai P, Tanaka H, Shoyama Y, Solasodine glycoside production by hairy root cultures of *Physalis minima* Linn., *BIOTECHNOLOGY LETTERS* 26 (7): 545-548 (2004)

(イ) 学会発表
なし。

G. 特許出願
なし。

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）
協力研究報告書

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

協力研究者 高野昭人 昭和薬科大学 講師

研究要旨 高倍数性薬用植物に含まれる外来ゲノムの実態調査を行った。調査対象植物として、北海道に自生する高倍数性タンポポ植物を用い、核 DNA, ITS 領域の PCR-RFLP 分析を行った結果、雑種起源と考えられる個体を多数確認した。また、これらの植物は、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。さらに、RFLP 分析で雑種起源と考えられた 5 個体について、葉緑体 DNA の *trnT* - *trnF* 間のダイレクトシーケンスを行った結果、セイヨウタンポポを母系起源種としていると考えられる個体がみつかった。

A. 研究目的

現在国内に自生している高倍数性薬用植物に含まれる外来ゲノムの実態調査を行った。

調査対象としたキク科のタンポポ属植物は、二倍体から八倍体までの多様なサイトタイプをもち、二倍体は有性生殖を行うが、三倍体以上は無融合性生殖で増殖することが知られている。環境調査の指標として、セイヨウタンポポの侵入程度が利用されてきたが、近年、セイヨウタンポポと日本在来種との雑種が非常に多いことが明らかになり、各地で雑種の分布調査が行われている。

外来ゲノムをもつ自生植物の分布状況を知ることは、遺伝子組み換え薬用植物が

環境に与える影響を予測する上で重要な情報となると考え、本研究に着手した。

B. 研究方法

1. 分布調査

北海道に生育する八倍体のシコタンタンポポについて、分布域を調査した。

2. 核 DNA, ITS 領域の PCR-RFLP 分析

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 で切断すると、本州産二倍体タンポポは 64bp, 196bp, 94bp, 59bp, 351bp の 4 箇所切れ、5 種類の断片になる。セイヨウタンポポは、本州産二倍体タンポポの 351bp の断片がさらに切れ、288bp と 63bp になり、全部で 6 種類

の断片になる。(Fig. 1) これをアガロースゲル電気泳動で流すことによって、断片の長さの違いを観察する。差が見られるのは本州産二倍体タンポポの 351bp とセイヨウタンポポの 288bp である。この二種間の雑種起源のタンポポには両方のバンドが見られる。(Fig. 2) また、二倍体のタカサゴタンポポもセイヨウタンポポと同じバンドパターンが観察されることが報告されている。このことを利用して、北海道産タンポポ属植物が、本州の在来種二倍体タンポポと異なるゲノムをもっているか否かについて検討した。

3. 葉緑体 DNA, *trn T* - *trn F* 間のシーケンス

葉緑体 DNA は母性遺伝するといわれる。そこで、RFLP 分析で雑種起源と考えられた 5 個体について、母系起源種に関する情報を収集する目的で本実験を行った。なお、今回は、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、ダイレクトシーケンスを行った。

C. 研究結果

1. 分布調査

北海道の南部から東部まで調査した結果、室蘭市、えりも町、および十勝郡浦幌町から根室市にかけての海岸線に高倍数性のシコタンタンポポが生育していることを確認した。

2. 核 DNA, ITS 領域の PCR-RFLP 分析

外部形態の特徴から在来種と考えられる個体について RFLP 分析を行った結果、観察されたバンドパターンは、a タイプ、b タイプ、c タイプの 3 つのパターンに分けられた (Fig. 3)。a タイプは 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、b タイプは 288bp と 351bp の両方のバンドを持つ雑種型、c タイプは b タイプの 288bp のバンドの位置が少しずれている雑種型である。

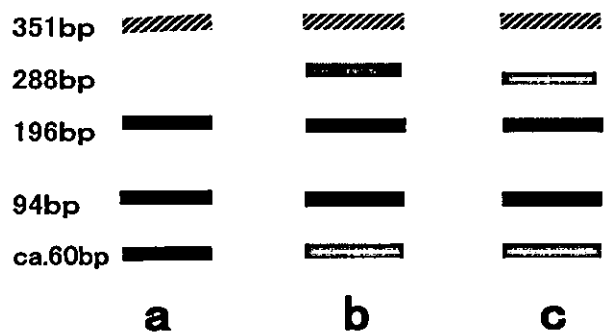


Fig. 3 北海道産タンポポから得られたバンドパターンの 3 タイプ

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。また、a, b, c 各タイプの採集地ごとの出現数を Fig. 4 に示した。

4. 葉緑体 DNA, *trn T* - *trn F* 間のシーケンス

RFLP 分析の結果から雑種個体と考えら

れた5個体について塩基配列を決定し、それらの配列をカントウタンポポ、エソタンポポ、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。その結果、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。

D. 考察

PCR-RFLP分析の結果、3種類のバンドパターンが観察され、浦幌町、釧路市益浦、鶴田、厚岸町、および根室市落石岬には、a, b, c各タイプのタンポポが混在していた。288bpのバンドはセイヨウタンポポや中国大陸産のタンポポを分析するとみられる特徴的なバンドであり、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。

PCR-RFLP分析で雑種起源と考えられた5個体について、葉緑体DNAの

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。

E. 結論

北海道に分布する高倍数性のシコタンタンポポは、遺伝的に極めて多様であることが確認された。また、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た。

今後さらに研究を進め、高倍数性誕生のメカニズムや多様化のメカニズムを解明し、複雑な進化の過程を解明することは、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はずである。

F. 研究発表

1. 日本薬学会第124年会(2004年4月、大阪)で、「北海道産 *Taraxacum* 属植物の分類学的検討」について発表した。
2. 第36回種生物学シンポジウム(2004年12月、土浦)で、「北海道産 *Taraxacum* 属植物の多様性」について発表した。

G. 知的所有権の取得状況

なし

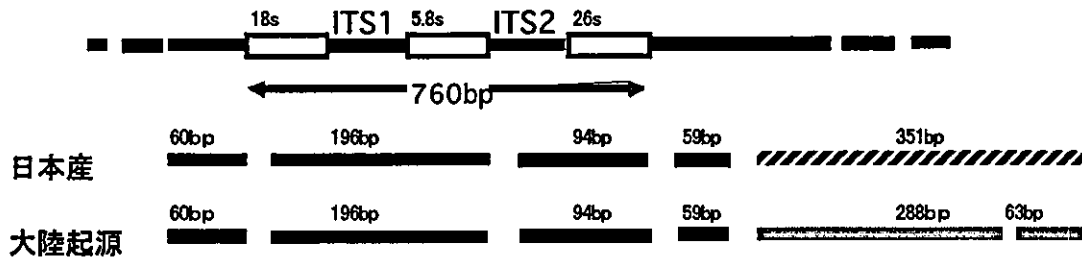


Fig. 1 核 DNA, ITS 領域の PCR-RFLP 分析の模式図

ゲルのバンディングパターン

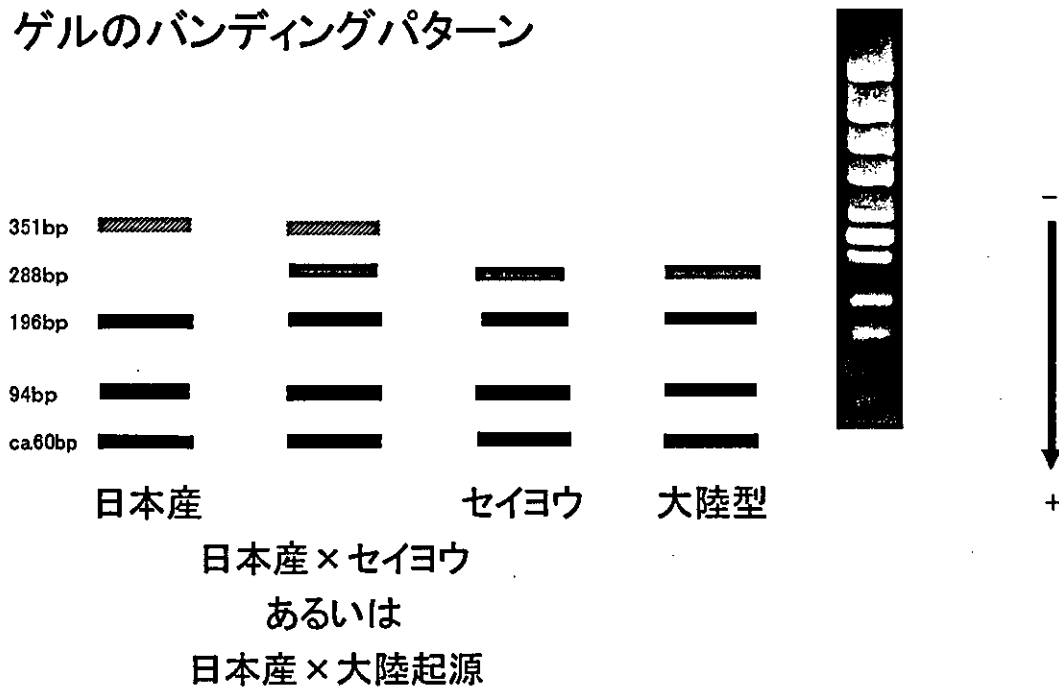


Fig. 2 核 DNA, ITS 領域の PCR-RFLP 分析の電気泳動像の模式図

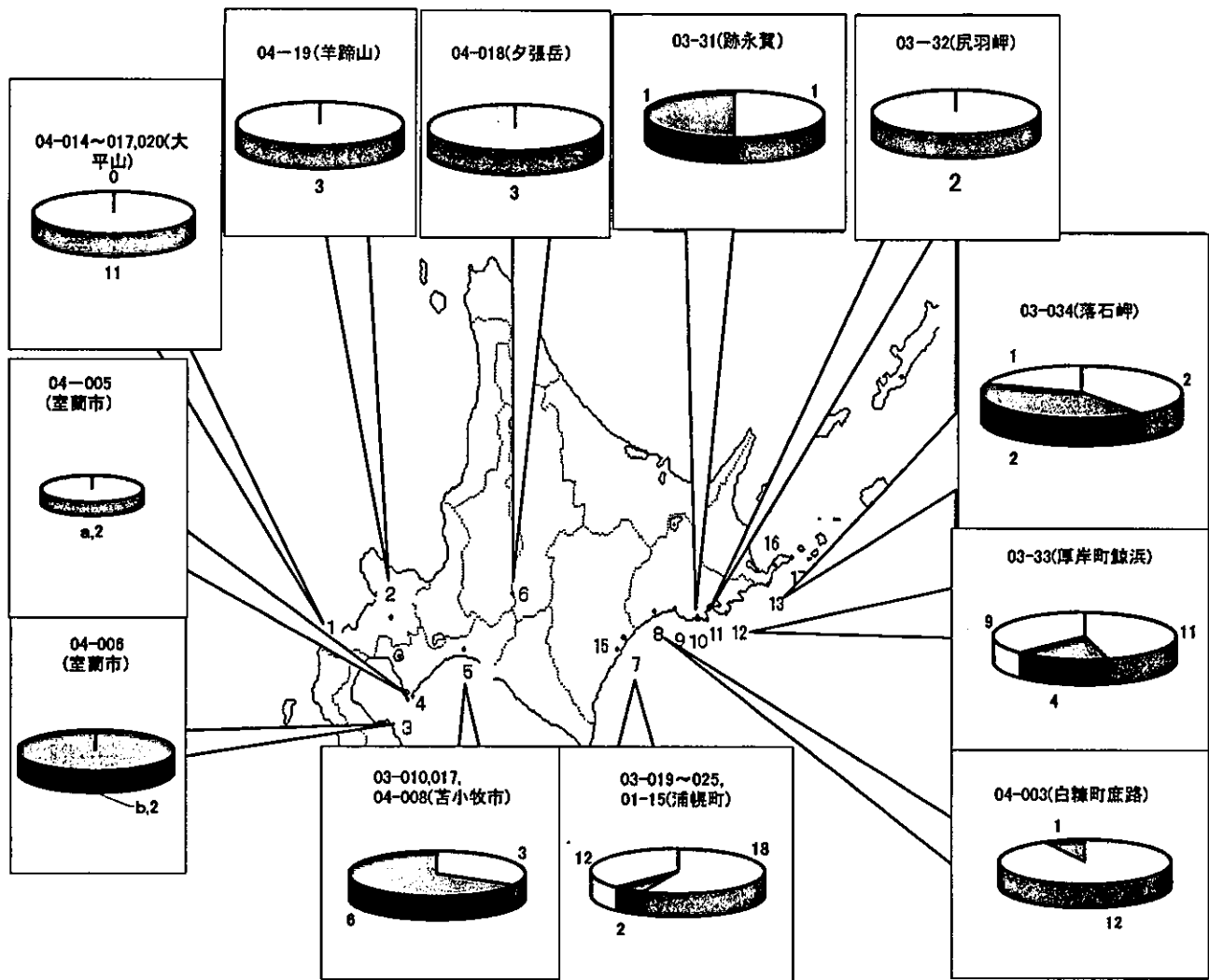


Fig. 4 採集地ごとによるa, b, cタイプの出現数

中国産マオウの遺伝子多型の研究

協力研究者 垣内信子 金沢大学大学院自然科学研究科・助教授

御影雅幸 金沢大学大学院自然科学研究科・教授

中国産野生 *Ephedra* 属植物 8 種について、核リボソーム DNA の internal transcribed sequence1 および 2 (ITS1 and 2)、および葉緑体 DNA である *trnL* intron - intergenic spacer between *trnL* 3' exon and the *trnF* gene (*trnL/F*) の DNA 解析を行い、系統関係および種内変異の解析を行った。これら *Ephedra* 属植物は 3 グループに別けることができ、グループ 1 は主として中国北部に生息し、グループ 3 は南西部に生息することがわかった。生薬として重要な *E.sinica*、*E.intermedia* を含むグループ 1、および *E.sinica* と他の *Ephedra* 属植物を区別することができる PCR による鑑別法を開発した。

A. 研究目的

Ephedra 属植物は裸子植物の Gnetales に属し、被子植物とも近いとされている。全世界で 50 種以上の存在が報告されている。中国北部および西部には 14 種の *Ephedra* 属植物が自生するとされている。これらのうち、*E.sinica*、*E.intermedia*、*E.equisetina* は日本薬局方（第 14 改正）および中華人民共和国薬典で漢薬「麻黄」の原植物として規定されている。日本はこれら生薬の原料を中国産の野生 *Ephedra* 属植物に依存している。さらに、モンゴル、チベットにおける伝統医学ではこれら 3 種とは違った *Ephedra* 属植物も利用されている。中国産の野生 *Ephedra* 属植物については、近縁関係がいまだ明確にされておらず、さらに近年の資源状況も良く把握されていない。そこで、これら中国産野生 *Ephedra* 属植物の DNA 解析を行い、系統関係を解析し、これら遺伝子多様性と生息地との関連を明らかにする。

B. 研究方法

2002-2004 年に、中国河北省、山西省、内蒙古自治区、甘肅省、青海省、新疆ウイグ

ル自治区で採取した野生 *Ephedra* 属植物完全標本のうち明確な同定の行われたものについて、全 DNA を DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて抽出した。核 DNA の internal transcribed sequence1 および 2 (ITS1 and 2)、および葉緑体 DNA である *trnL* intron - intergenic spacer between *trnL* 3' exon and the *trnF* gene (*trnL/F*) を (Fig. 1, 2) にしめす primers を用い、PCR で増幅し、PCR 産物を精製し、塩基配列を決定した。PCR は KOD-plus DNA polymerase (TOYOBO) を、また塩基配列決定は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 (Applied Biosystems) を使用した。

C. 研究結果

- (1) 中国産野生 *Ephedra* 植物の近縁関係の解明

野生 *Ephedra* 属植物標本の採取地を (Fig.3) に示す。

これら標本の核 DNA の ITS1 および 2、葉

緑体 DNA *trnL/F* の塩基解析の結果、近縁関係は Fig. 4 に示すようになった。

このうち近縁関係のある *E.intermedia*、*E.sinica*、*E.przewalskii*、また *E.equisetina*、*E.monosperma*、*E.gerardiana*、あるいは *E.likiangensis*、*E.minuta* はそれぞれ 3 グループ (グループ 1~3) に分けられることが判った。

(2) DNA 鑑別法の開発

上記 3 グループは ITS 1 の塩基配列に Fig. 5 のような変異がある。これを認識する primer をデザインし、これら 3 グループの識別に用いた。

また、グループ 1 の *E.sinica* と他の 2 種は *trnL/F* 領域に Fig. 6 の塩基配列に変異がある。そこで Primer *trnL-2R* をデザインし、*E.sinica* の識別にもちいた。

D. 結論と考察

(1) 中国産野生 *Ephedra* 属植物 8 種は 3 グループに分けられることが分かった。グループ 1 に分けられた *E.intermedia*、*E.sinica*、*E.przewalskii* は北部に分布し、またグループ 3 の *E.likiangensis*、*E.minuta* は南西部に分布し、グループ 2 *E.equisetina*、*E.gerardiana* は点在する。このように、おおまかな種の近縁関係と生息地に関連がみられた。グループ 1 の *E.przewalskii* は外部形態学的分類では、Sect. *Alatae* に分類されるが、今回 Sect. *Ephedra* とされる *E.intermedia*、*E.sinica* に近縁であることが明らかになった。

(2) *E.sinica* は生薬資源として、また ephedrine 原料として最も重要と考えられるが、今回 PCR 法によって、簡便に鑑定できることを示した。

E. 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).

2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

4) 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)。

5) 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 (13) 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)。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 1 核リボソーム DNA の ITS 領域と各プライマーの結合位置

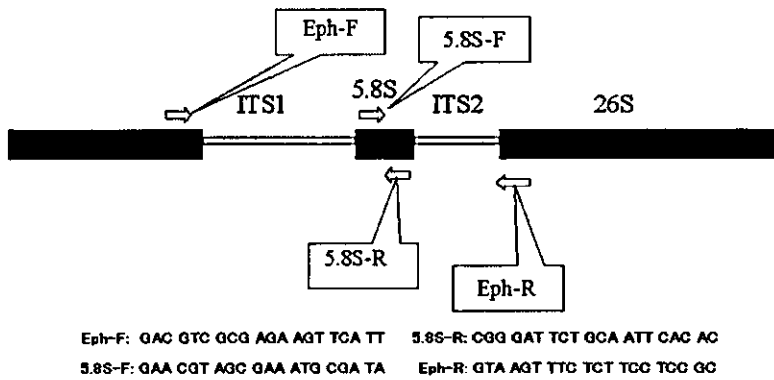


Fig. 2 葉緑体 DNA の *trnL/trnF* 領域と各プライマーの結合位置

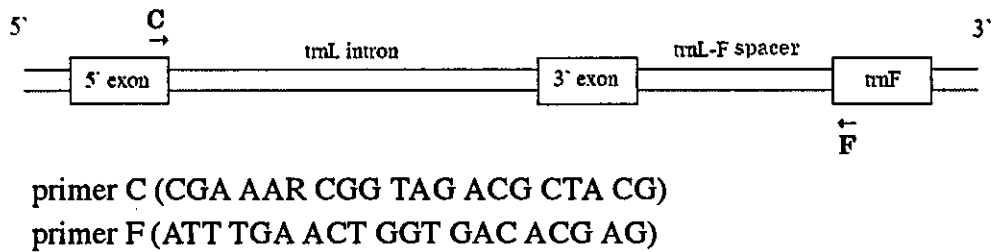


Fig. 3 *Ephedra* 属植物標本の採取地

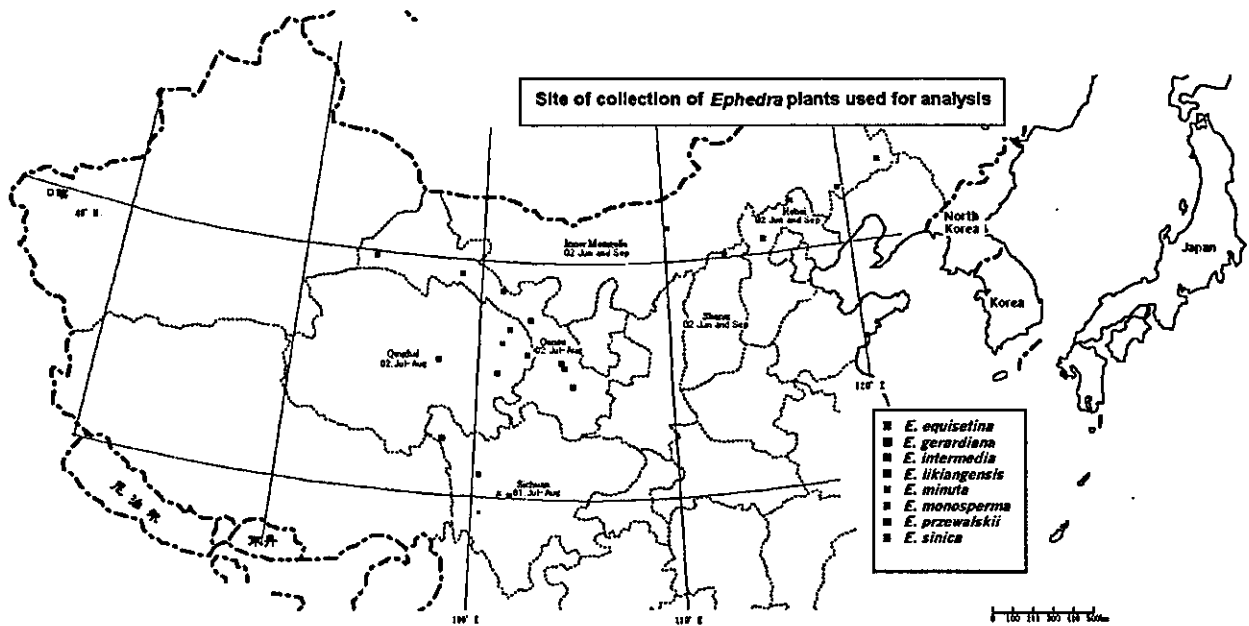


Fig. 4 中国産野生 *Ephedra* 属植物 8 種の近縁関係

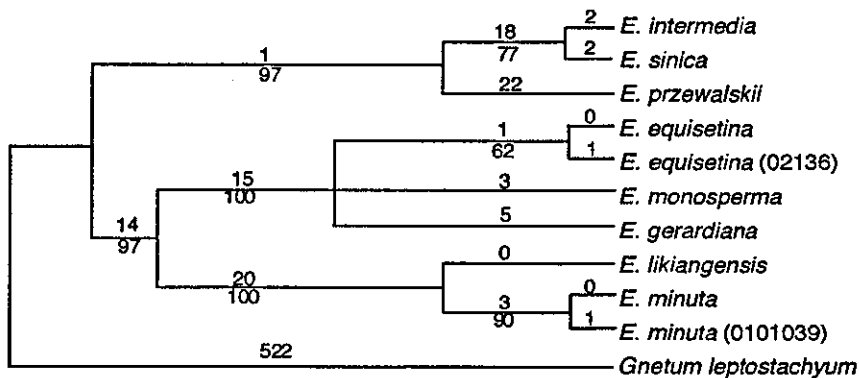
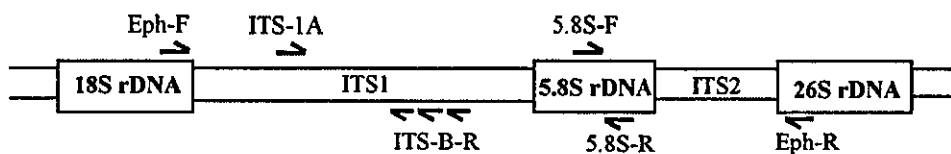
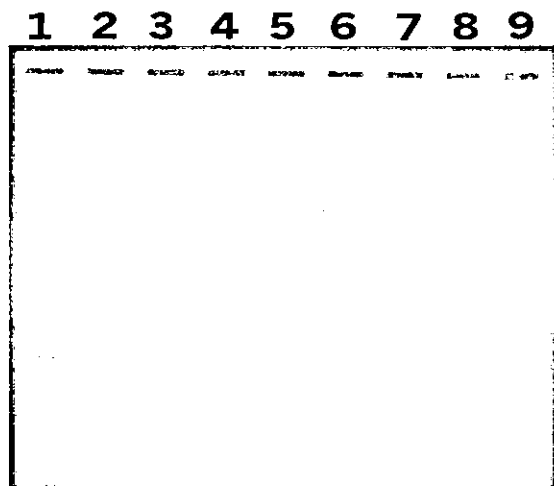


Fig. 5 Primer ITS-B-R (GTGAGCGGCAAGTAAGATCC) が認識すると思われる塩基配列



	791-810
EI, ES	GGATCTTACTTGCCGCTCAC
EP	GGATCTTACTTGCCGCTCAC
EE, EM	GGATCTCAC-----CGCTCAA
EG	GGATCTCAC-----CGCTCAA
EL, EMu	GGATCTTAC-----CGCTCAC

EI: *E.intermedia*, ES: *E.sinica*, EP:*E.przewalskii*, EE: *E.equisetina*, EM: *E.monosperma*, EG: *E.gerardiana*, EL: *E.likiangensis*, EMu: *E.minuta*



Condition
 Primers:ITS-1A and ITS-B-R, Annealing temp:65°C
 Hot start at 94°C for 2 min, 25 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 65°C for 30 sec and elongation at 68°C for 45 sec, and final elongation at 68°C for 5 min.
 Lane1: 100-bp marker. Lane 2: *E. intermedia*. Lane 3: *E. sinica*. Lane 4: *E. przewalskii*. Lane 5: *E. equisetina*. Lane 6: *E. monosperma*. Lane 7: *E. gerardiana*. Lane 8: *E. likiangensis*. Lane 9: *E. minuta*

Fig. 6 Primer trnL-2R (CCGGCCGGTAACACGAATTT) によって認識されると予想される塩基配列

	452nd-471 st
EI, EP, EI, EM, EG, EL, EMu	AAATTCGTGTTACCGGCCGG
ES	AAATTC - - GTTACCGGCCGG

1 2 3 4 5 6 7 8 9

2000
1500

500

Condition

Primers: C and trnL-2R, Annealing temp:60°C, Hot start at 94°C for 2 min, 25 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 60°C for 30 sec and elongation at 68°C for 45 sec, and final elongation at 68°C for 5 min.

Lane1: 100-bp marker. Lane 2: *E. intermedia*. Lane 3: *E. sinica*. Lane 4: *E. przewalskii*. Lane 5: *E. equisetina*. Lane 6: *E. monosperma*. Lane 7: *E. gerardiana*. Lane 8: *E. likiangensis*. Lane 9: *E. minuta*

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

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

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
協力研究者 菱田敦之 同 主任研究官

要旨 RAPD 法によるマオウ属植物 F1 種子の雑種検定に関する研究並びに「カラスビシャク」に関する栽培と品質評価指針の作成を行った。筑波試験場には十数種のマオウ属植物が保存されている。一般にマオウ属植物は雌雄異株とされ、雄株または雌株のみでは結実しない。しかし、筑波試験場の圃場及び標本園に植栽されているマオウ（EP-13, 雌株）は同系統の雄株が存在しないにも関わらず、生じた成熟果の種子は、50 %程度の発芽能力を持つことが明らかになった。そこで RAPD 分析による F1 種子の雑種検定を行った結果、EP-13 系統の F1 種子には外来 DNA の存在が認められ、マオウは同属他系統の植物と交雑することが示唆された。栽培と品質評価指針については、今までの栽培試験を基に、栽培歴と種苗特性表をまとめ、指針原稿を作成した。

A. 研究目的

一般にマオウ属植物は雌雄異株とされ、雄株または雌株のみでは結実しない。国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場（以下、筑波試験場）には、十数種のマオウ属植物が保存されている。マオウ保存系統は、試験場西側にあるマオウ園に植栽されているが、生薬「麻黄」の基原植物である *Ephedra intermedia* (EP-13) 系統は、種苗の増殖のため、マオウ園から離れた圃場や標本園に植えられている。この EP-13 系統は雌株であり、試験場内には同系統の雄株が存在しなかったが、7月の結実期になると不稔性種子と

もに発芽能力を有した稔性種子が確認された。

本研究では、通常、雌株単独では結実しない EP-13 系統に稔性種子が出現することに着目し、マオウ属植物の受粉・受精様式を明らかにすることを目的とした。本報告では、EP-13 系統から得られた種子 (F1 種子) について、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法による雑種検定を行うため、至適プライマーの検索と RAPD マーカーの検出を行った。

B. 研究方法