

Z00400143 A

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17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18(2006)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 ----- 11
吉松嘉代, 河野徳昭
2. 酵母プロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子を組込んだ
薬用植物ベラドンナの作成 ----- 27
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 ----- 33
野口博司
4. 薬用植物における雄性不稔制御因子の探索と解析 ----- 38
佐藤文彦
5. 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 ----- 44
水上 元
6. 核磁気共鳴スペクトルによる多変量解析法を用いた
組換え植物評価法の検討 ----- 48
刈野裕之, 木内文之
7. マオウアルカロイド生合成に関する分子生物学的・生化学的研究 ----- 54
関田節子
8. モノクローナル抗体を用いた漢方薬・生薬の有効成分に関わる研究 --- 58
正山征洋
9. 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 ----- 61
高野昭人
10. 中国産マオウの遺伝子多型の研究 ----- 66
垣内信子, 御影雅幸
11. 遺伝子組換え薬用植物の作出及び生態系に及ぼす影響に関する研究 --- 70
鎌田 博
12. 薬用植物の受粉・受精様式について ----- 76
飯田 修, 菱田敦之

13. 栽培環境が植物の受粉に及ぼす影響について -----	80
酒井英二	
14. Panax 属植物の遺伝資源的保存と葉挿し, 人工授粉による 増殖に関する研究 -----	84
神田博史	
15. 薬用植物の繁殖に関する研究 -接ぎ木・種子繁殖法- -----	86
香月茂樹	
16. 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 -----	90
柴田敏郎	
17. 薬用植物の栽培に関する研究 -----	93
飯田 修, 菱田敦之	
18. エンゴサクの栽培に関する研究 -----	99
鈴木幸子, 吉澤政夫, 浜野朋子, 安田一郎	
19. 有用植物アカネの生産に関する基礎研究 -----	109
後藤勝実	
20. 薬用ランの自然環境下での増殖方法の検討 -----	116
佐竹元吉	
 III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	 121

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 (独)医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター センター長

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するとともに、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も多いため、遺伝子組換え薬用植物を実用化するためには、その生育特性を調べて栽培法を確認する必要がある。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、モデル植物を用いた環境影響評価手法の開発を行った。セリバオウレンを材料として効率的遺伝子組換え体作出法を確立し、ベルベリン輸送タンパク遺伝子を導入した組換え植物を作出して遺伝子発現と成分変化を検討した。また、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) 遺伝子をベラドンナに組込んだ組換え体等の作出を行った。

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植物体を作成したが、培養細胞で見られた著しく多量のconiferinの蓄積は見られなかった。また、ケシのリゾビウム菌による形質転換体に於けるテバイン含量の増加は、一つの遺伝子の変化のような単純な原因で起こったものではないことが示唆された。これらの結果は、遺伝子組換えにより植物体の二次代謝産物の量を改変するためには、目的とする二次代謝産物の代謝制御に関与する様々な因子を考慮する必要があることを示している。

環境影響評価項目を設定するため、ノラニンジンモデル材料として、花粉の寿命と花粉を媒介する主たる昆虫の行動様式の解析並びに昆虫の行動パターンのシュミレーションソフトの改良により、虫媒花に於ける花粉の最大飛散距離の推定法を開発した。また、遺伝子組換え農作物用に開発されたサンドイッチ法を一部改変して、ベラドンナを用いたアレロパシー試験を行い、この方法が薬用植物にも適用可能であることを示した。

さらに、カキドオシ、エンゴサク等の栽培試験を行うとともに、ゲンノショウコ、ジオウ等の受粉様式を検討した。

分担研究者

飯田 修

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 室長

大塚 謙

お茶の水女子大学生活環境研究センター
教授

香月 茂樹

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 種子島研究リーダー

鎌田 博

筑波大学大学院生命環境科学研究科 教授

神田 博史

広島大学医学部総合薬学科 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

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 北海道研究リーダー

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

渕野 裕之

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 主任研究員

水上 元

名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

吉松 嘉代

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 室長

研究協力者

垣内 信子

金沢大学 助教授

河野 徳昭

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 研究員

後藤 勝実

京都薬科大学 講師

高野 昭人

昭和薬科大学 講師

浜野 朋子

東京都健康安全研究センター

菱田 敦之

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究
センター 主任研究員

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¹⁾。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も多いため、遺伝子組換え薬用植物を実用化するためには、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。特に成分の量的・質的な改変を目的とした遺伝子組換え薬用植物の場合、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²⁾。

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。更に、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が実用化された場合に、そ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することを目的とした。

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) 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) 或は高ベルベリン生産性オウレン培養細胞からクローン化されたベルベリン輸送体遺伝子 (Cjmdr1) cDNAセンス鎖またはアンチセンス鎖を植物の高発現型プロモーター (EL2-35S) の下流に連結したカセットとハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) が挿入されたバイナリーベクターを保有する *Rhizobium radiobacter* を

セリバオウレンに感染させ、組換え体を作成した。また、ベラドンナに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、シロイヌナズナにベンザルアセトン合成酵素 (BAS) を組込んだ組換え体を作成した。更に、遺伝子組み換え薬用植物の作出において重要な課題である不定芽形成効率の向上を検討した。(大塚, 吉松, 河野, 野口, 佐藤)

(2) ニチニチソウの配糖化酵素を組込んだシロイヌナズナ培養細胞並びに再生植物における成分変化を分析した。また、ケシの形質転換体における成分変化の原因遺伝子の探索と、自殖によって得られた後代植物の成分変化を調査した。更に、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、ウコン属植物をモデルとしてNMRを用いた多変量解析を検討した。(水上, 吉松, 河野, 瀧野, 木内)

(3) ダイオウにおけるポリケタイド生合成に関与する酵素の遺伝子を単離し、その機能を明らかにするとともに、マオウのエフェドリン生合成の初期段階に関与するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) をコードする遺伝子の単離を行った。また、小型化抗体を用いる成分含量向上を目的として、カンゾウの成分であるグルチルリチンに対する小型化抗体を作成した。(野口, 関田, 正山)

【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、北海道に分布する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遺伝子多様性等を調べた。(高野, 御影, 垣内, 鎌田)

(2) 遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響評価項目・手法の検討として、ノラニンジン, ベラドンナについて花粉の飛散性を調査し、最大花粉飛散距離を推定した。また、

他植物の成長への影響（アレロパシー試験）を実施した。（鎌田）

【薬用植物の栽培特性等】

（1）遺伝子組換え薬用植物を作出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、エンゴサク、カキドオシについて試験栽培の結果をとりまとめた。また、サンシチニンジン、クソニンジン、アカネ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、接ぎ木法による木本植物繁殖法並びにラン科植物の増殖法を検討した。（飯田、菱田、香月、佐竹、柴田、鈴木、後藤）

（2）薬用植物の受粉様式を、ゲンノショウコ、ムラサキ、クコ、ジオウ等について検討した。（飯田、菱田、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）セリバオウレン（*Coptis japonica* Makino var. *dissecta* Nakai）の葉柄切片に、レポーター遺伝子（*gus*）或は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カルスから、不定胚形成を経て再分化植物体を得た。栽培3ヶ月後に部位別の *Cjmdr1* mRNAの発現をノーザン法にて解析したところ、葉、葉柄、根でのmRNAの発現が野生株と比較し低下しており、同時に各部位のベルベリン含量も野生株と比較し低下していた。一方、栽培7ヶ月後の *gus* 導入植物体について、GUS活性染色並びにRT-PCR法により *gus* の発現を調べたところ、葉、葉柄、根において発現が確認され、各器官においてベルベリンの生産が確認された。

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得たカルスから誘導した毛状根で、遺伝子の組込みと酵素タンパク質の生産を確認した。また、再生植物体への酵母PDI遺伝子の導入を確認した。

再分化効率の向上を検討するために、ニンジン不定胚形成系において単離された複数の遺伝子のうちX遺伝子をpBI121に導入し、発現ベクターpBI121X1を作製した。また、シロイヌナズナの花芽形成に関与するFT遺伝子をpGWB2に導入したpGWB2FTを作成し、これらのベクター（pBI121, pBI121X1, pGWB2, pGWB2FT）を *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404にエレクトロポレーションにて導入後、ハナビシソウの形質転換を行なった。その結果、カルス化効率は形質転換の有無に関わらず、いずれの場合にも20%前後であったが、得られたカルスからの不定胚の形成は、形質転換のない場合20%程度であるのに対し、pBI121X1を除く形質転換では10%以下であった。一方、pBI121X1を導入した場合には30%に不定胚形成効率が向上することが認められた。

（2）ニチニチソウ（*Catharanthus roseus*）のUDP-glucosyltransferase (CaUGT2) 遺伝子をシロイヌナズナに組込み、この遺伝子を高発現している形質転換体のT₃世代について二次代謝産物組成をHPLCで解析した結果、野生株と比較して顕著に変化したピークは認められなかった。一方、CaUGT2遺伝子を高発現している培養細胞では、野生株では見られないconiferinの蓄積が認められ、ラインによっては他にも含量が増大したピークが認められた。

リゾビウム菌による形質転換によりタバインを主アルカロイドとして生産するケシ形質転換植物について、これまでにクローニングされているモルヒネ生合成に関与する遺伝子群の発現を調べたが、発現状態に野生株と顕著な差は見られなかった。また、その自殖T1世代についてアルカロイド分析並びにT-DNAの挿入パターンを調べたが、モルヒ

ネを主とするものからテバインを主とするものまでほぼ連続的に出現し、T-DNAの挿入パターンとの相関性も見られなかった。

ウコン属植物31系統について、プロトンNMRスペクトルを用いた多変量解析を行った結果、主成分分析によるプロットで植物種ごとにとおおよそのグループを示すことがわかった。

(3) ダイオウからクローニングした2種の遺伝子(CHS1, CHS2)の機能解析を行い、これらがカルコン合成酵素であることを明らかにした。これらは各々1,176-bp, 391アミノ酸, 1,179-bp 392アミノ酸からなり、互いに90%の相同性を示し、他の植物由来III型ポリケタイド合成酵素との間には概ね60-80%の相同性が見られた。どちらのCHSもほとんど全てのPKS IIIで保存されている3アミノ酸Cys164, His303, Asn336は存在し、その他Met137, Gly211, Gly216, Ile254, Gly256, Phe265, Ser338, Pro375, Phe215も保存されていた。なおキネティクスはCHS1 ($K_M = 61.1$ mM and $k_{cat} = 1.12$ min⁻¹ for 4-coumaroyl-CoA), CHS2 ($K_M = 36.1$ mM and $k_{cat} = 0.79$ min⁻¹ for 4-coumaroyl-CoA)であった。

マオウ (*E. sinica*) におけるPALの比活性を測定した結果、地上茎では41.3±5.5 nmol/mg protein/hr, 根では282 ±42 nmol/mg protein/hrであり、PAL比活性は地上部に比して根で約7倍高かった。既知の*pal*遺伝子の相同性に基づいてデザインした縮重プライマーを用いたRT-PCRにより、マオウから既知の*pal*遺伝子と極めて高い相同性を有する674 bpの特異的増幅断片を得、この遺伝子の全長配列の決定を行っている。

【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) 北海道に分布するタンポポは、ITS領域のPCR-RFLP分析により、在来種型 (aタイプ)、雑種型 (bタイプ)、セイヨウタンポポ型 (cタイプ) の3つのタイプが見られたが、これらについて更にPCR-SSCP (Single-Strand Conformation Poly-morphism) 分析を行った結果、セイヨウタンポポ型 (c

タイプ) を示したタンポポは、採集地ごとに異なるバンドパターンを示し、遺伝的に複数の系統が存在することが明らかになった。また、在来種型 (aタイプ) についても採集地毎に異なるバンドパターンを示し、遺伝的に複数の系統が存在することが明らかになった。

中国でマオウの栽培が盛んな内蒙古自治区と寧夏回族自治区7ヶ所で栽培されている*Ephedra*属植物を採集し、外部形態の観察並びに核DNAのITS1 および 2, 葉緑体DNA *trnL/F*の塩基解析を行った結果、これらのうち6ヶ所の植物は*E. sinica*と同定され、残り1ヶ所では*E. intermedia*と*E. sinica*の混在が認められた。また、混在が認められた栽培地の植物のエフェドリン型アルカロイドを分析した結果、*E. intermedia*はプソイドエフェドリンを多く含み、*E. sinica*はエフェドリンを多く含むことが明らかになった。

北海道渡島半島に自生するノラニンジン (野生ニンジン) の地域毎の集団における遺伝子多様性を、各種プライマーを活用したAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法により詳細に解析した結果、ヘテロ接合度は、野生集団では0.1872から0.2264となり、栽培品種 (時無5寸) では0.2162であった。

(2) ノラニンジン野生集団の個体群密度調査、増殖特性解析、花粉媒介昆虫の調査を継続し、花粉媒介昆虫 (ナミハナアブ) の行動パターンについて、北海道の野生繁殖地での多数の昆虫行動観察の結果を用い、モンテカルロシミュレーションに基づく解析ソフトも改良して花粉の最大飛散距離を308mと推測した。ベラドンナについては、同じナス科の近縁野生種との交雑性を検討するため、*Scopolia*属植物との交配試験を試みた。日本産の*S. japonica*は開花時期が限定されており、本年度はベラドンナと開花期を合わせることはできなかったが、*S. lurida*と開花時期を合わせることができ、交配試験を行った。その結果、交配した全ての花が結実することなく落果したことから、交雑は起こらないこと

が確認された。

一方、遺伝子組換え体が他植物の成育に対して影響を及ぼすか否かの検討(アレロパシー試験)については、遺伝子組換え農作物用に農業環境技術研究所で開発されたサンドイッチ法を一部改良して用い、形質転換ベラドンナと非形質転換ベラドンナの生葉から漏出する物質の存在下でレタス種子を発芽させ、発芽後の実生の成長(幼根の伸長)に及ぼす影響を調査した結果、野生型(非形質転換)ベラドンナにおいて約20-60%の幼根伸長阻害活性が認められ、遺伝子組換え植物での阻害活性(約30-50%)はこの範囲内であった。

【薬用植物の栽培特性】

(1) シソ科の多年草カキドウシを材料として生育特性に関する基礎的研究を行った。その結果、①栽培植物の生育は野生植物の生育に比べて極めて旺盛で、栽植密度、肥料、光強度への適応性が高く栽培は容易であり、定植2年生植物の10 a当たり換算乾物収量を200~280 kgと推定した。② 2年生株の無機成分吸収率は、N : 1.2~1.4%、 P_2O_5 : 0.7~0.8%、 K_2O : 2.5~3.1%、CaO : 1.2~1.4%、MgO : 0.5%であり、カリウムの吸収が比較的高く、この傾向は1年生株と同様であった。③ 萌芽後の気温の上昇に対する生育反応を比較した結果、名寄産は本州産に比べて温度上昇に敏感に反応して生殖成長に移行することが確認され、寒冷地型に分化している可能性が推察された。④ 日本の野生種の中には染色体数が $2n=36$, 45, 54の個体の存在が報告されているが、今回調査した4検体はいずれも $2n=36$ であることが確認できた。

エンゴサクは、植え付けた塊茎から発生する塊茎(母塊茎)と、茎の鱗片腋に新たに生じる塊茎(子塊茎)があるため、収穫時には発生起源の異なる2種類の塊茎が得られる。両者は肉眼で区別することが可能で、種塊茎には子塊茎を用いるのが最適であることが確かめられた。これらの結果を基に、特性調査表を作成した。

切り接ぎ(切断した部分を切り下げ、その

隙間に穂木を切り下げた底辺まで差し込み、接ぎ木する方法)で、施術部は市販の接ぎ木用ビニールテープで縛り、施術部の上部から穂木全体をパラフィルムで被う方法により、センダン、ウメを台木とした場合に良好な活着が見られた。

*Dendrobium*属植物の開花結実した種子をフラスコ中で無菌的に発芽させ、発芽苗をフラスコで増殖し、苗条を生育させ、これらを椰子の果皮の繊維と水苔でくるみ、自然林の樹上にホチキスで留める方法を行ったところ、着生が観察された。

(2) ゲンノショウコは、受粉に虫が介在する虫媒花であると考えられ、蕾に袋をかけた状態では受粉しないと考えていたが、おしべを除去していないものはもちろん、除去する時期が遅れたものについては結実する場合が確認された。また、ゲンノショウコの近縁種間での結実率と、同種間での結実率に差は認められなかった。袋掛け処理により、クコ、ジオウ、クララでは種子が得られなかったのに対し、ケシ、ムラサキでは無処理に対して減少するものの種子が得られた。

D. 考察

セリバオウレン圃場栽培株の葉柄を殺菌後前培養し、導入遺伝子を挿入したバイナリーベクターを保有するリゾビウム菌を感染させることにより、種々の組換え体の作出が可能となった。しかしながら、圃場栽培株の材料を利用できる時期は春から初夏までに限られており、一年を通しての組換え体作出を可能にするためには、培養物を材料とする組換え体作出法を確立する必要がある。レポーター遺伝子を導入した植物体では導入遺伝子の発現とベルベリンの蓄積は無関係であったが、ベルベリン輸送タンパク遺伝子を導入した植物体では、コサプレッションによる輸送タンパク遺伝子の発現抑制が起こり、ベルベリンの含量の低下が見られた。これは、ベルベリンの蓄積量とその輸送タンパクによっても制御されていることを示すものであり、興味深い。

これまでに、再分化を制御する遺伝子としては、サイトカニン受容体などが単離されているが、不定胚形成を促進する因子は未だほとんど知られていない。今回、ハナビシソウにおいて不定胚誘導促進効果が認められた遺伝子Xは、新規な不定胚誘導促進因子として期待が持てるものである。また、同遺伝子の過剰発現により、シロイヌナズナで、通常開花が阻害される短日条件でも開花の促進が認められ、新しい開花特性を有する実験材料としての利用が期待できる。

ニチニチソウの配糖化酵素を導入したシロイヌナズナ形質転換細胞においては、野生株では蓄積が見られないconiferinが蓄積したが、再分化植物体では二次代謝産物に変化は見られなかった。また、テバインを主アルカロイドとするケシのリゾビウム形質転換体では、テバインからモルヒネに至る2段階の脱メチル化反応が阻害されていると考えられたが、少なくとも4ヶ所あると考えられるリゾビウムT-DNAの挿入部位のT1世代への遺伝様式の解析から、テバイン含有量とこれらT-DNAの挿入部位のパターンとの間には相関が認められないことが判明し、本形質変異体の成分変異が単純な一遺伝子座の破壊等に起因するものではない可能性が示唆された。これらの結果は、遺伝子組換えにより植物体の二次代謝産物の量を改変するためには、目的とする二次代謝産物の代謝制御に関与する様々な因子を考慮する必要があることを示している。本研究では、ダイオウ、マオウ等の成分の生合成に関与する遺伝子の解析を行っているが、遺伝子組換え薬用植物の実用化には、このような基礎研究を積み重ねることが重要であると思われる。

プロトンNMRスペクトルを用いた多変量解析は、NMRで検出できる成分全体の捉えることのできる手法であり、遺伝子組換え薬用植物の成分変化を評価する最初の段階に適用可能であると思われる。

北海道渡島半島に自生するノラニンジン野生集団におけるヘテロ接合度は0.1872から0.2264であり、栽培品種（時無5寸）では

0.2162であったことから、栽培品種においても野生集団と同程度の遺伝子多様性を持つことが推測された。ヨーロッパを中心に集められた各種系統のベラドンナでは、昨年の実験で、ヘテロ接合度が0.099から0.169（平均で0.133）であったことから、他殖性の強いノラニンジンと比べ、自殖性も併せ持つベラドンナにおいては集団における遺伝子多様度は低い傾向にあるものと考えられる。

一方、ノラニンジンの主たる花粉媒介昆虫であるナミハナアブの多くの個体について行動パターン解析を実施するとともに、行動パターン解析ソフトの改良を行い、花粉最大飛散距離の推定方法を確立することができた。この方法は、他の植物にも適用可能であることから、今後、遺伝子組換え薬用植物の環境影響評価手法として活用しうるものと判断される。

また、アレロパシー試験においては、非形質転換ベラドンナおよび形質転換ベラドンナの双方において、調査系統毎あるいは形質転換系統毎に数値は異なるものの、レタス幼根の伸長阻害活性が認められた。形質転換体で見られる伸長阻害率は、非形質転換体における伸長阻害率の範囲内であることから、この幼根の伸長阻害は遺伝子組換え（T-DNAの挿入）に起因するものとは考え難い。薬用植物はさまざまな生理活性物質を作ることから、ベラドンナで見られたようにアレロパシー活性が強い可能性があり、アレロパシー試験は遺伝子組換え薬用植物の環境影響評価を実施する際の評価項目として重要と思われる。今後、さらに詳細な検討が必要である。

遺伝子組換え薬用植物の作出状況を、文献検索によって調べた所、2000年からこれまでの遺伝子組換え薬用植物体の作出の報告は、単なる形質転換体を含めてもわずか20件程度であり、そのほとんどがケシ、薬用ニンジン、シソ等、作物としての栽培の歴史が長いもの或は栽培が容易なものであった（Table 1）。遺伝子組換え薬用植物の実用化には、個々の薬用植物の栽培・増殖等の特性を明らかにしておく必要がある、薬用植物の

Table 1. 2000 年以降に発表された遺伝子組換え薬用植物の作出*

薬用植物	文献
<i>Artemisia annua</i>	Planta Med. 2004; 70(4):347-52
<i>Atropa belladonna</i>	J Exp Bot. 2003; 54(390):2065-70. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(1):367-72
<i>Catharanthus roseus</i>	Plant Cell Rep. 2004; 22(11):828-31
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Planta Med. 2003; 69(11):1018-23
<i>Curcuma longa</i>	Plant Cell Rep. 2006; 25(2):112-6
<i>Digitalis minor</i>	Planta Med. 2003; 69(2):143-7
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Transgenic Res. 2000; 9(3):163-8
<i>Isatis indigotica</i>	Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2000; 25(11):657-60
<i>Morinda officinalis</i>	Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2002; 27(10):733-5
<i>Morus indica</i>	Plant Cell Rep. 2003; 21(7):669-75
<i>Papaver somniferum</i>	Funct. Plant Biol. 2003; 30, 1045-1058. Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku. 2001; (119):52-6. Nat Biotechnol. 2004; 22(12):1559-66. Transgenic Res. 2004; 13(6):607-13
<i>Peppermint</i>	Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(15):8915-20. Phytochemistry. 2004; 65(5):547-54. Transgenic Res. 2005; 14(4):365-72
<i>Perilla frutescens</i>	Plant Cell Rep. 2004; 23(6):386-90
<i>Scrophularia buergeriana</i>	Plant Cell Rep. 2003; 21(12):1194-8
<i>Tylophora indica</i>	Plant Cell Rep. 2005; 24(1):25-35
<i>Vigna sesquipedalis</i>	Indian J Exp Biol. 2000; 38(5):493-8
<i>Gentian</i>	Plant J. 2005; 44(4):541-56

* 「genetically modified」或は「genetic transformation」と主要な薬用植物の属名をキーワードとしてPubMedを検索。単なる形質転換体の作出も含む

増殖・栽培法を確立しておくことが必要不可欠である。また、形質転換細胞に較べて植物体の作出が少ないのは、形質転換細胞から植物体への再分化がネックになっていると思われることから、再分化過程の効率を高める技術或はこの過程を必要としない種子への遺伝子導入技術の確立が重要な課題であるものと思われる。

E. 結論

遺伝子組換え薬用植物の作出並びに成分の変化に関しては、セリバオウレンにベルベリン輸送体遺伝子を組込んだ組換え植物等を作成して、再分化植物に於ける成分変化を検討した結果、遺伝子組換えにより植物体の二次代謝産物を改変するためには、目的とする二次代謝産物の代謝制御に関与する様々な因子を考慮する必要があることが明らか

となった。

野生薬用植物の遺伝的多様性に関しては、タンポポ、ノラニンジンについて、核遺伝子情報に基づいて遺伝的多様性を検討した。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。

環境への影響評価に関しては、花粉寿命と花粉媒介昆虫の行動パターンのシュミレーションから、虫媒花に於ける花粉の最大飛散距離を決定する手法を開発した。また、他植物への影響(アレロパシー試験)については、遺伝子組換え農作物に適用されている試験方法を応用し、良好な結果を得た。

以上のように今年度の研究では、昨年度までの研究結果を受けて遺伝子組換え薬用植物の作出、成分変化の評価、環境への影響評

価項目に付いての成果を上げるとともに、問題点を明らかにすることができた。環境影響評価に関しては、土壌微生物への影響等検討しなくてはならない項目が多数残されており、本研究で作出した遺伝子組換え薬用植物等を活用して、研究を継続していくことが重要である。遺伝子組換え薬用植物を実用化するためには、更に多くの問題を解決する必要があるが、本研究の成果に基づいて着実に問題点を解決していくことにより、その実用化への道が拓かれるものと期待される。

参考文献

- 1) 吉松嘉代, 薬用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向, 医薬品研究, 37 (3), 169-188 (2006).
- 2) 特集「遺伝子組換え作物の生産と環境影響評価の現状と課題」, 農業および園芸, 80 (1), 91-226 (2005).

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 3) Shitan, N., Kiuchi, F., Sato, F., Yazaki, K., Yoshimatsu, K.: "Establishment of *Rhizobium*-mediated transformation of *Coptis japonica* and molecular analyses of transgenic plants", *Plant Biotechnology*, 22(2), 113-118 (2005).
- 4) H. Noguchi; Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase, *FEBS Journal* (EUR. J. BIOCHEM.), 273, 208- 218 (2006).
- 5) I. Abe, T. Watanabe and H. Noguchi; Chalcone Synthase Superfamily of Type III Polyketide Synthases from Rhubarb (*Rheum palmatum*), *Proc. Japan Acad.*, 81, Ser. B 434- 440, (2005).
- 6) I. Abe, T. Watanabe, H. Morita, T. Kohno and H. Noguchi; Engineered Biosynthesis

of Plant Polyketides: Manipulation of Chalcone Synthase, *Org. Lett.*, 8(3), 499-502 (2006).

- 7) Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y, Rapid detection of glycyrrhizin by immunochromatographic assay, *Phytochemical Analysis*, 16, 370-374 (2005).
- 8) Morinaga O, Fujino A, Tanaka H, Shoyama Y, An on-membrane quantitative analysis system for glycyrrhizin in licorice roots and traditional Chinese medicines, *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, 668-672 (2005).
- 9) Fukuda N, Shan S, Tanaka H, Shoyama Y, New staining methodology: Eastern blotting for glycosides in the field of Kampo medicines, *J. Nat. Med.*, 60, 21-27 (2006).
- 10) M. Umehara, I. Eguchi, D. Kaneko, M. Ono and H. Kamada, Evaluation of gene flow and its environmental effects in the field. *Plant Biotechnol.*, 22(5); 497-504 (2005).
- 11) 路川宗夫, 今井清太, 野水美奈, 宮田佳奈, 鎌田博, 筑波大学構内の植物層 2004. 筑波大学農林技術センター研究報告, 18, 15-35 (2005).
- 12) 鎌田博, 遺伝子組換え植物の現状と今後. FFI (Food and Food Ingredient) ジャーナル, 210(7); 603-608(2005).
- 13) Motoyoshi Satake, I-Jung Lee: Flowers in Myanmar, *AROMA RESEARCH*, 6 (21), 94-97 (2005).
- 14) Motoyoshi Satake, I-Jung Lee: Flowers in Myanmar, *AROMA RESEARCH*, 5 (19), 83-89 (2004).
- 15) Motoyoshi Satake, I-Jung Lee: Flowers in Myanmar, *AROMA RESEARCH*, 5 (18), 88-91 (2004).

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代: 植物バイオテクノロジーによる新しい薬用植物資源の開発, 薬用植物

- フォーラム2005(つくば)(2005年7月)。
- 2) 河野徳昭, 吉松嘉代, 木内文之: ケシの *Agrobacterium*形質転換体における形質異原因遺伝子の探索, 第23回日本植物細胞分子生物学会京都大会・シンポジウム(2005年8月)。
 - 3) Yoshimatsu K: Tissue culture of medicinal plants: micropropagation, transformation and production of useful secondary metabolites, 2005 Annual Autumn Meeting of Korean Society for Plant Biotechnology and Korea-Japan joint Symposium on Platform Technology for Plant Bioproducts (Jeju, Korea, 2005. 11).
 - 4) Kawano N, Yoshimatsu K, Kiuchi F: Approach Toward the Creation of Nonnarcotic Opium Poppy-Morphological and Genetical Analysis on 'Thebaine Poppy', 2005 Annual Autumn Meeting of Korean Society for Plant Biotechnology and Korea-Japan joint Symposium on Platform Technology for Plant Bioproducts (Jeju, Korea, 2005. 11), Best Poster Award.
 - 5) Yoshimatsu K, Kawano N, Inui T, Sato F, Kiuchi F: Isoquinoline alkaloids in *Papaver somniferum* L. and *Papaver orientale* L. cultivated plants and their tissue cultures, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2005.12).
 - 6) Kawano N, Yoshimatsu K, Kiuchi F: Investigation of genes involved in altered opium alkaloid composition in *Agrobacterium* transformed *Papaver somniferum*, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2005.12).
 - 7) Akiyama T, Arai T, Liu H-M, Yoshimatsu K, Kunugi A, Shibuya M, Ebizuka Y, Yamazaki T, Tanamoto K: Biosynthesis of phyllodulcin in *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2005.12).
 - 8) 河野徳昭, 吉松嘉代, 木内文之: ケシの *Agrobacterium*形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索, 日本農芸化学会2006年度大会(京都)(2006年3月)。
 - 9) 吉松嘉代, 河野徳昭, 北澤尚, 根本泰行, 井上修, 飯田修, 木内文之, 「新規外国導入系統ケシの生育特性とアルカロイド組成・含量」, 日本農芸化学会2006年度大会(京都)(2006年3月)。
 - 10) 王麗雲, 大塚 譲 他, 酵母PDIの生産, 分子生物学会大会(福岡)(2005年)。
 - 11) 阿部郁朗, 渡辺達也, Lou Weiwei, 野口博司: 芳香族ヘプタケタイドの骨格を構築する大黃由来新規III型ポリケ タイド合成酵素の構造機能解析, 第125回 日本薬学会年会(東京), 要旨集4, p.173(2005年3月)。
 - 12) 渡辺達也, 野口博司, 阿部郁朗: 植物ポリケタイドの生合成工学: カルコン合成酵素への点変異導入によるオクタケタイドの生成, 日本生薬学会第52回年会(金沢), 要旨集, p. 49(2005年9月)。
 - 13) 安部剛史, 渡辺達也, 小黒聡史, 阿部郁朗, 野口博司: 植物ポリケタイドの生合成工学: ベンザルアセトン合成酵素の構造機能解析, 日本生薬学会第52回年会(金沢), 要旨集, p. 50(2005年9月)。
 - 14) 岡田岳人, 山崎真巳, 御影雅幸, 関田節子, Ephedrine系アルカロイド生合成に関与する *paI* 遺伝子のクローニング, 日本薬学会第126年会, 仙台(2006年3月)。
 - 15) 金子大輔, 江口郁恵, 小野道之, 鎌田博: ノラニンジン (*Daucus carota* L.) における遺伝子多様性比較, 日本植物学会第69回大会(富山)(2005年9月)。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部 育種生理研究室長

協力研究者 河野徳昭

医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部

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確立のため、組換え体作出法の開発、そして組換え体の評価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、導入遺伝子の発現様式の確認を行った。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由来の T-DNA 挿入型ケシ形質転換体について、その原因遺伝子の探索ならびに、T-DNA 挿入部位の遺伝様式の解析を行った。

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）の花変色技術による「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. 遺伝子組換えセリバオウレンの作出

モルヒネ、ベルベリンに代表されるイソキノリンアルカロイドは、様々な生理活性を有する医薬上非常に重要な化合物群であり、かつ、化学合成が困難であることから、それらの生合成機構に関する研究が活発に行われた結果、多くの生合成酵素及びその遺伝子群が同定されている。生薬黄連の主成分であるベルベリンの生合成酵素遺伝子群や植物体内でのベルベリンの輸送体遺伝子は、高ベルベリン生産性セリバオウレン培養細胞を材料にそのほとんどが単離されるに至った。しかしながら、これまで効率的な遺伝子組換えセリバオウレン作出法が確立されていなかったため、新規薬用資源植物開発ツールとしてこれらの遺伝子群の有効利用がされていなかった。

そこで本研究は、効率的な遺伝子組換えセ

リバオウレン作出法を確立し、種々ベルベリン生合成関連遺伝子を導入した組換え体を作成し、それらの組換え植物体の評価を行い、生合成関連遺伝子群の応用に関する基礎的知見を得ることを目的とする。また、レポーター遺伝子を導入した植物体を用いて、セリバオウレンにおける強発現プロモーターの発現様式の確認および交雑に及ぼす影響評価のための実験系の開発を行うことを目的とする。

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。本植物のアヘンアルカロイド生合成経路に関わる酵素・遺伝子群については精力的に解明が進められているが、未だ完全解明には至っていない。

本研究においては、モルヒネの生合成中間体であり、通常は蓄積されることのないテバインを高蓄積する、ケシのリゾビウム感染によるアヘンアルカロイド成分形質変異体（T-DNA挿入型形質変異体）を材料とし、高テバイン形質を安定に保持する自殖後代植物の保存・栽培を行い、分子生物学的手法により、アヘンアルカロイドの生合成酵素・遺伝子群について新たな知見を得ることを目的とする。また、外来遺伝子であるリゾビウムT-DNAのケシにおける遺伝様式の精査により、周辺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する。

B. 研究方法

1. 遺伝子組換えセリバオウレンの作出

レポーター遺伝子 (β -glucuronidase, *gus*)、高ベルベリン生産性オウレン培養細胞からクローン化された輸送体遺伝子 (*Cjmdr1*) cDNAセンス鎖またはアンチセンス鎖を植物の高発現型プロモーター (EL2-35S) の下流に連結したカセットとハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) が挿入されたバイナリーベ

クターを保有するリゾビウム・ラディオバクター (アグロバクテリウム・ツメファシエンス) PMP90株を、既報 (平成16年度分担研究報告書) により、3種の方法でセリバオウレン葉柄切片に感染させた。感染直後の除菌は Claforan 500 mg/l と NAA 1 mg/l、Kin 2 mg/l を添加した改変WP培地 (10 mg/l グルタミン含有) (WPGNK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℃、暗所で培養して選抜を繰り返し、*gus* 導入体の検出はGUS活性染色 (反応液: 0.5 mg/ml X-gluc in 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.3、37℃、一晚) により行った。*Cjmdr1* センス鎖及びアンチセンス鎖導入体の確認は、ゲノムPCR法によるハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hpt*) の検出により行った。

それぞれの形質転換カルス培養から不定胚を経て植物体に分化したクローンは、弱光下で培養して育成した後、野生株の植物体とともに植木鉢に植出し、人工光室あるいは隔離温室内で栽培し、導入遺伝子発現解析に用いた。

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

昨年度の本研究では、リゾビウムT-DNA挿入型形質変異体PsM1-2 (T0) 株におけるT-DNAのケシゲノムDNAへの挿入部位の解析を行い、少なくとも4ヶ所のT-DNA挿入部位が存在することを明らかにした (平成16年度分担研究報告書)。

本年度は、本形質変異体のアヘンアルカロイド成分変異の主因となるモルヒネ生合成経路における反応段階の絞り込みのため、形質変異体T0植物における、既知のモルヒネ生合成遺伝子群、ならびにリゾビウム由来のT-DNA上にコードされる遺伝子の転写発現について解析を行った。

また、T-DNA挿入部位とアヘンアルカロイド成分変異との関係を明らかにし、形質変異原因遺伝子に関する知見を得るため、自殖後

代植物であるT1世代植物におけるT-DNA挿入パターンの遺伝様式の解析、ならびに、アヘンアルカロイドの成分含有量の分析を行った。

2-1. PsM1-2 (T0)株におけるモルヒネ生合成遺伝子群の発現解析

ss-cDNAプールの調製

PsM1-2(T0)の*in vitro*培養植物体、または圃場栽培の野生株一貫種の芽生え(子葉、全草)からRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いtotal RNAを抽出、精製した。これらのtotal RNA 1 μ gを用いSuperscriptII (Invitrogen)により42 $^{\circ}$ C, 2 hr逆転写反応を行ったのち、RNaseHにより相補RNAを分解し一本鎖cDNA(ss-cDNA)プールとした[RT(+)]。なお、逆転写酵素を加えなかったものをコントロール[RT(-)]とした。

モルヒネ生合成遺伝子群の定性的発現解析

今回、発現解析の対象としたのは、モルヒネ生合成経路に関わる、既にクローニングされている下記の遺伝子群である(図2-1)。

CYP80B1 : (S)-N-methylcoclaurineの3'位を水酸化し(S)-3'-hydroxy-N-methyl- coclaurineへ変換するP450モノオキシゲナーゼ

4'OMT : 3'-hydroxy-N-methylcoclaurineの4'位水酸基にメチル基を転移するS-adenosyl-L-methionine依存性メチル基転移酵素

SalAT : salutaridinolの7位水酸基にアセチルCoAからアセチル基を転移するアセチル転移酵素

Cor1-1 : codeinone を codeine に還元するNADPH依存性codeinone還元酵素

Cor2-1 : Cor1-1と相同性が高く、codeinone還元酵素と機能推定されるアレル

PsWRKY1 : T0世代植物におけるT-DNA挿入部位の探索の過程でT-DNAのLeft Border(LB1)の上流約700bpの位置に見出されたシロイヌナズナの転写調節因子AtWRKY4と相同性の高いWRKYと機能推定される遺伝子

PsACTv : 恒常的に発現するハウスキーピング遺伝子である β -アクチン生合成酵素
なお、PsACTvはコントロールとして使用した。

PsM1-2(T0) *in vitro*培養植物体の葉由来のss-cDNAプールと、ケシ野生株(一貫種)の芽生え(子葉、全草)由来のss-cDNAプールを鋳型に下記PCR条件でPCRを行った。

なお、本実験で使用したプライマーの一覧を表2-1に記した。

[PCR条件]

機器 : GeneAmp 2400 (Perkin Elmer), iCycler (Bio-Rad)、反応容量 : 100 μ l

プライマー : 100 pmole each

ポリメラーゼ : Ex Taq (Takara)

プログラム : 94 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow (94 $^{\circ}$ C 30sec \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 30sec \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min) x 30

\rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C ∞

2-2. PsM1-2 (T1)自殖後代植物におけるT-DNA挿入部位解析ならびにアヘンアルカロイド成分分析

材料および栽培条件一般

遺伝的に同一なPsM1-2 T0世代種子2系統(#1および#2)より得られた自殖種子T1世代を温室内で播種し、室温20 $^{\circ}$ C、湿度60%、16時間明、8時間暗(補光照明を使用)、5寸鉢(赤玉土-堆肥-クレハ培養土 = 3:1:1)、灌水1日1回、ハイポネックス500倍液 週1回、の条件で栽培を行った。開花期、花卉の形態や草丈などは随時調査を行った。

アヘンアルカロイド分析

開花後、約4週後に未熟果実を切傷刀で傷つけ、滲出した乳液を回収した。乳液は50 $^{\circ}$ Cで一晩風乾し、アヘンとした。アヘンの約5 mgに、5 mlのメタノールを加え、30分間超音波下で抽出を行い、その400 μ lをUltrafree-MC spin column (Millipore)でろ過後、300 μ lをHPLC分析に供した。HPLC分析は下記条件でイオンペアクロマトグラフィーにより行った。

[HPLC条件]

Instruments: Waters Alliance PDA System
(separation module: 2795, PDA: 2996)
Column: TOSOH TSK-GEL ODS100V (pore
size 5 μ m, ϕ 4.6 x 250 mm)
Solvents: CH₃CN (A), 10 mM Sodium
1-Heptanesulphonate (pH 3.5) (B)
Column temperature: 30°C
Flow rate: 0.7 ml/min
Pressure: ca. 900 psi
Solvent gradient (A%): 0 min 28 %, 15 min 34%,
25-39 min 40%, 40 min 28%
Detection: UV 200-400 nm (qualitative), UV
284 nm (quantitative analysis)

T-DNA挿入パターン解析

[ゲノムDNA抽出]

成長したPsM1-2 (T1)各系統の葉を採取し、約100 mgをDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)によるゲノムDNA抽出に用いた。サンプルの破碎にはビーズ式細胞破碎装置 Micro Smash MS-100 (TOMY)を使用し、2 ml容のアシストチューブに、サンプルの葉とAP1バッファ 500 μ l、そして ϕ 4.8 mmステンレスボール2個を入れ4,500 rpm、60 secの破碎処理を2回行い、破碎液を以後の抽出操作に用いた。

[Multiplex PCR法]

T-DNAのケシゲノムDNAへの挿入部位4ヶ所の検出には、ゲノム挿入T-DNAの末端部と、それに接するケシゲノムDNA (RB1-RB4)の間でPCRを行い、T-DNA-ゲノムDNAの境界部位を増幅する方法をとり、4ヶ所の境界配列を同時に検出できるようmultiplex PCR法で行った。T-DNAのRBに隣接する4種のケシゲノム配列RB1-RB4にそれぞれ特異的なアンチセンスプライマーを設計し、T-DNAのRB特異的なセンスプライマーMAFF-14963Sとの間で下記の条件でPCRを行った。RB1-RB4特異的プライマーの設計の際には、それぞれの増幅産物のバンドが1.0%アガロースゲルで識別できるよう約100bpのサイズの差異が生じるよう配慮した。なお、使用した各プライマーの配列は表2-3のとおりである。

[PCR条件]

Template: *P. somniferum* PsM1-2 (T0 or T1)
genome DNA

Primer sets: MAFF-14963S (sense) + Anti-sense
primer mixture

Sense primer (MAFF-14963S): 100 pmole
Anti-sense primers (RB1-460A, RB2-393A,
RB3-588A, and RB4-261A): 25 pmole each

Program: 94°C 5 min -> (94°C 30 sec -> 58°C
30 sec -> 72°C 1 min) x 30

-> 72°C 10 min -> 4°C ∞

iCycler (Bio-Rad)

C. 研究結果

1. 遺伝子組換えセリバオウレンの作出 Cjmdr1センスおよびアンチセンス導入体

ゲノムPCR法によるhpt遺伝子検出の結果、得られたハイグロマイシン耐性カルスのうち、Cjmdr1センス導入カルス2クローン、アンチセンス導入カルス3クローンが組換え体であった(図1-1)。このうちのCjmdr1センス導入体 (Sense 2) は不定胚形成を経て植物体に分化したため、鉢に植出して栽培した(図1-2)。栽培3ヶ月後に部位別のCjmdr1 mRNAの発現をノーザン法にて解析したところ、葉、葉柄、根の全ての器官において、mRNAの発現が野生株と比較し低下していた(図1-3)。同様に、部位別のベルベリン含量も、全ての部位において野生株と比較し低下していた(図1-4)。残りのクローンは未だ植物体再生に至っていないため、カルス培養を継続しているが、アンチセンスクローンでは、通常黄色を呈するセリバオウレンカルス培養が白色一乳白色になる現象が生じている。

gus導入体

GUS活性染色陽性であったgus導入カルス培養7クローンのうち、植物体再性能が高く、植物体に分化した2クローン (II627-7-1、II627-7-2) を鉢に植出し栽培した(図1-5)。植出し7ヶ月後のgus導入植物体 (II627-7-1)

について、GUS活性染色によりgusの発現を調べたところ、葉、葉柄、根のすべての部位において発現が確認された(図1-6)。また、RT-PCR法でもすべての部位において発現が確認された(図1-7)。本植物の全ての器官においてベルベリンの生産が確認された(図1-8)。gus導入植物体は、植出し7ヶ月後に開花した(図1-9)。しかし、結実種子は得られなかった。

2. ケシのリゾピ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. PsM1-2 (T0)株におけるモルヒネ生合成遺伝子群の発現解析

モルヒネ生合成遺伝子群の発現解析

図2-2に示すように、コントロールであるアクチンをはじめ、全ての遺伝子の発現が認められた。定性的な結果ではあるが、*in vitro*培養植物体であるT-DNA挿入形質変異体PsM1-2(T0)と、野生株の芽生えにおいて、CYP80B1からCor1-1(Cor2-1)の一連の生合成遺伝子群については、発現状態に顕著な差異がないことが確認された。

2-2. PsM1-2 (T1)自殖後代植物におけるT-DNA挿入部位解析ならびにアヘンアルカロイド成分分析

T1植物の形態について

遺伝的に同一なT0世代種子2系統(#1および#2)より得られた自殖種子T1世代を温室内で播種し、下記条件下栽培したところ、成長、開花し、結実した。

T1世代60系統の形態についてまとめたのが表2-2である。コントロールとして同条件下栽培を行った一貫種野生株と比較したところ、T1植物においては花卉の枚数に3枚から8枚とバリエーションがみられた。T0植物に認められた花卉の切れ込みについては有るものと無いものに分かれた。また、開花期は野生株と比較して遅延傾向が認められた。ファイトトン内で馴化栽培したT0植物においては矮化傾向が特徴であったが、T1植物ではむしろ野生株よりも草丈が高くなる傾

向があった。

アヘンアルカロイド成分分析結果

T1世代植物60系統についてアヘンアルカロイドの成分分析を行った結果、一貫種野生株と同レベルのテバインを含む低テバイン(Low Thebaine: LT)系統から、26.5%(乾燥アヘン重量中%)に上るテバインを蓄積し、モルヒネ含有量が3.1%(同%)と低い高テバイン(High Thebaine: HT)系統まで幅広く分布していた(図2-3)。また、テバイン含有量が高くなるに従い、モルヒネ含有量が低下すること、また、コデインの含有量に大きな変動が見られないことが明らかになったが、これらの系統数が整数比に分離するような傾向は認められなかった。

つぎに、テバイン含有量の低い系統から高い系統へ、L1-L4の4系統に分類し、各系統についてモルヒネ、テバイン、コデイン、パパベリン、ノスカピン、レチクリンのモルヒネ生合成経路の中間体及び関連化合物について含量の平均値を求め、まとめたものが図2-4である。まず、モルヒネはテバイン含有量の上昇に伴い、その含有量が低下しているが、L2以降ではそのレベルは一定となっている。また、コデインについてはテバイン含有量の増加に伴い、増加している。テバインよりも生合成経路の上流および、分岐する経路の生産物であるレチクリン、ノスカピン、パパベリンについては野生株より含有量は低く、また、テバインの含有量の増加に従い微増していた。

T-DNA挿入パターン解析結果

アヘンアルカロイド含有量の分析を行った60系統のうち、テバイン含有量の代表的な24系統についてT-DNA挿入パターンの解析をmultiplex-PCRにより行った。PCR結果の例を図2-5に示す。この例では、#1-27がRB1,RB2,RB3,RB4の順に+,+,-,-であり、同様に#2-17が+,-,+,-であることを示す。

その結果をアヘンアルカロイド含量と共に記したのが図2-6である。この結果から、

例を挙げると、T-DNA挿入パターンが一致する#1-27と#2-6や、#2-1と#2-17においては、テバイン含有量は一方はHT系統であるのに対し、もう一方はLT系統と、アヘンアルカロイド含有量とこれら4ヶ所のT-DNA挿入パターンとの間に相関は認められないことが明らかになった。

D. 考察

1. 遺伝子組換えセリバオウレンの作出

セリバオウレン圃場栽培株の葉柄を殺菌後前培養し、導入遺伝子を挿入したバイナリーベクターを保有するリゾビウム(アグロバクテリウム)菌を感染させることにより、種々の組換え体の作出が可能となった。しかしながら、圃場栽培株の材料を利用できる時期は初春から初夏までに限られており、一年を通しての組換え体作出を可能にするためには、培養物を材料とする組換え体作出法を確立する必要がある。また、抗生物質による選抜後得られたカルスの多くはエスケープであり、ゲノムPCR法の結果組換え体と判定されたものの割合は低かった。組換え体の選抜方法に関しても、さらに検討が必要と思われる。

植出し3ヶ月後のCjmdr1センス導入植物体について、部位別のCjmdr1 mRNAの発現を解析し、野生株と比較したところ、葉、葉柄、根の全ての器官において発現低下が認められ、コサップレッションが生じていることが示唆された。また、同植物体の部位別のベルベリン含量を調べたところ、全ての部位において野生株と比較してベルベリン含量の低下が認められた。さらに、植物体再生にまでは至っていないものの、アンチセンスカルスの中には明らかにベルベリン生産能が低下したものがあつた。この結果は、生合成酵素遺伝子だけでなく、アルカロイド輸送体遺伝子の発現様式も植物体のアルカロイド含量に寄与していることを示唆しており非常に興味深い。

植出し7ヶ月後のgus導入植物体について、gusの発現を調べたところ、葉、葉柄、根の

すべての部位において発現が確認され、今回の遺伝子導入に用いた強発現プロモーター配列は、セリバオウレン植物体全体で発現することを確認した。また、本植物の全ての器官においてベルベリンの生産が確認され、レポーター遺伝子自身はベルベリン生産能に影響を与えていないことを確認した。gus導入植物体は、植出し7ヶ月後に開花し、その2ヶ月後に実の内部を調べたところ、種子の発達は認められず、媒介昆虫のいない閉鎖温室では、受粉等の処理を行わないと結実しないものと思われた。

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. PsM1-2 (T0)株におけるモルヒネ生合成遺伝子群の発現解析

PsM1-2(T0)と、野生株の芽生え(子葉)を材料に、アヘンアルカロイド生合成経路の酵素群のうち既にクローニングされているものについて定性的発現解析を行ったところ、全ての遺伝子の両試料における発現が認められた。これは、PsM1-2(T0)におけるアヘンアルカロイド含量の変異がテバインからモルヒネに至る2段階の脱メチル化反応の特異的な阻害に因るものであることを示唆すると考えられる。

2-2. PsM1-2 (T1)自殖後代植物におけるT-DNA挿入部位解析ならびにアヘンアルカロイド成分分析

少なくとも4ヶ所存在すると考えられるT-DNAの挿入部位のT1世代への遺伝様式の解析から、テバイン含有量とこれらT-DNAの挿入部位のパターンとの間には相関が認められないことが判明し、本形質変異体の成分変異が単純な一遺伝子座の破壊等に起因するものではない可能性が示唆された。

本形質変異体のアヘンアルカロイド成分変異に関わる酵素・遺伝子の探索には、高テバイン形質または低テバイン形質を示すPsM1-2の自殖後代植物同士や、ケシ野生株との発現遺伝子群の網羅的比較解析が有効

であると考えられる。

なお、本実験で用いた multiplex-PCR 法は複数の T-DNA 挿入部位の迅速な同時解析に有効であった。

E. 結論

1. 遺伝子組換えセリバオウレンの作出

セリバオウレン圃場栽培株の葉柄を材料に、リゾビウム (アグロバクテリウム) 菌を利用した外来遺伝子導入法を確立し、 β -glucuronidase (*gus*) 遺伝子 (レポーター遺伝子)、ベルベリン輸送体 (*Cjmdr1*) センス遺伝子、同アンチセンス遺伝子導入培養細胞を作成した。植物体が再生し、人工光室内で3ヶ月間栽培した *Cjmdr1* センス導入植物体について、部位別の *Cjmdr1* mRNA の発現を解析し、野生株と比較したところ、葉、葉柄、根の全ての器官において発現低下が認められ、コサップレッションが生じていることが示唆された。さらに、同植物体の部位別のベルベリン含量を調べたところ、全ての部位において野生株と比較してベルベリン含量の低下が認められた。

また、植物体が再生し、7ヶ月間人工光室内で栽培した *gus* 導入植物体について、*gus* の発現を調べたところ、葉、葉柄、根のすべての部位において発現が確認され、今回の遺伝子導入に用いた強発現プロモーター配列は、セリバオウレン植物体全体で発現することを確認した。また、本植物の全ての器官においてベルベリンの生産が確認され、レポーター遺伝子自身はベルベリン生産能に影響を与えていないことを確認した。*Gus* 導入植物体は、植出し7ヶ月後に開花したが、種子は発達せず、媒介昆虫のいない閉鎖温室では、受粉等の処理を行わないと結実しないものと思われた。

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

ケシのリゾビウム感染による形質変異体のアヘンアルカロイド成分変異は、T-DNA のゲノムDNAへの挿入に因るものと予想し、

その原因遺伝子(座)の探索を進めてきたが、その同定には至らなかった。しかしながら、テバインは鎮痛薬などの新薬開発のリード化合物として有望であり、テバインを高蓄積する本形質変異体の有用性は非常に高い。また、遺伝子工学的手法によるアヘンアルカロイド組成を改変したケシの作出における素材として、ならびにモルヒネ生合成酵素群の解析材料としても有用であると考えられ、本形質変異体を見出した意義は大きい。

本研究で解析を行った高テバイン形質を示す PsM1-2 T1 世代植物のうち、2系統において T-DNA 挿入部位が T0 世代の4ヶ所から2ヶ所に減少し、そのうち1ヶ所についてはホモであることを確認している。これらの系統の自殖後代植物において、高テバイン形質を示すホモ個体の選抜を進め、得られたホモ個体を用いた交配実験により、遺伝子組換え植物の周辺環境に及ぼす影響の評価が遺伝子レベル、化合物レベルの両者において可能になるものと期待される。

以上の研究より得られた知見および情報は、いずれも、薬用植物分野における有用遺伝子組換え体作出に関わる、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化合物レベルおよび遺伝子レベルの評価、さらには有用二次代謝産物の生産能改変といった各段階に密接につながるものであり、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いずれも欠くことのできないものであると言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shitan, N., Kiuchi, F., Sato, F., Yazaki, K., Yoshimatsu, K.: "Establishment of *Rhizobium*-mediated transformation of *Coptis japonica* and molecular analyses of transgenic plants", *Plant Biotechnology* (2005), 22(2), 113-118.

2. 学会発表