

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

分担研究者 正山征洋 九州大学大学院薬学研究院 教授

我々は先に小型化抗体 (scFv) 遺伝子を導入することにより薬効成分の含量をコントロールする分子育種法を確立した。本年度は本育種法をカンゾウに適用するため、カンゾウの主活性成分であるグリチルリチンに対する scFv 遺伝子を作成し、大腸菌および昆虫細胞で発現することにより、本 scFv がオリジナルのモノクローナル抗体と同様の活性を持つこと確認した。

A. 研究目的

薬用植物の育種研究においては、当該植物の薬効成分を簡便・高感度に定量するアッセイ系の確立が必須である。我々はカンゾウのグリチルリチン (GC) に対し、特異的なモノクローナル抗体を作成し、これを用いた超高感度アッセイシステムを確立した。さらに本抗体の応用によりイースタンブロット法、イムノクロマトグラフィー法といった簡便な検出法についても報告した。

一方我々は、小型化抗体 (scFv) 遺伝子を薬用植物に導入することで、薬効成分の含量をコントロールする新たな分子育種法を報告した。本法に基づき、カンゾウについても GC に対する scFv を導入することで GC 含量を高めることが可能と推察された。そこで本年度は分子育種に用いるツールとして scFv 遺伝子のクローニングを行い、その抗体活性について検討を行った。

B. 研究方法

1. scFv 遺伝子のクローニング

抗 GC モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから単離した mRNA から cDNA を合成し、その可変領域 (V_H , V_L) を増幅後、精製し、それぞれを pGEM-T Vector に組み込んで大腸菌に形質転換した。選抜したクローンに関

して DNA シークエンスを行い、 V_H , V_L 部分の塩基配列を決定し、またクローン間の相同性を比較検討した。塩基配列よりリンカープライマーを設計し、アミノ酸 15 個に相当するペプチドリンカーで連結して scFv 遺伝子を作製した。

2. 大腸菌での発現

作製した scFv 遺伝子は大腸菌発現ベクターである pET 28a (+)、pET 22b (+) 及び pQE 80L ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) あるいは OrigamiTMB に形質転換した。それぞれの組み換え体を培養した後、IPTG の添加により scFv タンパクの発現を誘導した。scFv タンパクの発現は SDS-PAGE 及び抗 T7-tag 抗体を用いた Western blotting により確認した。

精製した scFv の活性測定は、GC-HSA を固相化抗原とした直接的 ELISA によって行った。さらに今回調製した scFv が遊離の GC を正しく認識するかを確認するため、競合的 ELISA を行った。

3. 昆虫細胞での発現

scFv 遺伝子を pFastBac-Melittin ベクターに組み込んだ後、bacmid を保持している大腸菌 DH10Bac に導入し、Tn7 トランスポ

ゾンにより得られた bacmid を精製し、昆虫培養細胞 (Sf9) に導入した。さらに得られた組み換えウイルスを $10^8 - 10^9$ pfu / ml のスケールまで増殖させ、再度、昆虫培養細胞に感染させることにより、組み換え scFv タンパクの発現を誘導した。

また、scFv の精製は Ni^{2+} キレートカラムクロマトグラフィーを用いて行い、その活性を直接的 ELISA および競合的 ELISA により測定した。

C. 研究結果と考察

クローニングした V_H 、 V_L それぞれ 10 サンプルについて DNA シークエンスを行った結果、各クローンとも推定される全アミノ酸配列が一致していることを確認した。次にリンカープライマーを用いた PCR により、抗 GC scFv の全 241 アミノ酸をコードする領域を増幅した。既知たんぱく質との一次構造を比較検討した結果、抗 GC scFv は各種 scFv と高い相同性を示した。

発現菌株 pET 28a (+) - scFv / BL21 (DE3) を用いて scFv タンパクの発現誘導を行い、菌体抽出液の SDS-PAGE を行ったところ、予想される約 32 kDa の位置に非常に明確なバンドが観察され、さらに Western blotting でも対応する位置にバンドが検出された。そこで発現した scFv の可溶性を検討するため細胞分画を行ったところ、scFv の大部分が不溶性画分に inclusion body として存在することが明らかになった。このような結果は他の発現ベクターを用いた場合も同様であった。

Inclusion body 内のタンパク質は不活性化形で存在するため、種々の方法により巻き戻しを行い、直接 ELISA により活性を検討した。この結果、stepwise dialysis を用いた場合に最大の活性が得られることが判明した。

次に今回調製した scFv が遊離の GC を正

しく認識するかを確認するため、競合的 ELISA を行った。しかしながら $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ という高濃度の GC を添加したにもかかわらず、吸光度の低下は観察されなかった。この結果から scFv は遊離の GC を認識する能力が低下していることが明かとなった。適切な活性を有する scFv が得られなかった原因としては、発現したタンパクのフォールディングが不適切であったことが考えられたため、次いで真核生物 (昆虫細胞) での発現を検討した。

昆虫細胞発現用コンストラクトである pFastBac-Melittin - scFv を含む組み換えバキュロウイルスを調製し、これを Sf9 細胞に感染させて scFv タンパクの発現誘導を行い、SDS-PAGE で分析したところ、予想される位置にバンドが確認され、また Western blotting でも対応する位置にバンドが検出されたことから、本システムにより scFv が生産されていることが示唆された。

そこで、scFv の至的発現条件を決定するため、最適 MOI の検討を行った。設定した各 MOI (= 0.1、1、5、10、30、50)、 27°C で 3 日あるいは 4 日で発現を誘導したところ、MOI = 10、4 日の条件で発現量が最大に達することが確認された。さらに発現した scFv は大腸菌の場合とは異なり可溶性画分に存在することが明らかとなった。

次に可溶性画分のタンパクを His bind resin カラムクロマトグラフィーに付し、精製を検討した。直接的 ELISA により高い活性を示したフラクションは SDS-PAGE において単一バンドまで精製されていることを確認した。

次に、今回調製した scFv が遊離の GC と結合する活性を有するかを確認するために競合的 ELISA を行った。この結果、添加する GC の量に応じて吸光度が低下していることが確認され、今回調製した scFv は遊離の GC を認識しうる、活性のある scFv である

ことが確かめられた。

特になし。

D. 結論

本研究では遺伝子組み換えによるカンゾウの GC 含量コントロールへ向けた基礎的段階として、抗 GC モノクローナル抗体の scFv 遺伝子を作製し、組み換えタンパクの活性を検討した。この結果、scFv は遊離の GC との結合活性を保持していたため、これをカンゾウに導入した場合、GC と結合して GC を系外に除去し、結果的に GC の生合成を促進するものと考えられる。

すでにアグロバクテリウム・リゾゲネスを用いたカンゾウの遺伝子組みにも着手しているので、今後 scFv 遺伝子の導入に展開し、GC 高含有カンゾウを作出する計画である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

(ア) 発表論文

1. Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y, Rapid detection of glycyrrhizin by immunochromatographic assay, *Phytochemical Analysis*, **16**: 370-374, 2005.
2. 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.
3. 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.

G. 特許出願

高倍数性薬用植物に含まれる外来ゲノムの検出と由来の解明に関する研究

分担研究者 高野昭人 昭和薬科大学 講師

前回は、北海道産タンポポ属植物について、核 DNA, ITS 領域を用いて PCR-RFLP 分析を行い、雑種起源と考えられる四倍体、八倍体、九倍体タンポポが存在することを報告した。今回は、RFLP 分析で雑種起源と考えられた個体について、その親個体を探索することを目的として、核 DNA, ITS 領域の中で外来種に特徴的な塩基配列を含む約 350bp の領域を用いて、PCR-SSCP 分析を行った。その結果、RFLP 分析で同じバンドパターンを示したセイヨウタンポポ（北海道産）、中国産タンポポおよびロシア産タンポポは、PCR-SSCP 分析では、それぞれ異なるバンドパターンを示した。また、北海道産セイヨウタンポポとサハリン産タンポポは同じバンドパターンを示した。一方、北海道に分布する在来種四倍体タンポポについても同様に PCR-SSCP 分析を行った結果、RFLP 分析で同じバンドパターンを示した個体であっても、PCR-SSCP 分析では 3 パターンを示し、複数のクローンが存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

遺伝子組み換え薬用植物の環境への影響を検討する一環として、近年、外来種との交雑が話題になっているタンポポを材料として、国内に分布するタンポポへの外来種のゲノムの侵入状態の実態を調べてきた。北海道には、倍数性や形態が極めて多様なタンポポが生育しており、これらのタンポポは、北海道内外に生育していたタンポポ同士が複雑に交雑して形成された可能性がある。このような自然条件下でのゲノムの交流の実態が解明できれば、将来、遺伝子組み換え薬用植物が登場した際に予想される環境への影響を考える上で大きな情報となる。

これまで、在来種タンポポとセイヨウタンポポとの雑種を判定する場合、核 DNA の ITS 領域について、制限酵素 Taq I を用いて PCR-RFLP 分析を行うと、Fig. 1 に示すように在来種(a type)、雑種(b type)およびセイヨウタンポポ(c type)はバンドパターンの違

いによりそれぞれ区別できるとされてきた。

しかし、近年の研究で、中国大陸産タンポポの中にセイヨウタンポポと同じ c type を示す個体が存在することが明らかとなった。したがって、日本に分布する雑種 (b type) 個体の親の候補として、セイヨウタンポポ以外にも、大陸産タンポポが親である可能性がでてきた。日本列島と中国大陸はかつて陸続きであったとも考えられており、その時代に、あるいは、それ以降に、大陸産タンポポと在来種タンポポとの間で交雑が起きた可能性が十分考えられる。

そこで、今回は、PCR-RFLP 分析の際に在来種タンポポとセイヨウタンポポあるいは大陸産タンポポとの間で差を示す領域(約 350 bp, Fig. 2) について、PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) 分析を行い、その多様性を検討した。PCR-SSCP 分析は、短い DNA 断片の塩基配列の変異を、簡単かつ高感度に検出する方法で、PCR 産物中の 1 塩基の違いも検出できるとい

われている

B. 研究方法

1. PCR-RFLP分析でセイヨウタンポポ型 (Fig.1 の c type) を示した個体に関する PCR-SSCP分析:

①材料

セイヨウタンポポ: 北海道函館市、桧山郡厚沢部町、島牧郡島牧村で採集。

ロシア産タンポポ: バルナウル市アルタイ大学構内で採集した果実から発芽した個体およびサハリンにて採集した個体。

中国産タンポポ: 陝西省咸陽市で採集した果実から発芽した個体および北京市北京大学構内にて採集した果実から発芽した個体。

②方法

PCR-RFLP分析:

ユニバーサルプライマー、および制限酵素 Taq I を用いて、核DNA, ITS領域の PCR-RFLP 分析を行った。

PCR-SSCP分析:

次の手順により分析した。

- (1) DNA の抽出。
- (2) 次のプライマーを用いて、PCR 法により、DNA 断片を増幅。
プライマー

Forward : ITS430 (20bp)

Reverse : rDNA4 (21bp)

- (3) 熱変性。
- (4) 電気泳動。
ゲル中のグリセリン濃度 : 2%。
泳動時の緩衝液温度 : 20°C前後。
- (5) 銀染色。

FCMによるDNA量の測定

葉を材料として、FCM (フローサイトメトリー)により、DNA量を測定した。内部標準として、パセリの葉を使用、DNA

量の標準としてDNA量既知のダイズの葉を使用。

2. PCR-RFLP分析で在来種型 (Fig.1 の a type) および雑種型 (同 b type) を示した北海道産四倍体タンポポのPCR-SSCP分析:

①材料

PCR-RFLP分析で a type を示したタンポポ: 北海道函館市、桧山郡厚沢部町、島牧郡島牧村、釧路市で採集。外部形態的にはエゾタンポポに分類される。

PCR-RFLP分析で b type を示したタンポポ: 北海道苫小牧市で採集。外部形態的にはエゾタンポポあるいはクシバタンポポに分類される。

②方法

1. の方法に準じて行った。

C. 研究結果

1. PCR-RFLP法でセイヨウタンポポ型を示した個体に関するPCR-SSCP分析:

Figs. 3, 4 に電気泳動像とその模式図を示す。この結果、PCR-RFLP分析で c type を示した各タンポポは PCR-SSCP 分析で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。

2. PCR-RFLP法で在来種型および雑種型を示した北海道産四倍体タンポポに関するPCR-SSCP分析:

Fig. 5 にバンドパターンの模式図を示す。この結果、PCR-RFLP分析で a typeを示した各タンポポは採集地ごとに異なるバンドパターンを示し、遺伝的には少なくとも3つの系統が存在することが明らかになった。

D. 考察

1. PCR-RFLP法でセイヨウタンポポ型を示

した個体に関するPCR-SSCP分析：

北海道で採集したセイヨウタンポポのバンドパターンは、サハリンで採集したタンポポのパターンと類似していた。サハリンで採集したタンポポは形態的に小型であるが総苞片の形状はセイヨウタンポポに類似し、さらに、FCMで測定したDNA量は2.8-2.9 pgでセイヨウタンポポの値とほぼ等しい値であった。したがって、サハリンで採集したタンポポは、日本に帰化しているセイヨウタンポポに極めて近縁なものである可能性が高い。

釧路市で採集したタンポポは、外総苞片が反り返っているが、その程度がセイヨウタンポポとは異なり、やや開出している程度であったため、形態的には在来種との雑種ではないかと推定された。しかし、PCR-RFLP分析を行ったところ、これまで雑種起源が示とされたb typeではなく、純粋なセイヨウタンポポが示すc typeを示した。そこで、今回、このタンポポについて、PCR-SSCP分析を行ったところ、純粋なセイヨウタンポポとは全く異なるバンドパターンを示した。(Fig. 3) この結果は、このタンポポが純粋なセイヨウタンポポと遺伝的に異なることを示しており、セイヨウタンポポと大陸産タンポポの雑種由来である可能性が考えられた。

2. PCR-RFLP法で在来種型および雑種型を示した北海道産四倍体タンポポに関するPCR-SSCP分析：

PCR-RFLP分析で在来種型(a type)を示した北海道産四倍体タンポポと雑種型(b type)を示した苫小牧産四倍体タンポポについて、PCR-SSCP分析を行った結果、島牧村の個体を除き、他の材料には三本の共通バンドが確認でき、それらには遺伝的背景に共通性を有するものと考えられた。

雑種由来と考えられる苫小牧産四倍体タンポポのDNA量は、他の四倍体タンポポの値とほぼ同じであった。セイヨウタンポポ(ゲノムサイズが在来種に比べて小さい)が親である場合、DNA量は他の四倍体タンポポに比べて小さくなるはずであり、今回の結果は、苫小牧産四倍体タンポポは、セイヨウタンポポを親とする雑種個体ではないことを示唆している。これまでのところ、北海道産在来種タンポポの中にPCR-RFLP分析でc typeを示す個体は見つかっておらず、苫小牧産四倍体タンポポの親候補は不明であり、現時点では大陸産のc typeタンポポの遺伝子が組み込まれている可能性があると考えている。

E. 結論

本研究では、PCR-RFLP分析に加え、PCR-SSCP分析を行うことによって、北海道産タンポポについて、より多くの遺伝的情報が得られた。北海道および周辺地域からさらに多くの材料を収集し、データを蓄積することによって、北海道産タンポポ属植物と他の地域のタンポポとの遺伝的交流の実態が解明され、北海道産タンポポの分類学的位置づけが確立されるものと考えられる。

また、PCR-RFLP分析法およびPCR-SSCP分析法は遺伝子組み換え薬用植物の環境への影響を検討する際に、遺伝的情報を収集するための有効な手段であると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表
未発表。
2. 学会発表
未発表。

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

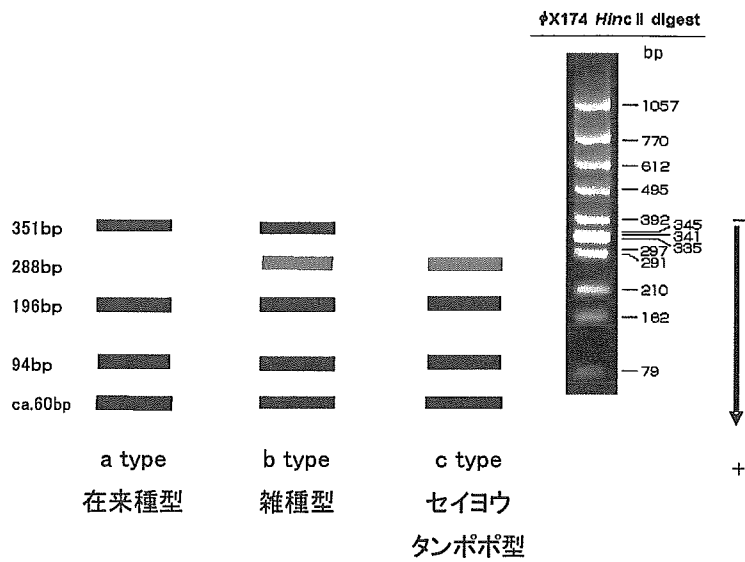


Fig. 1 核 DNA, ITS 領域について、制限酵素 Taq I を用いて、PCR-RFLP 分析を行った際に得られる 3 タイプの代表的なバンドパターン

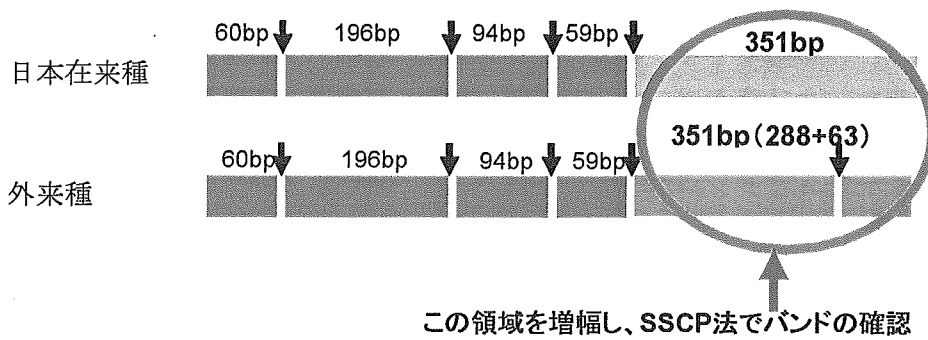


Fig. 2 核 DNA, ITS 領域の RFLP 分析における切断部位 (↓) を示した模式図、および PCR-SSCP 分析で利用した約 350 bp の部位

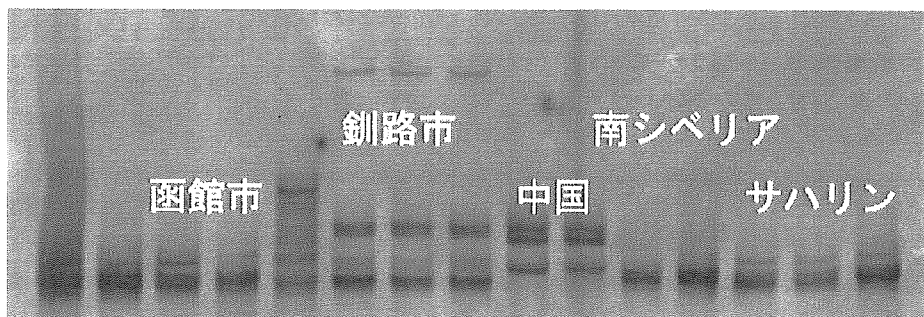


Fig. 3 PCR-RFLP 分析で c type を示した材料の PCR-SSCP 分析で得られた電気泳動像

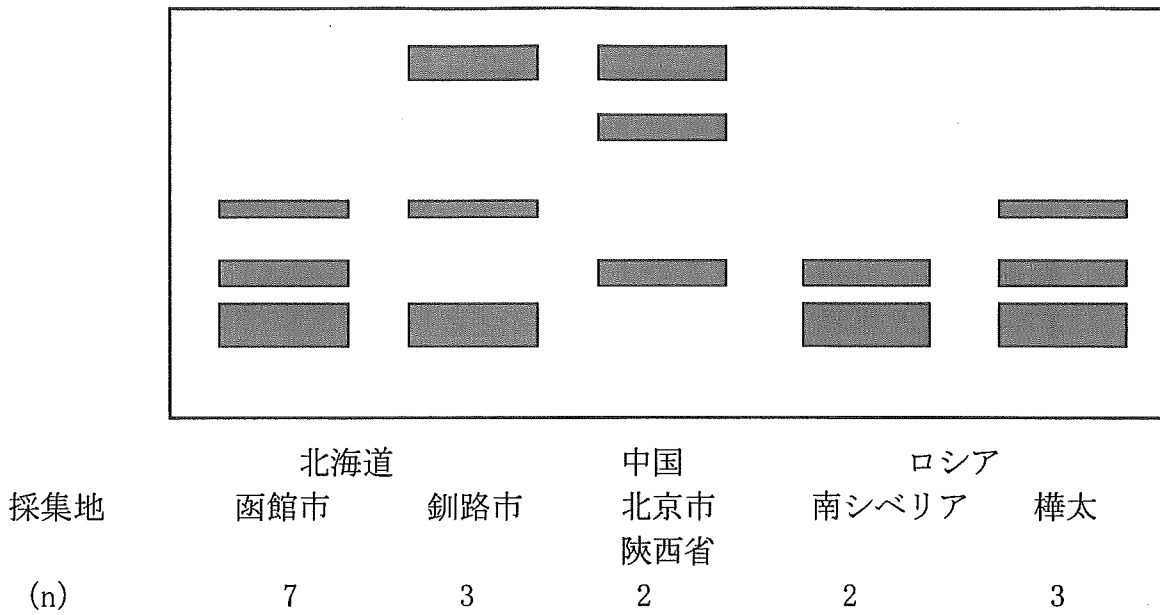


Fig. 4 PCR-RFLP 分析で c type を示した材料の PCR-SSCP 分析結果の模式図

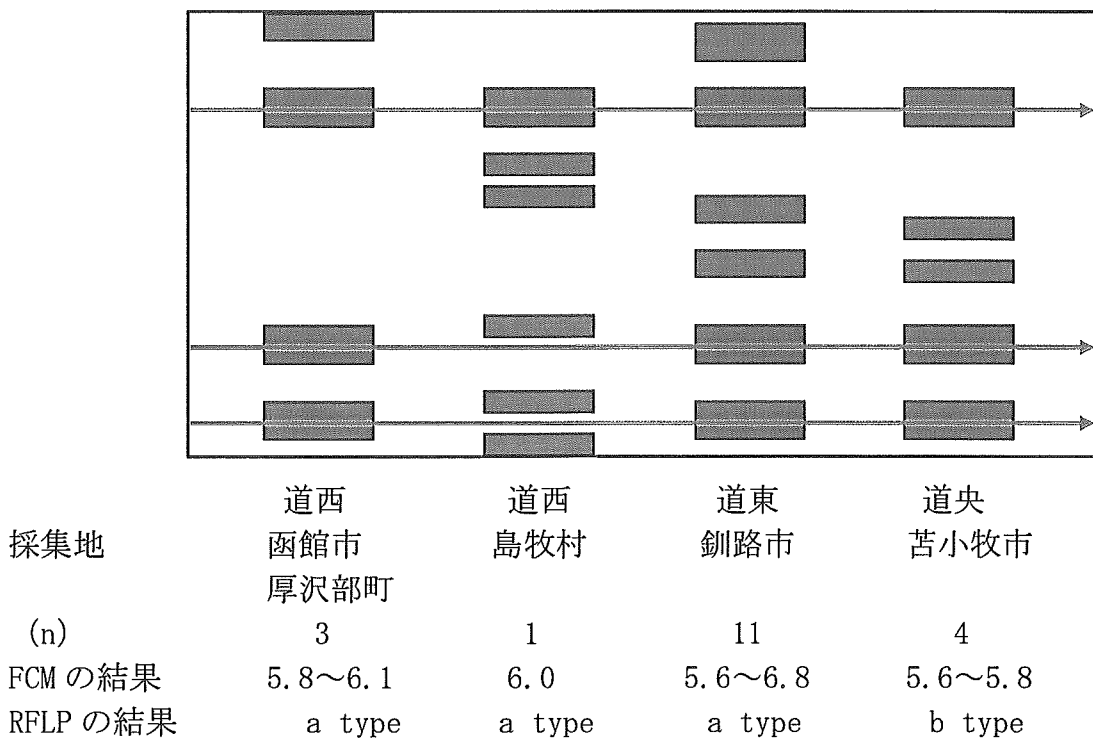


Fig. 5 北海道産四倍体タンポポの PCR-SSCP 分析結果の模式図

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

中国産マオウの遺伝子多型の研究

分担研究者 御影雅幸 金沢大学大学院自然科学研究科 教授
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

中国内モンゴル自治区および寧夏回族自治区の7か所のマオウ栽培地の調査を行い、栽培種の同定を行った。内モンゴル自治区の4栽培地および寧夏回族自治区の2栽培地では、栽培種は外部形態及びDNA解析から *Ephedra sinica* STAPF と同定されたが、寧夏回族自治区の1栽培地では外部形態から *E. sinica* と *E. intermedia* SCHRENK & MEYER の2種と思われる種の混合栽培がみられ、さらに同定困難な種も存在した。DNA解析からこの栽培地の栽培種を上記の2種の *Ephedra* 属植物のいずれかであると確認したが、その中に、*E. sinica* と *E. intermedia* の両方の葉緑体DNAを有するものがあり、混合栽培の結果、典型的な野生種と、外部形態やDNA型が変異のある個体が出現することが示唆された。これらの栽培品のエフェドリン型アルカロイドの含有量を分析し、多くが局方の基準を満たしていることを確かめた。

A. 研究目的

日本市場の生薬原料は、その多くを海外からの輸入によってまかなわれている。そのうちマオウの原料は、主に中国から輸入されているが、中国国内においては、野生マオウ資源が次第に枯渇してきており、栽培が政府によって奨励されている。現在、栽培品マオウは、ほとんどがアルカロイド抽出原料としてもちいられているが、将来、生薬原料として日本に輸入されることが予想される。

そこで、栽培マオウの現状を調査するため、中国内モンゴル自治区および寧夏回族自治区の7か所のマオウ栽培地の探査を行い、栽培種の同定を行った。

B. 研究方法

①栽培地調査

2003年7月29日から2003年8月12日、および2003年9月に栽培の盛んな地域の

一つである内蒙古自治区と寧夏回族自治区で調査を行った。(Table 1)

②DNA解析による種の同定

採集したマオウ検体からDNeasy Plant Mini Kitをもちいて全DNAを抽出し、さらにPCRにより核ITS (internal transcribing sequence of nuclear ribosomal DNA) と葉緑体 *trn L/F* (intron of *trnL* and intergenic spacer between the *trnL* and *trnF*) 部分を増幅し、direct sequencing法で塩基配列を解析した。

③*trn L/F*DNAのクローニング

制限酵素BamHIとHindIIIの認識配列を末端に含むプライマーをもちいて*trn L/F*をPCR増幅した。PCR産物を制限酵素処理後、プラスミッドBluescript SKII(-)とligationし、その産物で大腸菌をトランスフォームし、クローンを得た。

④エフェドリン型アルカロイド分析

乾燥したマオウ検体500 mgを混合液(アセトニトリル:水:リン酸=400:600:0.4+0.4%SDS)で25 mlで超音波溶出した。HPLC分析はODSカラムを用い上記混合液を移動相とし、40℃で行った。

C. 研究結果

①栽培地調査

Table 1 調査した栽培地

Site ID	Site address	Specimen ID	Date
①	内蒙古自治区通遼市開魯県道德郷章古台村	804-3-1 ~15	August, 4, 2003
②	内蒙古自治区赤峰市翁牛特旗五分地鎮大零補	803-41-1 ~13	August, 3, 2003
③	内蒙古自治区赤峰市松山区当鋪地郷	803-12-1 ~3	August, 3, 2003
④	内蒙古自治区赤峰市松山区当鋪地郷大芳隆庄村	803-11-1 ~5	August, 3, 2003
⑤	内蒙古自治区鄂尔多斯市鄂托克前旗布拉格郷吐格図戈查村	912-1-1 ~13	September, 12, 2003
⑥	寧夏回族自治区靈武市磁窯堡鎮煤砦寧夏綠苑公司農場	911-1-1 ~29	September, 11, 2003
⑦	寧夏回族自治区銀川市永寧県金沙郷広夏公司麻黄基地	913-1-1 ~9	September, 13, 2003

②DNA解析による種の同定

上記の①から⑦の栽培地において採取した検体を、外部形態から、内モンゴル自治区の

4栽培地および寧夏回族自治区の2栽培地では、栽培種は*E. sinica* STAPFと推定された。しかし、栽培地⑥では*E. sinica*と*E. intermedia* SCHRENK & MEYERの2種と思われる種の混合栽培がみられ、さらに同定困難な種も存在した。一方、ITS1および2、またE. sinicaと同定され、⑥は*E. sinica*と*E. intermedia*両者の混在がしめされた。(Table 2)

Table 2 形態および

Site ID	Number of Samples	Morphological typing	Result of trnL/F sequencing
①	15	ES	ES
②	13	ES	ES
③	3	ES	ES
④	5	ES	ES
⑤	13	ES	ES
⑥	29	ES + EI + ND	ES + EI
⑦	9	ES	ES

ES:*E. sinica*, EI :*E. intermedia*, ND:not determined

③

*E. sinica*と*E. intermedia*は同一のITS1及び2のDNA塩基配列を有するが、*E. sinica*はE. intermediaのみ増幅でき、簡便な鑑定ができる。しかし、⑥の*E. sinica*と同定された個体にこの差別PCRで増幅されるものがあり、同一個体中に、大量の*E. sinica*型と少量の*E. intermedia*型葉緑体の混在の可能性が考えられた。そこでこれらの個体の一部(911-1-7, -8, -10, -11)について

trn L/FDNAのPCR産物のクローニングを行い、塩基配列を確かめた。このうち*E. intermedia*型の塩基配列を有する物が存在した。(Table 3)

Table 3 *trnL*/F DNA塩基配列による各クローンのtypeの決定

Specimen ID	Number of clone	
	Sinica type	Intermedia type
911-1-7	18	2
911-1-8	20	0
911-1-10	20	0
911-1-11	19	1

④エフェドリン型アルカロイド分析
栽培地⑥についてエフェドリン型アルカロイドの分析をおこなった。28検体のうち、小型の4検体以外の検体はエフェドリンとプソイドエフェドリンの合計が0.7%以上で日本薬局方に適合していた。さらに、*trn L*/FDNAから*E. sinica*と同定された個体はエフェドリンを多く含み、*E. intermedia*と同定したものはプソイドエフェドリンが多かった。(Table 4)

D. 考察

内蒙古自治区、寧夏回族自治区いずれも主たる栽培種は*E. sinica*であったが、一部に*E. intermedia*の混在が認められた。この混植された栽培地のマオウは、外部形態の特徴が、野生のものから外れるものが高い確率で認められた。さらに葉緑体DNAにも混在が確認され、野生のものとは異なった形態やDNAを有する個体の出現が認められた。この栽培地のマオウ検体のエフェドリンおよびプソイドエフェドリンの含量はそれぞれ、*E. sinica*同定された個体はエフェドリンを多く含み、*E. intermedia*と同定された個体はプソイドエフェドリンを多く含む。このよう

Table 4 栽培地⑥の各個体のエフェドリン型エルカロイドの分析。赤字は*E. intermedia*、黒字は *E. sinica*とdirect sequencingで同定された個体をしめす。

Specimen ID.	Alkaloid content (%)		
	ephedrine	pseudo-ephedrine	Total ^{a)}
911-1-1	0.77	0.87	1.80
911-1-2	0.07	1.07	1.18
911-1-3	0.08	1.52	1.65
911-1-4	0.07	1.43	1.46
911-1-5	1.97	t ^{b)}	2.24
911-1-6	2.08	t	2.34
911-1-7	1.12	0.06	1.28
911-1-8	2.06	nd ^{o)}	2.32
911-1-9	1.91	t	2.14
911-1-10	1.99	nd	2.24
911-1-11	2.03	0.01	2.33
911-1-12	t	1.99	2.01
911-1-14	nd	1.82	1.82
911-1-15	0.06	1.64	1.70
911-1-16	nd	2.17	2.17
911-1-17	nd	1.94	1.94
911-1-18	0.93	1.64	2.67
911-1-19	0.62	0.52	1.23
911-1-20	1.11	0.27	1.47
911-1-21	1.38	0.19	1.73
911-1-22	1.19	0.06	1.36
911-1-23	0.30	0.06	0.41
911-1-24	0.28	nd	0.32
911-1-25	0.29	0.32	0.63
911-1-26	0.30	0.17	0.52
911-1-27	0.44	1.08	1.69
911-1-28	0.11	2.10	2.24
911-1-29	0.44	1.08	1.69

Total: sum of ephedrine, methylephedrine, norephedrine and pseudoephedrine
t: trace, nd: not determined

な傾向は野生品には報告されているが、今回生育環境が近似していると考えられる、同一栽培地内で確認することができ、エフェドリン型アルカロイド含有のプロファイルは *Ephedra* 属植物の種に依存して変化することが確かめられた。

E. 結論

中国内モンゴル自治区および寧夏回族自治区の7か所のマオウ栽培地における栽培種は *E. sinica* と同定されたが、一部 *E. intermedia* との混合栽培がみられた。混合栽培の結果、典型的な野生種と、外部形態やDNA型が変異のある個体が出現することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mikage M., Kondo N., Yoshimitsu M., Nakajima I., Cai S.Q., *Natural Medicines*, **58**, 312-320 (2004)
- 2) Nobuko Kakiuchi, Ikumi Nakajima, Yukimsa Kurita, Changfeng Long, Shaoqing Cai and Masayuki Mikage, Studies on cultivated *Ephedra* plants in Inner Mongolia Autonomous Region and Ningxia Hui Autonomous Region. *Bio. Pharm. Bull.* In press.

2. 学会発表

○日本薬学会第125年会（2005年4月，東京）で次の2報を発表。

- 1) 渥美聡孝、垣内信子、中村憲夫、服部征雄、御影雅幸。茯苓の研究 第7報-茯苓の性状と成分との相関
- 2) 隆長鋒、垣内信子、北岡文美代、大場秀章、御影雅幸。日本産及び韓国産アケビ属植物の遺伝子分析

○日本生薬学会第52年会（2005年9月，金沢）で次の1報を発表。

- 1) 垣内信子、井上景子、大久保圭祐、栗田幸昌、御影雅幸、津田喜典
パキスタン北部の *Ephedra* 属植物資源

G. 知的財産権の出願・登録状況
無し

遺伝子組換え薬用植物の作出及び生態系に及ぼす影響解析に関する研究

分担研究者 鎌田 博 筑波大学大学院生命環境科学研究科・教授

有用二次代謝物生産の改善・改変を目的とする遺伝子組換え薬用植物の育成が進められており、その実用化に際して必要不可欠なカルタヘナ担保法に基づく環境影響評価（交雑性、繁殖特性、同種あるいは他生物への影響等）を実施するための評価法を検討する目的で、ベラドンナ (*Atropa belladonna*) を材料とし、日本産毛根病菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) を用いた形質転換（毛状根誘導）を行い、多数の形質転換個体（毛状根からの再分化個体）を育成した。この形質転換個体は胚軸や節間が短い矮性形質や本葉が丸みを帯びる等の特徴的な形質を示すことが明らかとなり、形質転換個体と非形質転換個体の雑種（戻し交雑）第一代について外来遺伝子（T-DNA）の挿入・伝達様式と形態的特徴を調査し、調査した系統（M8）では3コピーのT-DNAが挿入されており、T-DNAが内在遺伝子と同様に子孫に伝達され、安定して機能することが明らかとなった。一方、形質転換個体と非形質転換個体の生葉を用い、他植物への影響（アレロパシー活性）を調べる目的で、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、レタス実生の幼根伸長への影響を調査した結果、系統間や再分化個体間で差はあるものの、形質転換体と非形質転換体で有意な差は認められなかった。また、ベラドンナおよびノラニンジンモデル材料とし、生態特性や遺伝子多様性について調査を進め、他殖性の強いノラニンジンでは高いヘテロ接合度を示すのに対し、自殖性も併せ持つベラドンナではノラニンジンのような高いヘテロ接合度は見られなかった。さらに、ベラドンナと同じナス科の近縁野生植物である *Scopolia lurida* との交雑の可能性を検討したが、交雑は起こらないことが確認された。

A. 研究目的

高等植物に見られる根頭癌腫（クラウンゴール）病や毛根病の原因が、土壤中に存在する原核微生物（*Agrobacterium* 菌）による高等植物の遺伝子組換え（自然の遺伝子組換え現象）であることが1970年代半ばから1980年代はじめに明らかにされた。この発見をもとに、微生物における人為的遺伝子操作技術の開発・発展に伴い、*Agrobacterium* 菌を遺伝子導入系として用いる遺伝子組換え植物の育成が一般化し、1980年代半ば以降、各種有用植物において遺伝子組換え植物の育成が進められ、その商業栽培が世界的規模で

急拡大するとともに、食品や医薬品生産への利用も飛躍的に発展してきた。このような状況の中、各種薬用植物が生産する多様な有用二次代謝物の合成の効率化や新規代謝物生産への利用の可能性が検討され、最近では、各種二次代謝物の生合成遺伝子の単離・解析とともに、多様な遺伝子組換え薬用植物の育成が進められるようになってきた。

一方、多様な遺伝子組換え生物の開発・利用に伴い、食品・医薬品としての安全性ばかりでなく、環境への影響についてもさまざまな議論・検討が行われ、世界規模での有用生物資源の維持および持続的な利用を目的と

する生物多様性条約の枠組みの中で、遺伝子組換え生物の国境を越える移動に関する国際条約（カルタヘナバイオセーフティ議定書）が締結され、我が国においても平成15年3月にその担保法としての「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」（通称、カルタヘナ担保法）が制定され、平成16年2月に施行された。

このような国内外の情勢に鑑み、世界的に開発が進められている遺伝子組換え薬用植物について、効率的かつ安全性の高い育成技術の開発ばかりでなく、カルタヘナバイオセーフティ議定書やその国内担保法に基づき、環境への影響を調査・検討することが緊急の課題となっている。そこで、本研究では、代表的な薬用植物であるベラドンナを中心に、*Agrobacterium*菌を用いた遺伝子組換え薬用植物育成技術の開発を進めつつ、環境への影響評価を実施する際に必要となる評価項目の検討ならびに関連するデータの取得・解析方法を検討することとした。

B. 研究方法

1. 薬用植物における遺伝子組換え体の作出および環境影響評価

代表的な薬用植物の一種であるベラドンナ (*Atropa belladonna*) を主な材料とし、毛根病菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) を感染させることで形質転換器官である毛状根を発生させ、この毛状根から組織培養技術を用いて植物個体を再生させ、遺伝子組換えベラドンナを得る。この遺伝子組換え体は、野生型の毛根病菌を使っていることから、自然界でも生じるものであり、カルタヘナ担保法上の規制は受けないが、本研究では遺伝子組換え体のモデルケースとして取り扱うため、同法上の取り扱いに則り、実験室内で栽培し、形態・生理特性や分子生物学的特性を解析する。その後、カルタヘナ担保法で定められている特定網室において自然光下での栽培試験を実施し、その特性解析、土壌微生物相への影響、花粉飛散性、虫媒性、他植物との交

雑の可能性、他植物の成育への影響（アレロパシー試験）等、カルタヘナ担保法上の第一種使用（封じ込め措置を取らずに行う使用）の申請の際に求められる環境影響評価項目について、データの取得とデータの解析手法を検討する。最終的には、自然界でも生じるものであるため、大臣承認は必要としないものの、環境影響試験圃場において隔離圃場栽培試験を行い、法律上定められている項目について環境影響評価試験をモデルケースとして実施することを目指す。なお、実験室内実験、特定網室試験、隔離圃場試験は段階を追って実施する必要があるため、各試験の実施状況により、次の段階の試験を実施する時期を随時調整することとした。

2. 環境影響評価項目・評価法の検討

3年間の限定された期間に、有用遺伝子を導入した遺伝子組換え薬用植物を実際に育成し、特定網室試験を経て隔離圃場試験を実施し、環境影響評価を実施することは実質的に不可能なことから、生態特性や遺伝子多様性について以前より解析を進めているノラニンジン (*Daucus carota*) および栽培が容易な薬用植物の事例としてベラドンナを用い、非遺伝子組換え植物の生態特性（生息地の特性、成育特性、繁殖特性、他植物との競合の可能性等）、花粉飛散性（風媒性、虫媒性等）、交雑特性、遺伝子多様性等、環境影響評価を実施する際に必要となる各種項目について調査し、基盤となるデータの蓄積およびデータ解析手法の検討を行うこととした。なお、このような環境影響評価に必要な項目については単年度でのデータ取得は不可能であることから、年度毎に取得できる項目から順次データを蓄積・解析し、継続して調査することとした。

C. 研究結果

1. 薬用植物における遺伝子組換え体の作出および環境影響評価

昨年度までの研究で作成したベラドンナ毛状根からの再分化植物体（遺伝子組換え体）について、鉢上げを行い、実験室内での

栽培を開始した。この再分化植物体の大部分は、胚軸や節間が短くなる典型的な矮性形質を示し、このような形質を示す個体では、PCR法により、T-DNAの挿入が確認された。また、先行して栽培を開始していた系統 (M8) について、非形質転換体 (遺伝子組換えをしていない通常のベラドンナ) との交雑を行い、その戻し交雑第一代の植物 (播種後5週目の植物の葉) について、昨年度改良したDNA抽出法を用いて核DNAを抽出し、T-DNA上の遺伝子 (ミキモピン合成酵素遺伝子) をプローブとするサザン法による導入遺伝子 (T-DNA) の存在・コピー数の確認と形態的特徴の解析を行った。その結果、M8系統においては、T-DNAが3コピー導入されており、戻し交雑第1代の子孫についてPCRによるT-DNAの存在を確認したところ、約70%の植物でT-DNAが確認され、コピー数に見合う比率 (3/4) で子孫にT-DNAが伝達されることが明らかとなった。また、T-DNAの挿入が確認された個体においては、胚軸や節間が短くなる矮性形質と葉が丸みを帯びる等の特徴的な形質が見られた。ところで、このM8系統においては、T-DNAが伝達された植物の種子の発芽が非形質転換体に比べて有意に早くなっていた。

一方、遺伝子組換え体が他植物の生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のアレロパシー試験のためのバイオアッセイ法として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た。上述した形質転換ベラドンナと非形質転換ベラドンナの生葉を用い、こ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も、調査系統 (本研究のために筑波薬用栽培試験場を経由して欧州6カ所および我が国2カ所から収集した系統) 毎に活性は異なるものの、約20-60%の幼根伸長阻害活性が認められた。また、遺伝子組換え植物においては、野生型と同様、系統毎に活性は異なるものの、約30-50%の幼根伸

長阻害活性が認められた。なお、遺伝子組換え系統で認められたこの阻害活性の程度は非遺伝子組換え系統で見られた阻害活性の範囲内であった。

本年度は、鉢上げしたベラドンナの生育が遅れ、また、特定網室が他の遺伝子組換え植物の栽培で使用できなかったため、特定網室栽培や隔離圃場栽培を実行することはできなかった。この点については次年度以降、継続して検討する予定である。

2. 環境影響評価項目・評価法の検討

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。

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等は今年度も昨年度と同様な方法で調査を継続した。その結果、個体群密度の変遷や生息範囲の拡大については昨年度までに推測された知見以上の結果は得られなかったが、花粉媒介昆虫 (ナミハナアブ) の行動パターンについては、本年度は北海道の野生繁殖地での多数の昆虫行動観察を行い、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、花粉の最大飛散距離は308mと推測された。

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ができず、交配試験を行うことはできなかったが、*S. lurida* との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。なお、本年度は、上述したように、遺伝子組換えベラドンナを野外で栽培することができなかったため、訪花昆虫の調査は実施

できなかった。

また、土壤微生物相に対する影響を調査するための方法としてDGGE法の適用を検討したが、再現性の高い結果を得るためのDNA抽出条件を決定することができず、次年度以降継続して検討する予定である。

D. 考察

これまでの研究により、日本産毛根病菌によって形質転換した多数の毛状根クローンから再分化させた形質転換個体(遺伝子組換え体)が得られ、その形態的特徴が明らかとなった。形質転換体に見られる胚軸や節間の短縮する矮性形質は、他の植物においても、毛状根からの再分化植物に一般的に見られる形質であり、この形質はT-DNA上の*rol*遺伝子によってもたらされることがかねてより明らかにされている。また、M8系統においては、T-DNAが3コピー導入されていることがサザン解析によって明らかとなり、さらに、後代植物へはこのコピー数に合致するように伝達され、T-DNAの存在が確認された後代植物はこの矮性形質を示したことから、ベラドンナにおいても、後代に伝達されたT-DNAは安定して機能するものと推測された。導入遺伝子の安定性は、遺伝子組換え植物の安全性評価を実施する際の重要な検討項目の1つであり、遺伝子組換え薬用植物の安全性評価を実施する際の1つの事例として今回の結果を活用できるものと思われる。

ところで、今回の調査で詳細に検討したM8系統においては、T-DNAが挿入された遺伝子組換え体(形質転換体)においては、非形質転換体に比べ、種子発芽が有意に早い傾向が認められた。現在、毛状根からの再分化植物体において、このような種子発芽特性が詳細に調べられた事例はなく、この早い種子発芽がT-DNA上の遺伝子に起因するものであるか、もしくは、T-DNA挿入位置によるものかを明らかにする必要があるが、もし導入されたT-DNAの影響であれば、早期発芽性は自然環境下において生態的優位性をもたらす可能

性があり、今後さらに詳細に検討することが必要である。

一方、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が、薬用植物はさまざまな生理活性物質を作ることから、本研究において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、今後、さらに詳細な検討が必要である。

さまざまなプライマーを用いたAFLP法による遺伝子多様性の解析については、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。なお、ベラドンナでは、ヨーロッパを中心に集められた各種系統において、昨年の実験で、ヘテロ接合度は0.099から0.169(平均で0.133)の値が得られており、プライマーが異なるために直接の比較はできないが、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。いずれにしても、遺伝子組換え体を栽培する際、交配によって遺伝子が野生集団に拡散した時の遺伝子多様性への影響を評価するためには、野生集団がもともと持っている遺伝子多様性を基盤データとして使用することとなり、本研究で提示した遺伝子多様性解析手法とそれをもとにした遺伝子多様度の決定は、遺伝子組換え薬用植物の今後の環境影響評価に1つの指標を与え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について、本年度はこれまで以上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。なお、ベラドンナについては、昨年度の研究により、主たる花粉媒介昆虫はコマルハナバチと推測されている。本年度は遺伝子組換えベラドンナの野外栽培ができなかったことから、訪花昆虫の種類調査および訪花昆虫の行動パターン解析を実施できなかった。この点については今後も継続して調査する予定である。

土壌微生物相に対する影響については、現状では、土壌中に存在する微生物（バクテリア、菌類、放線菌）について、適切な培地を用いたコロニー数の計測をもとに、微生物数への影響として評価されている。ベラドンナについては、T-DNA上に存在する*rolC*遺伝子を過剰発現させた場合、上述した培養方法によって解析する限り、微生物相への影響は見られないことが、本研究課題分担者の以前の研究によって明らかとなっている。本研究で育成した多数の遺伝子組換えベラドンナ系統について詳細な検討が必要であるが、基本的には微生物相への影響はないものと予想される。しかし、最近では、難培養微生物も含めた土壌微生物相全体を調査するための方法が次々に開発されており、このような新しい方法の適用を検討することは重要である。本研究では、土壌微生物相全体を調査する方法としてDGGE法の適用を検討したが、土壌からのDNA抽出において適切な条件を決定することができなかったため、この点については今後の課題である。ただ、DGGE法をはじめとする最近の網羅的解析法においては、調査する時期や調査時の天候（温度や降雨の有無等）によって検出される微生物の種類や量が大きく変動することが明らかとなってお

り、遺伝子組換え体の栽培の影響か否かを検討する以前に、さまざまな栽培条件下での微生物相の大幅な変動の基盤データ整備が必須である。

遺伝子組換え植物の環境影響評価項目の1つである近縁野生種との交雑性については、ベラドンナと同じナス科の近縁野生植物として*Scopolia*属植物との交雑性を検討したが、我が国に自生する*S. japonica*とは開花時期を合わせることができず、交雑性は検討できなかったが、*S. japonica*の近縁種である*S. lurida*との交配実験の結果、ベラドンナとは交雑しないことが確認された。

本年度は、遺伝子組換えベラドンナの成育遅延のため、特定網室試験および隔離圃場試験を実施することはできなかったが、環境影響評価のためのさまざまな評価項目について、その評価法の概略を決定できたことから、次年度以降継続して栽培・解析を実施することにより、遺伝子組換え薬用植物における環境影響評価の1つの事例を提示することができるものと考えられる。

E. 結論

本研究では、ベラドンナをモデル薬用植物として用い、自然界で見られる遺伝子組換え現象の1つである毛根病菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 感染により、遺伝子組換え体(毛状根から再分化させた形質転換ベラドンナ)を多数育成し、その特性解析を行い、T-DNAが挿入された遺伝子組換えベラドンナにおいては、胚軸や節間が短くなる典型的な矮性形質を示すこと、および、この T-DNA 上の *rol* 遺伝子による形質は後代交配種においても安定であることを示すことができた。また、このような形質転換ベラドンナについて、改変サンドイッチ法を用い、レタス実生の幼根伸長に及ぼす影響を調査したところ、形質転換体であっても、非形質転換体と同程度の幼根伸長阻害を示すことから、ベラドンナにおいては、形質転換の有無とは関係なく、アレロパシー活性を持つことが明らかとなった。多様な生理活性を持つさまざまな二次代謝

物を合成する薬用植物においては、遺伝子組換え体の環境影響評価に際しては、アレロパシー試験は必須の項目と考えられ、サンドイッチ法のようなバイオアッセイ法が適切な試験方法であることが示された。

一方、遺伝子組換え植物が環境に及ぼす影響のうち、重要な検討項目である、近縁種との交雑性の有無および交雑した場合の遺伝子多様性に及ぼす影響を調査するため、野生型ペラドンナについて、近縁野生種である *Scopolia* 属植物との交雑性を検討したが、少なくとも、*S. lurida* とは交雑しないことが明らかとなった。また、AFLP 法をもとに、ヘテロ接合度を調査し、集団の多様度を評価したところ、他殖性が強いニンジンと比べ、自殖性も併せ持つペラドンナにおいては集団の多様度は低かった。実際の遺伝子多様性に及ぼす影響評価においては、多数のバンドを検出・比較できる AFLP 法は好適な方法であり、実際の環境影響評価に先立ち、自然集団中での遺伝子多様性をヘテロ接合度のような指標で決定しておくことが重要と思われる。

さらに、ペラドンナのような虫媒花においては、虫媒昆虫を事前に決定しておき、花粉の寿命を実測した後、花粉媒介昆虫の実際の行動パターンの観測と行動パターン解析ソフトを活用することにより、花粉飛散距離を推定することが可能となった。

本研究で示したさまざまな環境影響評価手法と、従来から用いられてきた生態特性調

査法を併用することで、さまざまな環境影響評価が可能となり、今後、本研究で作出した遺伝子組換えペラドンナの野外栽培時における環境影響評価をこのような方法を活用して実施することにより、遺伝子組換え薬用植物の環境影響評価の一つの事例を提示することができるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・M. Umehara, I. Eguchi, D. Kaneko, M. Ono and H. Kamada (2005) Evaluation of gene flow and its environmental effects in the field. *Plant Biotechnol.*, 22(5); 497-504.
- ・路川宗夫、今井清太、野水美奈、宮田佳奈、鎌田博 (2005) 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.
- ・鎌田博 (2005) 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.

2. 学会発表

- ・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 (富山大学) 2005 年 9 月 22 日。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

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

薬用植物の受粉・受精様式について

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筑波研究部 室長

協力研究者

菱田敦之（独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター筑波研究部 主任研究員

薬用植物の受粉・受精様式を把握するために袋掛け処理を行い、自殖性について検討した。供試材料はケシ4系統、ムラサキ、クコ、ジオウ2種、クララ、ツノゲシ及びシロバナムシヨケギクを用いた。花粉の性状は、ケシは粉質性であり、花粉の飛散が観察されたが、他の植物では粘質性があり、肉眼的に飛散は見られなかった。袋掛け・放任処理により、ケシおよびムラサキで結実種子が得られ、自殖性があることが判明したが、その他は種子が全く得られなかった。

A. 研究目的

高等植物の受粉・受精様式は自殖性と他殖性に大別され、受粉は虫媒や風媒等によってなされる。人工的な管理下で植物の遺伝的な特性を維持するに当たり、それぞれの植物種の受粉・受精様式を把握し、類縁種間の交雑を防ぐ対応が不可欠である。今後作出が期待される遺伝子組換え薬用植物においても、花粉の飛散による在来種との交雑の危険性を回避するために、各種植物の受粉・受精様式を明らかにする必要があるが、薬用植物についての知見は極めて少ない。

著者等は過去、ミシマサイコの受粉・受精様式を検討し、他殖性、虫媒、雄ずい先熟であること等を明らかにしたが、詳細な

検討には多くの手間と時間を要した。薬用植物は種類が多いため、詳細な検討を行う一方で、簡便な方法で広く網羅的にその性質を検討することも必要である。

本研究では、袋掛け処理により結実の程度を確認することにより、自殖性の程度を検討した。

B. 研究方法

材料は、薬用植物資源研究センターに植栽されている以下のものを用いた。ケシ (*Papaver somniferum* L.) 4系統、ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zucc.), クコ (*Lycium chinense* Mill.), アカヤジオウ (*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. var. *purpurea* Makino),

カイケイジオウ (*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. f. *hueichingensis* (Chao et Schih) Hsiao), クララ (*Sophora flavescens* Aiton), ツノゲシ (*Glaucium flavum* Crantz), シロバナムシヨケギク (*Pyrethrum cinerariifolium* Trevir.).

植物の育成は慣行法によって行った。

袋掛け処理は、パラフィン紙を用い、開花前にケシ、クコ、ツノゲシは1花毎に、その他は花序単位で行った。シロバナムシヨケギクについては袋掛けを行わず、開花期間を通じ1) オープン受粉、2) 筆を用いた人工受粉、3) 異なる花同士を接触させて受粉の3方法を行った。花が終わった後に適宜袋を除去し、結実状況を観察した。

C. 研究結果

供試した植物の花粉の性状について、ケシは粉質性があり、葯の裂開時には花卉内に花粉を飛散させることが観察された。しかしながら、トウモロコシ、ハトムギ、アサ等で見られる程の飛散量ではなかった。

ムラサキ、クコ、ジオウ2種、クララ、ツノゲシ、シロバナムシヨケギクの花粉は粘質性があり、花粉の飛散は肉眼的にはほとんど見られなかった。なお、いずれの植物においても、昆虫の訪花が見られたが、それらの種の特定期および同定は、今回行わなかった。

袋掛け処理により、ケシとムラサキで種子が得られた。ケシは分枝果を用い、オープン受粉に対する種子重量比で、袋掛け・人工受粉が16.2~92.5%、袋掛け・放任で

0~19.9%の種子が得られた(表1)。採種量は、人工受粉および放任処理ともに、系統間で大きく異なったが、これは処理花の花粉量の差異に起因すると思われた。採種量が多かったインド8系統は、いずれの個体ともに花粉量が多かった。

ムラサキは2本の分枝を一緒に、花序毎に袋掛けを行い、花序の下から上に向け10花の種子総数を調査した。オープン受粉に対し、15.5%の種子が得られた(表2)。

処理、無処理ともに、同程度の発生部位および成熟度の分枝を用いたが、袋掛け処理区では中段から先端部にかけて枝の枯死が多く、種子は得られなかった。無処理では最高、最下位から上位27段花までの結実が見られた。

袋掛け処理したクコ、ジオウ2種、クララ、ツノゲシからは、種子が全く得られなかった(表3)。シロバナムシヨケギクでは、オープン受粉を含め、いずれの処理区からも種子が全く得られなかった。

D. 考察

ケシ、ムラサキの袋掛け・放任処理から種子が得られ、自殖性のあることが判明した。ケシでは系統により袋掛け・放任から得られた種子量が異なり、同一種であっても品種あるいは系統により自殖・結実の程度が異なることが推察された。高採種量を示したインド8は、花粉の産出量が極めて良好であったことから、花粉の粘質・粉質性のみならず、花粉の産出量も受精に関与していることが容易に推察される。