

Z00500143B

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 15 年度～平成 17 年度 総合研究報告書

(H15-ゲノム-001)

主任研究者 木内 文之

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

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	

(資料)

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 -----	16
吉松嘉代, 河野徳昭	
2. 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 -----	32
大塚 譲	
3. 薬用植物の遺伝子解析に関する研究 -----	41
野口博司	
4. 二次代謝酵素遺伝子の導入が内生的代謝機能に及ぼす影響 -----	48
水上 元	
5. 遺伝子組換え薬用植物の成分評価法に関する研究 -----	52
淵野裕之, 木内文之	
6. 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 -----	58
関田節子	
7. 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 -----	61
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 -----	67
高野昭人	
9. 遺伝子解析による植物と生薬の種間別に関する研究 -----	75
水上 元	
10. 中国産マオウの遺伝子多型の研究 -----	77
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 -----	82
鎌田 博	
12. 薬用植物における雄性不稔制御因子の探索と解析 -----	91
佐藤文彦	
13. 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 -----	97
飯田 修, 菱田敦之	

14. 植物の内部形態による遺伝子組換え・非組換え体の 比較と遺伝子拡散について -----	102
酒井英二	
15. <i>Panax</i> 属植物の遺伝資源的保存三七人參 (<i>Panax notoginseng</i>) の 生産性に関する研究 -----	108
神田博史	
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 -----	112
香月茂樹	
17. 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 -----	116
柴田敏郎	
18. 薬用植物 (オオツヅラフジ及びエンゴサク) の栽培に関する研究 -----	121
鈴木幸子, 吉澤政夫, 浜野朋子, 安田一郎	
19. 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 -----	127
後藤勝実	
20. 遺伝子組換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 -----	140
佐竹元吉	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	149

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立し、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立する必要がある。本研究では、これらに関する研究を通して、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目的とした。

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、ベ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、そこから得た再分化個体（遺伝子組換え体）を育成して実験に用いた。また、セリバオウレンについて、効率的遺伝子組換え体作出法を確立し、この組換え体を超低温保存できることを示した。更に、マルバダイオウ、シロイヌナズナへの植物ポリケタイド生合成酵素遺伝子の導入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）遺伝子をベラドンナに組込んだ組換え体を作成した。

遺伝子組換えが薬用植物成分に与える影響を調べるために、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組換え植物個体を作成したところ、形質転換培養細胞では予期せぬ成分変化が起ったが、再生植物の成分は野生型と変わらないことを見いだした。遺伝子組換え薬用植物については、その成分全体を評価する必要がある、その手法としてはLC-MS/MS, NMRを用いたメタボローム分析手法が有効と考えられる。

野生薬用植物の遺伝的多様性及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についての核リボソームDNAのITS領域のPCR-RFLP分析による外来ゲノムの実態調査、並びにAFLP法に基づくノラニンジンの遺伝子多様性の解析を行い、各々の野生植物の遺伝的多様性の程度を明らかにした。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、ベ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、自殖性の程度の調査等を行い、訪花昆虫の行動解析と花粉の寿命から虫媒花に於ける花粉の最大拡散距離を推定する手法を開発した。さらに、農作物用に開発されたサンドイッチ法を一部改変してアレロパシー試験を実施し、この方法が、遺伝子組換え薬用植物

に対しても有効であることを示した。

更に遺伝子組換え薬用植物を作出するための基礎となる栽培法並びに植物特性に関する調査を、カキドオシ、オオツヅラフジ、カラスビシャク、ヨロイグサ等について行うとともに、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。

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

大塚 譲

お茶の水女子大学生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
センター筑波研究部 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
センター筑波研究部 室長

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のように変化したかを、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。

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した。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ることが目的とした。

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) 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、遺伝子組換え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) 並びにベルベリン輸送体遺伝子 (Cjmdr1) 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) ケシのリゾビウム形質転換体に於ける形質変異の原因となった遺伝子を探索するとともに、マオウに於けるエフェドリンの生合成の初期段階に関与する酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子のクローニングを検討した。更に、ダイオウにおけるカルコン合成酵素ファミリーをコードする遺伝子を探索し、得られた遺伝子の機能解析並びにアミノ酸変異の導入による機能変化の解析を行った。(吉松, 河野, 関田, 野口)

(3) 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、LC-MS/MSを用いてマルバダイオウの成分を検討するとともに、プロトンNMRを用いた多変量解析をウコン属植物の成分分析に適用し、この手法が遺伝子組換えによって起こる成分変化全体を捉える手法として利用可能かを検討した。また、モノクローナル抗体を用いた微量成分の定量法について検討した。更に、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組込んだシロイヌナズナ形質転換細胞並びに再生植物体における成分代謝能の変化を分析した。(淵野, 木内, 正山, 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による遺伝的多様性への影響が考えられるが、それ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的多様性を基盤データとして使用することになる。そこで、野生薬用植物として北海道に分布する高倍数性

のタンポポ、中国の *Ephedra* 属植物、ノラニンジン、ベラドンナの遺伝的多様性を調べるとともに、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を、薬用植物園での栽培植物の逸出をモデルとして調査した。(高野, 御影, 垣内, 鎌田, 飯田, 菱田, 後藤)

(2) 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、交雑特性等を調べるとともに、アレロパシー試験等の環境影響評価項目・評価法を検討した。(鎌田)

(3) 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、これをタバコに導入してその効果を観察するとともに、シロイヌナズナから単離されている花成制御因子の一つであるFT遺伝子の花芽形成に対する効果を検討するため、ハナビシソウへの導入を行った。(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。本研究では、ウイキョウ、オオツヅラフジ、オミナエシ、カラスビシャク、ヨロイグサ、カキドオシ、エンゴサク、クソニンジン等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検討を行った。(飯田, 菱田, 香月, 熊谷, 佐竹, 柴田, 鈴木, 浜野, 吉澤, 安田)

(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、オウゴン並びにバクモンドウの栽培品の内部形態の特徴を検討した。(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て無菌の毛状根クローンを得、この毛状根を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た。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、これを順化後、土壌栽培として鉢上げし、実験室内で栽培してアレロパシー試験等に用いた。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が、これらの個体においては、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。

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、導入遺伝子 (GUS, *Cjmdr1*) 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が得られた。

このうち、不定胚形成を経て植物体に分化した *Cjmdr1* センス導入体を鉢に植出し、栽培3ヶ月後に部位別の *Cjmdr1* mRNA の発現をNorthern法にて解析したところ、葉、葉柄、根においてmRNAの発現が野生株と比較し低下し、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。一方、*gus* 導入クローンから分化した植物体を鉢に植出し、7ヶ月後にGUS活性染色とRT-PCR法で *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、ベルベリンの生産への影響はほとんど認められなかった。

Cjmdr1 を導入した不定胚及び不定根を超低温保存した後再培養した結果、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。

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b-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LBA4404/GUSを感染させた場合においては、胚軸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が、不定芽の形成率は低かった。一方、LBA4404/BASでは不定芽形成には至らなかった。

また、BAS遺伝子を組込んだプラスミドpSMAB704:35S-bas-hisを作成し、これをエレクトロポレーションで導入したアグロバクテリウムGV3101をシロイヌナズナの蕾に感染させ、得られた種子から形質転換体を選抜してBAS遺伝子の導入を確認した。更に、そこからBASホモの種子を得ており、その成分変化については今後検討する。

酵母Protein Disulfide Isomerase(PDI)遺伝子を組込んだアグロバクテリウム用の形質転換ベクターWLYPDI/pIG⁺-Hmを構築し、これをエレクトロポレーション法でアグロバクテリウムAR10に導入した。この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形質転換カルスを得、これから毛状根培養並びに再生植物を得て、酵母PDI遺伝子

の導入を確認した。

また、遺伝子組換え薬用植物の作出の一つのネックになっている再分化に際して、不定胚の形成効率を上げる働きのある遺伝子を見い出した。

(2) ケシのリゾビウム感染によるT-DNA挿入型形質転換体は、草丈が低く開花期が非常に遅れ、主アルカロイドがテバインとなる形質変異を示した。この形質変異の原因遺伝子を同定するため、T-DNAの挿入箇所を調べた所、少なくとも4ヶ所にT-DNAが挿入されているが、挿入によるORFの破壊等は起きていないと考えられた。また、自殖後代植物であるT1世代植物について4ヶ所のT-DNA挿入部位をmultiplex-PCR法により同時に解析し、アヘンアルカロイド成分含有量と比較したところ、テバイン含有量とT-DNAの挿入パターンには相関が無いことが判明した。

ダイオウからクローニングしたカルコン合成酵素関連の3つの遺伝子の全長配列を決定するとともに、異種発現した酵素タンパクを用いてその機能を解析し、二つのカルコン合成酵素(CHS1, CHS2)とアロエソン合成酵素(ALS)であることを明らかにした。このうち二つのCHSは、C20までの脂肪酸CoAエステルを受容しテトラケタイドラク톤を生成すること、則ち3個のmalonyl CoAを縮合することが分った。一方ALSは、cinnamoyl CoAや脂肪酸CoAなど様々な基質を受け入れることが判明した。更に、ALSについて種々のアミノ酸変異酵素を作成した結果、基質特異性や生成物に様々な変化が見られた。

(3) 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、自殖を繰り返すことによりT₃世代を育成した。T₃世代の植物組織からMeOH抽出を行い、その二次代謝産物組成についてHPLCにより解析したが、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。また、植物体自体についても顕著な

表現型の変化は観察されなかった。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。

マルバダイオウの成分のLC-MS/MS分析により、rhapontin, piceid, deoxyrhapontigenin, resveratrolが根茎ばかりでなく茎にも存在することを明らかにし、ベンザルアセトン合成酵素の導入により、根茎のみでなく茎に於いてもlindleyinの生成が期待できることを明らかにした。更に、種々のウコン属植物試料のプロトンNMRを測定し、それらのデータの主成分解析(PCA)を行った結果、第1成分と第2成分によるプロットにより、クスリウコン、キョウオウ、ウコン、ガジュツがおおよそそのグループに分かれた。これは含まれる成分、特に低極性の精油成分などが同様なパターンを示すことによるものであると考えられた。

【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PCR-RFLP分析を行った結果、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間をダイレクトシーケンシング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と比較検討した結果、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。更に、PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Poly-morphism)分析を行った結果、PCR-RFLP分析でaタイプ並びにcタイプを示したタンポポは、採集地毎に異なるバンドパターンを示し、遺伝的に異なる複数の系統が存在することが明らかとなった。

マオウの遺伝子による種の鑑別法を検討し、chlB遺伝子のPCR-RFLPによって*E. sinica*と*E. equisetina*を同定し、そのいずれでもない試料についてはITS1領域の884番目の塩基を解読することによって*E. intermedia*を同定するというプロトコールで鑑別が可能であることを見いだした。

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、これらは大きく*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)の3グループに分けられ、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。また、内モンゴル自治区および寧夏回族自治区の7カ所の栽培地のマオウを調査し、外部形態及びDNA解析から6ヶ所での栽培種は*E. sinica*と同定したが、1ヶ所では*E. sinica*と*E. intermedia*両者が混在していた。更に、混在が認められた栽培地のマオウのエフェドリン型アルカロイドを分析したところ、*E. sinica*と同定された個体はエフェドリンを多く含み、*E. intermedia*と同定されたものはプソイドエフェドリンの含量が高かった。

また、薬用植物資源研究センター筑波研究部のEP-13系統のマオウ(*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く、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。発芽種子から得た子葉から鋳型DNAを調製し、RAPD法によるF1種子の雑種検定を行った結果、F1種子には、親株であるEP-13系統には存在しないRAPDマーカーが検出された。

京都薬科大学付属薬用植物園周辺の調査から、花椒、テンダイウヤク、クチナシ、アオモジ、ジギタリスの周辺への逸出の原因は、ジギタリスを除くといずれも鳥類による種子の運搬と考えられた。

(2) 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月に野外栽培圃場(つくば市)において訪花昆虫の調査を行った結果、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、fluorescein diacetateと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°C、湿度60%の条件下で測定した結果130時間であった。

AFLP(amplified fragment length polymorphism)法を用いたベラドンナの遺伝子多様性の解析を検討し、64対のプライマーの中から検出される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カ所の研究所から入手したベラドンナ種子から無菌発芽個体を育成し、各集団16個体の若い本葉からDNAを抽出して上述の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。

ベラドンナについては、同種の野生種が我が国に自生しないことから、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、交配試験を行う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。

カルタヘナ担保法で実施が求められている遺伝子組換え体が他植物の成育に及ぼす影響の程度を検討するため、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アレロパシー試験を行った。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、無処理に比べ約20-60%の幼根伸長阻害活性が認められ、遺伝子組換え植物において認められた約30-50%の幼根伸長阻害活性との間に差は認められなかった。

また、環境影響評価項目の一つである国内自生種の生態調査のモデルとして、野生ノラニンジン(ノラニンジン)の生態調査を行い、他殖性が極めて強く、ヘテロ接合度は0.1872から0.2264であること、北海道に於ける主たる訪花昆虫はナミハナアブ(*Eristalis tenax* Linnaeus)であり、花粉の寿命は最大10日であること等を明らかにした。更に、ナミハナアブの多数の個体について行動様式・移動距離の観察・測定を行い、モンテカルロシミュレーションに基づく飛行距離推定ソフトを開発・活用して1日あたりの行動様式・移動距離を推定し(1日約30.8m移動)、この結果と花粉寿命から、ノラニンジンにおける昆虫を介した花粉による遺伝子拡散距離は最大308mと推定した。

(3) 形質転換により作成したERF3ir,

ERF4ir導入タバコ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。形質転換体でのこれらの遺伝子の発現抑制に伴う効果を観察した結果、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。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等】

(1) ウイキョウ、オミナエシ、オオツツラフジ、カラスビシャク、ヨロイグサ、カキドオシ、エンゴサク、クソニンジン等について栽培試験並びに特性調査を行い、標準的な栽培方法を確立した。これらのうち、ウイキョウ、オミナエシ、オオツツラフジ、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」として出版した。

また、植物の受粉様式に関する文献調査を行うとともに、ハトムギ、ゲンノショウコ、クコ、ジオウなどについて袋掛け実験等から各々の受粉様式を推定した。

(2) オウゴンでは、栽培品と野生品との間に道管の配列等について相違が観察され、両者が形態的に区別できる可能性が示唆された。一方、栽培の歴史の長いバクモンドウについては、特に行き届いた管理の下に生産されたとされる産地の商品はおおきさが揃っていて外見上は良品と思われた。

D. 考察

【遺伝子組換え薬用植物の作出と成分変化

の評価】

ベラドンナに関しては、日本産および外国産の毛根病菌によって形質転換効率は菌の系統によって大きく異なったものの、比較的容易に形質転換した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ることができた。こうして得られた形質転換体は、遺伝子組換え薬用植物の評価モデルとして非常に有用である。

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。ベルベリン輸送体遺伝子を導入した植物では、この遺伝子の発現が野生型より低下し、ベルベリン含量の低下が見られた。これは遺伝子導入によるコサプレッションの結果と思われるが、輸送体遺伝子の発現低下によりベルベリン含量が低下したことは興味深い。

マルバダイオウへの外来遺伝子の導入においては、リゾビウム感染後の不定芽形成効率が悪く、組換え植物作出には至らなかった。遺伝子組換え薬用植物の作出では、植物体再生のステップが障害になっていると思われることから、植物体再成功率を上げる技術或はこのステップを必要としない種子への遺伝子導入技術の確立が、今後の重要な課題であろう。

ケシのリゾビウム感染によるT-DNA挿入型形質転換体では、テバイン含有量とT-DNAの挿入パターンには相関が無いことが判明した。また、ニチニチソウの配糖化酵素を導入したシロイヌナズナ培養細胞では、野生型では蓄積が見られないconiferinの蓄積が見られたが、再生植物体では野生株と比較して顕著に変化した代謝物は認められなかった。これらの結果は、高等植物における二次代謝物の生産調節は複雑な機構で制御されており、その生産能の改変のためには、生合成経路に直接もしくは間接的に関わる酵素・遺伝子群の網羅的な理解、そしてそれらを制御する技術が必要であることを改めて示すものである。本研究では、ダイオウ、ケシ、マオウについて有効成分の生合成に関与する遺伝子

の解析を進めたが、成分の意図的な改変を目的とした遺伝子組換え薬用植物を作出するためには、このような基礎研究を更に進める必要がある。

遺伝子組換え薬用植物の成分を評価する手法として、LC-MS/MS並びにプロトンNMRスペクトルを用いた主成分分析を検討した。LC-MS/MS分析は、微量成分の検出に適した手法であり、変化が予想される化合物群の評価だけでなく、成分全体の変化を評価する手法としても有用と思われる。また、NMRを用いた主成分分析は、成分組成の傾向を大きく捉えるのに有効であり、組換え体の成分評価の最初のステップとしての利用が考えられるが、今後更に検討を重ねる必要がある。また、有効性・安全性に影響の大きい生理活性の強い微量成分の分析に関しては、モノクローナル抗体を用いたアッセイが有効であろう。

【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】

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、更にPCR-SSCP分析を行った結果、aタイプ並びにcタイプを示したものについては、採集地毎に遺伝的に異なる複数の系統の存在が示された。このように北海道に分布するタンポポは遺伝的に極めて多様であることが明らかになるとともに、葉緑体DNAの*trnT-trnF*間塩基配列から、外来種タンポポと在来種タンポポとの種間雑種にこれまで考えられていたものとは異なる新しいタイプの雑種形成の可能性が示唆された。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。

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を調べた所、RAPDマーカーによるDNAタイプ

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。

ベラドンナは他殖だけでなく一定の頻度で自殖をするが、AFLP法により遺伝子多様性を調べた結果、他殖の強いノラニンジンに較べ遺伝子多様性は低かった。また、ベラドンナとノラニンジンの花粉の寿命を決定するとともに、主たる花粉媒介昆虫を同定し、ノラニンジンについては花粉媒介昆虫の行動パターン解析を行い、虫媒花に於ける花粉最大飛距離の推定法を確立することができた。これらの手法は他の植物にも適用可能であり、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思われる。

また、カルタヘナ担保法上重要な評価項目の1つである他植物の成長への影響(アレロパシー活性)については、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て実施した。レタス幼根の伸長阻害(アレロパシー)活性は、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で認められたが、両者の活性に差はなく、この活性は導入遺伝子に起因するものではないと結論された。薬用植物はさまざまな生理活性物質を作ることから、アレロパシー活性が強い可能性があり、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。

【薬用植物の栽培特性等】

遺伝子組換え薬用植物を実用化するためには、まずその薬用植物が栽培化されている必要がある。これまでに遺伝子組換え植物が作出されている薬用植物は、ケシ、ベラドンナ、シソ、薬用ニンジン等、栽培化されているもの或は栽培が容易なものに限られている。本研究では、ウイキョウ、オオツヅラフジ、カラスビシャク、ヨロイグサ、カキドオシ、エンゴサク等について栽培特性調査を行ったが、薬用植物の栽培化による安定供給の

確保のみならず、薬用植物の遺伝子組換えを含めた将来に向けての活用のためにも、このような基礎研究が必要である。

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。接ぎ木による増殖は、遺伝的性質を変えずに樹木を増やせる利点があり、木本性の遺伝子組換え薬用植物の短期間での増殖法として有利であるが、異種の台木を使用した場合、利用部位の成分が台木によって変化しないかを検討する必要がある。

E. 結論

近年、様々な遺伝子組換え作物が作出されているが、薬用植物に関しては、ケシ、ペラドンナ等の限られた植物で遺伝子組換え植物の作出が報告されているに過ぎない。この原因の一つは、形質転換細胞（カルス）から植物体への再分化の条件が植物毎に異なり、この再分化に適した条件を設定できるか否かが、組換え薬用植物の作出の成否を分ける重要なポイントとなっているためと考えられる。本研究では、セリバオウレンについて効率の良い組換え体作出条件を確立することができたが、今後多種の薬用植物についての組換え植物の作出を考えると、植物体への再分化過程が必要ない、種子の形質転換法を検討していく必要があるものと思われる。

遺伝子組換え体の成分変化に関しては、配糖化酵素をシロイヌナズナに組込んだ場合のように、培養細胞の状態では導入された遺伝子により成分の大きな変化が認められたにも関わらず、それを再分化させた植物体では成分の変化が見られなかったり、ケシの形質転換体で見られたように、成分変異が導入遺伝子のパターンと関係なく起こっているように見えたりすることが明らかになった。高等植物の二次代謝は、それに関与する様々な因子が複雑に絡み合って制御されている

ものと考えられ、遺伝子組換えによって薬用植物の特定の成分を量的・質的に思い通りに改変するためには、その成分の生合成過程を遺伝子レベルで十分に解析する必要があるものと思われる。また、組換え体の成分評価に際しては、意図していない代謝産物の変動も評価できるように、できるだけ広範な代謝産物の変化を評価できる手法を用いることが重要である。

遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響の評価に関しては、本研究で行ったアレロパシー試験のように、多くの場合農作物の組換え体で行われる評価手法が適用可能と思われる。環境影響評価に際しては、種子の稔性、発芽性、栄養繁殖性、花粉の性質、交雑和合性など、植物自体の性質を知る必要があるが、栽培の歴史の長い農作物とは異なり、薬用植物に関してはこのような性質はほとんど調べられていないのが現状である。遺伝子組換え薬用植物を実用化するためには、まず作物としての栽培法が確立されている必要があり、さらに遺伝子組換え素材として、遺伝的に均質な系統が必要である。このような観点からも、薬用植物の作物としての研究が重要であるものと思われる。また、国内に自生する野生薬用植物の遺伝的多様性についてはこれまでほとんど調べられていないことから、本研究で開発された手法を活用して調査を行うことが重要であろう。

本研究では、遺伝子組換え薬用植物を実用化するために必要な、栽培・増殖、成分の生合成に関与する遺伝子、組換え体作成技術、組換え体の成分評価、環境影響評価について検討を加え、具体的な成果を上げるとともに、今後の課題も明らかにできた。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、その有用性を飛躍的に拡大する可能性のある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。本研究の成果を踏まえ、実用化に向けた基礎研究を着実に進めることにより、遺伝子組換え薬用植物を実用化する道が拓けるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) I. Abe, T. Watanabe and H. Noguchi; Enzymatic formation of long-chain polyketide pyrones by plant type III polyketide synthases; *Phytochem.*, 65, 2447-2453 (2004).
- 4) Ikuro Abe, Yoriko Utsumi, Satoshi Oguro and Hiroshi Noguchi; The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide, *FEBS Letters*, 562, Issues 1-3, 171-176 (2004).
- 5) Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y, A one-step immunochromatographic assay for detecting ginsenosides Rb1 and Rg1, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (5): 1338-1341 (2004).
- 6) Ochiai T, Soeda S, Ohno S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingomyelinase-ceramide signaling by increasing glutathione synthesis, *Neurochem. Int.*, 44 (5): 321-330 (2004).
- 7) Zhu SH, Shimokawa S, Tanaka H, Shoyama Y, Development of an assay system for saikosaponin a using anti-saikosaponin a monoclonal antibodies, *Biol. Pharm. Bull.*, 27 (1): 66-71 (2004).
- 8) Kim JS, Tanaka H, Shoyama Y, Immunoquantitative analysis for berberine and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines, *Analyst*, 129 (1): 87-91 (2004).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) I. Eguchi, M. Umehara, M. Ono and H. Kamada, Proposal to investigate gene flow and gene diversity using carrot (*Daucus carota* L.). *In Proceedings of Korea Conference on Innovative Science and Technology 2004 — GM Crops and Foods -Potential, Safety & Environmental Impact.* pp. 69-82 (2004).
- 14) Mikage M., Kondo N., Yoshimitsu M., Nakajima I., Cai S.Q., Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 2. On the Current situation of the Cultivation of *Ephedra* Plants in China, *Natural Medicines*, 58, 312-320 (2004).
- 15) Takahata, K., Takeuchi, M., Fujita, M., Azuma, J., Kamada, H., Sato, F., Isolation of putative glycoprotein gene from early somatic embryo of carrot and its possible involvement in somatic embryo development. *Plant Cell Physiology*, 45(11):1658-68 (2004).

- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) I. Abe, S. Oguro, Y. Utsumi, Y. Sano, and H. Noguchi; Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides: Chain Length Control in an Octaketide-Producing Plant Type III Polyketide Synthase, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (36), 12709-12716 (2005).
- 20) 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).
- 21) Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y, Rapid detection of glycyrrhizin by immunochromatographic assay, *Phytochemical Analysis*, 16: 370-374 (2005).
- 22) 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).
- 23) Changfeng Long, Nobuko Kakiuchi, Guoyue Zhong and Masayuki Mikage, Survey on resources of *Ephedra* plants in Xinjiang. *Bio. Pharm. Bull.* 28 (2), 285-288 (2005).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) 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).
- 27) 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).
- 28) I. Abe, T. Watanabe, W. Lou, H. Noguchi; Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase, *FEBS Journal (EUR. J. BIOCHEM.)*, 273, 208-218, (2006).
- 29) 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).
- 30) Y. Guo, A. Tsuruga, S. Yamaguchi, K. Oba, K. Iwai, S. Sekita and H. Mizukami: Sequence analysis of chloroplast *ch1B* gene of medicinal *Ephedra* species and its application to authentication of Ephedra Herb, *Biol. Pharm. Bull.*, in press.
- 31) 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.
- 32) Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y, A one-step immunochromatographic assay for detecting glycyrrhizin, submitted.
- 33) Tanaka H, Fukuda N, Shoyama Y, Identification and Differentiation of *Panax* Species by Using ELISA, RAPD and Eastern Blotting, submitted.
- 34) Kim JS, Tanaka H, Shoyama Y, Development of the monoclonal antibody-based ELISA for the isoquinoline alkaloid coptisine and its application to the screening in medicinal plants, submitted.

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代, 士反伸和, 佐藤文彦, 矢崎一史: 物質輸送エンジニアリングによる新規有用植物の育種 1. 遺伝子組換えオウレンの作出, 第 21 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (香川) (2003.8).
- 2) 御影雅幸, 日本東洋医学会・ランチョンセミナー (2003 年 5 月 18 日, 福岡市).
- 3) 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, 日本生薬学会第 50 年会 (2003 年 9 月, 東京).
- 4) 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, 日本生薬学会第 50 年会 (2003 年 9 月, 東京).
- 5) 関田節子, 麻黄の試験栽培, 薬用植物フォーラム 2003 (2003 年 7 月, つくば市).
- 6) 御影雅幸, 中国の麻黄資源と栽培問題, 薬用植物フォーラム 2003 (2003 年 7 月, つくば市).
- 7) 中根孝久, 淵野裕之, 高橋真理衣, 飯田修, 柴田敏郎, 香月茂樹, 関田節子, 佐竹元吉: マオウ科 *Ephedraceae* 植物のエフェドリン含量 IV—国内栽培試験種及び国外野生種—, 日本生薬学会第 50 回年会 (東京) (2003 年 9 月).
- 8) 金俊植, 田中宏幸, 正山征洋, 抗ベルベリンモノクローナル抗体を用いた ELISA と HPLC 法の相関, 日本生薬学会第 50 回年会 (東京), 要旨集 p.188 (2003 年 9 月).
- 9) 士反伸和, 吉松嘉代, 佐藤文彦, 矢崎一史: オウレン形質転換体を用いた CjMDR1 の機能解析, 日本植物生理学会 2004 年度年会 (東京) (2004.3).
- 10) 吉松嘉代, 柴田敏郎, 木内文之, 飯田修, 関田節子, 牧野由紀子: ケシ属植物の形態とアルカロイド, 日本薬学会第 124 年会 (大阪) (2004.3).
- 11) 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) (2004.8).
- 12) 吉松嘉代, 士反伸和, 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) (2004.8).
- 13) 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, 2004.9).
- 14) 王麗雲, 大塚 讓 他, 酵母 PDI の生産, 日本農芸化学会 (2004, 年広島).
- 15) 阿部郁朗, 内海依子, 佐野幸恵, 小黒聡, 野口博司, 大黃由来新規 III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析, 日本薬学会第 124 年会 (大阪) 31-P2-440 (2004).
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 高野明人 他, 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).

- 21) 高野明人 他, 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).
- 22) 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, 日本薬学会第 124 年会 (2004 年 3 月, 大阪).
- 23) 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)内モンゴル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).
- 24) 中島育美, 隆長鋒, 近藤直子, 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).
- 25) 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 (招待講演) .
- 26) H. Kamada: An update on regulating genetically modified plants (including foods/food additives) in Japan ---Assessment of food safety and environmental effects. 4th ASEAN-ILSI Training Workshop on Safety and Risk Assessment of Agriculture-Related GMOs, Aug. 31-Sept. 2, 2004, Jakarta, Indonesia (invited speech).
- 27) 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.
- 28) 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).
- 29) 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. Gyeongju, Korea, Nov. 9-12, 2004 (invited speech).
- 30) 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.
- 31) 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, 札幌) 講演要旨集 p.28.
- 32) 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, 札幌) 講演要旨集 p.28.
- 33) 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) (2005.3) .
- 34) 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) (2005.3) .
- 35) 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 (2005.7, つくば) .
- 36) 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, 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 (2005.8) .
- 37) 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).
- 38) 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.
- 39) 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).
- 40) 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).
- 41) Akiyama T, Arai T, Liu H-M, Yoshimatsu K, Kunugi A, Shibuya M, Ebizuka Y, Yamazaki T, Tanamoto K: Biosynthesis of phylloidalin in *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2005.12).
- 42) 王麗雲, 大塚 讓 他, 酵母 PDI の生産, 分子生物学会大会 (2005, 年福岡).
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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, 日本生薬学会第 52 年会 (2005 年 9 月, 金沢).
- 47) 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.
- 48) 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) (2006.3) .
- 49) 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) (2006.3) .
- 50) 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 *pal* 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) .
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 「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)
- 2) 佐藤文彦, 申請準備中

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

(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 河野徳昭

(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

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、組換え体の保存法の開発、そして組換え体の評価に関す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、輸送タンパク質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。さらに、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感染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

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、セリバオウレンの効率的な組換え体作出法を確立し、種々のベルベリン生合成関連遺伝子を導入した組換え植物体の作出ならびに評価を行い、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。

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う。

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有用二次代謝産物であるアヘンアルカロイドを生産する重要な薬用植物のひとつである。

本研究においては、まず、ケシのリゾビウム感染によるT-DNA挿入型形質変異体における、リゾビウム感染のアヘンアルカロイド生合成能へ及ぼす影響について調査を行う。ついで、ケシゲノムへのリゾビウムT-DNAの挿入部位を解析することにより、アヘンアルカロイド生合成能とT-DNA挿入部位との関連を調べ、アヘンアルカロイド生合成経路の関連酵素・遺伝子群に係る新たな知見を得ることを目的とする。

さらに、形質変異体の自殖後代植物におけるT-DNA挿入部位の後代植物への遺伝様式を解析し、アヘンアルカロイド生合成能と、T-DNAの遺伝様式との関連について解析する。その結果から、T-DNAのケシゲノムへの挿入がアヘンアルカロイド生合成経路関連

酵素・遺伝子群に及ぼす影響について遺伝子レベル、化合物レベルで検討を加え、薬用植物の有用二次代謝物生合成能の改変のための基盤情報とすることを目的とする。

また、同後代植物におけるケシゲノム由来T-DNAのホモ個体の選抜を行うことにより、遺伝子組換え植物の環境に及ぼす調査における、交配実験に用いる外来遺伝子導入植物の作出を目的とする。

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う。

B. 研究方法

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(*gus*: β -glucuronidase)、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: *Coptis japonica* multidrug resistance 1, DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AB043999) 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、下記の