

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

分担研究者 関田 節子

徳島文理大学香川薬学部 教授

薬用植物の特定成分に関わる遺伝子を解明し、組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に麻黄を選んだ。麻黄の薬効成分の一つエフェドリンの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及び上流遺伝子である *pal* 遺伝子のクローニングと機能解明を行った。

A. 研究目的

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。世界各地では未利用植物を含め、絶滅に瀕している薬用遺伝資源も多数ある。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遺伝子を組み込んだ組換え作物の花粉や種が周囲に飛び散り、自然や生態系に悪影響を及ぼすという問題が起きている。遺伝子組換え技術の薬用植物への応用は、海外で薬剤耐性薬用ニンジン作出が報告されている。生合成遺伝子を明らかにすることは、組換えタンパク質を利用した *in vitro* における薬効成分の酵素的全合成、あるいは、遺伝子改変による薬効成分高生産植物の作出が可能となり、化学的合成や植物体からの抽出のみに依存しない新規医薬品生産方法の創出、および、その低コスト生産を実現できる等の利点があり今後もその件数は増えるものと推測される。このような中、組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、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、更に組換え時に生成する成分を検出することを目的とし、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。先ず基礎となる組織培養法の確立を検討し、次いで Ephedrine 系アルカロイド生合成の上流遺伝子である *pal* 遺伝子のクローニングと機能解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

1) 組織培養法の検討: 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: 初めに種子を 70 % エタノールで、続いて次亜塩素酸ナトリウム溶液で滅菌後、培地に置床した。培地は Murashige & Skoog 寒天培地に、オーキシシン(NAA)及びサイトカイニン(BA)の比率を変えた3種の培地を作成し、

[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)], 6-well プラ

スチックプレートに 6 mL ずつ分注後、12 時間明期 - 12 時間暗期、温度 25 °C。で培養した。

2) 遺伝子のクローニングと機能解析: *E. sinica* の種子をバーミキュライト・川砂混合土に播種後、地上茎が第 4 節まで分化した植物体の地上茎と根を別に用いた。種子は金沢大学大学院自然科学研究科・御影雅幸教授より分与頂いた。

タンパク質抽出バッファー (200 mM Bis-Tris Propane/HCl [pH 8.5], 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA [pH 8.0], 0.1 g/g [fresh weight] PVPP) を用いて粗タンパク質溶液を得た。タンパク質の定量には Bradford 法を用いた。次いで酵素反応を行い、生成する L-Phe 由来 *trans*-Cinnamic acid および L-Tyr 由来 *p*-Coumaric acid を酵素活性の指標とし、これを HPLC-UV により測定した。分離カラム: COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 150 mm, 5 μm) (nacalai tesque)、溶離液 A: 3% AcOH/H₂O、B: CH₃CN のグラジエント送液 (0→100%B)。 *trans*-Cinnamic acid は 278 nm、*p*-Coumaric acid は 310 nm の波長で検出した。酵素の活性強度は、生成化合物のモル数をタンパク質量と反応時間で除した比活性として表した。*pal* 遺伝子のクローニングは、植物体より total RNA を抽出後、アダプター領域結合型オリゴ dT プライマーを用いて mRNA の逆転写反応を行ない、cDNA を合成した。このアダプター領域と相補的なプライマー (Adp)

5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'

と、既知の植物由来 *pal* 遺伝子のホモロジーよりデザインした縮重型プライマー (*pal*-dg-F):

5'-GAYCTIBGTYCCBYIVTCYTA-3'

との組み合わせにより PCR を行なった。

これを鋳型として、*pal*-dg-F と、同様にしてホモロジーよりデザインした縮重型プライマー (*pal*-dg-R):

5'-AGYTCNGWRAAYTGVCRAACAT-3'

との組み合わせにより nested PCR を行ない、得られた特異的増幅産物の塩基配列より、3'-RACE のためのプライマーを 2 種類デザインした。これを鋳型としてプライマー Adp と *pal*-3RC-F2 の組み合わせにより nested PCR を行なった。

塩基配列のシーケンシングは、Dideoxy-Chain Termination 法により行った。得られた塩基配列の相同性検索は、BLAST 2 により行った。また、分子進化系統解析には DNASIS Pro Ver. 2.06 (HITACHI Software) を用い、CLUSTAL W アルゴリズムを利用して行った。

C. 研究結果

1) 組織培養法の検討: オーキシン及びサイトカイニンの比率を変えた 3 種の培地で、カルスが誘導されることが明らかとなったが、満足する Ephedrine 含量を得るには、更に検討が必要である。

2) 遺伝子のクローニングと機能解析: 地上茎における PAL 比活性は 41.3 ± 5.5 nmol/mg protein/hr、根では 282 ± 42 nmol/mg protein/hr であり、地上部に比して根で約 7 倍強いという結果を得た。この結果から地上部のみならず根を含めた植物体全体を対象として *pal* 遺伝子のクローニングを行った。既知の植物由来 *pal* 遺伝子の相同性に基づいてデザインした縮重型プライマーを用いて RT-PCR を行い、674 bp の特異的増幅断片を得た。次いで、3'-RACE を行ない、新規領域として、ストップコドンを含む 3' 末端 ORF 領域、3'-UTR、mRNA 末端領域と考えられるポリ A 部分を含む約 1200 bp の特異的増幅断片を得た。現在 5'-RACE を行なっている。

D. 考察

Ephedrine 系アルカロイド類の含有量は種間あるいは同種であっても環境条件などにより差があることが知られていて、生薬の基原植物としては中国

産の *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* に限定されている。近年、中国は麻黄の産地の砂漠化を防止する目的で採取を制限したことから野生植物のみに依存せず、栽培化が勧められている。そこで栽培時の種株の選択あるいは分子生物学的生産を考慮し、組織培養及び植物体における Ephedrine 系アルカロイド生合成遺伝子の解明を開始した。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。

Ephedrine 系アルカロイドの多くは地上部に蓄積するにも関わらず、PAL 比活性は地上部より根において強く検出された。このことより、植物体内における Ephedrine 系アルカロイド生合成の初期過程は、地上部以外においても進行している可能性が考えられた。このことは、今後、遺伝子組換えの技術を応用して Ephedrine 系アルカロイド高生産細胞培養系あるいはカルス誘導系等を確立する上で有用な知見である。

組換えタンパク質を利用した *in vitro* における Ephedrine 系アルカロイドの酵素的全合成、あるいは、遺伝子改変によるアルカロイド高生産植物の作出を行なうためには、*pal* を含めた生合成反応触媒酵素遺伝子のクローニングと機能解析が必要不可欠である。今後、それら遺伝子を明らかにしてい

くとともに、同定した遺伝子については上述の応用研究を進めていく予定である。

E. 結論

Ephedrine 含有量についてはさらなる検討が必要であるが、良好なカルス誘導が見られた。*E. sinica* の PAL 比活性を測定した結果、根は地上部に比して約 7 倍強いことが明らかになった。そこで、全草における *pal* 遺伝子のクローニングを行い、*pal* 遺伝子 ORF の 674 bp を同定した後その 3' 末端塩基配列を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

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：岡田岳人、山崎真巳、御影雅幸、関田節子、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

なし

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

薬用植物の育種には薬効成分を簡便・高感度に定量するアッセイ系の確立が必須である。我々は各種生薬成分に対し、特異的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。さらに我々は小型化抗体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など、新しい分子育種法を確立しており、これをカンゾウ等に適用するため種々の基礎的研究を行った。

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。そこで我々は研究 1 として、オウレン、オウゴン等の薬理活性成分に対し、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構築した。

一方、本課題では遺伝子工学的手法を取り入れ、薬用植物の分子育種についても検討を行った。研究 2 としては、ステロイドホルモンの原料となりうるソラソジン配当体の生産種である *Physalis minima* Linn. にアグロバクテリウム・リゾゲネスを感染させた組み換え毛状根を作出し、ソラソジン配糖体の高生産を検討した。

一方、我々は生薬成分に特異的な抗体の可変領域を組み合わせた小型化抗体 (scFv) の遺伝子を用いた薬用植物の遺伝子組み換えについて検討を行っており、既に、抗 solamargine scFv を *Solanum khasianum* に導入することで、solamargine の含量をコントロールする新たな分子育種法を確立し報告している。そこで本法をカンゾウについて応用するためのファーストステップとして、グリチルリチンに対するモノクローナル抗体から scFv を作製し、その抗体活性につい

て検討を行った (研究 3)。

B. 研究方法

研究 1 モノクローナル抗体の作製と応用

1-1 モノクローナル抗体 (Mab) の作製と高感度アッセイ系の構築

オウレンの berberine から熱処理により berberrubine を誘導し、これとモノクロル酢酸を反応させることで carboxymethyl-berberrubine を調製した。本化合物をハプテンとしてカルボジイミド法により免疫原であるコンジュゲートを作製した。オウゴンの baicalin については、カルボジイミド法により直接キャリアータンパクに結合し、免疫原を作製した。いずれのコンジュゲートも、免疫原のキャリアータンパクとして BSA を用い、ELISA 用固相化抗原では ovalbumin を用いた。得られた免疫原をマウス腹腔に投与し血中抗体価上昇を確認した後、脾臓を摘出、脾細胞を調製した。調製した脾細胞とミエローマ細胞を混合し、PEG を滴下することで細胞融合を行った。

続いて、HAT (hypoxanthine, aminopterin, thimizine) 培地で細胞を培養することで選択的にハイブリドーマを得た後に、限界希釈法により目的の抗体産生ハイブリドーマを

クローニングした。クローニングの終えたハイブリドーマを無血清培地で大量培養した後、培地中に分泌された MAb を protein G アフィニティーカラムを用いて精製し、これを ELISA 用一次抗体として用いた。

ELISA としては、イムノプレート上での固相化抗原と遊離抗原との競合による競合的 ELISA を採用した。

1-2 Ginsenoside Rb1, Rg1 に対する MAb を用いた同時分析キットの開発

膜へのトラップ用の G-Rb1-HSA, G-Rg1-HSA をそれぞれニトロセルロース膜上の適当な位置に塗布し、吸着させた。続いて、抗 G-Rb1 MAb, 抗 G-Rg1 MAb を金コロイド標識し、コンジュゲーションパッドに装着することでスティック状キットを作製した。ニンジンエキスをスティック下部に浸すことで、膜上をサンプルが移動し、その過程でサンプルと金コロイド標識抗体が複合体を形成する。この複合体並びにサンプル中の ginsenoside と複合体を形成しなかった標識抗体が、膜状の固相化抗原上を通過する際、遊離の標識抗体が補足されることで生じる赤紫色のスポットの発色強度を測定し、ginsenoside 含量を算出した。

研究 2 *Physalis minima* Linn. 組み換え毛状根による物質生産

2-1 *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、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 1/2MS 培地に移し除菌後、培養することで毛状根を形成させた。

2-2 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。

2-3 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 IELISA 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。

研究 3 抗 glycyrrhizin scFv の作製と性質

3-1 scFv 遺伝子のクローニング

抗 glycyrrhizin (GC) MAb 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。

3-2 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 (+) に組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換した。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 GC の定量分析に応用可能であることを確認するため、競合的 ELISA を行った。

3-3 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 glycyrrhizin を固相化した直接的 ELISA および競合的 ELISA により測定した。

C. 研究結果と考察

研究 1 に関する結果と考察

オウレンの berberine, coptisine, parmatine に対して親和性を有する MAb が得られた。本 MAb を用いて競合的 ELISA を確立した結果、 $1.56 \mu\text{g/ml} \sim 50 \mu\text{g/ml}$ の範囲で正確な分析が可能であることが判明した。また、旧来の HPLC 法による分析結果と良好な相関が得られ、信頼性の高い分析法であることを確認した。本法を用いて、オウレン並びにオウレン配合漢方製剤中の berberine 関連化合物の含量を分析した結果、本手法により極めて多種類の成分の混在したサンプルについても高い精度を持って分析可能であることを証明した。

オウゴンの baicalin に対する MAb は、baicalin のアグリコンである baicalein に

対して高い親和性を示すことが判明した。Baicalin が生体内で baicalein に代謝されることを勘案すれば、本抗体を活用した ELISA は薬物動態学的に極めて有用な手段となり得る。

さらに、Ginsenoside Rb1, Rg1 分析用キットを作出し、その性能を評価した。本キットは、競合的 ELISA を応用しており、スポットの発色強度の低下の度合いが、サンプル中の ginsenoside 含量を反映することとなる。本キットの検出限界について調査した結果、 $2 \mu\text{g/ml}$ の検出感度を有することが明らかとなり、続いて各種ニンジンエキスを分析した結果、発色強度から算出されるエキス中の含量と ELISA の定量値に高い相関性を認めることが出来た。

研究 2 に関する結果と考察

まず、1/2MS 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 mg/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 mg/g dry wt. であった。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) 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。

研究 3 に関する結果と考察

クローニングした V_H , V_L の塩基配列を決定した後、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。そこで、inclusion body のタンパクを巻き戻し、直接法 ELISA で活性を確認した。

次いで得られた 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 μ g / 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らかとなった。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、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。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。

昆虫由来の 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。

D. 結論

研究 1 に関する結論

オウレンとオウゴンの薬理活性成分に対する MAb を作製し、本抗体を活用して、簡便・高感度な分析法を確立した。本法は、生薬オウレン・オウゴンや漢方製剤の品質評価法として有用であり、有機溶媒を必要としない環境に優しい次世代型の分析法である。

ニンジンの有効成分である G-Rb1, G-Rg1 の分析キットを完成させた。本キットの検出限界は 2 μ g/ml であり、極めて簡便であり、目視判定が容易な現場測定に適した手法である。

研究 2 に関する結論

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、既に件製している坑ソラマルジン小型化抗体遺伝子を *P. minima* Linn. に導入した後、遺伝子組み換え薬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。

研究 3 に関する結論

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

発表論文

1. 発表論文

1. Putalun W, Taura F, Qing W, Matsushita H, Tanaka H, Shoyama Y, Anti-solasodine glycoside single-chain Fv antibody stimulates biosynthesis of solasodine glycoside in plants, *Plant Cell Rep.*, **22** (5): 344-349, 2003.
2. Lu ZH, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y, A quantitative ELISA using monoclonal antibody to survey paeoniflorin and albiflorin in crude drugs and traditional Chinese herbal medicines, *Biol. Pharm. Bull.*, **26** (6): 862-866, 2003.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y, A one-step immunochromatographic assay for detecting glycyrrhizin, submitted.
8. Tanaka H, Fukuda N, Shoyama Y, Identification and Differentiation of *Panax* Species by Using ELISA, RAPD and Eastern Blotting, submitted.
9. 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.
10. 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.
11. Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y, Rapid detection of glycyrrhizin by immunochromatographic assay, *Phytochemical Analysis*, **16**: 370-374, 2005.
12. 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.

13. 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.

2. 学会発表

1. Zhaohua Lu, Tadashi Masaki, Hiroyuki Tanaka and Yukihiro Shoyama,
Expression, purification and characterization of a functional anti-paeoniflorin single-chain Fv in *Escherchia coli*, 日本薬学会第123年会 (長崎)、27 【P1】 I-137
2. 正木 雅、田浦太志、田中宏幸、正山征洋、
Glycyrrhizin 特異的scFv の作製と大腸菌での発現日本薬学会第123年会 (長崎)、27 【P1】 I-138
3. 来海温子、西里洋平、山門亜喜代、吉田瑞樹、田中宏幸、平山総良、正山征洋、
免疫化学的手法による黄精品質評価法の開発、日本薬学会第123年会 (長崎)、27 【P1】 II-142
4. 森永 紀、田中宏幸、正山征洋、
Sorasak Lhieochaiphant、Waraporn Putalun、抗senenoside A、B モノクローナル抗体によるconcurrent ELISA およびイムノクロマトグラフ法を用いた迅速分析キットの開発 (長崎)、日本薬学会第123年会、28 【P1】 I-124
5. Waraporn Putalun、森永 紀、Sorasak Lhieochaiphant、田中宏幸、正山征洋、
免疫化学的手法によるセンノシド迅速分析キットの開発、(社)日本植物園協会第38回大会・総会 (群馬) 第10回研究発表会 研究発表要旨 p. 9

6. 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

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

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、これらの植物は、中国大陸産タンポポやセイヨウタンポポ等の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、PCR-RFLP 分析で雑種起源と考えられた植物中、5 個体について、葉緑体 DNA、*trn T - trn F* 間のダイレクト・シーケンスを行い、塩基配列を比較した結果、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。次に、PCR-RFLP 分析で雑種起源と考えられた個体について、その親個体に関する情報をさらに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、PCR-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、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、雑種の親を探索する方法として利用できる可能性が示された。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、PCR-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になった。以上、PCR-RFLP 分析と PCR-SSCP 分析を組み合わせることにより、種々の遺伝的情報を得ることができた。

A. 研究目的

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、外部形態上セイヨウタンポポと考えられていた子他の中に、実はセイヨウタンポポと日本在来種の種間雑種が非常に多いことが明らかになり、現在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が、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 箇所を切れ、5 種類の断片になる (Fig. 1, Fig. 2 a type)。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, Fig. 2 c type)。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 b type)。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。これらのことを利用して、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 間のダイレクト・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得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。

4. PCR-RFLP 分析でセイヨウタンポポ型 (Fig. 2 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：2. の方法と同じ。

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 断片を増幅した。

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、パセリの葉を使用し、DNA量の標準としてDNA量既知のダイズの葉を使用した。

5. PCR-RFLP分析で在来種型 (Fig. 2 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：4. の方法に準じて行った。

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 type、b type、b' type の 3つのパターンに分けられた (Fig. 3)。

a type 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 type は 288bp と 351bp の両方のバンドを持つ雑種型、b' type 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。

今回、北海道産タンポポ 188 個体について検討した結果、a type が 137 個体、b type が 23 個体、b' type が 28 個体であった。

3. 葉緑体 DNA、*trn T* - *trn F* 間のダイレクト・シーケンス

PCR-RFLP 分析の結果から雑種個体と考えられた植物中 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、エゾタンポポ、セイヨウタンポポ、アカミタンポポ、タカサゴタンポポ、モウコタンポポの塩基配列を比較検討した。

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であった。

4. 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. 4, 5 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、遺伝的に異なる複数の系統が存在することが明らかになった。

5. 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. 6 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. 北海道産在来種タンポポについて、PCR-RFLP 分析を行った結果、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、3つのタイプ (a, b, b' 各 type) 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 b' 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。

2. PCR-RFLP 分析で雑種起源と考えられた植物中5個体について、葉緑体 DNA の *trnT-trnF* 間の塩基配列を決定した結果、5個体中1個体は、セイヨウタンポポやアカミタンポポと相同性の高い塩基配列をもっていた。これまで、セイヨウタンポポと在来種タンポポとの種間雑種は、有性生殖を行う二倍体の在来種タンポポを母親として、セイヨウタンポポの花粉が受精して雑種形成されると考えられてきた。しかし、母系遺伝するとされる葉緑体 DNA の遺伝子配列がセイヨウタンポポに非常に類似した個体を認めたことは、新しいタイプの雑種形成の可能性を示すものといえる。

3. 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すとされた 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. 5 釧路市産)。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。

4. 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 (Fig. 6)。

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

PCR-RFLP 分析と 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。その結果、北海道に分布するタンポポは、高倍数性のシコタンタンポポをはじめとして、遺伝的に極め

て多様であることが確認された。また、これまで考えられていた説とは異なる雑種形成の過程を経たと考えられる雑種個体が見つかった。

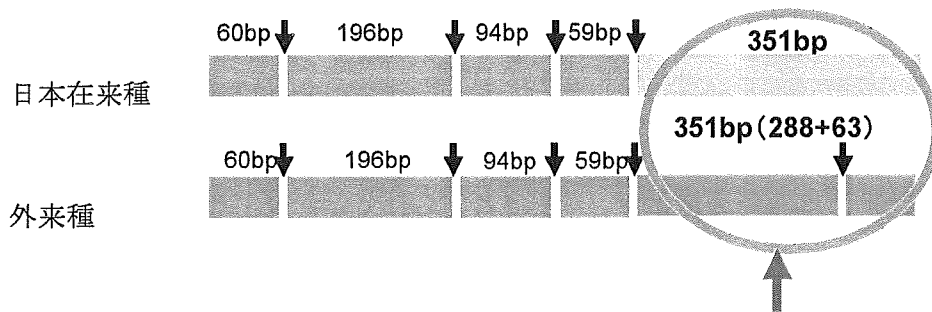
今後、北海道および周辺地域からさらに多くの材料を収集し、データを蓄積することによって、北海道産タンポポ属植物と他の地域のタンポポとの遺伝的交流の実態が解明され、北海道産タンポポの分類学的位置づけが確立されるものとする。また、高倍数性誕生のメカニズムや多様化のメカニズムを解明し、複雑な進化の過程を解明することは、遺伝子組み換え薬用植物を作出した際に起こりえる環境への影響を考える上で貴重な資料となるはずである。

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



この領域を増幅し、SSCP法でバンドの確認
 Fig. 1 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

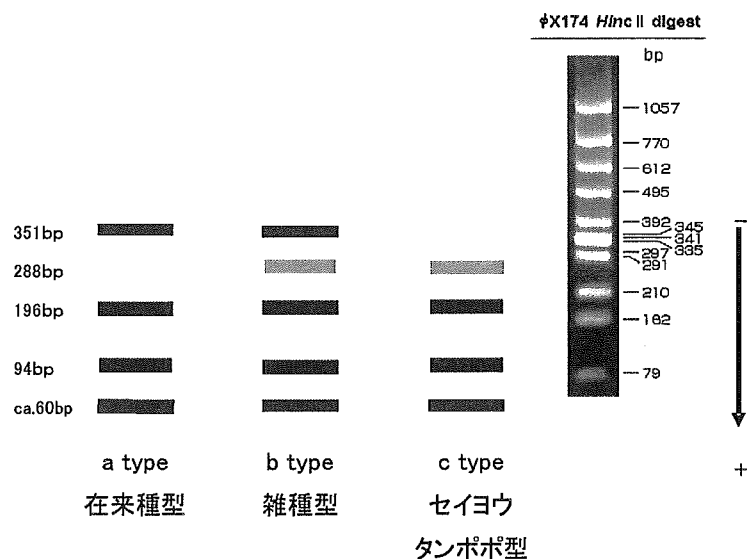


Fig. 2 核 DNA, ITS 領域について、制限酵素 Taq I を用いて、PCR-RFLP 分析を行った際に得られる 3 タイプの代表的なバンドパターン

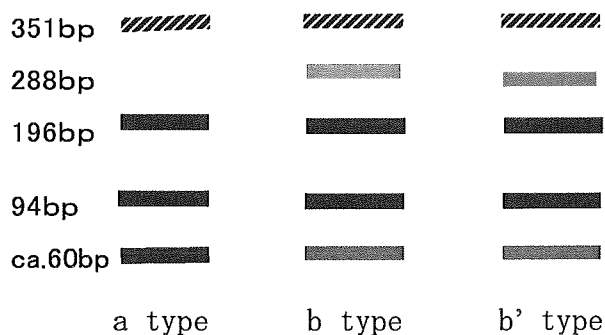


Fig. 3 北海道産タンポポから得られたバンドパターンの 3 タイプ

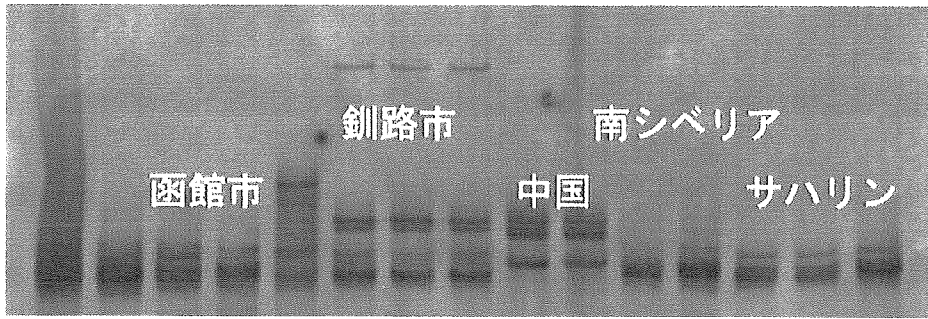


Fig. 4 PCR-RFLP 分析で c type を示した材料の PCR-SSCP 分析で得られた電気泳動像

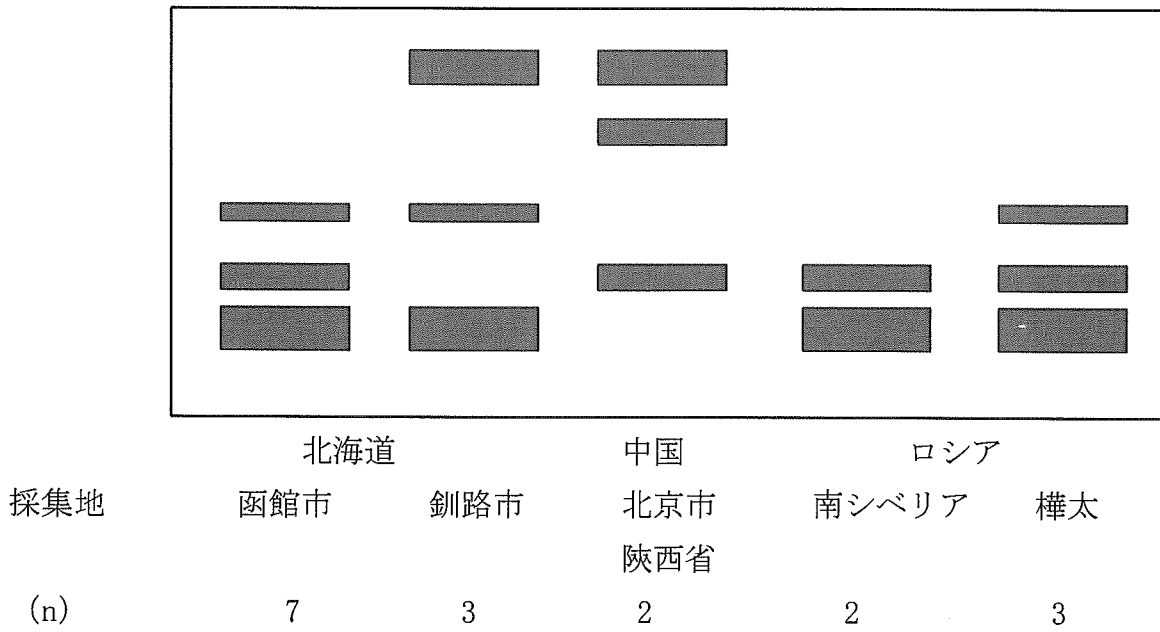
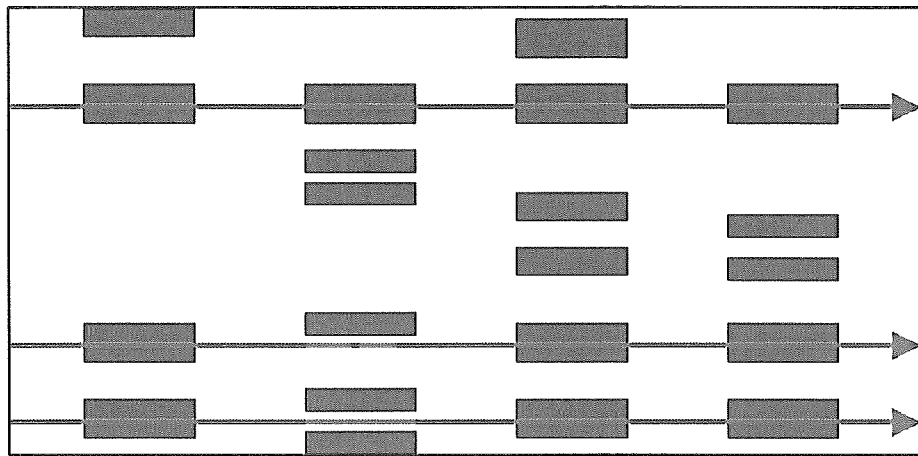


Fig. 5 PCR-RFLP 分析で c type を示した材料の PCR-SSCP 分析結果の模式図



採集地	道西 函館市 厚沢部町	道西 島牧村	道東 釧路市	道央 苫小牧市
(n)	3	1	11	4
FCM の結果	5.8~6.1	6.0	5.6~6.8	5.6~5.8
RFLP の結果	a type	a type	a type	b type

Fig. 6 北海道産四倍体タンポポの PCR-SSCP 分析結果の模式図

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

遺伝子解析による植物と生薬の種鑑別に関する研究

分担研究者 水上 元 名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

遺伝子組換え植物の環境中に対する影響を検討する上では、環境中に生育する種々の植物および植物由来産物（食品、生薬など）の種同定・鑑別を正確かつ迅速に行うことが必須である。

このような観点から、マオウ属植物ならびにそれらを基原とする生薬「麻黄」の *chlB* 遺伝子の塩基配列に基づく遺伝子鑑別法を開発した。

A. 研究目的

遺伝子組換え植物の環境中に対する影響を検討する上では、環境中に生育する種々の植物および植物由来産物（食品、生薬など）の種同定・鑑別を正確かつ迅速に行うことが必須である。

我々は、このような観点から、マオウ属植物ならびにそれらを基原とする生薬「麻黄」の遺伝子鑑別法の開発を目的として研究を実施した。

麻黄は種々の漢方薬に配合されて用いられているほか、エフェドリン製造原料としても重要な生薬である。日本薬局方では麻黄の基原植物として *Ephedra sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* の3種を規定している。しかしながら、1999年からの中国政府による麻黄の輸出禁止措置によって日本には粉末生薬しか輸入されず、麻黄の新しい導入資源の確保が重要な課題になっている。

一般に新しい供給源からの生薬の導入を行う場合には、その基原植物や調製された生薬の同定を正確に行うことが必要である。*Ephedra* 属植物の基本体制は比較的単純であり、また生育環境によってしばしば変化するので外部形態からの同定は困難である。そこで、麻黄の鑑別には、茎横断面の形状、髄と繊維の有無、表皮クチクラの発

達度など内部形態の観察が重要であるが、これらの鑑別指標もしばしば種間で重なりが見られ、その鑑別には高度の熟練が必要である。

そこで、麻黄の新しい供給先からの導入に当たって前提となる種鑑別の手段として、遺伝子鑑別法を開発することを目的として研究を実施した。遺伝子鑑別のマーカーとしては、葉緑体ゲノム上に存在し、光非依存的 *protochlorophyllide reductase* の subunit B をコードしている *chlB* 遺伝子を用いた。

B. 研究方法と結果

まず、ツムラ、生薬・資源研究所標本室に保存されている植物の押し葉標本と生薬標本について、形態学的な再評価を実施し、その結果と標本に付されているラベル名が一致した標本を選定した。その結果、*E. sinica* を基原とするもの14検体、*E. intermedia* を基原とするもの9検体、*E. equisetina* を基原とするもの5検体、また薬用種ではないが特に *E. intermedia* と分布域が重なり、混乱して流通する可能性がある *E. przewalskii* を基原とするもの4検体を解析材料として選んだ。

これらの試料から DNeasy Plant Mini キットを

用いて DNA を抽出し、これを鋳型とし、DNA データベースに登録されている *E. altissima* 由来の *chlB* 遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いて、そのほぼ全長 (約 1.5 kb) を PCR 増幅し、その塩基配列を解読した。生薬中の DNA はしばしば断片化しており、1.5 kb のサイズの増幅産物を得ることができない場合も多い。このような場合には、*chlB* 遺伝子を互いに重複した 4 つの領域にわけ、内部プライマーを用いて増幅と塩基配列の解読を行い、その塩基配列を重ね合わせるにより *chlB* 遺伝子全長の遺伝子配列を決定した。

押し葉・生薬標本 32 検体の *chlB* 遺伝子塩基配列を解読した結果、その塩基配列には 4 つのタイプ (Type S, TypeI-P, TypeE1, TypeE2) が存在していた。標本の基原植物種と配列タイプの関係は明確で、*E. sinica* を基原とする標本はすべて TypeS を、*E. intermedia* と *E. przewalskii* を基原とする標本は全て同一の TypeI-P の配列を有していた。一方、*E. equisetina* を基原とする標本には、2 つの配列タイプ (TypeE1 と TypeE2) が存在していた。

さらに、上記 4 種以外の標本 (*E. gerardiana*, *E. pachyclada*) についても *chlB* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、これらの配列は上記 4 つの配列タイプとは異なっていた。

これらのことから、麻黄の基原種のうち *E. sinica* と *E. equisetina* は *chlB* 遺伝子の塩基配列によって鑑別、同定することができるのに対して、*E. intermedia* は上記 2 種との鑑別は可能であるが、非薬用種である *E. przewalskii* との区別ができないことが明らかになった。最近になって金沢大学のグループは rDNA ITS 領域の塩基配列を解析し、*E. sinica* と *E. intermedia* では同一であり、また *E. intermedia* と *E. przewalskii* では種内変異が認められるが ITS1 領域の 884 番目の塩基では *E. intermedia* はすべて A であるのに対して *E.*

przewalskii では C であることを報告している。そこで、まず *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* を同定するという鑑別プロトコールが可能であると考えられた。

中国市場で入手した麻黄 21 検体の遺伝子鑑別をこのプロトコールにしたがって実施したところ、9 検体は *E. sinica*、3 検体は *E. equisetina*、残り 9 検体は *E. intermedia* または *E. przewalskii* であると同定できた。そこで、これらの 9 検体について ITS1 領域の塩基配列を解読することにより、7 検体が *E. intermedia*、2 検体が非薬用種である *E. przewalskii* であると同定できた。*E. przewalskii* と同定した 2 検体のエフェドリンアルカロイド含量を測定したところ、いずれの検体もほとんどアルカロイドを含んでおらず、遺伝子鑑別の結果とよく一致した。

C. 結論

本研究で確立した遺伝子鑑別法は、新しい供給先からの生薬の同定だけでなく、中国から現在輸入可能な粉末生薬の鑑別にも有力な方法となりえるものと考えられる。

D. 研究発表

Y. Guo, A. Tsuruga, S. Yamaguchi, K. Oba, K. Iwai, S. Sekita and H. Mizukami: Sequence analysis of chloroplast *chlB* gene of medicinal *Ephedra* species and its application to authentication of Ephedra Herb, *Biol. Pharm. Bull.*, in press (2006).

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

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

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のできる PCR による鑑別法を開発した。この結果を踏まえ、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 *E. sinica* 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* 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

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。さらに近年中国各地で開発されている栽培地を調査し、栽培地の現状と栽培種の解析を行う。

B. 研究方法

① 中国産野生 *Ephedra* 植物の調査