

2002-2004 年に、中国河北省、山西省、内蒙古自治区、甘肅省、青海省、新疆ウイグル自治区で採取した野生 *Ephedra* 属植物完全標本のうち明確な同定の行われたものについて、全 DNA を DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて抽出した。核 DNA の internal transcribed sequence1 および 2 (ITS1 and 2)、および葉緑体 DNA である *trnL* intron - intergenic spacer between *trnL* 3' exon and the *trnF* gene (*trnL/F*) を (Fig. 1, 2) にしめす primers を用い、PCR で増幅し、PCR 産物を精製し、塩基配列を決定した。PCR は KOD-plus DNA polymerase (TOYOBO) を、また塩基配列決定は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 (Applied Biosystems) を使用した。

Fig.1 核リボソーム DNA の ITS 領域と各プライマーの結合位置

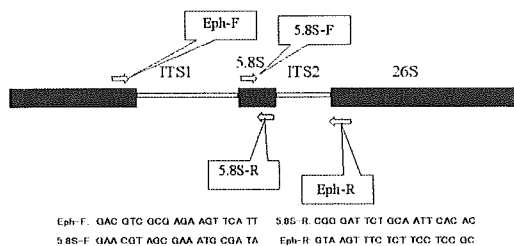
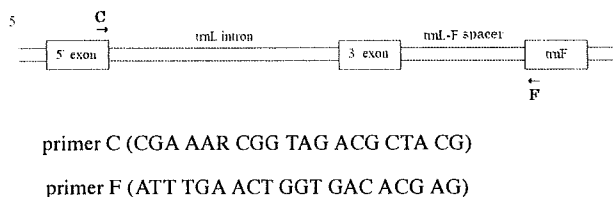


Fig.2 葉緑体 DNA の *trnL/trnF* 領域と各プライマーの結合位置



②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)

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砒寧夏綠苑公司農場 | 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 |

③ *trnL/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 *trnL/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) 中国産野生 *Ephedra* 植物の近縁関係の解明

野生 *Ephedra* 属植物標本の採取地を (Fig.3) に示す。これら標本の核 DNA の ITS1 および 2、葉緑体 DNA *trnL*/F の塩基解析の結果、近縁関係は (Fig 4) に示すようになった。

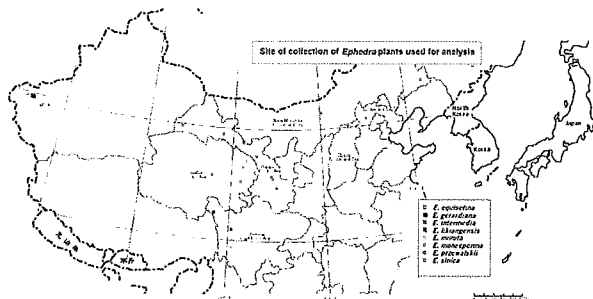
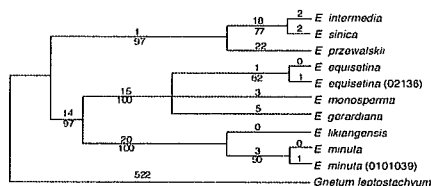


Fig.3 *Ephedra* 属植物標本の採取地

Fig.4 中国産野生 *Ephedra* 属植物8種の近縁関係

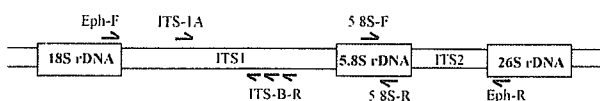


このうち近縁関係のある *E.intermedia*、*E.sinica*、*E.przewalskii*、また *E.equisetina*、*E.monosperma*、*E.gerardiana*、あるいは *E.likiangensis*、*E.minuta* はそれぞれ3グループ(グループ1~3)に分けられることが判った。

(2) DNA 鑑別法の開発

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

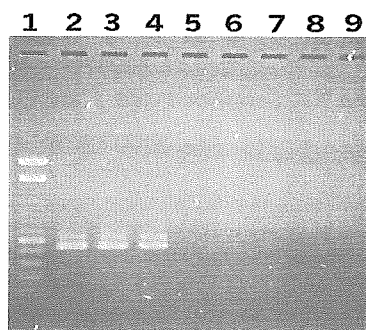
Fig. 4 Primer ITS-B-R (GTGAGCGGCAAGTAA GATCC) が認識すると思われる塩基配列



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

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

Fig. 5 PCRによるグループ1の検出



Condition

Primers:ITS-1A and ITS-B-R, Annealing temp:65°C
Hot start at 94°C for 2 min, 25 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 65°C for 30 sec and elongation at 68°C for 45 sec, and final elongation at 68°C for 5 min.

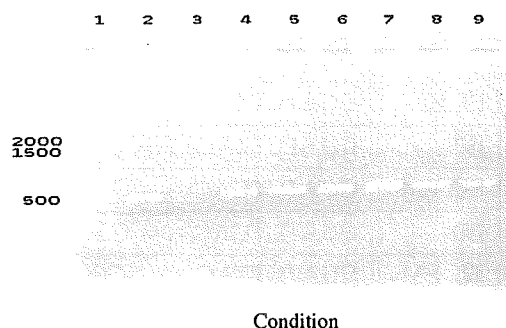
Lane1: 100-bp marker. Lane 2: *E. intermedia*. Lane 3: *E. sinica*. Lane 4: *E. przewalskii*. Lane 5: *E. equisetina*. Lane 6: *E. monosperma*. Lane 7: *E. gerardiana*. Lane 8: *E. likiangensis*. Lane 9: *E. minuta*

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

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

| | |
|-----------------|---------------------|
| | 452-467 |
| EI, EP, EI, EM, | AAATTCGTGTTACCGG |
| EG, EL, EMu | |
| ES | AAATTC - - GTTACCGG |

Fig 7. *E. sinica* 以外の *Ephedra* 属の検出



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

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

(3) 栽培地調査

前記の栽培地①から⑦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* STAPPと推定された。しかし、栽培地⑥では *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。一方、ITS1および 2、また *trn L/F* のDNA塩基配列から①～⑤、⑦は *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 *trnL/F* DNA塩基配列による栽培種の同定

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

| Site ID | Number of Samples | Morphological typing | Result of <i>trnL/F</i> 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 |

(4) *trn L/F* DNAのクローニング

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 *trn L/F* 部分に、2塩基の欠如があり、両者を区別できる。この欠如部分を含むPCRプライマーを用いることにより、*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/F* DNA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 |

(5) 栽培地⑥の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/F* DNA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。

D. 結論と考察

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

(2) 栽培マオウについては、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* と同定された個体はエフェドリンを多く含み、*E. intermedia* と同定された個体はプソイドエフェドリンを多く含む。このよう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. 研究発表

1. 論文発表

1) Changfeng Long, Nobuko Kakiuchi, Akira Takahashi, Katsuko Komatsu, Shaoqing Cai, Masayuki Mikage, Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non-coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of *Ephedra* plants in China, *Planta Medica*, 70 (11), 1080-1084(2004)
Mikage M., Kondo N., Yoshimitsu M.,

Nakajima I., Cai S.Q., *Natural Medicines*, 58, 312-320 (2004)

2) Mikage M., Kondo N., Yoshimitsu M., Nakajima I., Cai S.Q., *Natural Medicines*, 58, 312-320 (2004)

3) 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).

4) 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

1) 隆長鋒、垣内信子、御影雅幸、中国産マオウ属植物の研究 (4) 核内 DNA の解析, 日本生薬学会第 50 年会 (2003 年 9 月, 東京)

2) 近藤直子、隆長鋒、垣内信子、御影雅幸、高橋志保子、中国産マオウ属植物の研究 (5) 栽培地における草質茎のアルカロイド含量と形態の変異, 日本生薬学会第 50 年会 (2003 年 9 月, 東京)

3) 隆長鋒、垣内信子、御影雅幸、中国産マオウ属植物の研究 (10) 核及び葉緑体 non-coding DNA の解析, 日本生薬学会第 124 年会 (2004 年 3 月, 大阪)

4) 御影雅幸、近藤直子、吉沢千絵子、垣内信子、陳虎彪、高橋晃、安田和弘、高橋志保子、中国産マオウ属植物の研究 (12) 内蒙古産マオウ属植物のアルカロイド, 日本生薬学会第 51 年会 (2004 年 9 月, 神戸)

5) 中島育美、隆長鋒、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)

6) 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)

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世界的に活発に進められており、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を実施するための評価法を検討することが急務となっている。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モデル材料とし、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、組織培養技術を活用して多数の形質転換個体（毛状根からの再分化個体）を育成し、その特性解析と環境影響評価を行うこととした。形質転換ベラドンナおよび非形質転換個体との戻し交雑第1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た結果、詳細に調査した系統（M8）では3コピーのT-DNAが挿入されており、胚軸や節間が短くなる矮性形質等の特徴的な形質を示し、T-DNAが内在遺伝子と同様の遺伝様式で後代に伝達されるのに伴い、後代においてもT-DNA上の遺伝子が安定して機能し、この特徴的な形質を示すことが明らかとなった。また、この形質転換ベラドンナの生葉を用い、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改良し、レタス実生の幼根伸長への影響を調査した結果、野生型系統間や遺伝子組換え系統毎に差はあるものの、幼根の伸長阻害活性（アレロパシー活性）が認められたが、遺伝子組換え体と非組換え体の間では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、多様なプライマーを用いることで多数の増幅バンドを比較・検討することができる AFLP 法を用い、遺伝子多様性を検討した。その結果、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が、自殖性も併せ持つベラドンナでは、ノラニンジンに比べ、ヘテロ接合度は低かった。さらに、野生型ベラドンナを用い、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。一方、ノラニンジンについて、詳細な訪花昆虫調査および主たる花粉媒介昆虫の行動パターン解析を行い、花粉を介した遺伝子拡散距離の推定方法を確立した。なお、主たる花粉媒介昆虫は、ノラニンジンにおいてはナミハナアブであり、ベラドンナにおいてはコマルハナバチと推定された。本研究で提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いる生態特性解析手法を用いることで、遺伝子組換え薬用植物の環境影響評価を実施することが可能となり、遺伝子組換えベラドンナに関する野外栽培実験を継続することで、遺伝子組換え薬用植物の環境影響評価の1つの事例を提供できるものと思われる。

A. 研究目的

1970年代半ばに開発された大腸菌を用い

る遺伝子操作技術の発展に伴い、高等植物においても、1970年代半ばから1980年代初頭

にかけて発見された自然の遺伝子組換え現象である根頭癌腫（クラウンゴール）病や毛根病の原因となる *Agrobacterium* 菌を活用した遺伝子組換え技術が一般化し、1980年代半ば以降、各種植物において有用遺伝子組換え体が育成され、遺伝子組換え農作物としての商業栽培が世界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増大している。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酵素遺伝子が次々に単離され、当該遺伝子を導入した遺伝子組換え薬用植物の育成が進められており、二次代謝物生合成経路の解明ばかりでなく、有用二次代謝物の効率的生産や新規化合物の生産を目指した研究も活発に行われるようになり、最近では、有用二次代謝物生産の改善・改変を目的とする多様な遺伝子組換え薬用植物の育成が活発に進められるようになってきた。

一方、多種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・検討がなされるようになり、世界規模での有用生物資源の維持・保全および持続的な利用を目的とした生物多様性条約の中で、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、活発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遺伝子組換え体育成技術の開発ばかりでなく、環境への影響を調査・検討する研究を実施する必要が生じてきた。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*) をモデル材料として用い、毛根病菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) を感染させて毛状根を発生させ、個々の毛状根クローンから組織培養技術を用いて植物個体を再生させ、形質転換体（遺伝子組換えベラドンナ）を育成する。この遺伝子組換え体は自然界でも生じるものであるため、カルタヘナ担保法上の規制は受けないが、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、形態特性・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ける自然光下での栽培試験を行い、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、他植物の生育への影響（アレロパシー試験）等、カルタヘナ担保法上の第1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解析手法を検討することとした。最終的には、自然界でも生じうるものであることから、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、実験室内試験、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年の限定された期間内に、有用遺伝子を導入した遺伝子組換え薬用植物を実際に作出し、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不可能

である。そこで、カロチノイド合成酵素遺伝子の解析が進んでおり、我が国に交配可能な野生植物が存在し、かつ、有用な遺伝子組換え体が既に育成されており、生態特性解析や遺伝子多様性解析を以前から進めていた（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材料とし、非遺伝子組換え（普通の）植物の生態特性（生息地や生育特性、繁殖特性、他種植物との競合性等）、花粉飛散性（風媒性、虫媒性等）、交雑特性、遺伝子多様性等、カルタヘナ担保法に基づく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

ベラドンナの種子を滅菌後、ジベレリンを含むMS固形培地上に播種し、無菌の発芽個体を得た。この無菌植物体の葉切片を用い、日本産および外国産の*A. rhizogenes* (1724株、2659株、8196株、15834株、A4株、R1000株)を感染させ、MS固形培地上で毛状根を多数発生させた。この毛状根を抗生物質（クラホラン）を含むMS固形培地上で培養し、無菌の毛状根クローン（形質転換器官）を多数得た。この毛状根について、BA (0.5 mg/L) と IAA (1 mg/L) を含むMS固形培地で培養し、不定芽（形質転換体）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、不定根を誘導しつつ再分化植物体（遺伝子組換えベラドンナ）を得た。この遺伝子組換えベラドンナを順化後、土壌栽培として鉢上げし、実験室内で栽培した。

この遺伝子組換えベラドンナの大部分は、胚軸や節間が短くなる典型的な矮性形質と

葉が丸みを帯びる特徴的な形質を示し、このような形質を示す個体では、T-DNA上に存在する遺伝子を増幅させるプライマーを用いたPCR法により、T-DNAの挿入が確認された。また、筑波薬用植物栽培試験場で以前より育成・栽培されていた毛状根由来再分化ベラドンナ系統（M8）を分与してもらい、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）との戻し交雑を行い、その交雑第1代の植物（播種後5週目の植物の葉）について、DNeasy Plant Mini Kitを用いるDNA抽出法によって核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、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、アレロアパシー試験を行った。アレロアパシー試験については、遺伝子組換え農作物の同種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、生葉を用いる試験方法を採用した。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カ所および国内2カ所から収集した系統）毎

に活性は異なるものの、無処理に比べ、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（再分化個体）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阻害活性の程度（約30-50%）は非遺伝子組換え系統で見られた阻害活性の程度（約20-60%）の範囲内であった。

最終年度には、鉢上げしたベラドンナの成育が遅れ、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

ニンジンについては、文献調査の結果、世界各地に野生種（ノラニンジン）が存在し、我が国においては、日本海側を中心とする各地に自生することが明らかとなった。そこで、大きな自生集団が多数見られる北海道渡島半島を中心に、生態調査を実施した。ノラニンジンは、人の手が恒常的に入る道路端（除草作業が行われたり、道路工事が行われている場所）や瓦礫の多い海岸に生息し、他の植物との競合が起きにくい場所を生息地とすることが明らかとなった。また、多くの種子は春から夏にかけて発芽し、順調に生育した個体が冬の低温にさらされることで抽苔（花芽が形成される）し、春から伸長生長を開始し、夏前頃から開花することも明らかとなった。集団の個体数について年次変動を調査した結果、光がよく当たる場所では個体数は年々増加する傾向にあるが、光照射量の少ない日陰では、個体数が年々減少する傾向にあり、成育・繁殖にとって強い光強度が必要と判断された。実際、人の手が入らない地域や山の中等他の植物が繁茂しているような場所ではノラニンジンはほとんど見られず、光を巡る他植物との競争においては、ロゼット状態で生育するニンジンは不利な性質を持つものと考えられた。さらに、ニンジンは自殖弱性（他殖性）が極めて強く、虫媒による

交雑によって種子繁殖し、農作物として栽培されている栽培ニンジン（同種である）との交雑も容易に起こることが明らかとなった。

一方、ノラニンジン生息地において、訪花昆虫の詳細な観察を行い、主たる花粉媒介昆虫がナミハナアブ（*Eristalis tenax* Linnaeus）であることが明らかとなり、多数の個体について30分間ずつの行動様式・移動距離の観測・測定を行った。さらに、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、1日あたりの行動様式・移動距離の推定（1日約30.8m移動）を行った。一方、花粉媒介昆虫の行動パターン解析と合わせ、花粉の生存期間（寿命）をFDA（fluorescein diacetate）とPI（propidium iodide）を用いた2重染色法によって測定し、ニンジンにおける花粉寿命は最大10日であることが明らかとなった。したがって、花粉媒介昆虫の移動距離と花粉寿命を考慮すると、ニンジンにおいては、昆虫を介した花粉による遺伝子拡散距離は最大308mと推定された。

一方、ベラドンナについては、実験室内栽培中の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、他殖性を主とするが、自殖性も兼ね備えていることが明らかとなった。一方、ベラドンナにおいては、花の構造から虫媒性であると考えられ、2004年5-6月に筑波薬用植物栽培試験場の野外栽培圃場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。残念ながら、研究期間中に遺伝子組換えベラドンナの野外栽培を実行することができなかったため、訪花昆虫調査は次年度以降継続して実行し、昆虫の行動パターンを解析する必要がある。なお、ベラドンナにおける花粉寿命（生存率が0%となる時間）は、ニンジンと

同様の方法で解析したところ、最大で約130時間であった。

ところで、ニンジンについては、種子を介した拡散を調査し、風やヒトの移動の影響が強い（年間平均で約33m拡散）こと、また、裸地への侵入に際し、事前に裸地に侵入・発芽した他の植物（種）の根元（地際）で発芽したニンジン個体とその後の定着の基礎となることが予想された。

遺伝子多様性の解析については、多数のプライマー対を活用することで多数の増幅バンドを検出・比較することができるAFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）法を採用し、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。一方、ベラドンナにおいては、ニンジンと同様のAFLP法を用い、適切なプライマー対を決定した後、欧州6カ所および国内2カ所の研究所から分譲していただいた種子集団につき16個体ずつについてヘテロ接合度を調査したところ、ヘテロ接合度は0.099から0.169となり、全体としての平均は0.133であった。プライマー対が異なるため、直接の比較はできないが、ニンジンに比べ、ベラドンナでは、遺伝子多様度が低い結果となった。

上述したように、ニンジンにおいては、栽培種と野生種が容易に交雑したことから、交雑第1代について、形態特性と生理特性を調査した。その結果、雑種第1代は、栽培種と野生種の中間の形質を示し、野生地の環境で発芽・成長することが確認されたが、野生地における次年度以降の成長は認められず、雑種を介した遺伝子拡散は起こりにくいことが予想された。

ベラドンナについては、同種の野生種は我が国には自生しないため、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、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。

また、土壌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こととなった。

一方、毛状根からの再分化植物体（遺伝子組換えベラドンナ）の隔離圃場試験に際し、栽培に伴う周辺環境への長期影響をモニタリングすることが必要となることから、対象区となる栽培前の圃場周辺の生物相（特に、植物相）について2年がかりの調査を実施し、そのとりまとめを行った。今後、遺伝子組換えベラドンナの栽培開始後一定期間（数年程度）の後に、類似の調査を実施し、遺伝子組換え体の栽培による影響の有無や程度を明らかにする予定である。

D. 考察

遺伝子組換え生物の環境影響評価については、国際条約である生物多様性条約カルタヘナ議定書が締約され、それを担保する国内法（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）が制定され、平成16年2月19日より施行された。この法律に基づく環境影響評価については、概念的な評価項目は設定されているものの、具体的な評価項目やデータの取得・解析方法が定まっておらず、具体的な事例をもとに検討する必要がある。本研究では、3年の研究期間が定められており、実用的な遺伝子組換え薬用植物を育成し、実験室内実験、特定網室実験、隔離圃場実験、一般圃場実験と順を追って試験を実施する（各段階毎に2年程度かかる）ためには時間的な制約が大きいため、モデルケースとして、自然の遺伝子組換え現象である毛根病菌の感染によって生じる形質転換器官である毛状根、および、毛状根か

ら生じる再分化植物個体（形質転換植物）を用い、カルタヘナ担保法に準拠した形で環境影響評価を実施することとした。この実験系を用いれば、自然現象としての遺伝子組換え体（ナチュラルオカレンス）であるため、カルタヘナ担保法の適用は受けず、大臣確認や大臣承認を受けずに実験を実施することができる。

本研究では、薬用植物のモデルとしてベラドンナを用いて実験を行った。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（遺伝子組換えベラドンナ）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一般的な特徴として、胚軸や節間の短縮する矮性形質と葉が丸みを帯びる特徴が見られた。この矮性形質は、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これまでの研究によって明らかにされている。実際、詳細に検討した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、T-DNAは内在性遺伝子と同様、単一の優性遺伝子としてメンデルの遺伝様式に従って後代に伝達され、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評価項目の1つであり、遺伝子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、本実験で詳細に検討した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上に起因するのか、もしくは、T-DNA挿入位置による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、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、アレロパシー物質が同定されている場合にはHPLCやGC/MS等による定性・定量分析が可能であるが、多くの植物ではこのような物質の単離・同定はほとんど行われておらず、バイオアッセイ法を用いた検討が重要である。そこで、本研究では、遺伝子組換え農作物のアレロパシー試験用に開発されたバイオアッセイ法のうち、生体組織を直接用いるサンドイッチ法について検討し、ベラドンナ生葉を用いる方法へと試験方法を一部変更して活用することとした。その結果、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（アレロパシー）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導入遺伝子（T-DNA）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、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、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アレロパシー試験は重要と思われる、今後、さらに詳細な検討が必要である。

次に、カルタヘナ担保法に基づく環境影響評価のうち、交配可能種が存在する場合に重要となる遺伝子多様性への影響を評価する方法を検討するため、多様なプライマー対を設定することができ、多数のバンドを検出・比較できるAFLP法の適用を検討した。AFLP法を用いた解析の結果、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、ニンジンにおいては、栽培品種であっ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、欧州6カ所および我が国2カ所で収集された各種系統について検討し、ヘテロ接合度は0.099から0.169（平均で0.133）であった。プライマー対が異なるため、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と考えられる。実際、自殖性の強い植物種では、一般的にニンジンよりかなり低いヘテロ接合度の値が示されている。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、遺伝子組換え葉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、本研究で生態特性調査を行ったノラニンジンおよびベラドンナはいずれも虫媒性であるが、ノラニンジンは他殖性が極めて強く、ベラドンナは他殖を主とするが、自殖性も兼ね備えていることが明らかとなった。そこで、ノラニンジンについては、北海道渡島半島の自生地において訪花昆虫調査を行い、主たる花粉媒介昆虫がナミハナアブであることを明らかとし、さらに、ナミハナアブの行動パターン解析を実施するとともに、新たに開発・改良した行動パターン解析ソフトを用い、花粉寿命解析データを併用することで、虫媒花における花粉最大飛散距離の推定方法を確立することができた。なお、花粉寿命解析方法として、FDAおよびPIを用いる方法を採用した。本研究で開発した花粉飛散最大距離の推定方法は、他の植物にも適用可能であることから、今後、遺伝子組換え葉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。ベラドンナについては、本

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たが、本研究期間中には遺伝子組換えベラドンナの野外栽培試験を実施できなかったため、さらに詳細な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は今後の課題として残された。この点については今後も継続して調査する予定である。

遺伝子組換え体が土壤微生物相に及ぼす影響については、現状の環境影響評価においては、土壤中に存在する微生物（バクテリア、菌類、放線菌）について、各々適切な培地を用いて計測したコロニー数をもとに、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についても詳細な検討は必要であるが、これまでの研究結果を考えると、T-DNAが挿入された形質転換体では、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、培地上で増殖しない難培養微生物も含めた土壤微生物相全体を調査するための方法が開発されつつあり、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、土壤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、土壤から直接DNAを抽出する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気象条件（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を整備することが必須と考えられる。

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や競合に

については、ニンジンにおいては、我が国に同種の野生植物（ノラニンジン）が存在し、容易に交配することから、野生種、栽培種およびその雑種第1代について、その形態特性・生理特性・繁殖特性を調査し、さらに、ノラニンジン自生地における雑種第1代種子の発芽・成育特性を調査した。その結果、ノラニジンは、人の手が恒常的に入る環境や他の植物が繁殖できないような瓦礫地においてのみ繁殖・固着し、光を巡る他植物との競合が起こるような場所では最終的に集団が消滅することが明らかとなった。また、雑種第1代は両親（栽培種と野生種）の中間的形質を示し、自生地においては発芽するものの、その成育は野生種と比べて遅く、この形質は競合において不利な成育特性であるため、雑種を介した花粉による遺伝子拡散は実質上起こらないものと推測された。一方、ベラドンナについては、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。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、本研究を継続して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、自然の遺伝子組換え現象である毛根病菌感染によって多数の遺伝子組換え体（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* 遺伝子によって引き起こされる導入形質は後代交配種においても安定であることが示された。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、形質転換体および非形質転換体の両方において、同程度の幼根伸長阻害を示す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、アレロパシー試験の実施は必須の項目であり、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野生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、野生型ベラドンナについて、近縁野生種である *Scopolia* 属植物との交雑性を検討したが、我が国に成育する *S. japonica* の近縁種である *S. lurida* とは交雑しないことが明らかとなった。また、多様な増幅バンドの解析が可能な AFLP 法をもとに、ベラドンナにおけるヘテロ接合度を調査し、欧州および我が国で収集した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、自殖性も併せ持つベ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である。

さらに、ベラドンナのような虫媒を主とする植物においては、虫媒昆虫を事前に決定しておき、花粉寿命を決定するとともに、花粉媒介昆虫の実際の行動パターンの観測および本研究で開発・改良した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ベ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

- ・ K. Yoshimatsu, H. Sudo, H. Kamada, F. Kiuchi, Y. Kikuchi, J. Sawada and K. Shimomura (2004) 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.
- ・ I. Eguchi, M. Umehara, M. Ono and H. Kamada (2004) 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.
- ・ 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

- ・ 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 31 日 (招待講演)。

- ・ 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).

- ・ 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 12 日。

- ・ 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).

- ・ 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).

- ・ 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

薬用植物における雄性不稔制御因子の探索と解析

分担研究者 佐藤文彦 京都大学生命科学研究科 教授

薬用植物における花芽形成、雄性不稔関連遺伝子の単離を行ない、同遺伝子を用いて薬用植物に不稔性を付与することを目的に該当遺伝子の単離と解析を試みている。この目的のためにエチレンジグナル伝達系の ERF 因子の発現制御をモデル植物であるタバコを用いて行ない、ERF4 の発現抑制により部分的に葯の解裂を抑制できることを明らかにした。さらに、薬用植物の分子育種を行なう上で、重要な課題である再分化形成率の向上をケシ科のハナビシソウをモデルに検討するとともに、花芽形成の鍵遺伝子と考えられる FT 遺伝子を導入した形質転換細胞を作製した。その結果、ハナビシソウにおいて不定胚形成効率を飛躍的に向上できる機能遺伝子を新たに見い出すとともに、シロイヌナズナの FT 遺伝子を導入したハナビシソウ形質転換細胞からも不定胚と思われる細胞集塊を得、新たな実験系を確立することに成功しつつある。

A. 研究目的

薬用植物の多くは、育種が十分にされておらず、その特性の安定性に不安があり、近縁種との交雑により、特性が変化していくことが危惧されている。従って、栄養繁殖することにより、特性の維持管理が計られることが多い。栄養繁殖できることは、遺伝子組換えした場合にも、容易に繁殖でき、その普及を計るうえで有利である。一方、このことは、薬用植物が比較的高い交雑性を持つということの意味している。従って、薬用植物の稔性を制御し、均質な植物体を作製管理する技術を開発することは、単に遺伝子組み換え体における導入遺伝子の拡散のリスクに対して予防する観点からのみならず、薬用植物の品質管理という観点からも重要である。

さらに、ある種の薬用植物では、開花にともない成分の低下が生じることが知られており、こうした場合には、積極的に開花／あるいは、稔性を抑制することにより、より高品質な薬用植物の育成が期待できる。また、

雄性不稔性を導入することにより、均一性が高く、かつ、収量性、耐病性などの農業形質が優れた一代雑種（F1）種子を生産するシステムを構築することも期待できる。

このように、不稔性、特に、雄性不稔性の導入は、遺伝子組み換え薬用植物の安全性の担保とともに、薬用植物の特性の向上に貢献することが期待できるものである。

本研究では、このように薬用植物に（雄性）不稔性を導入するために有用な遺伝子の探索を行なうとともに、その遺伝子の特性を解析し、応用への展開を図ることを目的としている。

B. 研究方法

不稔性の制御に関してはいくつかの方法が考えられる。1つは、雄性配偶子である花粉の不稔性であり、花粉母細胞から花粉へと発達する段階において、花粉の発達を抑制または破壊してしまう方法が考えられる。一方、

このような花粉の不稔に限定せず、植物体において花成を阻害することにより、個体レベルでの不稔性を与えることも可能であり、より一般的な手法となると考えられる。

本研究では、薬用植物のモデルとして、形質転換系が確立されるとともに、ESTの解析が進んでいるケシ科のハナビシソウ、あるいは、ナス科のタバコを材料とし、これらにおける花芽形成、あるいは、花粉形成に関わる因子の単離を試みた。

すでに、多くの植物において花器官の発達に植物ホルモンであるジャスモン酸やエチレンなどが深く関わっていることが知られている。さらに、近年、タバコにおいてエチレンが胚珠成熟に関わっているという報告

[Martinis et al., Plant Cell.

11(6):1061-72, 1999]や、エチレンレセプター阻害剤で処理された花芽では葯の開裂と開花が同調しないとの報告があった[Rieu et al., Planta. 217(1):131-7, 2003]ことより、エチレンシグナル伝達の下流で機能する転写因子ERFが花器の発達において果たす役割を解析した。具体的には、転写因子であるERFのうち、ERF3あるいは、ERF4の発現抑制体を作製し、その効果を解析した。まず、ERF3ならびに4遺伝子の発現を抑制するために、RNAi発現抑制ベクターであるpKANNIBALおよびバイナリーベクターpART27 [Wesley et al. 2001]を用いてpART-ERF3ir, pART-ERF4irベクターを作製し、これらの発現ベクターを導入した形質転換タバコを作製し、その表現形質を解析した。

また、モデル植物シロイヌナズナにおいては、既にLEAFY, AP1, TFL等の花成制御因子が単離されており、これらの遺伝子の機能欠失により、花芽形成の異常が起こること、あるいは、異所的過剰発現による花成促進が知られていた。これら遺伝子のうちで、特に、FT遺伝子は開花促進因子として注目されており、多くの植物種から遺伝子が単離されるとともに、その過剰発現により花芽形成が誘

導されることが知られていた。薬用植物においても同様にFT遺伝子の機能制御により、花芽形成を制御し、不稔性を与えることが可能と考え、シロイヌナズナからFT遺伝子を単離し、その過剰発現ベクターを作製するとともに、イソキノリンアルカロイドを生産するケシ科のハナビシソウ (*Eschscholtzia californica*) に遺伝子導入し、その花芽形成に与える効果を検討した。

さらに、ハナビシソウを含め、多くの薬用植物において、培養細胞からの個体再生の効率が極めて低く、形質転換による開花制御において大きな課題となっていたことより、ニンジンにおける不定胚形成過程において新たに同定した遺伝子を用いて、同遺伝子の不定胚形成におよぼす効果を検討した。

C. 研究結果

ERF3ir, ERF4ir導入タバコ株の全ラインにおいて導入したRNAiベクターの配列が存在することを確認するとともに、ノザン解析により、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においてのみ十分なERF4発現抑制を認めた。以上のように、形質転換体間で発現抑制効果に差がみとめられたが、その開花に及ぼすERFの発現抑制の効果を観察した。

その結果、図1に示すように、ベクターコントロールとしてのpARTを導入したタバコにおいては、いずれの花においても開花直後ですでに葯が完全に解裂していたのに対し、ERF4ir-17では、葯が解裂する前に開花している花を複数観察した。その中には、葯が緑色をしており、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、葯が茶色になっても開かないものが含まれていた。しかし全体の7割程度の花器は正常な発達をし

ていたことより、それら正常な花から種子を採取した。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。なお、ERF4の発現抑制効果が弱いERF4ir-9とERF4ir-28の花器ではこの異常が全く見られなかったことから、この表現型はERF4発現量の変化による効果であることが示唆された。

一方、薬用植物細胞培養系における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 (Takahata et al., *Plant Cell Physiol.*, 45, 1658-1668 (2004)) 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、シロイヌナズナより単離したFT遺伝子cDNAをpGWB2に組み込み、発現ベクターpGWB2AtFTを作製した。ついで、これらの発現ベクターを*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。発芽後2～3週間後の植物体より調製した葉および葉柄に*Agrobacterium tumefaciens* (pGWB2, pGWB2AtFT, pBI121, pBI121X1) を感染させたのち、適当な抗生物質を含む選抜培地にて、選抜培養した。その結果、表1に示すような形質転換体をえることができた。表1に示すように、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(図2参照)、得られたカルスからの不定胚形成(図3、表1参照)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みとめられた。シロイヌナズナFT遺伝子を導入した場合にもコントロールに比べ、不定胚形成効率の向上が認められた(図4)が、その効果は、pBI121X1に及ばなかった。現在、これらFT遺伝子を導入した不定胚からの個体の再生を試みており、その花芽形成におよぼす効果の評価を今後行なう予定である。

D. 考察

以上のように、エチレンシグナルの最下流に存在すると考えられる転写因子 ERF のうち、ERF4 の発現を抑制することにより、開花には影響しないものの、葯の解裂を部分的に阻害することが可能であることが判明した。このことは、エチレンシグナル伝達系が花粉の発達に関与しているとする Rieu らの報告を支持するものであるが、その効果は部分的であった。このことは、エチレンシグナル伝達において ERF が重複して機能している可能性、あるいは、全く別のシグナル伝達系が ERF4 の機能を相補している可能性が考えられる。現時点で得られている葯の解裂抑制の効果は限られていることから、本遺伝子とともに、新たに開花あるいは花粉形成に関与する遺伝子の単離が必要と考えられる。

一方、シロイヌナズナでは幾つかの開花制御遺伝子が単離されていることから、これらの制御因子をもちいた開花の制御が有効ではないかと考え、シロイヌナズナのFT遺伝子を単離し、過剰発現ベクターの作製、ハナビシソウ細胞への導入をおこなった。形質転換体が既に作製できており、今後、植物体を再生し、その開花特性を解析したいと考えている。もし、FT遺伝子による開花促進が可能であれば、同遺伝子のドミナント-ネガティブ型遺伝子による開花抑制をさらに検討していき

たいと考えている。

また、本研究において、薬用植物の分子育種においては、特に、再分化系の確立が急務であることが明らかになってきた。そこで、イソキノリンアルカロイド生産性薬用植物のモデル植物としてハナビシソウにおける再分化系の効率化を検討した。その結果、ハナビシソウにおいて遺伝子Xの過剰発現により有意に不定胚形成が促進されることが明らかになった。本因子による不定胚形成の促進機構は全く新規であることから、薬用植物の分子育種に新しい展開が期待できる。

E. 結論

エチレンのシグナル伝達系に関与する転写因子 ERF4 の発現抑制により葯の解裂を抑制できる可能性が示された。また、不定胚形成効率を飛躍的に向上できる可能性をもつ新規遺伝子を見い出し、ハナビシソウの不定胚形成効率を著しく向上することに成功し

た。また、シロイヌナズナ FT 遺伝子を導入したハナビシソウ形質転換体を作製した。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

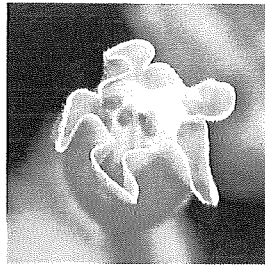
2. 学会発表

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

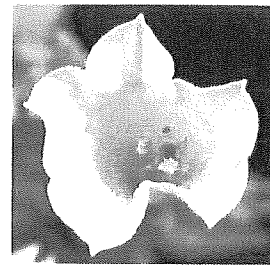
G. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請準備中

A: vector control

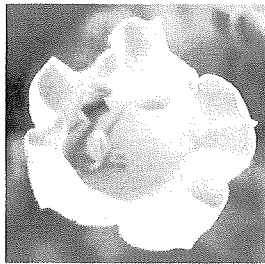


(1)



(2)

B: ERF4ir-17



(3)



(4)

図1 ERF4の発現抑制による葯の解裂阻害

表1 ハナビシソウにおけるカルス形成と不定胚形成

WT:形質転換していないハナビシソウ葉、葉柄からのカルス化ならびに再分化を示す。
 PBI121X1, pBI121, pGWB2AtFT, pGWB2 はそれぞれ、発現ベクター発現ベクターを含む
 Agrobacterium による形質転換体からのカルス化ならびに再分化を示す。

| | | 不定胚形成 | カルス | 不定胚形成率 (%) | average | SD | |
|-----------|-------|-------|-----|---------------|---------|-----|-----------|
| pBI121X1 | プレート1 | 10 | 21 | 47.6 | 34.2 | 2.3 | pBI121X1 |
| | プレート2 | 9 | 29 | 31.0 | | | |
| | プレート3 | 6 | 25 | 24.0 | | | |
| pBI121 | プレート1 | 1 | 19 | 5.3 | 5.6 | 1.1 | pBI121 |
| | プレート2 | 1 | 25 | 4.0 | | | |
| | プレート3 | 2 | 27 | 7.4 | | | |
| pGWB2AtFT | プレート1 | 1 | 7 | 14.3 | 7.2 | 5.1 | pGWB2AtFT |
| | プレート2 | 0 | 18 | 0.0 | | | |
| | プレート3 | 2 | 27 | 7.4 | | | |
| pGWB2 | プレート1 | 0 | 21 | 0.0 | 2.2 | 1.5 | pGWB2 |
| | プレート2 | 1 | 23 | 4.3 | | | |
| | プレート3 | | | | | | |
| WT | プレート1 | 6 | 18 | 33.3 | 21.3 | 5.9 | WT |
| | プレート2 | 3 | 23 | 13.0 | | | |
| | プレート3 | 3 | 17 | 17.6 | | | |

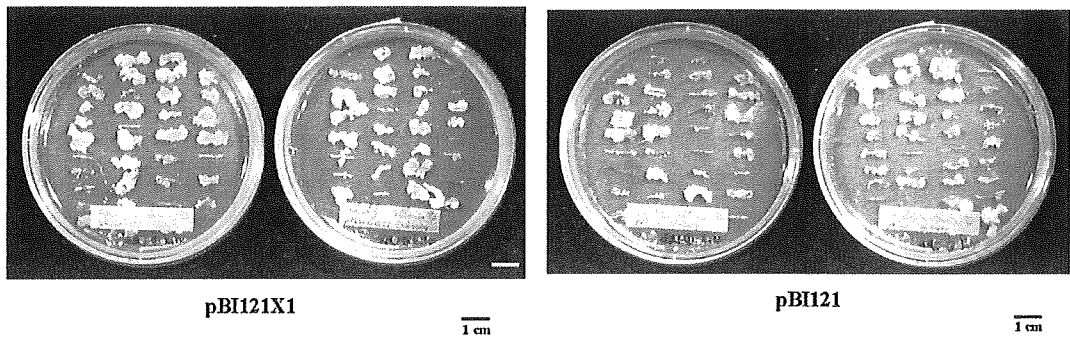


図2 pBI121 ならびに pBI121X1 を導入したハナビシソウ葉ならびに葉柄からのカルス化

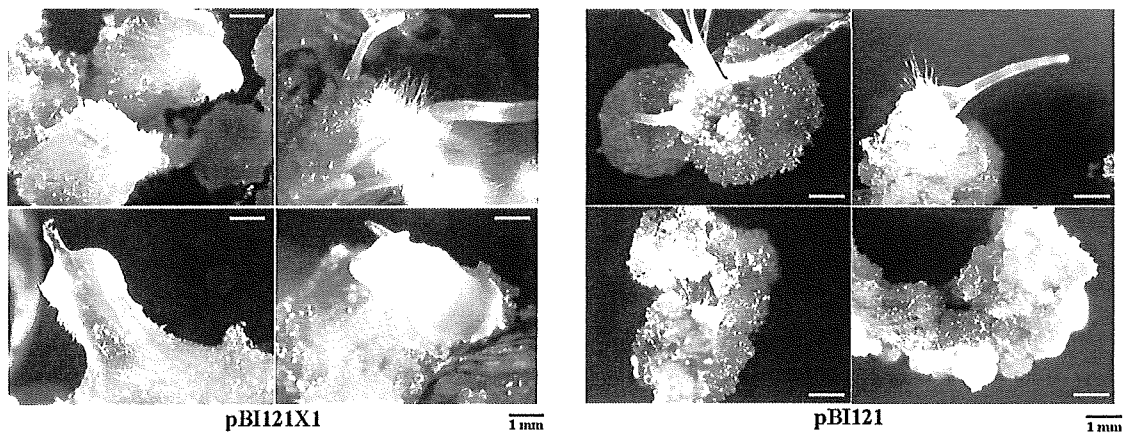


図3 pBI121 ならびに pBI121X1 を導入したハナビシソウ葉ならびに葉柄からの再分化

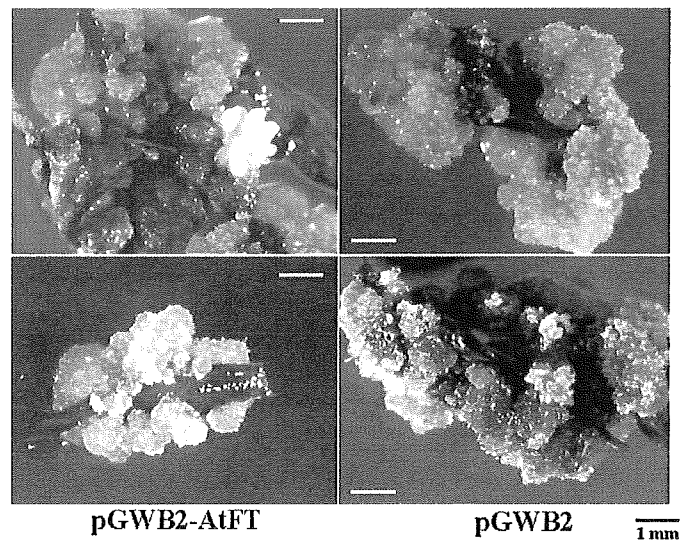


図4 pGWB2AtFT 遺伝子を導入したハナビシソウ細胞からの再分化

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

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

遺伝子組換え薬用植物の環境に与える影響を検討するため、薬用植物の受粉・受精様式並びに交雑に関する研究および薬用植物の栽培に関する研究を行った。前者では花粉の逸脱による他種間の交雑防止法を探ることを目的に、袋掛け処理による結実の程度から自殖性の高い植物を確認し、雌雄異株で、雄株のないマオウを用い、得られた種子が他種との交雑により形成された可能性が高いことを RAPD 法により検証した。また、風媒花のため、類縁他種との交雑が容易に起こり得るハトムギを用い、種苗特性調査を行い、品種あるいは系統を特定する外部形態上の形質を見出した。作成された組換え体植物を育成するため、個々の植物における増殖法を含む栽培技術体系を確立しておく必要があり、クソニンジンの肥料試験、ヤマノイモ類の種苗比較試験およびカラスビシャクの種苗特性調査を行った。

1. 薬用植物の受粉・受精様式並びに交雑に関する研究

1) 薬用植物の受粉・受精様式、特に自殖性について

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、花粉の流出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。

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。

材料として、薬用植物資源研究センターに