

(条件3における WT の TIC)

(条件3における BAS の TIC)

(条件4における WT の TIC)

(条件4における BAS の TIC)

Fig. 4 TIC による BAS 導入体 (BAS) と野生株 (WT) の比較 (1)

次に代謝物解析用のソフトである Metabolite ID を使い、代謝物測定におけるコントロールに野生株、サンプルに BAS 導入体を置き換えて、両者の成分の相違の検索を行った。上記5条件で検討を行ったが、いずれにおいても TIC での全体的なパターンで顕著な違いは見られなかった。条件1では LC-MS 用に通常用いられる short column (4.6 x 60 mm) を用いたが (条件1, 2)、全体的な TIC の違いを見るために long column (2.1 x 150 mm) を用いての検討も行った (条件3)。一般的に ESI をイオン源として用いると positive mode では  $[M+H]^+$  の他に、 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$  などの疑似分子イオンピークが出てしまい、解析が困難になるため、negative mode で行った (条件4-6)。条件4においては、Metabolite ID での解析結果で

は多くの相違が見つかったが、分析時間を 70 分に延ばすとヒット数がかなり減った。この差はおそらく 50 分の分析時間ではすべてが溶出されずに次測定中に溶出されてしまったためと考えられた。また APCI をイオン源として使用した場合、一般に LC-MS で用いているように溶媒に添加物やバッファーを加える必要がなく、そのため添加剤を用いない条件6についても検討した。

Metabolite ID における代謝物検索では、(Transformation)に以下の条件をあらかじめ入力して行った。

- +147.0446 (+p-coumaroyl)
- +163.0395 (+caffeoyl)
- +131.0497 (+cinnamoyl)
- +179.0344 (+trihydroxycinnamoyl)

+149.0603 (+dihydro+p-coumaroyl)  
 +309.0974 (+p-coumaroyl+glucose)  
 +311.1131 (+dihydro+p-coumaroyl+glucose)

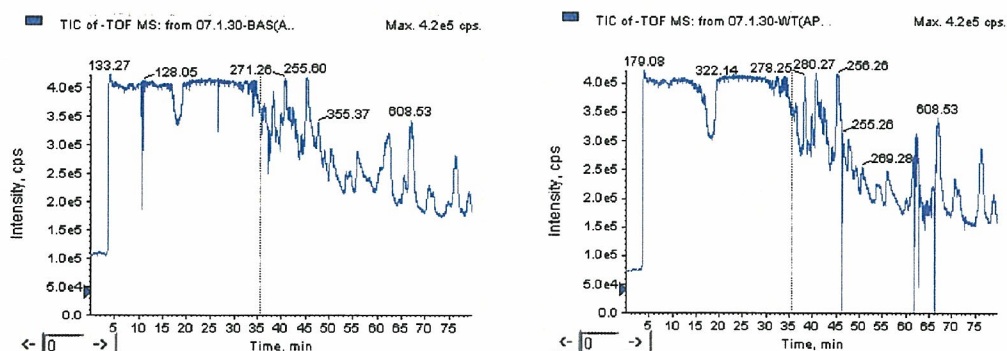
しかしながら、いずれの条件下での transformation 検索においてもこれらの transformation に該当するヒットは得られなかった。そのため、野生株と BAS 導入体の比較をそのまま行い compare control and sample にて検索を行った。

Metabolite ID の compare control and sample 検索

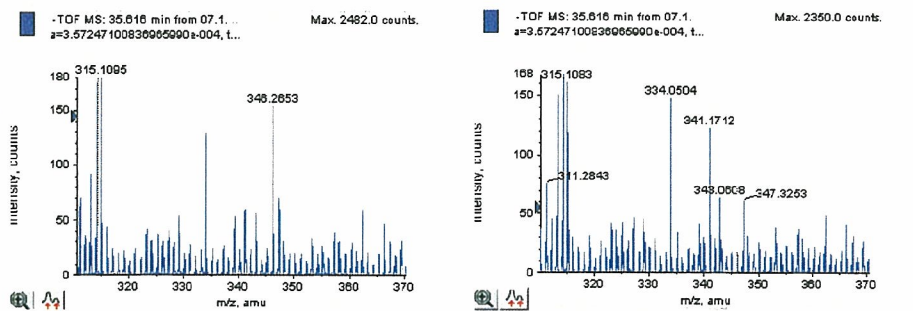
を各条件において行った結果、条件 4 および 5 においては以下のような結果が得られた。

Metabolite ID 検索 条件 (4)

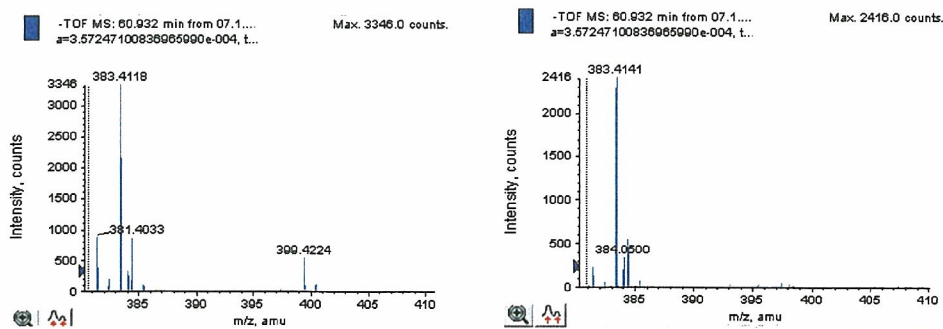
RT (min)	Mass	Intensity
37.05	383.4092	11721
38.03	493.4738	444
38.47	381.3968	6250
40.56	461.4416	824
40.71	461.4397	1025
41.47	437.4348	9628
47.22	337.3664	692



(条件 6 における BAS と WT の TIC)



(Rt 35.61 における BAS と WT の m/z346 付近)



(Rt 60.93 における BAS と WT の m/z399 付近)

Fig. 5 TIC による BAS 導入体 (BAS) と野生株 (WT) の比較 (2)

## Metabolite ID 検索結果 条件 (5)

RT (min)	Mass	Intensity
12.59	195.0917	2444
<u>24.61</u>	<u>215.1572</u>	<u>8344</u>
25.91	201.1763	1262
26.00	242.2144	683
26.21	217.1734	3814
<u>26.62</u>	<u>287.2602</u>	<u>13896</u>
27.12	283.2316	5083
28.49	234.2216	1153
28.49	232.2065	502
30.96	445.3660	2398
31.02	257.2124	3156
35.54	346.2591	609

このように、測定条件によって異なる結果となったが、これはリテンションタイムのわずかなずれがピークの差と認識されてしまうためと、各測定において完全に成分が溶出していないあるいはグラジエントで十分な溶媒置換がおこなわれていないと次の測定に影響を与えるためと考えられる。以上の点を十分に考慮して新たに条件6にて測定し、同検索条件にて検索した結果、最もヒット数の少ない2ヒットを与えた。 $m/z$  346 および 399 はともに BAS 導入体では観測されるが、野生株ではほとんど観測されていない。

## Metabolite ID 検索結果 条件 (6)

RT (min)	Mass	Intensity
35.61	346.2653	1092
60.93	399.4224	3559

現在これらのピークの MS/MS 測定を行っており、 $m/z$  product ion を collision energy を変えることでフラグメントを起こらせることにより、また高分解能質量分析を行うことにより、これらの構造が明らかになると予想される。

## D. 考察および結論

GC-MS 分析においては、野生株、BAS 導入体の間に TIC の明確な差は見られなかった。これは抽出の問題や遺伝子発現の有無にあるのではなく、GC-MS の検出感度の限界にあると考えられる。微量の変化物と思われるピークも検出したが、十分な MS 測定はできなかった。感度を高く測定するためには、抽出効率を考え、エーテル抽出や、精油定量時に用いるように水抽出を行い、生じた精油をキシレンでトラップ濃縮し、そのキシレンを GC-MS 分析に付する方法も考えられるが、特に後者は検体試料量がかなり必要になるため今回は行えなかった。GC-MS は基本的に EIMS のライブラリー検索が可能であるため、目的とするピークが見つかった場合にその構造を類推することは容易であるが、以上の理由で組換え体の成分変化検索への適用は難しいと考えられた。

LC-MS 分析においては、代謝物評価用ソフトウェアである Metabolite ID を用いることにより、野生株には見られず BAS 導入体にのみ検出される TIC ピークを探し出すことが可能であった。しかしながら単純に予想される変換はソフトウェアの検索では検出されず、多くの変換未同定ピークが検出された。本ソフトウェアは、コントロール (今回の場合は Wild Type) とサンプル (今回の場合は BAS) の TIC における retention time が 0.1 min 異なると別のピークと見なすため、グラジエント条件で検討する場合、十分な溶媒置換が必要となり、注意が必要である。基本的にイオン源として ESI (TIS) を用いた場合、目的とする化合物のピークが  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$  の他、 $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  などのピークも検出されてしまうため、構造が未知の場合解析を困難にしてしまうので、 $[M-H]^-$  のみが観測される negative mode や、 $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$  のみを生じる APCI が適していると考えられた。また APCI は低極性物質に適用されるため、今回のような目的物が低分子化合物の場合最適なイオン源であると考えられた。今回の検索の結果、APCI をイオン源とし用い、添加剤を溶媒に加えない場合最も少ないヒット数を与え、それらの結果  $m/z$  346 および 399 の分子量を与える化合

物が BAS 導入体にのみ検出された。これらの化合物が遺伝子組換えにより得られた変換体である可能性もあるが、現在それらの MS/MS を各種条件で検討しており、また高分解能での測定を行いその結果により構造が推定されることが考えられる。

今回用いたソフトウェアの Metabolite ID は組換え体と非組換え体の比較を行うには有用であるが、予想される transformation をあらかじめ入力する必要があるのと、また初期条件の設定次第で検索されてくるピークが大きく異なってくるため、それらの設定を確定するためさらなる条件検討が必要である。

#### F. 健康危機情報

特に問題はなし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし

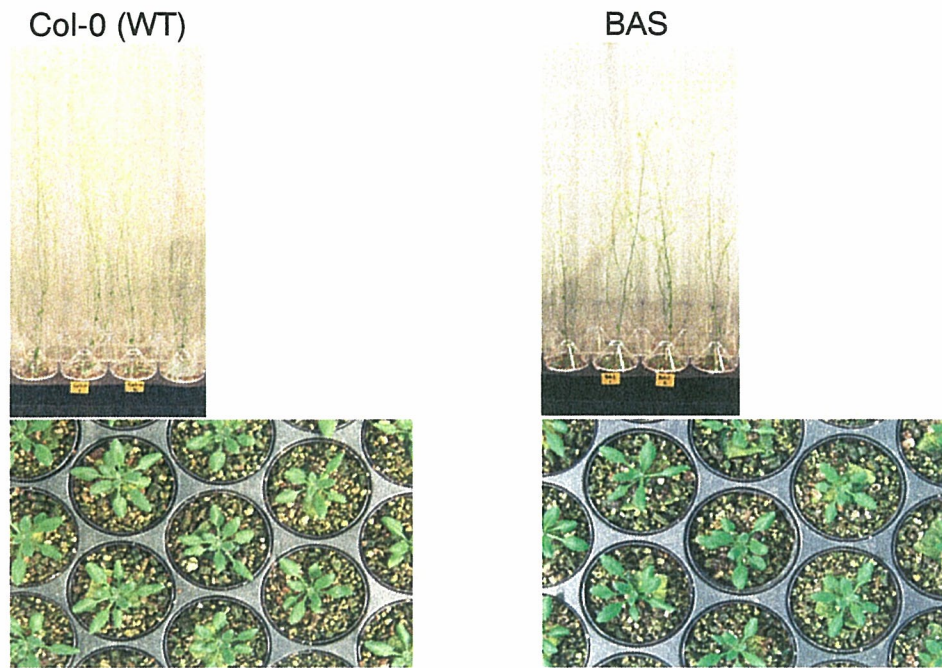


Fig. 1 Growth of *A. thaliana* on "Arasystem"

Above: ca. 6 weeks after germination (抽苔期)

Below: ca. 4 weeks after germination (ロゼット期)

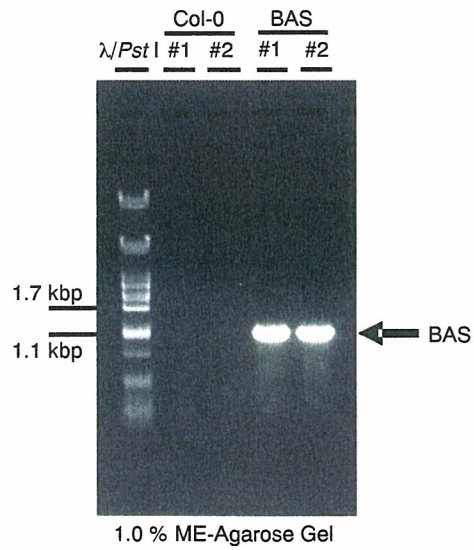


Fig. 2 Detection of BAS gene by PCR

遺伝子組換え薬用植物におけるアレロパシー物質の解析

分担研究者 鎌田 博

所属・職 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・改変を目指した遺伝子組換え薬用植物の育成が進められており、その実用化（野外栽培）に際して必須となるカルタヘナ法に基づく環境影響評価のうち、二次代謝物による影響が大きいと考えられる他植物の成長への影響（アレロパシー活性）を包括的に評価するためのバイオアッセイ法について検討した。遺伝子組換え技術の適用が進んでおり、自然現象としての遺伝子組換えである毛根病菌による形質転換（T-DNA 導入）体の作出が既に行われているベラドンナを材料として用い、毛状根からの再分化個体について、葉あるいは根の試料から漏出する物質の影響を調べるサンドイッチ法、葉あるいは根の新鮮試料からの揮発性物質の影響を調べるディッシュパック法、葉あるいは根のメタノール抽出液を用いる抽出アッセイ法を検討した。レタス幼植物の幼根の伸長を指標として検定した結果、ディッシュパック法では伸長阻害は全く見られず、揮発性のアレロパシー活性は検出できなかった。一方、サンドイッチ法と抽出アッセイ法では、強い伸長阻害活性が見られたが、形質転換体と非形質転換体で阻害程度が同程度であり、形質転換（毛根病菌の T-DNA 導入）による影響は認められなかった。さらに、世界数カ所から収集したベラドンナのさまざまな系統（非形質転換体）および同一ベラドンナ系統に由来する多数の毛状根ラインについてサンドイッチ法を用いてアレロパシー活性を測定した結果、毛状根におけるライン間差はほとんど無く、逆にベラドンナの系統間では有意な差が存在することが明らかとなった。

#### A. 研究目的

高等植物における遺伝子組換え技術の発展に伴い、さまざまな薬用植物においても有用二次代謝産物の改変や効率的生産を目的とした研究が近年活発に行われるようになってきた。一方、遺伝子組換え生物の育成・利活用においては、「遺伝子組換え生物等の使用等による生物多様性の確保に関する法律（以下、カルタヘナ法と略す）」に基づく取り扱いが義務づけられており、

特に、遺伝子組換え植物の野外栽培のように、（遺伝子組換え体等の）拡散を防止しないで行う使用等に該当する第一種使用等においては、使用（野外栽培等）に先立つ環境影響評価が必要不可欠である。薬用植物を遺伝子改変することによって有用二次代謝物の改変や効率的生産を行う場合、代謝過程を大幅に変更することから、低分子化合物の組成に大きな影響が生じるものと予想され、その結果として、他生物、特に

当該薬用植物栽培地周辺に生息する他植物の成長に大きな影響を及ぼす物質（アレロパシー物質）に大きな変化が生じるものと考えられる。しかし、薬用植物におけるアレロパシー物質に関する研究事例は少なく、遺伝子組換え薬用植物におけるアレロパシーに関する研究事例は世界的に見ても皆無である。

そこで本研究では、遺伝子組換え技術の適用が進んでいるベラドンナ (*Atropa belladonna*) をモデル薬用植物とし、遺伝子組換え植物の実用栽培に際して避けて通ることができないカルタヘナ法に基づく環境影響評価のうち、他植物への影響に焦点を絞り、アレロパシー物質を包括的に調査することができるバイオアッセイ法の確立を目指すこととした。

## B. 研究方法

ベラドンナをモデル材料として用い、自然の遺伝子組換え現象を活用し、日本産の毛根病菌 (*Agrobacterium rhizogenes* MAFF 03-01724) 感染によって生じた毛状根から組織・器官培養によって再分化個体（遺伝子組換え植物：形質転換体）を育成した。この再分化個体を、クレハ園芸培土とバーミキュライトを1：1で混合した培養土に植え、鉢で栽培した。この栽培個体の葉あるいは根を一定の大きさに切り取り、バイオアッセイに用いた。また、抽出液を用いた検定においては、葉あるいは根を材料とし、80%メタノールで可溶性成分を抽出し、減圧濃縮後、そのまま検定試料として用いた。

アレロパシー物質のバイオアッセイにおいては、試料から滲出する物質の活性を測定するサンドイッチ法 (Y. Fujii, et al., *Weed Biology Management*, 3; 233-241, 2003)、生組織からの揮発性物質の効果を直接検定するためのディッシュパック法 (M. Matsuyama, et al., *Weed Research Japan*, 45; 80-81, 2000)、メタノール抽出液を染み込ませた濾紙の上に検定植物の種子を直接播

種して効果を検定する抽出アッセイ法を用いた。検定用植物としてはレタス (*Lactuca sativa* cv. Great Lakes 366) を用い、検定試料を入れたシャーレ（サンドイッチ法およびディッシュパック法では6穴シャーレ、抽出アッセイ法ではガラス製の深底シャーレを用いた）中に、5ないし7粒の種子を播種し、暗所 22°Cで72時間培養後、発芽幼植物の根の長さを測定した。サンドイッチ法とディッシュパック法では、試料無添加（水をコントロールとした）の条件で得られた値を形質転換体あるいは非形質転換体で得られた値と比較して伸長阻害率を決定した。一方、抽出アッセイ法では、濃縮液を数段階に希釈して検定し、根の伸長を50%阻害する濃度 (EC50) を求め、形質転換体と非形質転換体の値を比較した。

また、本研究の研究代表者が所属する筑波薬用植物栽培試験場を経由して世界数カ所（チュービンゲン（ドイツ）、カールスルーエ（ドイツ）、バーゼル（スイス）、クラーゲンフルト（オーストリア）、ザグレブ（クロアチア）、つくば（日本）、北海道（日本））から収集したベラドンナの多数の系統について、非形質転換体の葉のアレロパシー活性をサンドイッチ法で調べた。さらに、ベラドンナの同一系統に異なる毛根病菌株を接種して多数の毛状根クローンを得、その各毛状根クローンから再分化した多数の個体（ライン）について、葉のアレロパシー活性をサンドイッチ法で調べた。

## C. 研究結果

サンドイッチ法の標準プロトコルでは、乾燥した検定試料（乾重量で10 mg程度）を用いることとなっているが、今回用いたベラドンナでは、乾燥試料を用いると細菌の発生が著しく、検定が不可能であったことから、新鮮試料（新鮮重量で80 mg程度：乾重量約10 mgに相当）を用いることとした。バイオアッセイの結果、検定試料無添加の対照区に比べ、葉および根の試

料ともに、強い幼根伸長阻害活性（アレロパシー活性）が認められ、阻害活性は根よりも葉の方が2倍程度高かった。しかし、形質転換体と非形質転換体の間で葉および根ともに阻害活性の有意な差は認められなかった。このことから、ベラドンナは葉および根の両方でアレロパシー物質を生産する植物であることが判明したが、本実験で行った形質転換（毛根病菌の T-DNA 導入）ではアレロパシー活性の増大は引き起こされないことが明らかとなった。

ディッシュパック法では、形質転換体および非形質転換体の葉および根の試料（今回は新鮮重で2.0g）とともに、検定試料を入れていない対照区と比べ、検定植物の根の伸長は全く阻害されなかった。したがって、ベラドンナにおいては、揮発性のアレロパシー物質は根においても葉においても生産されておらず、毛根病菌の T-DNA 導入（形質転換）によっても新規なアレロパシー物質は生産されないことが明らかとなった。

抽出アッセイ法では、葉および根の抽出液とともに、濃度依存的に幼根伸長阻害活性が上昇したが、形質転換体と非形質転換体の間で有意な差は認められなかった。実際、濃度依存的阻害曲線から EC50 を計算したところ、形質転換体の葉では 53.6 mg/l、根では 182.0 mg/l、非形質転換体の葉では 45.0 mg/l、根では 147.7 mg/l となり、95%信頼区間による統計的な有意差は認められなかった。また、この EC50 値からも分かるように、根と比較し、葉では強い阻害活性が見られ、サンドイッチ法の結果と一致していた。

一方、世界数カ所から収集したベラドンナ系統について、非形質転換体の葉を用いたバイオアッセイの結果、系統間でアレロパシー活性に統計的に有意な差が認められ、チュービンゲン（ドイツ）のものは幼根伸長阻害率が55%と最も高く、北海道のものは23%と最も低かった。また、各種毛根病菌株を用いて育成した多数の毛状根ラインについて、再分化個体の葉を用いたバイオ

アッセイの結果、幼根伸長阻害は37-50%となり、統計的に有意な差は認められなかった。

#### D. 考察

今回用いたさまざまなバイオアッセイ法は、生態学的に問題となる多様な雑草のアレロパシー活性を測定するために開発された手法であり、その標準プロトコルに従って検定を始めたが、今回用いたベラドンナでは、サンドイッチ法において、乾燥材料ではバクテリアのコンタミが多く、検定は不可能であった。そのため、さまざまな予備検討を行った結果、新鮮な材料をそのまま使うことで良好な結果が得られた。今後、多様な薬用植物でアレロパシー活性を検定する際には、その検定試料の調整や検定植物の培養期間等を予め検討する必要がある。また、検定に使う試料の最適重量についても実験材料による違いが大きく、被検材料毎に事前に検討する必要がある。

今回実験に用いたベラドンナでは、サンドイッチ法および抽出アッセイ法の両者において、葉および根でアレロパシー物質が生産されていることがはじめて明らかとなり、葉における活性は根の2倍程度であることも明らかとなった。これまで、遺伝子組換え作物のアレロパシー検定では、サンドイッチ法か抽出アッセイ法のいずれかが用いられてきたが、今回の実験により、いずれの方法を用いてもほぼ同じ結果が得られたことから、より簡便なサンドイッチ法を用いることで外来遺伝子導入（形質転換）によるアレロパシー活性への影響の概略を評価できるものと考えられる。

ディッシュパック法は、新鮮試料から揮発・拡散する物質が、少し離して置いた検定植物の成長に及ぼす影響を調査する方法であり、今回の実験に用いたベラドンナでは、揮発性物質としてのアレロパシー活性は認められなかった。実際、GC-MS 分析の結果でも、既知の揮発性生理活性物質は全く検出できなかったことから、ベラドンナ



においては揮発性物質の検討は省略できるものと考えられる。しかし、揮発性のアレロパシー物質を生産する植物も多数知られていることから、今後さまざまな薬用植物について、揮発性アレロパシー活性を今回用いたディッシュパック法で測定し、基礎データとして蓄積しておくことが重要であろう。

一方、ベラドンナでは、系統が異なることでアレロパシー活性が異なること（有意差があること）が今回の実験で明らかとなったことから、比較対照とする植物の選定においては十分な考慮が必要である。同一系統であれば形質転換毎（毛状根のライン間）では有意差が見られなかったことを考慮すれば、形質転換に用いた植物（系統）そのものを比較対照とし、予備的に蓄積しておいた同一植物種の複数系統における変動幅を越さない場合には影響なしとするような判断基準を設定する必要がある。このような判断方法（比較基準の設定）は遺伝子組換え農作物の食品としての安全性評価（栄養成分の比較等）においても適用されており、今後このような考え方をアレロパシー検定等にも広げていくためには、さまざまな薬用植物とその多数の系統（非形質転換体）について、アレロパシー活性を含むさまざまな形質に関する基礎データを蓄積していくことが重要であろう。

## E. 結論

本研究では、ベラドンナをモデル薬用植物とし、毛根病菌の感染（自然の遺伝子組換え現象）によって生じる形質転換器官である毛状根から再分化した形質転換植物（遺伝子組換え植物）について、その葉あるいは根を用いてアレロパシー活性（他植物への成長への影響）を包括的に調査するためのバイオアッセイ法を検討した。それぞれに特色のある3種類のバイオアッセイ法（サンドイッチ法、ディッシュパック法、

抽出アッセイ法）を検討した結果、ベラドンナでは、サンドイッチ法と抽出アッセイ法において、葉および根でアレロパシー活性を検出することができ、両方法ではほぼ同等の結果が得られたことから、より簡便なサンドイッチ法の活用が推奨される。一方、揮発性のアレロパシー活性を検出するディッシュパック法では、ベラドンナにおいては、アレロパシー活性は全く検出できず、GC-MS 分析においても既知の揮発性生理活性物質は検出できなかったことから、ベラドンナについては、本試験は不要と判断された。しかし、植物の種類によっては揮発性のアレロパシー物質の生産が知られているものもあり、非形質転換体を用いた予備試験を実施しておくことが重要であろう。

また、同じベラドンナであっても系統によってアレロパシー活性が異なることから、直接の比較対照は形質転換体を育成した同じ系統のものを使用することが望ましく、また、複数の系統についてアレロパシー活性を基礎データとして蓄積しておき、遺伝子組換え体のアレロパシー活性の変動幅の比較対照とすることが重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

・ 笹本裕美、管野真実、平舘俊太郎、藤井義晴、吉松嘉代、鎌田博：薬用植物ベラドンナの形質転換体および非形質転換体におけるアレロパシー活性。日本植物学会第70回大会（熊本大学）、2006年9月15日。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

薬用植物種子の発芽条件及び長期保存法に関する研究

分担研究者 飯田 修 薬用植物資源研究センター種子島研究部 栽培研究室長  
協力研究者 香月 茂樹 薬用植物資源研究センター種子島研究部 研究リーダー  
協力研究者 木内 文之 薬用植物資源研究センター センター長

要旨 薬用植物種子の発芽条件及び長期保存法を確立するため、薬用植物資源研究センター種子島研究部にて、5℃で保存した種子を用い、発芽率および発芽温度条件を検討した。貯蔵期間16年の種子では、フヨウ、ホソバセンナ、モロヘイヤが高い発芽率を示し、発根率-出葉率はそれぞれ92%-86%、70%-58%、70%-60%であった。貯蔵期間2年のキビ、ゲットウ、ゴジカ及び同1年のアサガオ(黒実)の発根率及び出葉率は100%であった。発芽率の経年変化について、アカメガシワでは低温下でも発芽率は1年間で半減したが、採種後紙袋に入れて室内で放置したものでは3ヶ月で発芽力が消失した。ホソバセンナは長期貯蔵でも高い発芽力を有す一方で、貯蔵期間1年での出葉率が8%と低い場合も見られ、種子の採取時の状況や保存条件によって発芽率が異なることが明らかとなった。また、トウキ種子の長期保存方法を検討するため、種子の洗浄処理を行い、発芽状態を確認の上、乾燥、密封状態で低温貯蔵を開始した。

#### A. 研究目的

植物遺伝子資源の長期保存に関しては、農作物では多くの機関での歴史と実績があり、種子保存の基礎となる標準的な発芽試験法<sup>1)</sup>もまとめられている。しかし、薬用植物に関しては取り扱う機関が極めて少ない上、歴史や実績が少なく、整備体制の強化が急務とされている。そこで薬用植物種子の発芽条件及び長期保存法を確立するため、低温で保存した種子を用い、発芽温度条件を検討するとともに、発芽率の経年変化を検定した。

また、セリ科植物には薬用として重要な種が多いが、それらの種子は低温での

貯蔵であっても寿命は2〜3年と短く、頻繁な種子の更新が必要である。そこで、トウキ種子の長期保存を目的として、貯蔵に先立ち種子を洗浄処理することによる種子寿命の変化の検討を開始した。

#### B. 研究方法

##### (1) 発芽適温と発芽率の経年変化

材料：薬用植物資源研究センター種子島研究部にて、ポリ袋、5℃で貯蔵した平成元年（1989年）、同2年（1990年）、同15年（2003年）、同16年（2004年）、同17年（2005年）年産種子及び同18年（2006年）産新規種子。ただし、平成元年は貯

蔵年，2年，15年，16年，17年は採種年。  
発芽温度：15，20，25，30，35℃ 恒温  
条件

供試粒数：種子の大小により25～100粒，  
各温度での反復無し。

発芽チャンバー：温度勾配型チャンバー  
EYELA MTI-202（庫内5室），後に同  
MTI-201（庫内5室）に変更，同MTI-204  
（庫内3室）

照明条件：明12時間（7：00～19：00）40W  
直管蛍光灯4本，暗12時間（19：00～7：  
00）

発芽シャーレ：152×72×25 mm（内径）  
のスチロール製角形シャーレ。底にろ紙  
を1又は2枚敷く。

種子処理：果肉の除去以外，種子消毒，  
種皮の切傷等の処理は行わなかった。

発芽期間：原則置床から1ヶ月で終了。発  
芽の可能性の有るものは継続した。

発芽調査：発根及び出葉（子葉は展開時，  
鞘葉は出葉時）の2段階で行った。

## （2）トウキ種子の洗浄処理

材料：トウキ（*Angelica acutiloba*）平成  
18年（2006年）産種子 100粒重 0.235  
～0.245 g

洗浄液： 1) 蒸留水，2) アルカリ性洗  
剤（シカクリーン LX-3 関東化学）1%  
濃度液

方法：1lの三角フラスコに種子30 gと蒸  
留水又は洗剤液を500 ml入れ，8時間また  
は24時間振とうを行った。24時間振とう  
は，途中8時間時に液を交換した。発芽確  
認用種子は，乾燥種子では24時間，8時間  
処理種子では処理後16時間蒸留水に浸漬

したものを用いた。処理後種子を水道水  
の流水で良く洗浄し，除湿器設置の室内  
で約1ヶ月乾燥し，再度発芽率を確認し，  
封入後低温下に貯蔵した。

種子封入：ラミジップアルミチャック袋  
（0.089×85×120 mm AL-D 生産日本  
社）に乾燥種子約1.5 g，脱酸素剤及びシリ  
カゲルを各1個入れ，脱気後密封した。  
封入前に種子の含水量を測定した。

発芽温度：20℃

照明条件：（1）に準じた。

試験区：1) 蒸留水8時間振とう，2) 蒸留  
水24時間振とう，3) 1%洗剤液8時間振と  
う，4) 1%洗剤液24時間振とう，5) 無処  
理 スチロール製角形シャーレ1個に50  
粒置床。3反復。

発芽抑制の確認：アサガオ，キビ，黒ゴ  
マ種子を対象に，洗浄処理廃液の発芽抑  
制の影響を検討した。

## C. 研究結果

### （1）発芽適温と発芽率の経年変化

総数120点の種子について，発芽率及び  
発芽温度を調査した（表1）。また，種子  
の基本データとして，平成18年度採取種  
子の一部について，100粒重ならびに種子  
の大きさを測定した（表2）。

種子の発芽適温は植物種によって様々  
であり，植物毎に調べる必要がある。今  
回は，全く情報の無い種については，15℃  
から35℃まで5℃刻みで5点，また，何  
らかの情報があるものについては，2～  
3点の温度で発芽試験を行った。15℃～  
20℃の比較的低い温度で最も高い発芽率  
を示したものは，ゲンノショウコ，ウツ

ボグサ、アサガオ、オオバコ、クララ、メハジキ、ミシマサイコ、ハマボウフウ等であり、30℃～35℃という高温で最も良い結果を与えたのは、エビスグサ、カワラケツメイ、ハトムギ、ホソバセンナ等であった。

貯蔵期間16年の平成2年産種子では、フヨウ、ホソバセンナ、モロヘイヤが高い発芽率を示し、発根率-出葉率はそれぞれ92%-86%、70%-58%、70%-60%であったが、エヒサゴは発根率が60%と高かったものの、出葉率は15%と低かった。

貯蔵期間3年の平成15年産種子では、カワラケツメイの発根率及び出葉率がともに100%と極めて高く、ゲンノショウコがやや高い発芽率を示した(66%-56%)。

貯蔵期間2年の平成16年産種子では、キビ、ゲットウ、ゴジカの発根率及び出葉率が100%であった。

貯蔵期間1年の平成17年産種子では、アサガオ(黒実)の発根率及び出葉率が100%であった。

発芽率の経年変化を見ると、アカメガシワでは低温下でも貯蔵1年目から2年目の1年間に発芽率が半減したが、平成18年産種子の結果から、紙袋に入れ室内に放置した場合、採種後3ヶ月で急激に発芽力を失った。同様にハマビワも同条件下では、採種後1ヶ月で発芽力を失った。

また、ホソバセンナは貯蔵期間が16年でも高い発芽率を有する一方、平成17年産種子の出葉率が8%と低く、種子の状態によって発芽率が異なる場合が見られた。

なお、発芽率の経年変化に供した種子材料は、種子交換に用いた種子の余剰分

であったため、各年度で必ずしも同一種を供試することができなかった。

## (2) トウキ種子の洗浄処理

洗浄処理直後に行ったトウキ種子の発芽試験結果を表3に示した。

発根率は無処理>蒸留水24時間>1%洗剤液24時間>1%洗剤液8時間>蒸留水8時間の順であったが、その差は小さく、高い値を示した。しかし、1%洗剤液24時間及び無処理を除き、根は発根後褐変し、出葉率が著しく低下した。1%洗剤液24時間においてはわずかに褐変が見られたが、無処理では全く見られなかった。根の褐変は処理中の洗剤あるいは発芽抑制物質の吸収による影響と推察された。洗浄処理により上記障害が見られたものの、発芽が促進される傾向が見られた。

乾燥後に再度行った発芽試験では、発根率にはほとんど変化がなく、出葉率は処理直後よりむしろ高くなる傾向が見られた。

一方、トウキ種子を洗浄した洗浄液については、アサガオ、キビ、ゴマの種子に対する発芽抑制試験を行った(図1)。洗剤液を用いたものでは洗剤の影響が強く現れ、いずれの種子の発芽も抑制された。一方、蒸留水を使った洗浄液では、キビ、ゴマの発芽が抑制されたのに対し、アサガオの発芽は抑制されなかったが、根の褐変や伸張の抑制が見られた。この結果から、トウキ種子には、発芽抑制物質が含まれているものと考えられた。

## D. 考察

薬用植物の種子の発芽条件等に関する

研究はほとんど行われておらず、情報の整備が必要となっている。今回、発芽適温が特定できたものについては、更に光に対する要求性を検討した上で、標準的な発芽試験法を設定して行く予定である。

貯蔵種子は年々発芽活性を失い、出根するものの出葉や展葉に至らず枯死するものが現れ、その程度は貯蔵条件や貯蔵期間に大きく左右される。そのため、種子の活力を確認するためには、出根のみならず異常のない健全葉の程度まで確認する必要がある。発芽は一般に高温状態で発根、出葉が短期間で行われるが、カビや蒸れ等により展葉前に枯死することが多い。一方、低温ではカビ等の発生が少ないものの、発根までに時間を要し、また展葉まで至らない場合がある。種子の活力状態を的確に把握するため、発芽試験における発芽適温は、上記のことを考慮し、できるだけ短時間に最高の発芽率が得られるよう設定する必要がある。

貯蔵期間中の発芽率の低下は明らかに植物の種類により異なり、10年以上も高い発芽率を有するものや急速に低下するものがある。薬用植物の種子の貯蔵条件と寿命に関しほとんど不明であり、今後貯蔵温度のみならず、貯蔵前の種子の乾湿状態等も含め、植物種毎にさらに検討が必要である。

## E. 結論

総数 120 点について、発芽率及び発芽温度を調査した。

貯蔵期間16年の種子では、フヨウ、ホソバセンナ、モロヘイヤが高い発芽率を示し、発根率-出葉率はそれぞれ92%

-86%, 70%-58%, 70%-60%であった。貯蔵期間2年のキビ、ゲットウ、ゴジカ及び同1年のアサガオ（黒実）の発根率及び出葉率は100%であった。

発芽率の経年変化では、アカメガシワの発芽率は低温下でも1年間で半減したが、採種後紙袋に入れて室内で放置すると3ヶ月で発芽力が消失した。ホソバセンナは長期貯蔵でも高い発芽力を有す一方で、貯蔵期間1年での出葉率が8%と低い場合も見られ、種子の採取時の状況や保存条件によっても発芽率が異なることが明らかとなった。

トウキ種子の長期保存方法を検討するため、種子の洗浄処理を行い、発芽状態を確認の上、乾燥、密封状態で低温貯蔵を開始した。

## 引用文献

- 1) 国際種子検査規定，農林水産省種苗管理センター，平成3年3月。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

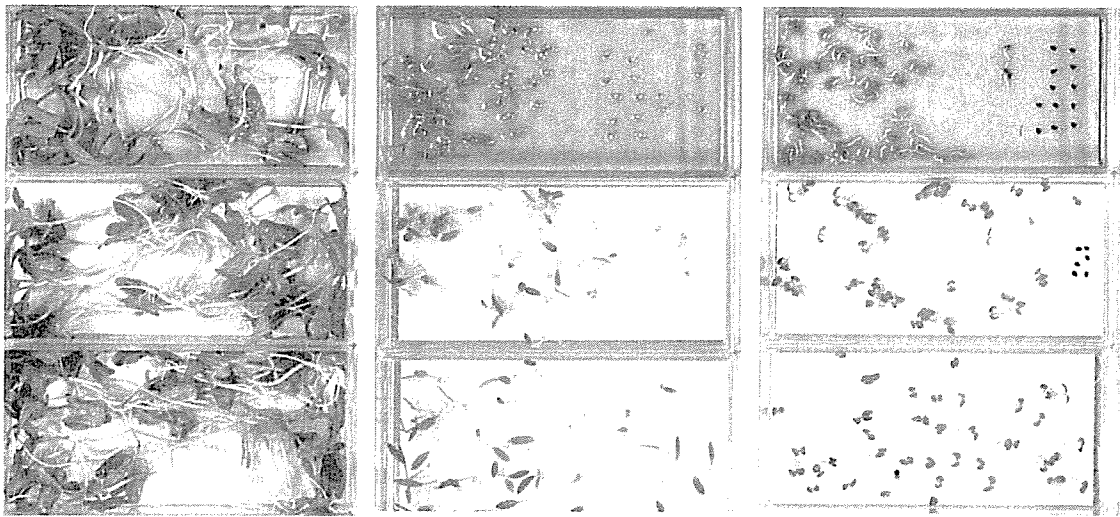
## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表3 トウキ種子の発芽率(処理直後)

区	供試種子数	発根数	発根率%	平均所要 日数	出葉数	出葉率%	平均所要 日数
蒸留水8h	50	42.3±3.1	84.7±6.1	13.3±0.6	14.7±3.1	29.3±6.1	20.4±0.8
蒸留水8h+16h	50	44.7±3.5	89.3±7.0	13.1±0.6	25.3±6.5	50.7±13.0	19.0±0.6
1%洗剤液8h	50	42.7±1.2	85.3±2.3	12.8±0.2	4.3±0.6	8.7±1.2	17.2±0.8
1%洗剤液8h+16h	50	44.0±4.6	88.0±9.2	12.5±1.0	37.0±2.6	74.0±5.3	19.4±0.7
無処理	50	46.3±1.5	92.7±3.1	13.8±0.5	39.7±1.2	79.3±2.3	22.9±0.6

Mean±S.D.(n=3)



アサガオ

キビ

黒ゴマ

各植物とも上段から

1回目洗浄液

2回目洗浄液

蒸留水

図1 トウキ種子洗浄液による発芽抑制

表1 採種年別薬用植物等種子の発芽率及び発芽温度 (発芽試験期間2006.4~12)

採種年	植物名	供試種子数	発根率 %	発根 至適温度	発根 開始日数	発根平均 所要日数	出葉率 <sup>2)</sup> %	出葉 至適温度	出葉 開始日数	出葉平均 所要日数	発芽 最適温度	未発芽種子		
1989(H元) <sup>1)</sup>	ゴジカ Bracteantha	50	6.0	25,35	1	3.0	0	—	—	—	未確定	インドジャボク(28日間,カビ)		
		50	8.0	15,20,25,30,35	7	9.8	8.0	15,20,25,30,35	11	16.5	16.5	未確定	キダチチオウセンアサガオ(32日間) タチノウゼン(13日間,腐敗) 食用ホオズキ(32日間) トウモロコシ(32日間) Prunella(54日間)	
	1990(H2)	*エヒサゴ カワラケツメイ	20	60.0	25,30,35	3	4.9	15.0	25,30,35	8	8.7	30~35	アカメガシワ(37日間)	
			50	18.0	30,35	4	5.2	18.0	30,35	5	6.3	30~35	インドジャボク(23日間,カビ)	
		*キダチチオウガラシ	50	36.0	25,30	14	28.2	8.0	25,30	16	25.3	25~30	オオバユウカリ(28日間)	
			50	32.0	15,20,25,30,35	3	6.6	26.0	15,20,25,30,35	3	6.4	未確定	クチナシ(日大系:28日間)	
		*ケンポナシ	25	8.0	15,25	10	12.0	8.0	15,25	14	17.0	未確定	ゲットウ(37日間,腐敗)	
			50	8.0	15,20,25,30,35	1	2.5	0	—	—	—	未確定	コロシントウリ(23日間,腐敗)	
		*トカドヘチマ	10	20.0	25,30,35	2	2.5	20.0	25,30,35	6	6.5	6.5	未確定	サルトリイバラ(37日間)
			25	50.0	20,25,30	6	6.6	28.0	20,25,30	6	6.3	6.3	未確定	ジギタリス(34日間)
*ニシインドコキユウリ		50	24.0	15,20,25	2	4.1	2.0	25	25	7	7.0	25~30	シマカナメモチ(20日間,腐敗)	
		50	92.0	15,20,25,30,35	2	2.4	86.0	15,20,25,30,35	5	5.4	5.4	30~35	シンノウヤシ(37日間)	
*フヨウ	50	70.0	15,20,25,30,35	2	2.3	58.0	15,20,25,30,35	5	5.9	5.9	30~35	トウキ(42日間,腐敗)		
	50	70.0	15,20,25,30,35	2	3.1	60.0	15,20,25,30,35	3	5.6	5.6	25~30	ナンハンカラスウリ(32日間) ハゼノキ(37日間) ハシバア(35日間)		
2003(H15)	アオジソ	50	4.0	15,20,30	7	8.5	4.0	15,20,30	10	11.5	未確定	タカクマムラサキ(40日間)		
		50	46.0	15,20,25,30	15	25.6	40.0	15,20,25,30	22	35.0	20	ホソゴシユユ(37日間)		
	オオハマギキョウ	50	100	25,30,35	6	14.5	100	25,30,35	7	16.1	30(25~35)	—		
		50	66.0	15,20,25	10	14.2	56.0	15,20,25	13	19.2	15(15~25)	—		
	コガネバナ	50	8.0	15,25,30	19	20.8	6.0	15,25,30	19	21.3	未確定	—		
		9	44.0	20,25,30,35	6	12.3	33.0	20,25	22	23.7	20~25	—		
	ホウライアオキ	50	10.0	30	9	20.6	2.0	30	36	36.0	30	—		
		25	20.0	15,20,25,30	18	20.8	4.0	20,25	48	48.0	25	アシタバ(18日間,腐敗)		
	2004(H16)	アオノクマタケラン	50	38.0	25,30	12	24.2	28.0	25,30	20	32.6	25~30	クスノハガシワ(3ヶ月)	
			50	96.0	15,20,25,30,35	2	2.1	96.0	15,20,25	5	5.3	20(15~25)	ハシバア(ドレステン系:34日間)	
アサガオ		50	48.0	15,20	10	12.4	48.0	15,20	12	15.3	15	—		
		25	52.0	25,30,35	2	3.5	0	—	—	—	—	未確定		

採種年	植物名	供試種子数	発根率 %	発根 至適温度	発根 開始日数	発根平均 所要日数	出葉率 <sup>2)</sup> %	出葉 至適温度	出葉 開始日数	出葉平均 所要日数	発芽 最適温度	未発芽種子
	エビスグサ	50	64.0	25,30,35	1	20.7	64.0	25,30,35	2	22.9	35(25~30)	
	エビスグサモドキ	50	98.0	15,20,25,30,35	2	3.5	98.0	15,20,25,30,35	5	6.5	30	
	オオイタビ	100	89.0	15,20,25,30,35	10	14.4	85.0	15,20,25,30	13	17.9	25	
	オオハコ	100	16.0	15,20	13	14.3	16.0	15,20	20	16.9	20	
	キビ	100	100	15,20,25,30,35	2	3.5	100	15,20,25,30,35	5	5.0	25	
	クチナシ(伊豆系)	50	70.0	15,20,25	21	47.7	56.0	20,25	22	34.3	25	
	クチナシ(日大系)	50	82.0	20,25,30,35	12	23.0	62.0	25,30,35	18	23.2	25(30)	
	クララ(大平産)	50	28.0	20,25,30	13	27.9	28.0	20,25	21	34.9	20~25	
	クララ(当場産)	50	80.0	15,20,25,30	12	19.0	80.0	15,20,25,30	19	28.2	20~25	
	クロゴマ	100	99.0	20,25,30,35	2	2.0	99.0	20,25,30,35	5	5.0	30(25~30)	
	ゲツウ	50	100	15,20,25	16	22.9	100	15,20,25	27	28.0	20(25)	
	ゴジカ	100	100	15,20,25,30,35	2	2.2	100	15,20,25,30,35	3	6.0	30(25~35)	
	コロシントウリ	25	36.0	20,25,30	3	4.1	32.0	20,25	9	12.3	25	
	シロハナヨウシュユウセンアサガオ	100	69.0	15,20,25,30,35	5	5.0	25.0	2	12	13.0	25~30	
	シンノウヤシ	50	60.0	25,30,35	50	64.3	22.0	30	56	67.5	30	
	トウガラシ(タカノヅメ)	25	96.0	15,20,25,30,35	5	8.3	64.0	25,30	9	16.6	25	
	トウガン	25	96.0	30,35	4	5.7	0	—	—	—	未確定	
	トウゴマ	25	4.0	30,35	2	2.0	0	—	—	—	未確定	
	ニシインドキユウリ	50	90.0	15,20,25,30,35	2	2.8	74.0	15,20,25,30	3	6.2	20~25	
	ハトムギ(穀付き)	50	88.0	20,25,30,35	3	3.7	86.0	20,25,30,35	3	4.2	30	
	ハブソウ	50	40.0	20,25,30	2	6.3	34.0	20,25,30	5	9.5	20(25,30)	
	ハマゴウ	50	10.0	15	58	86.6	0	—	—	—	未確定	
	ホソハセンナ	50	96.0	15,20,25,30,35	4	4.0	50.0	20,25	4	6.9	25	
	ボタンボウフウ	50	70.0	15,20,25	16	20.7	58.0	15,20,25	23	33.1	15	
	メハジキ	50	72.0	15,20,25,30,35	5	6.2	68.0	15,20,25,30,35	10	13.1	25(15~30)	
2005(H17)	アカメガシワ	50	70.0	20,25,30	11	16.7	58.0	20,25,30	19	26.0	20~30	アシタバ(22日間, 腐敗)
	アサガオ(黒実)	25	100	15,20,25,30,35	1	2.0	100	15,20,25,30,35	3	3.7	20~30	アミガサユリ(32日間)
	インドジャボク	25	20.0	25,30,35	7	14.4	16.0	25,30,35	14	18.5	30~35	オオカラスウリ(30日間)
	エビスグサ	50	94.0	15,20,25,30,35	5	10.8	86.0	15,20,25,30,35	5	12.4	25~30	ニガキ(32日間)
	キビ	100	98.0	15,20,25,30,35	2	2.1	98.0	15,20,25,30,35	2	2.6	30	ハマボウフウ(30日間)
	クチナシ(日大系)	50	96.0	15,20,25,30,35	6	10.5	84.0	20,25,30	18	21.9	20~30	
	クララ	25	32.0	20,25,30,35	4	9.3	32.0	20,25,30,35	7	13.3	25~30	
	クロゴマ	50	96.0	25,30,35	1.0	2.3	96.0	25,30,35	5	5.5	25	
	シロハナヨウシュユウセンアサガオ	50	78.0	15,20,25,30	8	11.1	14.0	20	11	16.1	20	
	トウガラシ(タカノヅメ)	50	66.0	15,20,25,30,35	4	8.3	12.0	20,25,30	8	13.2	20~30	
	ハトムギ(穀付き)	15	73.3	20	4	4.1	73.3	20	4	4.5	20~25	
	ハバパイア	50	60.0	20,25,30	7	10.4	22.0	20,25,30	14	17.1	25~30	
	ハブソウ 1回目	50	36.0	20,25,30	4	6.4	32.0	20,25,30	5	8.9	20~30	



採種年	植物名	供試種子数	発根率 %	発根 至適温度	発根 開始日数	発根平均 所要日数	出葉率 <sup>2)</sup> %	出葉 至適温度	出葉 開始日数	出葉平均 所要日数	発芽 最適温度	未発芽種子
2006(H18)	ハブソウ 2回目	50	54.0	15,20,②,30,35	2	5.7	52.0	⑬,20,25,30	11	20.4	20~30	
	ヒメヒオウギ	50	88.0	15,④,⑤	20	29.3	88.0	15,④,⑤	28	34.2	20	
	ベニノキ	25	52.0	20,25,30,③	6	8.4	12.0	25	11	14.3	25	
	・ホンバセンナ	50	62.0	⑬,⑭,⑮,30,35	4	4.3	8.0	20	8	9.5	20~30	
	ボタンボウフウ	50	94.0	⑮,⑯,⑰	14	18.7	94.0	15,⑱,25	21	28.3	20	
	ミシマサイコ(韓国系)	50	16.0	15,⑳,25	19	25.3	4.0	20	25	25.0	20	
	ミシマサイコ(和歌山系)	50	28.0	⑮,20,25	12	20.7	21.0	⑮,20,25	21	30.3	15~20	
	*アカメガシワ 取り播き	50	60.0	⑳	9	14.3	54.0	⑳,30	17	21.9	25~30	サジオモダカ(73日間)
	アカメガシワ 貯蔵1ヶ月 ポリ袋5℃	25	60.0	30℃設定	6	10.5	56.0	30℃設定	13	18.1		モモ <sup>3)</sup>
	アカメガシワ 貯蔵1ヶ月 紙袋室温	25	60.0	30℃設定	6	10.1	52.0	30℃設定	11	15.3		リュウキウエイチゴ(2ヶ月)
	アカメガシワ 貯蔵1ヶ月 ポリ袋5℃	25	0	20℃設定	—	—	0	20℃設定	—	—		腐敗 リュウケツヅジュ(31日間)
	アカメガシワ 貯蔵1ヶ月 紙袋室温	25	32.0	20℃設定	18	23.0	24.0	20℃設定	28	31.0		
	アカメガシワ 貯蔵3ヶ月 ポリ袋5℃	50	52.0	30℃設定	11	14.9	28.0	30℃設定	15	24.2		
	アカメガシワ 貯蔵3ヶ月 紙袋室温	50	6.0	30℃設定	7	9.7	6.0	30℃設定	17	25.0		
	シロバナムシヨケギク(和歌山産) 取り播き 1回目	50	6.0	15,20	10	11.3	6.0	15,20	11	12.3		15~20
	シロバナムシヨケギク(和歌山産) 取り播き 2回目	50	4.0	15,20,25	7	11.3	4.0	15,20,25	10	13.3		15~25
	ハマビワ 取り播き	25	100	⑳,25,30	23	35.3	100	⑳,25,30	31	46.8	20	
	ハマビワ 貯蔵1ヶ月 ポリ袋5℃	25	76.0	30℃設定	13	23.5	64.0	30℃設定	25	26.1		
ハマビワ 貯蔵1ヶ月 紙袋室温	25	4.0	30℃設定	55	55.0	4.0	30℃設定	60	60.0			
*ハマビワ 貯蔵4ヶ月 ポリ袋5℃	25	68.0	20℃設定	20	23.7	68.0	20℃設定	27	33.9			
*ハマビワ 貯蔵4ヶ月 紙袋室温	25	0	20℃設定	—	—	0	20℃設定	—	—			
ハマビワ 貯蔵6ヶ月 ポリ袋5℃	25	48.0	20℃設定	22	29.3	40.0	20℃設定	32	43.0			
ハマビワ 貯蔵6ヶ月 紙袋室温	25	0	20℃設定	—	—	0	20℃設定	—	—			
ハマボウフウ 取り播き	50	28.0	⑮,20	24	30.0	28.0	⑮,20	35	49.0	15		

<sup>1)</sup> 貯蔵開始年、<sup>2)</sup> 子葉は展開した時、<sup>3)</sup> 種子を湿らせた砂とともに5℃、3ヶ月貯蔵で発根

植物名の前の・及び\*印は、発芽チャンバー内の温度上昇に遭遇。

・印 15℃→15~21.5℃, 20℃→20~26.3℃, 25℃→25~29.7, 30℃→30~33.2℃, 35℃→35~35.6℃

\*印 15℃→16~18℃, 20℃→21~24℃, 25℃→26~28, 30℃→31~32

発根並びに出葉至適温度で○が付いている温度は、発根/出葉率が最も良かった温度

表2 薬用植物種子の100粒重並びに大きさ

No.	和名	100粒重 (mg)	種の高さ (mm)	種の長径 (mm)	種の短径 (mm)
1	アカジソ	72.7	1.22	1.34	1.34
2	アカネ	978.2	3.41	3.36	2.10
3	アキカラマツ	15.7	2.73	0.89	0.70
4	アマチャヅル	1,025.1	3.49	2.65	2.42
5	アメリカアリタソウ	23.2	0.82	0.91	0.61
6	イヌザンショウ	769.3	2.55	2.45	2.42
7	イブキジャコウソウ	13.5	1.63	0.78	0.65
8	イブキトラノオ	136.9	3.57	1.82	1.57
9	ウイキョウ	209.8	5.06	2.00	0.91
10	ウイタニア・ソムニフェラ	95.6	2.38	2.11	0.50
11	ウツボグサ	24.1	1.59	1.06	0.73
12	エゴマ	162.7	1.53	1.58	1.27
13	エゾカノコソウ	47.4	2.11	1.43	0.65
14	エビスグサ	2,488.0	4.55	2.86	2.69
15	オオバコ	55.3	1.93	0.85	0.65
16	オオバナオケラ	2,707.4	8.80	3.10	1.79
17	オカトラノオ	29.0	1.10	0.90	0.27
18	オトギリソウ	4.2	0.91	0.35	0.28
19	オトコエシ	41.1	1.42	1.23	0.70
20	オミナエシ	59.0	2.33	1.80	0.60
21	カワミドリ	22.1	1.95	1.17	0.58
22	カワラケツメイ	543.6	3.98	3.23	0.91
23	キササゲ	223.2	10.00	2.73	0.34
24	キバナオウギ	629.1	2.97	2.70	1.32
25	クサノオウ	33.0	1.31	0.84	0.80
26	クチナシ	244.4	3.23	2.70	0.59
27	ケイガイ	23.6	1.42	0.68	0.56
28	ゲンノショウコ(白花)	269.2	1.89	1.44	1.39
29	コガネバナ	105.5	1.77	1.19	1.15
30	サジオモダカ	42.3	2.34	1.60	0.55
31	サラシナショウマ	98.4	3.85	1.51	1.01
32	ジキタリス	8.2	0.73	0.50	0.40
33	シナカンゾウ	1,121.3	2.91	2.68	2.11
34	スイカズラ	115.7	3.28	2.16	0.60
49	スコポリア・ルシダ	576.1	3.38	2.09	2.76
35	タチフウウロ	395.2	1.98	2.80	1.81
36	ツリガネニンジン	48.9	1.27	1.00	0.65
37	トウスケボウフウ	290.4	5.84	2.65	0.89
38	トリカブト	54.8	4.20	2.43	0.92
39	ノイバラ	1,043.0	5.39	3.05	2.32
40	ハッカ(赤坂)	8.5	1.17	0.80	0.63
41	ハナスゲ	676.5	8.82	3.78	1.44
42	ヒキオコシ	84.9	1.73	1.12	0.84
43	ヒナタイノコズチ	249.0	2.74	1.12	1.02
44	ヒロハセネガ	349.2	3.43	1.75	1.75
45	ホソババレンギク	167.5	3.87	2.76	1.78
46	マルバインコズチ	179.6	2.05	0.98	0.94
47	マルバダイオウ	470.0	6.70	4.78	4.63
48	ムラサキバレンギク	281.2	4.30	2.71	1.94

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
I. Abe, T. Abe, K. Wanibuchi, and H. Noguchi	Enzymatic Formation of Quinolone Alkaloids by a Plant Type III Polyketide Synthase	<i>Organic Letters</i>	8 (26)	6063-6065	(2006)
T. Abe, H. Noma, H. Noguchi and I. Abe	Enzymatic formation of an unnatural methylated triketide by plant type III polyketide synthases	<i>Tetrahedron Letters</i>	47	8727-8730	(2006)
H. Morita, S. Kondo, T. Abe, H. Noguchi, S. Sugio I. Abe and T. Kohno	Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a novel plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone	<i>Acta Crystallographica</i>	62	899-901	(2006)
I. Abe, T. Watanabe, H. Morita, T. Kohno and H. Noguchi	Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides: Manipulation of Chalcone Synthase	<i>Organic Letters</i>	8(3)	499-502	(2006)
I. Abe, T. Watanabe, W. Lou, H. Noguchi	Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase	<i>FEBS Journal</i>	273	208- 218	(2006)
H. Takemoto, M. Ito, T. Shiraki, T. Yagura, G. Honda	Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components	<i>J. Natural Medicines</i>	submitted		

# Enzymatic Formation of Quinolone Alkaloids by a Plant Type III Polyketide Synthase

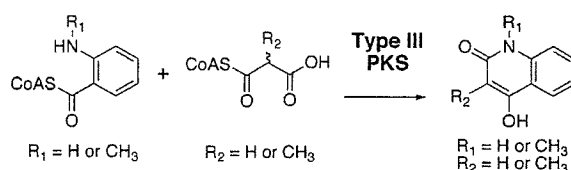
Ikuro Abe,<sup>\*,†,‡</sup> Tsuyoshi Abe,<sup>†</sup> Kiyofumi Wanibuchi,<sup>†</sup> and Hiroshi Noguchi<sup>†</sup>

School of Pharmaceutical Sciences and the COE 21 Program, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526, Japan, and PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

abei@ys7.u-shizuoka-ken.ac.jp

Received October 13, 2006

## ABSTRACT



Benzalacetone synthase from *Rheum palmatum* efficiently catalyzed condensation of *N*-methylanthraniloyl-CoA (or anthraniloyl-CoA) with malonyl-CoA (or methylmalonyl-CoA) to produce 4-hydroxy-2(1*H*)-quinolones, a novel alkaloidal scaffold produced by a type III polyketide synthase (PKS). Manipulation of the functionally divergent type III PKSs by a nonphysiological substrate thus provides an efficient method for production of pharmaceutically important quinolone alkaloids.

The functional diversity and catalytic potential of the chalcone synthase (CHS) (EC 2.3.1. 74) superfamily of type III polyketide synthases (PKSs) are remarkable.<sup>1</sup> The structurally simple homodimeric proteins catalyze iterative decarboxylative condensations of malonyl-CoA with a CoA-linked starter molecule to produce a variety of biologically active secondary metabolites. For example, CHS, a pivotal enzyme in flavonoid biosynthesis, catalyzes sequential condensation of 4-coumaroyl-CoA with three C<sub>2</sub> units from malonyl-CoA to produce a tetraketide naringenin chalcone (Scheme 1A),<sup>2</sup> whereas benzalacetone synthase (BAS) from *Rheum palmatum* (Polygonaceae) carries out a one-step decarboxylative condensation of 4-coumaroyl-CoA with malonyl-CoA to produce the C<sub>6</sub>–C<sub>4</sub> skeleton of a diketide benzalacetone (Scheme 1B).<sup>3</sup> One of the most characteristic features is that plant type III PKSs exhibit unusually broad, promiscuous substrate specificities; the enzymes readily accept a variety of nonphysiological substrates, including aromatic and aliphatic CoA thioesters, to produce a vast array of chemically and structurally distinct unnatural polyketides.<sup>4,5</sup>

<sup>†</sup> University of Shizuoka.

<sup>‡</sup> PRESTO.

(1) For recent reviews, see: (a) Schröder, J. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Elsevier: Oxford, 1999; Vol. 2, pp 749–771. (b) Austin, M. B.; Noel, J. P. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79–110.

We now report that the diketide-producing *R. palmatum* BAS efficiently catalyzes condensation of *N*-methylanthraniloyl-CoA (or anthraniloyl-CoA) with malonyl-CoA (or methylmalonyl-CoA) to produce 4-hydroxy-2(1*H*)-quinolones, a

(2) (a) Ferrer, J. L.; Jez, J. M.; Bowman, M. E.; Dixon, R. A.; Noel, J. P. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 775–784. (b) Jez, J. M.; Ferrer, J. L.; Bowman, M. E.; Dixon, R. A.; Noel, J. P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 890–902. (c) Jez, J. M.; Noel, J. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39640–39646. (d) Jez, J. M.; Bowman, M. E.; Noel, J. P. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14829–14838. (e) Tropf, S.; Kärcher, B.; Schröder, G.; Schröder, J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7922–7928. (f) Suh, D. Y.; Fukuma, K.; Kagami, J.; Yamazaki, Y.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y.; Sankawa, U. *Biochem. J.* **2000**, *350*, 229–235. (g) Austin, M. B.; Bowman, M. E.; Ferrer, J.-L.; Schröder, J.; Noel, J. P. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1179–1194. (h) Abe, I.; Watanabe, T.; Morita, H.; Kohno, T.; Noguchi, H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 499–502.

(3) (a) Abe, I.; Takahashi, Y.; Morita, H.; Noguchi, H. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3354–3359. (b) Abe, I.; Sano, Y.; Takahashi, Y.; Noguchi, H. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25218–25226.

(4) (a) Abe, I.; Morita, H.; Nomura, A.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11242–11243. (b) Morita, H.; Takahashi, Y.; Noguchi, H.; Abe, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *279*, 190–195. (c) Morita, H.; Noguchi, H.; Schröder, J.; Abe, I. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3759–3766. (d) Abe, I.; Takahashi, Y.; Noguchi, H. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3623–3626. (e) Abe, I.; Takahashi, Y.; Lou, W.; Noguchi, H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1277–1280. (f) Abe, I.; Watanabe, T.; Noguchi, H. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2447–2453. (g) Oguro, S.; Akashi, T.; Ayabe, S.; Noguchi, H.; Abe, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 561–567. (h) Abe, I.; Utsumi, Y.; Oguro, S.; Morita, H.; Sano, Y.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1362–1363. (i) Abe, I.; Oguro, S.; Utsumi, Y.; Sano, Y.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12709–12716. (j) Abe, T.; Noma, H.; Noguchi, H.; Abe, I. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8727–8730.