

表4. 2年生ウラルカンゾウ再生植物体の生育とグリチルリチン含量・収量（鉢栽培）

		GuH			Gu		
		平均	SD	%CV	平均	SD	%CV
生育調査(長さ cm)	草丈	80.83	3.06	3.8	60.33	13.51	22.4
	節数	26.00	3.46	13.3	23.00	3.61	15.7
	最大葉長	13.09	5.73	43.8	14.42	1.27	8.8
	最大葉幅	4.69	0.60	12.7	5.86	0.95	16.2
	最大頂小葉長	2.60	0.29	11.3	3.16	0.17	5.3
	最大頂小葉幅	1.89	0.54	28.8	1.99	0.11	5.4
	最大側小葉長	2.46	0.41	16.7	2.94	0.75	25.4
	最大側小葉幅	1.63	0.04	2.5	2.04	0.34	16.7
	主根長	54.63	9.10	16.7	46.40	11.45	24.7
	最大主根幅	1.33	0.11	8.0	1.24	0.17	13.6
収量 (乾燥重g)	小葉	0.41	0.05	11.2	0.86	0.58	67.0
	葉軸	0.21	0.13	62.3	0.16	0.12	72.5
	茎	2.48	1.21	48.7	2.34	0.98	41.7
	主根	8.27	3.11	37.6	12.28	1.43	11.6
	細根	0.97	0.73	75.3	1.45	0.42	29.4
	根茎	3.62	3.89	107.4	/	/	/
Glycyrrhizin % dry weight	茎	0.196	0.271	138.3	0.099	0.062	63.2
	主根	2.104	0.124	5.9	2.085	0.251	12.0
	細根	0.567	0.201	35.5	0.753	0.013	1.8
	根茎	2.133	0.547	25.7	/	/	/
Glycyrrhizin harvest mg/plant	茎	5.139	7.756	150.9	2.637	2.234	84.7
	主根	176.327	75.990	43.1	253.724	14.002	5.5
	細根	6.223	5.715	91.8	10.933	3.379	30.9
	根茎	13.842	1.906	13.8	/	/	/



図7. Gu2ストロン様培養物（左）及びストロン様培養物から育成した植物体（右）

表5. Gu2水耕栽培8ヶ月間の生育とグリチルリチン含量・収量

		フィールド式			ハイドロカルチャー		
		平均	SD	%CV	平均	SD	%CV
生育調査(長さ cm)	草丈	27.67	24.02	86.8	100.53	14.88	14.8
	節数	23.33	4.62	19.8	29.00	9.17	31.6
	最大葉長	4.08	4.24	104.0	18.19	2.01	11.0
	最大葉幅	2.79	2.87	102.9	7.10	1.50	21.1
	最大頂小葉長	2.31	2.12	91.6	3.68	0.93	25.2
	最大頂小葉幅	1.96	1.55	79.0	2.67	0.56	21.0
	最大側小葉長	3.21	/	/	3.60	0.33	9.1
	最大側小葉幅	2.48	/	/	2.17	0.21	9.5
	主根長	13.79	8.85	64.2	33.33	11.09	33.3
	最大主根幅	0.33	0.11	32.7	1.83	0.42	23.0
収量 (乾燥重g)	小葉	0.02	0.02	69.4	7.93	4.76	60.0
	葉軸	0.03	0.04	152.0	1.21	0.88	73.1
	茎	0.03	0.02	77.9	9.55	4.06	42.5
	主根	0.12	0.17	142.2	21.29	13.40	62.9
	細根	0.08	0.09	115.2	2.75	2.80	102.0
	根茎	/	/	/	/	/	/
Glycyrrhizin % dry weight	茎	0.051	0.036	71.3	0.146	0.047	31.9
	主根	0.647	0.626	96.8	1.841	0.107	5.8
	細根	0.071	0.048	67.2	0.058	0.033	57.4
	根茎	/	/	/	/	/	/
Glycyrrhizin harvest mg/plant	茎	0.018	0.024	132.9	13.177	3.938	29.9
	主根	1.488	2.436	163.7	401.422	274.619	68.4
	細根	0.070	0.097	137.7	1.124	0.775	69.0
	根茎	/	/	/	/	/	/



図8. ハイドロボール水耕栽培4ヶ月間のGu2 (培養苗)

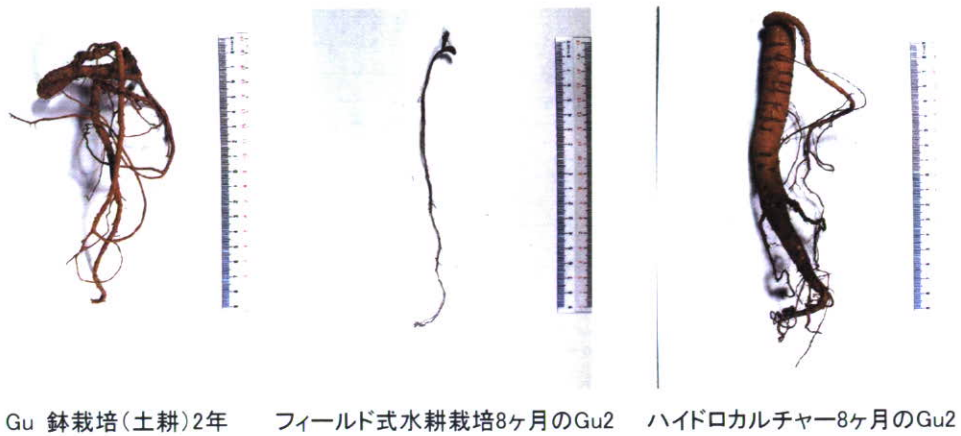


図9. 種々条件で栽培したGu主根

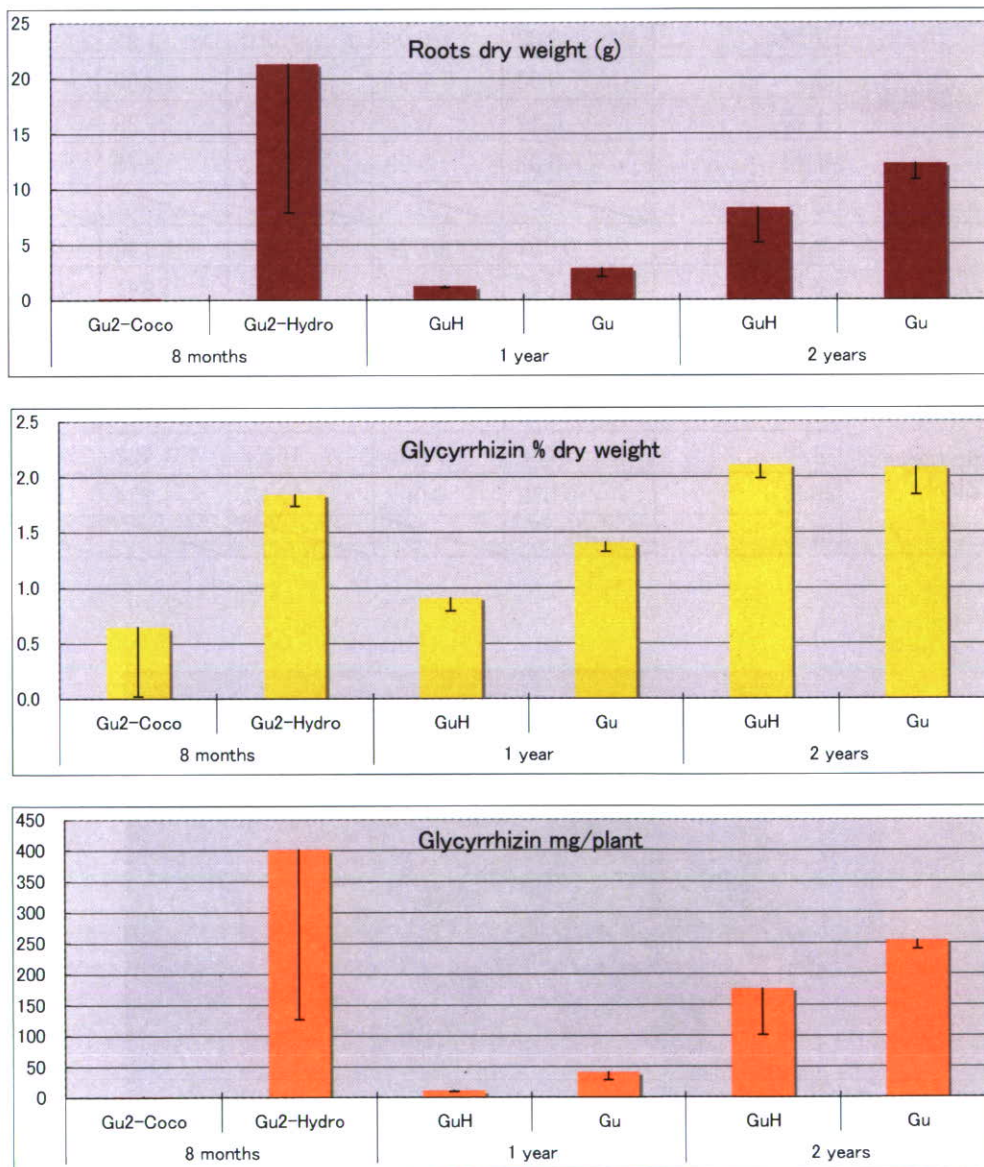


図10. 種々条件で栽培したウラルカンゾウ主根の収量、グリチルリチン含量・収量
 Gu2-Coco : フィールド式水耕栽培, Gu2-Hydro:ハイドロカルチャー

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物資源の安定確保と有効活用のための基盤的技術の研究
分担研究報告書

大規模機械化栽培による薬用植物の低コスト栽培法の確立

分担研究者 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

要旨

- 1) トウキの栽培生産は、1年間床で育成した苗を掘上げ、一定の大きさの苗を選別して圃場に定植する方法で行われるが、苗の選別は経験を要する。そこで、アスパラ収穫物の選別用に開発され、現在一般に普及している選別機を用いて苗選別作業の機械化を検討した。その結果、選別された苗のサイズと実測した根頭径の間には高い相関性が認められ、手作業での仕分けと同程度の選別精度が得られ能力的に応用可能であることが判明した。
- 2) 苗の圃場への定植作業は腰への負担が大きく健康上改善が要求される作業であるため、野菜苗の定植作業用に開発され、現在一般に普及している半自動定植機を用いて、トウキ、センキュウ、ゲンチアナ、ダイオウ及びボウフウについて、作業性及び定植後の活着率を調査した。その結果、従来の手植え作業と比べて、いずれもほぼ同様の活着率が得られ、また、作業の疲労度が低下するため作業者からは良い感想が得られ、実用化への目処をつけることができた。
- 3) 根を利用する薬用植物における収穫後の残茎の切取り作業は、現在剪定バサミ等による手作業で行われ、大量の収穫物を扱う場合には腱鞘炎等、作業者の健康を害する上に多大な時間を要する。そこで、ナイモウオウギを材料としてゴボウ用に開発された根切断機の応用を検討した結果、従来の手切り作業に比べて作業効率も良好で十分応用可能であることがわかった。

A. 研究目的

現在日本で使用される生薬の多くは中国をはじめとする外国に依存し、国内自給率は10%以下に低下しており、今後、安定した品質の生薬の安定供給をはかる上では国内での低コストでの栽培生産技術の確立が必要であり、そのためには大規模機械化栽培の実用化が必至である。

北海道では広大な圃場を利用した大型

機械農業が定着しているが、それら機械の薬用植物生産へ応用することによる大規模機械化栽培の実用化に向けた栽培・調製法の確立をはかるべく検討を行った。

19年度においては、これまで人力により行われてきたトウキ類の苗の選別作業、及び圃場への定植作業の機械化をトウキ、センキュウ、ダイオウ、ゲンチアナ、ボウフウについて検討した。また、次年度に向けて、根を利用する薬用植物について、収穫後の残茎の切取り作業の機械化を予備的に検

討した。

B. 研究方法

1) アスパラ選別機を用いたトウキ類苗の選別作業機械化に関する研究

材料：北海道研究部で継代栽培中のトウキ、ホッカイトウキ種子を2006年6月5日に幅1 m長さ10 mの床に播種し、それぞれ2007年5月1日、同年5月9日に掘り起こして材料とした。

選別用作業機と運転条件：アスパラ選別機（AS-Iin, オギワラ精機）を用いた。本機は6段階に仕分け可能な機械であり、それぞれ、1: 17 g<, 2: 14 g, 3: 11 g, 4: 8 g, 5: 5 g, 6: 5 g>, の重さに調整されているが、予備試験の結果、トウキ苗が軽すぎて目的が達成できないことが判明した。そこで、コンベア部の板上にそれぞれ約4 gの重りを固定して、苗の重さが1: 13 g<, 2: 10 g, 3: 7 g, 4: 4 g, 5: 1 g, 6: 1 g>, で作動するように改良し、1回転25秒で運転した。

調査：トウキ苗、152本、ホッカイトウキ苗、110本を機械にて選別し、各ランクに仕分けられた本数を数えた後、各苗の根頭径をノギスにより測定した。トウキ苗、3,092本、ホッカイトウキ苗、3,315本を材料にして、作業員8-9名にて機械選別を行い、作業時間を測定した。

2) 野菜移植機を使った苗の機械定植に関する研究

材料：1) で選別したトウキ、ホッカイトウキ苗に加え、センキュウ（2007年産種イモ）、ダイオウ（ペーパーポット苗）、ボウフウ（ペーパーポット苗）及びゲンチアナ（ペーパーポット苗）を用いた。ダイオウ及びボウフウは2007年4月9日に、ゲンチアナは2006年10月31日にビート用ペーパーポット（700穴、径3 cm×13.5 cm、用土：プライムミックス）に播種して育成した苗を用いた。

作業機と定植：半自動野菜移植機（ベジータキッドKP-1K, クボタ製）を用いて、トウキは2007年5月1日、ホッカイトウキ同年

5月10日、ダイオウ同年5月29日、ゲンチアナ同年6月8日、センキュウ同年10月4日に定植した。ホッカイトウキとセンキュウについては比較のため手植え作業でも行った。

調査：定植時における定植状況、定植に要した時間を測定した後、トウキは2007年5月30日、ホッカイトウキ同年5月31日、ダイオウ同年6月27日、ゲンチアナ同年6月27日に活着状況を調査した。

3) 連続ごぼう自動根切機を使った根頭部の切断作業に関する研究

材料：2005年5月24日に圃場に播種して栽培した3年生ナイモウオウギを2007年10月16日に掘上げ、水洗した後、1,334本の根（茎残基付き）を材料として用いた。

作業機の改良：連続ごぼう自動根切機（GCB-195A型、岡山農栄社製）を用いた。なお、最初に、予備試験的に試みたところ、切断中に根が固定されないため根が飛び跳ねて効率良く切断できないことがわかったため、上部に根を押さえる部品を取り付けて実施した。

調査：切断状況及び作業時間の測定を行った。比較として、従来から行われている剪定バサミや押し切りを用いた場合の作業時間について計測した。

C. 研究結果

1) アスパラ選別機を用いたトウキ類苗の選別作業機械化に関する研究

選別された苗のサイズと実測した根頭径の間にはヤマトトウキ $r^2=0.887$ ($n=152$), ホッカイトウキで $r^2=0.872$ ($n=110$) と高い相関性が認められた（図1）。そして、ランク3、ランク4及びランク5に仕分けされた苗の根頭径は、ヤマトトウキではそれぞれ 9.0 ± 0.91 mm, 6.3 ± 0.90 mm, 4.5 ± 0.79 mm, ホッカイトウキではそれぞれ 7.9 ± 0.83 mm, 5.6 ± 0.85 mm, 4.4 ± 0.48 mm で、これまで手作業で仕分けを行った「中（根頭径7-9 mm）」、「小（同5-7 mm）」、「極小（同3-5 mm）」の苗にそれぞれ良く

対応し、手作業での仕分けと同程度の選別精度が得られた。作業効率は、コンベア1回転25秒の設定において、10 m²の苗床から得られる約3,300本の苗の仕分けに1時間5分～1時間11分(1本当たり10.3～11.0秒/人)を要した。

2) 野菜移植機を使った苗の機械定植に関する研究

トウキの場合(10 aで測定)、移植成功率は64%±10%で、何らかの手直し作業が必要なケースが36%±10%の割合で発生したが、作業時間は手植え作業3時間35分/10 aに対し2時間54分±14分/10 aと大幅に短縮されることがわかった(表1)。定植した苗の活着率はヤマトトウキの中苗及び小苗93.5±3.4%、ホウキトウキの中苗及び小苗88.9±0.4%(手植え84.6±0.7)と良好な結果が得られた。また、ダイオウ(ペーパーポット苗、5 aで測定)の場合は、作業時間1時間21分/10 a、活着率は97.0±2.0%(手植え100%)、ボウフウの場合(ペーパーポット苗、60 m²で測定)、作業時間2時間46分/10 a、活着率は100%、ゲンチアナの場合(ペーパーポット苗、24 m²で測定)の活着率は93.6%と良好な結果であった。一方、センキュウ(種イモ、2 aで測定)の場合、作業時間は手植え4時間2分/10 aに対し4時間5分±1時間1分/10 aと少ない面積では手植えとの間に作業時間の優位性は認められなかった(表1)。

3) 連続ごぼう自動根切機を使った根頭部の切断作業に関する研究

試験的に実施した結果、手切り(401本の調査)6.3～6.86秒/本に対し機械切り(9回反復、合計933本の調査)5.0～5.9秒/本と効率良く切断できること、切断成功率は89%であることが判明した(表2)。

D. 考察

1) トウキ類苗の選別作業へのアスパラ選別機の応用は、選別された苗のサイズと実測した根頭径の間には高い相関性が認められ、手作業での仕分けと同程度の選別精度が得

られ、能力的に応用可能であることが判明した。しかし、苗の葉の展開の程度、土砂の付着程度が選別精度に強く影響するため、条件の統一が必要である。また、従来の手作業での作業時間の正確な計測データがなく、次年度に調査する。

2) 野菜移植機を使った苗の機械定植について、機械操作に慣れていないこともあって作業性の測定が十分正確に実施できなかった点があるが、従来の手植え作業と比べて、いずれもほぼ同様の活着率が得られ、また、作業の疲労度が低下するため作業者からは良い感想が得られ、今後の実用化への目処をつけることができた。また、トウキの場合、葉の展開の程度により、苗の落下が妨げられるため、成功率が低下することが明らかになり、実用化に向けてさらにデータが必要である。

3) 連続ごぼう自動根切機を使った根頭部の切断作業について、従来の手切り作業に比べて作業効率も良好で十分応用可能であることがわかった。次年度に他の植物を材料にして、詳細に調査する予定である。

E. 結論

1) アスパラ収穫物の選別用に開発され、現在一般に普及している選別機は、トウキ類苗の選別に能力的に応用可能であることが判明した。

2) 野菜苗の定植作業用に開発され、現在一般に普及している半自動定植機は、トウキ、センキュウ、ゲンチアナ、ダイオウ及びボウフウの、苗、種イモ、ペーパーポット苗の定植に応用可能であり、従来の手植え作業と比べて、いずれもほぼ同様の活着率が得られ、また、作業の疲労度が低下することが判明し、実用化への目処をつけることができた。

3) ゴボウ用に開発された根切断機は、根を利用する薬用植物における収穫後の残茎の切り取り作業に応用可能であり、従来の手切り作業に比べて作業効率も良好であることがわかった。

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

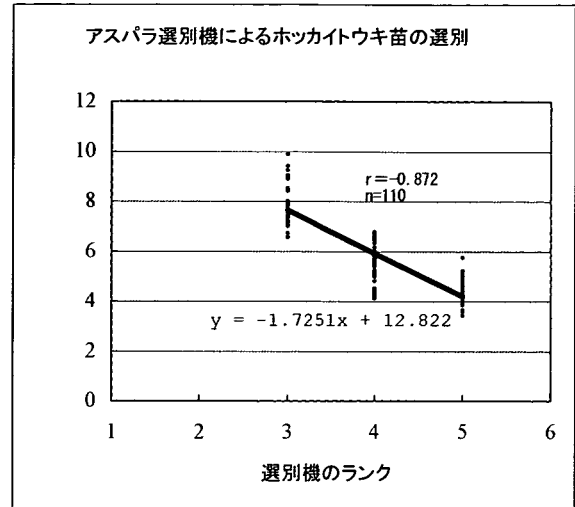
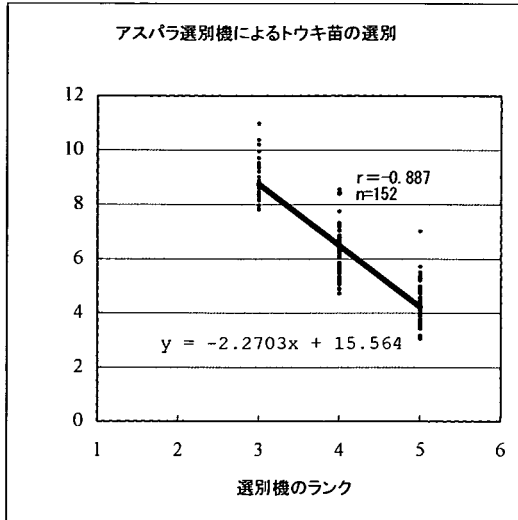


図1 アスバラ選別機により選別されたトウキ類苗のサイズ

表1 野菜移植機ベジータキッドKP-1K(クボタ製)定植による作業時間比較

10a当たり換算作業時間	
トウキ, 定植面積5a, 作業者5名(機械操作1名, 苗入れ1名, 補植者3名), 70cm×32cm	移植機 2時間54分32秒±15分4秒/3人(苗)
ホッカイトウキ, 定植面積5a, 作業者5名(機械操作1名, 苗入れ1名, 補植者3名), 70cm×32cm	移植機 2時間54分20秒±13分59秒/3人(苗) 手植え* 3時間34分56秒/3人(苗)
センキュウ, 定植面積2a, 作業者3名(機械操作1名, 苗入れ2名), 60cm×24cm	移植機 4時間5分±1時間1分15秒/1人(種イモ) 手植え** 4時間2分40秒/1人(種イモ)
ダイオウ, 定植面積5a, 作業者3名(機械操作1名, 苗入れ2名), 100cm×48cm	移植機 1時間21分40秒/3人(ペーパーポット苗)
ポウフウ, 定植面積60m ² , 作業者3名(機械操作1名, 苗入れ2名), 60cm×24cm	移植機 2時間46分/3人(ペーパーポット苗)

*50mの畝2列実施した時の時間を基に換算。

**20mの畝2列実施した時の時間を基に換算。

表2 連続自動根切機(GCB-195A型, 岡山農機社製)による3年生ナイモウオウギ根頭部の切断作業効率

	試行本数 本	切断成功 本	再試行必要 本	成功率 %	所要時間		作業者数 人	作業効率 秒/本・人	備考
					秒				
自動根切り機 平均	103.7	92.6	11.1	89.1	272.3	4分32秒	2	5.43 *	9反復, 合計933本
SD	16.9	18.6	8.8	8.9	36.8	(3分55秒~5分9秒)		0.43	作業者: 女性2
剪定バサミ	210	210	0	100	721	12分1秒	2	6.86 **	作業者: 女性・男性各1
押し切り	191	191	0	100	604	10分4秒	2	6.30 **	作業者: 女性・男性各1

10a当たり推定収穫数(16,000本)の切断に要する単純推定時間(換算値)は, *12時間6分/10a・2人,

**14時間~15時間14分/10a・2人(いずれも疲労による作業効率の低下は考慮していない)。

実施日: 2007年10月25日, 午前中, 時間の計測はストップウォッチによる。

薬用植物への新規遺伝子導入法の開発

分担研究者 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・研究員

協力研究者 千田 浩隆

（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・リサーチレジデント

我々の研究対象とする薬用植物は、一般に形質転換が困難である場合が多い。特に、未分化組織からの再分化の段階が障壁となるケースが多く、そのステップを経ない新規遺伝子導入法は、薬用植物形質転換法のブレークスルーとなる可能性が高い。本研究では、従来法では形質転換が困難であった薬用植物への迅速かつ高効率な遺伝子導入を実現するため、種子への遺伝子導入法や、アグロバクテリウム菌体を植物の幼分裂組織へ直接接種する *in planta* 遺伝子導入法の薬用植物への適用、最適化について検討し、脱分化、再分化過程を経ない新規遺伝子導入法の開発を行うことを目的とする。今年度はケシを材料とした種子への遺伝子導入法の研究を進め、発芽組織におけるマーカー遺伝子 GFP の一過的発現を指標として、導入用ベクター、催芽時間等の諸条件について検討した結果、形質転換効率を最大 8.5%まで上げることに成功した。

A. 研究目的

我々の研究対象とする薬用植物は、一般に形質転換が困難である場合が多い。特に、未分化組織からの再分化の段階が障壁となるケースが多く、そのステップを経ない新規遺伝子導入法は、薬用植物形質転換法のブレークスルーとなる可能性が高い。一般的に、植物への遺伝子導入法としては、アグロバクテリウムを介したバイナリーベクター法や、パーティクルガンを用いる方法が一般的であるが、単子葉植物をはじめとする遺伝子導入の困難な植物種については、高効率で簡便な遺伝子導入法の開発が待たれている。

本研究では、従来法では外来遺伝子の導入、形質転換体の作成が困難であった薬用植物への迅速かつ高効率な遺伝子導入を実現するため、（独）農業生物資源研究所 萩尾高志 主任研究官のグループが開発した種子への遺伝子導入法や、リゾビウム菌体を植物の幼分裂組織へ直接接種する *in planta* 遺伝子導入法を薬用植物に最適化し、脱分化、再分化過程を経ない新規遺伝子導入法の開発を行うことを目的とする。今年度は種子への遺伝子導入について研究を進めた。

B. 研究方法

遺伝子導入対象種子

従来法であるアグロバクテリウム法による遺伝子導入効率が低く、モルヒネ等、有用な医薬品原料を生産するケシ（一貫種）の完熟種子（平成13年採取 優良果）を用いた。

遺伝子導入用ベクター

平成18年度までに当研究部で構築済みである、GFP (Green Fluorescence Protein) 遺伝子を組み込んだpWI-sGFPベクター、および遺伝子の導入効率の向上およびGFP遺伝子の安定的な発現を目的に、pUC18ベクターを基本骨格としてEL2- Ω エンハンサー配列を有するpUC-EL2- Ω -sGFPベクターを使用した。このpUC-EL2- Ω -sGFPベクターは、生物研の萩尾高志主任研究官より譲渡を受けたpUC-EL2- Ω -GUSベクターを制限酵素Hind III, Xba Iで消化し、電気泳動後、EL2配列/Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter (CaMV35S P)配列/ Ω 配列を含むDNA断片を抽出し、同制限酵素で消化したpUC-sGFPベクターからCaMV35S P配列を除去した断片と再ライゲーションすることで作製した（図2）。

なお、sGFP遺伝子は静岡県立大学大学院生活健康科学研究科食品栄養化学専攻（食糧細胞工学研究室）丹羽康夫博士より譲渡を受けたものである。

種子への遺伝子導入

下記に示す実験方法は生物研のプロトコルに概ね従い、ケシへの遺伝子導入用に催芽時間、DNA濃度、電圧条件等につ

いて種々検討したプロトコルの一例である。

[催芽処理] 60 mmシャーレにケシ完熟種子400粒 (200 mg) を秤取り、下記の組成のエレクトロポレーション (EP) buffer 2 mlを加え、20 °C暗所で3, 6, 12, 14および18時間催芽処理を行った。実験に使用したPlasmid DNAはQIAfilter plasmid maxi kit (QIAGEN)で精製したものを、最終濃度が0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように調製した。
[減圧・冷却] 催芽処理を行った種子及びEP bufferを60 mmシャーレのまま氷上に移し、3時間減圧処理を行った。減圧度はチャンバーの圧力計の表示で最低 0.095 MPaであった。

[エレクトロポレーション] ケシ種子はイネやムギに比べ非常に小さい(1.0 x 0.5 mm程度) ため、Gene Pulser Xcell エレクトロポレーションシステム(Bio-Rad社)のshock podおよびEP用キュベットを使用した。減圧処理したケシ種子の半量(約100 mg, 200 粒)をEP用キュベット(極板間距離4.0 mm)に入れ、bufferを種子が浸る程度まで加える。その後、EP用機器(CUY 21EDIT-S, Nepa Gene)にShock podを接続し、EP用キュベットをセットした。抵抗値チェックを行い、抵抗値が30-50 Ω であることを確認した後、下記の条件でパルスを加え、氷上で2分放置する。この際の電流値は0.3-0.5 Aを示す。更に電極を逆にして再度パルスを加え、種子およびEP bufferを60 mmシャーレに移し、氷上で1時間静置した。

[養生] EPが終了したケシ種子は、EP buffer に浸した状態のまま20 °C暗所で1

日養生した。

[発芽・育成] ろ紙 (5A, Advantec) を1枚敷いた90 mmシャーレに、発芽用buffer 2 mlとベンレート100倍液を500 μ l加え、種子間隔が5 mm程度になるように種子を移動する。ろ紙に吸収されなかった溶液はピペットで吸い取る。その後、20°C暗条件で5-10日育成する。

[GFP蛍光観察] 上記条件で育成後、3日目、10日目 (発芽部位が5 mm~) に蛍光観察を行った。

エレクトロポレーション (EP) buffer

滅菌水	940 μ l
1.0%ポリビニルピロリドン	500 μ l
Silwet L-77	0.5 μ l
0.1M スペルミジン	100 μ l
Plasmid DNA (1.0 μ g/ μ l)	200 μ l
0.1 g/ml セルラーゼ	100 μ l
2.5M 塩化カルシウム	160 μ l
Total	2,000 μ l

発芽用buffer

0.2% PVP (ポリビニルピロリドン)
0.2% アンチホルミン(有効塩素約0.001%)

エレクトロポレーション機器

スクエアパルス式エレクトロポレーター
— CUY21EDIT-S (Nepa Gene社)

Shock pod (Bio-rad社)

EP用キュベット (極板間距離4.0 mm,
Bio-rad社)

エレクトロポレーション条件

Cuvette : 4.0 mm gap

Voltage : 50 V/cm

Pulse : 50 msec square pulse

Interval : 75 ms

Number of pulse : 50

GFP蛍光観察装置

実体蛍光顕微鏡VG-05シリーズ (キーエンス社)、バンドパスフィルターFF01-513/17 (中心波長513 nm, Semrock)

C. 研究結果

pUC-EL2 Ω -sGFP ベクターの構築

pUC-EL2 Ω -sGFPベクターの構築法は図2の通りである。

ケシ種子への遺伝子導入

pWI-sGFPベクターを用いた場合、GFPの一過的発現が確認されなかったため、GFP遺伝子が安定的に発現するように最適化されたpUC-EL2 Ω -sGFPベクターを用いて、種々条件検討した。まず催芽時間3時間に固定し、遺伝子導入操作後、GFPの一過的発現を遺伝子導入操作後3日目に観察した結果、ベクター濃度 0.05 μ g/ μ l、極板間距離4.0 mm、電圧50 V/cm、パルス幅50 ms、パルス間隔75 ms、パルス回数50回の条件下において2粒の種子が蛍光を発した (形質転換効率0.5%)。しかしながら、10日目では、蛍光を発する種子が無くなったため、催芽時間を18時間 (一晚) にし、ベクター濃度を倍の0.1 μ g/ μ lに変更した。その結果、遺伝子導入操作後3日目で、26粒の種子が蛍光を発し (形質転換効率11.5%)、10日目にお

いても2株で蛍光が観察された。次に、各催芽時間（3-18時間）における、遺伝子導入後10日目の形質転換効率を検討した結果、それぞれ5.8% (23/400 粒、3時間)、8.5% (34/400 粒、6時間)、3.5% (14/400 粒、12時間)、4.0% (16/400 粒、14時間)および 0.5% (2/400 粒、18時間)となり、催芽時間6時間が最も良い条件であることが明らかになった（表）。また、GFPの蛍光部位は、ほとんどの株で発芽組織の一部であったのに対し、催芽時間3, 6時間のもものは、発芽部位全体が蛍光を発するものが得られた（図3）。

D. 考察

この手法は簡便ではあるが、生物資源研の報告によると、形質転換効率は比較的低い（ダイズで1.0%程度）ため、今回のケシ種子における遺伝子導入効率（最大8.5%、催芽6時間）は、高い形質転換効率であると考えられる。今後の検討課題としては、一過的遺伝子発現のみならず恒常的に遺伝子が発現する実験条件を検討する必要がある。また、ケシは、移植により根毛等が損傷を受け、その後の生長に影響を及ぼすため、根毛の損傷の少ない1/2MS培地等での生育を行うことが好ましいと考えられた。

E. 結論

薬用植物への新規遺伝子導入法の開発のため、ケシを材料とした種子への遺伝子導入法について研究を進め、遺伝子導入用ベクター、DNA濃度、そして催芽時間等の諸条件の検討により、GFPの一過

的発現を指標とした形質転換効率を最大8.5%まで上げることに成功した。

本法の利点は、遺伝子導入が短期間に完了する点にあり、今回のケシの場合は催芽6時間、減圧浸透処理3時間の実質9時間で導入操作は完了し、その後3日ないし10日後の発芽の段階で遺伝子導入の成否を評価可能であった。

以上のように、ケシに対し本法が適用可能であることが示されたことから、ダイオウやハトムギといった他の薬用植物についても、各植物に応じた遺伝子導入条件の最適化により適用が可能と考えられ、従来法では遺伝子導入が困難であった薬用植物への新規遺伝子導入法として本法は有望であると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

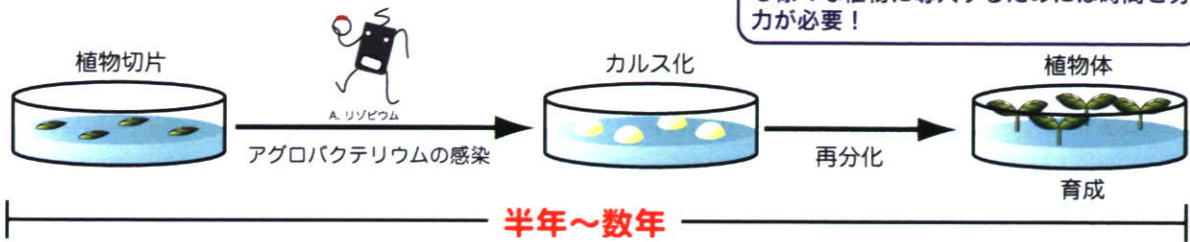
「薬用植物への新規遺伝子導入の開発」
千田浩隆、河野徳昭、吉松嘉代、木内文之
日本薬学会第128年会（横浜）2008年3月26日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

種子への直接遺伝子導入法の利点

(従来法)



再分化条件は植物の種類によって異なるため、その条件検討には数ヶ月～数年を要する。そのため、有用な遺伝子が発見されても様々な植物に導入するためには時間と労力が必要！

(直接遺伝子導入法)



植物の種類を問わず、種子が採れる植物であれば、遺伝子の導入が可能！！再分化条件を検討する必要も無く、時間・労力もかからない！

図 1 種子遺伝子導入法の利点

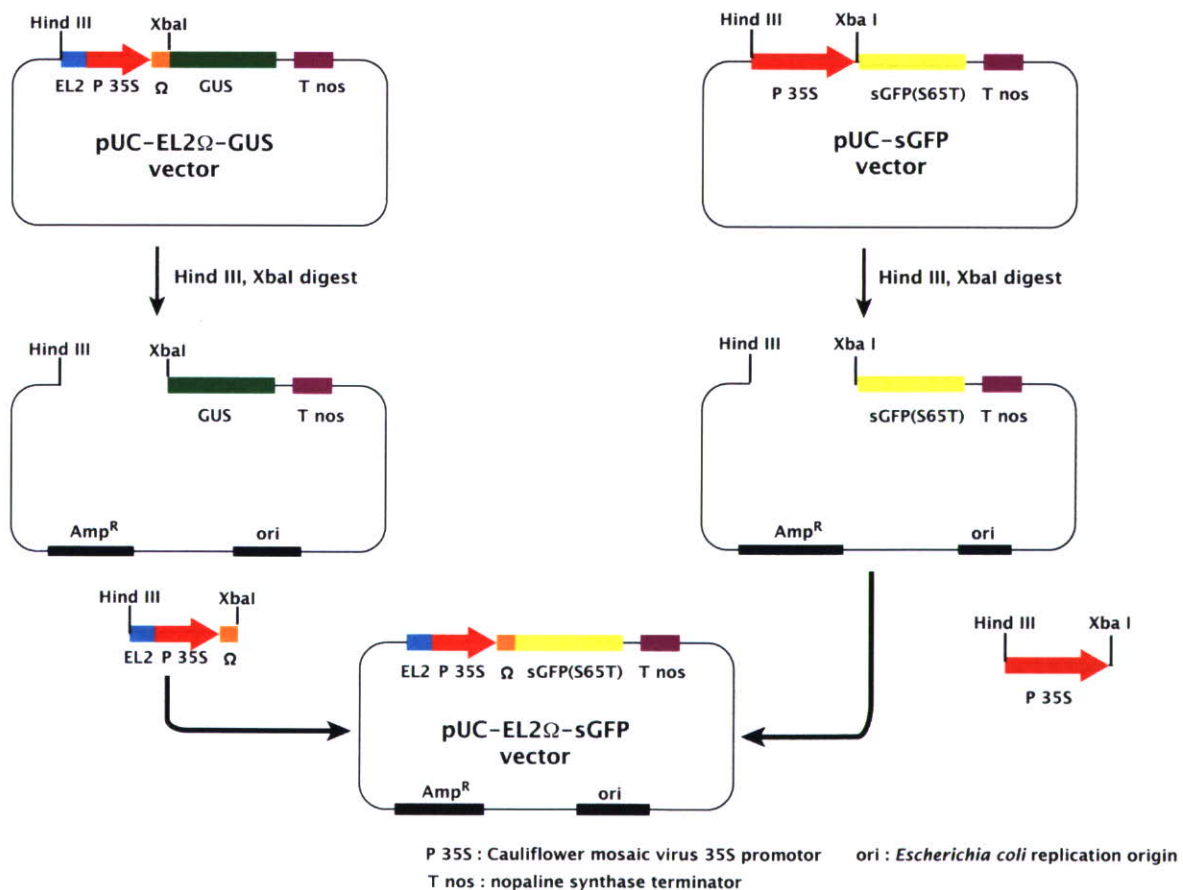
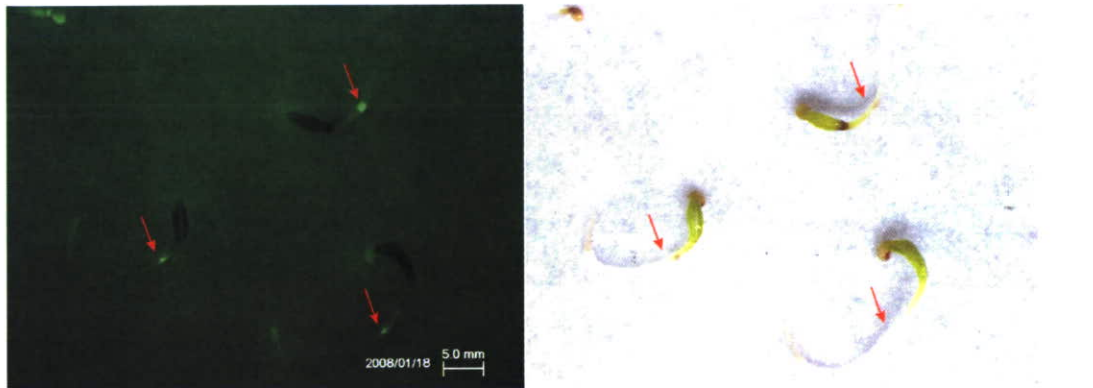


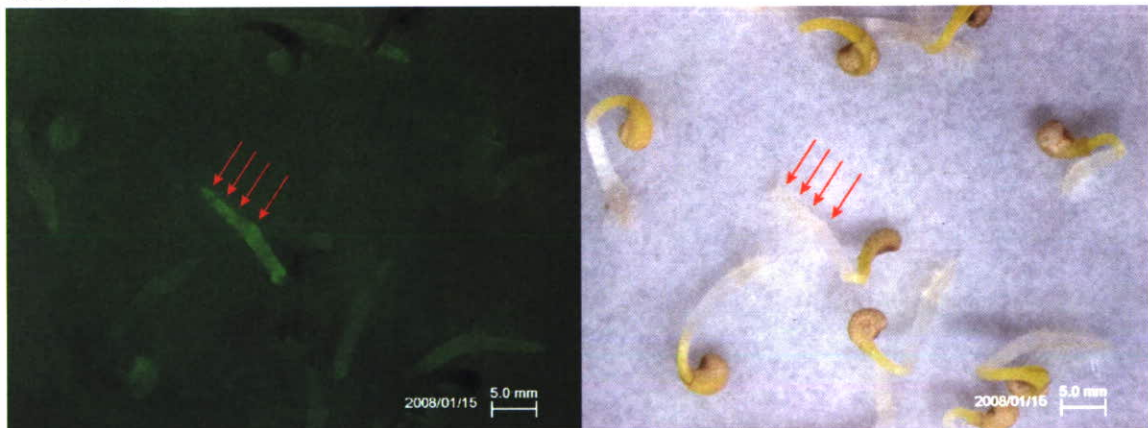
図 2 pUC EL2Ω-sGFP ベクターの構築図

表 検討条件および形質転換効率の比較

催芽時間	3 hrs.	6 hrs.	12 hrs.	14 hrs.	18 hrs.
Vector	pUC-EL2 Ω -sGFP	pUC-EL2 Ω -sGFP	pUC-EL2 Ω -sGFP	pUC-EL2 Ω -sGFP	pUC-EL2 Ω -sGFP
種子数	400粒	400粒	400粒	400粒	400粒
DNA濃度	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
電圧	50 V/cm	50 V/cm	50 V/cm	50 V/cm	50 V/cm
一過的発現種子数 育成10日目	23粒	34粒	14粒	16粒	2粒
形質転換効率	5.8%	8.5%	3.5%	4.0%	0.5%



催芽3時間



催芽6時間

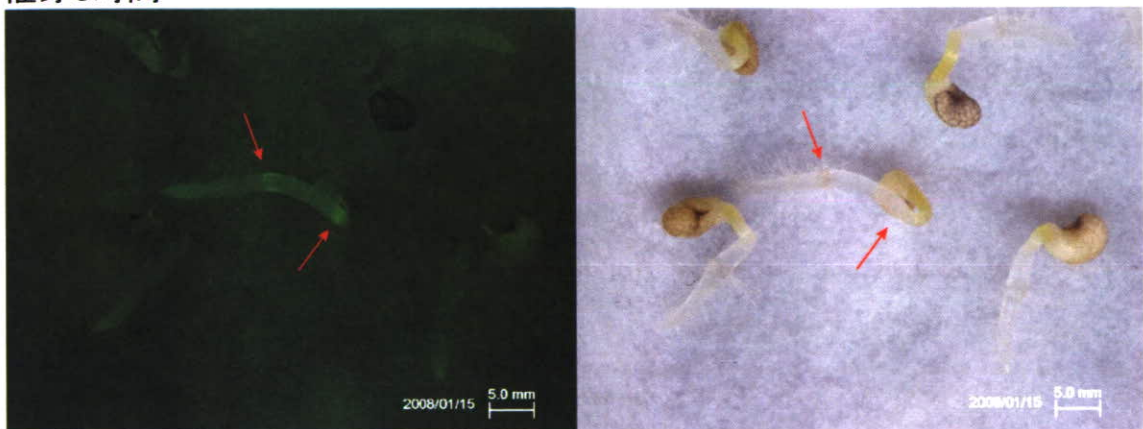


図3 催芽処理3および6時間遺伝子導入キシ種子の GFP 蛍光 (10 日目)

遺伝子組換え薬用植物の形質変異の評価法に関する研究

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

分担研究者 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・研究員

協力研究者 千田 浩隆

(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・リサーチレジデント

遺伝子組換え技術による外来遺伝子の導入が、薬用植物の形質に与える影響を評価することを目的とし、ダイオウ(*Rheum palmatum*)より得られたフェニルブタノイド骨格を構築するベンザルアセトン合成酵素(BAS)遺伝子を、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)に導入した植物体と野生株の、高ショ糖ストレス下における応答性の差異について検討した。その結果、高ショ糖ストレス下においてBAS導入株と野生株との間でアントシアニンの生産に差異は認められなかった。BAS遺伝子が転写・発現されていない可能性が考えられた為、PCRによりmRNAの発現解析を行ったが、BAS導入株ではBAS遺伝子は発現しており、その配列にエラーもなかった。さらに、高ショ糖ストレス下におけるBASおよびCHS両遺伝子の発現プロファイルを解析した結果、両遺伝子ともにストレス付与による発現レベルの変動は認められなかった。

これらのことから、本シロイヌナズナ形質転換体で発現しているBASは、アントシアニン生合成系には影響を及ぼしていない可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、種々の薬用植物をはじめとする高等植物から、有用物質生産に関わる生合成遺伝子の情報が集積されつつあるが、シロイヌナズナのようなゲノム情報が潤沢で栽培が容易なモデル植物に、有用物質生産植物由来の遺伝子群を組み込み、有用二次代謝産物の生産能を付与することはポストゲノム時代のアウトプットの一

形態として非常に有望であると考えられる。

本研究で使用するBASは、薬用植物ダイオウ由来のポリケタノイド合成酵素の一種であり、1分子の4-coumaroyl-CoAと1分子のmaronyl-CoAの縮合、脱炭酸により、lindleyinの生合成中間体であるbenzalacetoneを生成する酵素である。先に我々は、このBAS酵素遺伝子を導入し

たシロイヌナズナの成分を精査したが、BAS の反応生成物を見出すことはできず、野生株との間に成分的な違いを見出すことはできなかった。

一方、シロイヌナズナにも存在する植物色素の一つであるアントシアニンは、BAS と同様に 4-coumaroyl-CoA 1 分子と maronyl-CoA 3 分子を基質とするカルコン合成酵素(chalcone synthase, CHS)によりその骨格が形成される。シロイヌナズナ野生株においては、高ショ糖濃度ストレス下で育成するとアントシアニン生合成が誘導されることが知られている。これに対して、BAS 過剰発現シロイヌナズナでは、高ショ糖濃度ストレス下で誘導されるアントシアニン生合成の基質がベンザルアセトン生合成に利用され、アントシアニン生産が低下、すなわち、植物体の赤色-紫色化が抑制される可能性が考えられる(Fig. 1)。そこで、本研究では、遺伝子組換え技術による外来遺伝子の導入が薬用植物の形質に与える影響を評価することを目的とし、BAS 遺伝子導入シロイヌナズナを高ショ糖ストレス下で育成し、野生株との糖ストレス応答の差異について評価・検討した。

B. 研究方法

実験に用いたシロイヌナズナの系統

野生株 : *Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia (Col-0)

BAS 遺伝子導入株 : *A. thaliana* (Col-0)株にカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターで *Rheum palmatum* 由来ベンザルアセトン合成酵素 (RpBAS,

EMBL/DDBJ/Genbank accession No. AF326911) 遺伝子を強発現する発現カセットを導入した遺伝子組換え体。

シロイヌナズナの栽培条件

シロイヌナズナの栽培は、MS培地 (0.5% ショ糖、0.2% Gelrite) に1プレートあたり100粒の野生株およびBAS導入株を播種し、4 °Cで2日間低温処理し、その後長日条件 (Light / Dark = 16 / 8 hrs. approximately 2,500 lux.) で14日間育成した。その後、高ショ糖ストレス付与用MS培地 (6.0% ショ糖、0.2% Gelrite) に移植し、同生育条件で7日間、形質観察を行った。

野生株およびBAS導入シロイヌナズナの観察

植物体の観察は、光学顕微鏡 (Leica M Stereo microscopes, The Leica CLS Cold-Light Sources CLS150X) を用いて行った。記録には、デジタルカメラ (Nikon Cool pix 990) を用いた。

BAS遺伝子のPCRによる検出

野生株およびBAS導入株の両系統について、播種後14日目に葉よりRNeasy Plant Mini kit (QIAGEN)を用い、total RNAを抽出し、逆転写を行い、single-strand cDNA を作製した。また、genomic DNAは、DNeasy plant mini kit (QIAGEN)を用いて抽出した。その後、*R. palmatum*由来BAS 遺伝子の全長配列を増幅する様に設計したプライマーにより、導入遺伝子の発現の有無を確認した。プライマー配列なら

びにPCR条件は下記の通りである。

BAS全長増幅用プライマー：

センス方向 RpBAS-1S : 5'- ATG GCA
ACT GAG GAG ATG AAG -3'

アンチセンス方向 RpBAS-1155A : 5'-
CTA GCT AAT TAC GGG CAC ACT -3'

Program : 94°C 5 min → (94°C 30 sec →
58°C 30 sec → 72°C 1 min) x 30 → 72°C 10
min → 4°C ∞

使用機器：GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

BAS遺伝子の配列確認

前項においてcDNAより増幅したBAS
遺伝子の配列を確認するため、pT7 blue
T-vector (Takara-bio)にライゲーションし、
大腸菌DH5αに形質転換した。得られた
コロニーを5 mlのLB-アンピシリン培養
液に添加し、37°C, 220 rpmで16時間培養
した。その後、プラスミドを調製し、
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing
Kit (Applied Biosystems)を用いて、シーク
エンスサンプルを作製し、Genetic
Analyzer 3100-Avant (Applied Biosystems)
を用いて、配列を確認した。

高ショ糖ストレス下におけるBASおよび CHS遺伝子の発現プロファイルの解析

BAS遺伝子の導入により同じ基質を使
用するCHS遺伝子の発現に変化が起きて
いるか否かを確認する為に、ショ糖スト
レス下における野生株およびBAS導入株
のCHS遺伝子の発現プロファイルを解析
した。RNAの抽出は、6%ショ糖含有MS
培地移植後、0, 1, 2, 3, 4および5日目（そ
れぞれ播種後14, 15, 16, 17, 18および19日

目）に採取した植物体からRNeasy Plant
Mini Kit (QIAGEN)を用い、total RNAを抽
出し、逆転写を行い、single-strand cDNA
を合成し、それをPCRの鋳型とした。BAS
遺伝子増幅の為にプライマー配列および
PCR条件は上記に示した通りであり、
CHS遺伝子増幅の為にプライマー配列お
よびPCR条件は以下の通りである。

CHS増幅用プライマー：

センス方向 AtCHS-510S : 5'- CTG ACT
ACC AGC TCA CCA AGC -3'

アンチセンス方向 AtCHS-1089A : 5'-
TCA ACA CGT GAC GTG TCG CC -3'

Program : 94°C 5 min → (94°C 30 sec →
58°C 30 sec → 72°C 1 min) x 30 → 72°C 10
min → 4°C ∞

使用機器：GeneAmp 2400 (Perkin Elmer)

C. 研究結果

シロイヌナズナの栽培および形質変化

Fig. 2に0.5% (播種後14日目) および6%
(19日目、6%にしてから5日目) ショ糖
含有MS培地で生育する野生株および
BAS遺伝子導入株の写真を示した。0.5%
ショ糖含有MS培地で育成した両株に目
立った変化は見られず、6%ショ糖含有
MS培地に移植した両株は、葉の裏面から
アントシアニンと思われる紫色の色素が
蓄積し始め、徐々に葉の表面までアント
シアニンの蓄積が起こる。個体により若
干のアントシアニン蓄積の差が見られた
が、野生株とBAS導入株の間でアントシ
アニンの蓄積量に差が見られることは無
かった。なお、シロイヌナズナは21日間
育成したが、高ショ糖ストレスの影響で

21日目の植物体は全体が紫色になり写真が見難いため、アントシアニンの生産が比較的に見易い19日目の植物を示した。

BAS遺伝子のPCRによる検出

野生株およびBAS導入株の両者より抽出したtotal RNAから合成したcDNAおよびgenomic DNAを鋳型に、BAS特異的なプライマーでBAS遺伝子の検出を行ったところ、Fig. 3に示す様にBAS導入株のみにBAS遺伝子の全長に相当する約1.2 kbpのバンドが現れ、その増幅産物のサイズから、BAS導入株におけるBAS遺伝子の存在 (genomic DNA) および転写 (cDNA) が確認された。

BAS遺伝子の配列確認

増副産物の塩基配列決定後、データベースに登録済みの*R. palmatum*由来BAS遺伝子と比較した結果、シロイヌナズナに導入され、発現しているBASに変異および欠落は起きていないことが判明した。

高ショ糖ストレス下におけるBASおよびCHS遺伝子の発現プロファイルの解析

前項までに、シロイヌナズナに導入されたBAS遺伝子は正常な配列を持ち、発現していることが明らかになった。しかしながら、BAS導入株は、野生株と比較して高ショ糖ストレス下でのアントシアニンの生産に差異が見られなかった。そのため、BAS遺伝子の発現がシロイヌナズナ内在のCHS遺伝子の発現をより促進している可能性が考えられたので、BASおよびCHS遺伝子の発現プロファイルを

解析した。その結果、BAS遺伝子の発現によりCHS遺伝子の転写量の増加は確認できなかった (Fig. 4)。

D. 考察

高ショ糖ストレス存在下でアントシアニンの生合成が促進されることを指標にして、同じ基質を使用するBASの異種発現系であるシロイヌナズナにおける遺伝子導入の影響を評価しようと試みたが、高ショ糖 (6%) 存在下における野生株およびBAS導入株の形質に有意な差は見られなかった。遺伝子の発現 (転写) が起きていないことが懸念されたため、RNA抽出後、cDNAを合成し、PCRによってBAS遺伝子の発現を確認した結果、BAS導入株でのみBAS遺伝子は発現していた。そのため、遺伝子配列に変異または欠落が起きている可能性が考えられたため、DNAシーケンサーにより配列を確認したが、その配列はデータベース上に登録されているBAS遺伝子と一致していた。このことから、BAS導入シロイヌナズナでは、BAS遺伝子が正常に発現していることが明らかになった。さらに、BASと同じ基質を生合成に用いるCHS遺伝子の発現プロファイルを解析したが、BAS遺伝子の導入による転写量の変化は確認できなかった。

以上の結果から、本シロイヌナズナ形質転換体で発現しているBASは、アントシアニン生合成系には影響を及ぼしていない可能性が示唆された。

E. 結論

ダイオウ由来の BAS のシロイヌナズナへの導入の影響を評価する為に、同じ基質を生合成に用いるアントシアニン生合成経路との関連性(Fig. 1)を調べたが、野生株と BAS 導入株は、高ショ糖ストレス下ではほぼ同じ形質（アントシアニンの蓄積）を示した(Fig. 2)。BAS 遺伝子の発現および塩基配列も調べたが、転写も正常に行われており(Fig. 3)、配列にエラーもなかった。さらに CHS の発現にも影響を及ぼさない(Fig. 4)。このことから、本シロイヌナズナ形質転換体で発現している BAS は、アントシアニン生合成系の酵素群とは、コンパートメントを異にし、シロイヌナズナの形質には影響を及ぼしていない可能性が示唆された。

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

特になし

(図表)

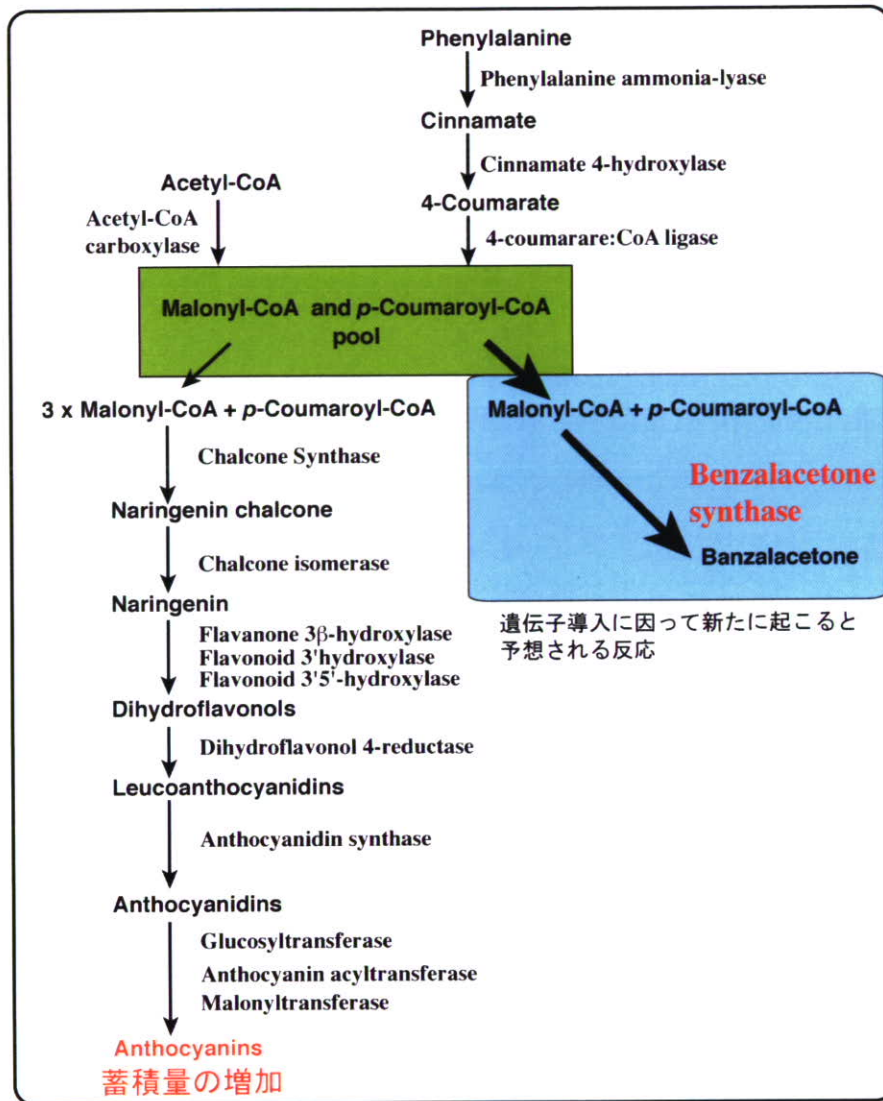


Fig. 1 BAS 遺伝子導入により考えられる生合成経路の変化

緑 Box : BAS およびカルコン合成酵素の基質

水色 Box : BAS 遺伝子導入により起こると考えられる生合成経路の変化(予想)