

図1 洗浄処理したトウキ種子の発芽率(%)の推移(左:発根率, 右:出葉率)



図2 洗浄処理したトウキ種子の発芽状況(種子置床後21日)

上左:水8h, 上右:洗剤8h
 中左:水24h, 中右:洗剤24h
 下左:無処理

表2 異なる温度下で2年間貯蔵したトウキ洗浄処理種子の発根率(%)および出葉率(%)

貯蔵温度	水8h		洗剤8h		水24h		洗剤24h		無処理	
	発根率 %	出葉率 %	発根率 %	出葉率 %	発根率 %	出葉率 %	発根率 %	出葉率 %	発根率 %	出葉率 %
5℃	90.0	34.7	88.0	22.7	91.3	63.3	94.0	78.7	90.0	81.3
-1℃	55.3	12.7	64.7	12.7	91.3	66.0	86.0	70.0	92.0	86.7
-20℃	58.0	13.3	82.7	40.0	88.0	56.7	91.3	80.7	84.7	58.7

註1: 種子島研究部で処理, 封入した種子. 貯蔵は5℃を種子島研究部で, -1℃と-20℃を筑波研究部で行い, その後の発芽試験は, それぞれの研究部で, 発芽チャンバーの機種を除き, 同一条件下で行った.

表3 発芽率と温度の関係

植物名	温度 (°C)	最終 発根率 (%)	発根 開始日 (日)	発根 終了日 (日)	平均発根 所要日数 (日)	最終 出葉率 (%)	出葉 開始日 (日)	出葉 終了日 (日)	平均出葉 所要日数 (日)
メハジキ	15	3.3	16.5	18.5	16.8	2.7	23.0	32.0	27.5
	20	48.0	4.0	4.7	4.0	48.0	7.7	14.0	9.3
	25	76.7	4.0	6.7	4.1	76.0	5.0	10.3	6.0
	30	89.3	4.0	5.7	4.0	87.3	4.0	11.7	5.4
ケイガイ	15	2.0	7.0	9.0	5.0	2.0	9.0	9.0	9.0
	20	4.0	4.7	6.3	5.4	2.7	6.7	7.0	6.8
	25	2.7	4.0	4.0	4.0	2.7	4.0	4.0	4.0
	30	0.7	8.0	8.0	8.0	0.7	9.0	9.0	9.0
アマ	15	94.0	3.0	6.0	3.0	92.0	6.3	10.0	7.7
	20	94.7	3.0	4.0	3.0	93.3	4.0	6.0	4.7
	25	94.7	2.0	3.0	2.1	91.3	3.0	5.0	3.4
	30	89.3	2.0	3.3	2.1	88.0	3.0	6.3	3.1
アイ	15	55.3	4.0	22.3	7.9	51.3	15.0	34.7	16.2
	20	58.0	3.0	20.0	5.6	55.3	7.7	23.7	13.8
	25	46.7	2.0	8.7	3.5	43.3	7.0	24.3	10.2
	30	40.0	2.0	7.0	3.0	33.3	5.0	24.0	10.3
カワラケツメイ	15	10.7	33.3	52.0	44.2	5.3	46.3	68.0	59.1
	20	28.0	3.0	59.7	51.1	26.7	10.0	87.0	59.4
	25	76.7	3.0	59.0	34.0	74.7	9.7	63.7	36.5
	30	70.7	3.0	30.3	15.4	60.7	6.0	25.3	15.4
ジギタリス	15	68.7	8.7	32.3	14.7	65.3	14.0	41.0	18.5
	20	58.7	7.7	15.3	10.2	56.0	8.7	18.7	11.9
	25	53.3	4.0	14.0	8.2	50.0	8.0	15.7	9.7
	30	60.0	3.0	15.3	8.1	57.3	8.0	17.7	9.7

数値は3反復の平均値(1処理50粒供試 3反復)

発根および出葉の開始日と終了日は置床後日数

シソ種子(分果)の保存に関する研究

分担研究者 木内文之 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター・センター長
協力研究者 伊藤美千穂 京都大学大学院薬学研究科・准教授

一般的に種子は長期間の保存が難しく、遺伝子資源保存のためには一定時間ごとに貯蔵種子を更新する必要があるが、その間隔や貯蔵条件等に関する実験データは多くない。そこで、4℃乾燥条件下で貯蔵されている1986年から2007年収穫のシソ純系の分果を用い、発芽試験を行った。その結果、シソでは貯蔵開始から7～8年で発芽率が急激に低下し、10年を超えるとほぼ0%になることが明らかとなった。また、発芽率が0%になる直前の期間では、播種から発芽までに要する時間の長さによらずにばらつきが非常に大きくなることが示された。

A. 研究目的

薬用植物資源の安定供給には、優良な種苗が十分量確保されることが必要だが、地下茎の分割や挿し木などの栄養繁殖で遺伝的にまったく同一の子孫が増殖できる場合の他は、多くが種子による増殖と継代を行うことになる。優良品種の保存や交配実験のための親系統の保存などの目的で種子が貯蔵されることが多いが、一般的に種子は長期間の保存に堪えるものは少なく、貯蔵が難しい。従って、一定期間ごとに種子から植物を育て、新しい種子に更新する必要があるが、これら一連の系統維持の作業に関して参照できる実験データや文献は殆ど見当たらない。貯蔵温度や水分量などの条件も手探り状

態であるのが現状である。

そこで本研究では、研究のために純系の系統維持が続けられている京都大学大学院薬学研究科薬品資源学分野所蔵のシソ分果を使い、貯蔵時間と発芽率について調査した。

B. 研究方法

1986年から2007年に収穫し、シリカゲルを入れた密閉容器に入れ、4℃で保管していたシソ(*Perilla frutescens*)の純系各系統のタネ(分果)を各100粒ずつ無作為に選び、水で湿らせたろ紙を敷いたガラスシャーレに広げ、乾燥させないように注意しながら2週間4℃で低温処理した。使用した各系統の分果の収穫年度は、

No. 9 (1997, 1999, 2000, 2001, 2005, 2007), No. 32 (1986, 1990, 1991, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1999, 2000, 2002, 2004, 2007), No. 5343 (1997, 1999, 2000, 2003, 2004, 2007) である。なお、これらの系統はいずれも精油型がペリラアルデヒドを主成分とするものである。処理後、1粒ずつオアシス挿し木培地に播種し、温室内に置き、翌日から3週間にわたり、毎日定時に観察し、発根、発芽について記録した。

C. 研究結果

観察の結果得られた3つの系統の発芽率データを平均し、プロットしたものを図1に示した。貯蔵期間が1-2年の分果はほぼ100%、7-8年のものでも80%程度の発芽率があった。しかし、貯蔵期間が10年では発芽率は0%またはそれに近い値になり、10年を超過するとほぼ0%となった。

種子の発芽力の強弱の指標となる発芽勢（播種後10日以内に発芽した分果の割合）を求めると、保存期間が1-2年の分果は80%以上、同7-8年では60%程度であったが、それ以上の保存期間のものでは、ほぼ0%となった。

また、発芽のタイミングのばらつきも保存期間によって差がみられたため、No. 5343の2003, 2004, 2007年に収穫した分果が発芽までに要した日数について、標準偏差を算出したところ、 ± 4.18 日、 ± 1.90 日、 ± 0.818 日となった。

D. 考察

乾燥状態で4℃に貯蔵したシソ分果については、貯蔵期間が約7年より長くなると、発芽率、発芽勢ともに急激に低下している。しかし、各系統について詳細に検討すると、貯蔵期間が長くなると、7-8年程度のある時点で発芽勢が低下し、その後、数年で発芽率が急激に低下し、やがて0%になる。分果の発芽力が弱くなり、次第に発芽能力を失っていくことが、データで表された結果であるといえる。このことは言い換えると、同時に播種した分果が一斉に発芽する間は、種子更新の心配は無用だが、発芽に大きなばらつきが観察されるようになったら、貯蔵種子の更新を考えるべきであるということを示唆しているということである。

また、発芽に要する日数のばらつきは、上記の低下の時期的なずれと関連して説明でき、例えば、No. 5343について述べると、貯蔵期間3年目までは発芽率と発芽勢がほぼ同じであるが、4年目からは発芽勢が低下するものの、21日目までには発芽してくるものが多く、結果的に発芽率は3年目までと大きくかわらない。すなわち、4年目からは発芽に要する日数にばらつきが大きくなり始めているということが示されている。このことは、標準偏差が貯蔵3年目は ± 1.90 であったのが、4年目では ± 4.18 日と2倍以上になっていることからわかる。

種子の寿命に影響する要素としては、種子の含有水分と貯蔵温度が挙げられている (Roberts E.H. et al. 1968, *Ann. Bot.* 32, 97-117)。本研究では、一般的な研究施設で簡便に、かつ安価に準備できる形（分

果を葉包紙で包み、紙製の種子袋に入れたものを、シリカゲルを入れたプラスチック製タイトボックスに入れて蓋をし、4℃の低温庫に貯蔵)で貯蔵したシソ分果について発芽率の経年変化を観察したが、この場合は収穫後から最長で7-10年程度は単純な低温処理(春化处理)で発芽する能力がある状態であることが明らかとなった。なお、発芽しなかった種子について、発芽能力を完全に失った(死んだ)状態であるのか、休眠が深くて単純な低温処理ではそれが打破できなかったために発芽しなかったのか、については、今後の検討課題となった。

E. 結論

シソ分果を乾燥状態で4℃に貯蔵した場合、貯蔵開始から7-8年間は80%程度の十分な発芽率を保つことが可能であることが示された。しかし、それ以上の

期間では発芽率は急激に低下し、10年以上貯蔵した分果では、発芽率はほぼ0%であることが明らかとなった。また、貯蔵期間が長くなるに従って発芽勢は低下し、発芽に要する日数について、ばらつきが大きくなることが判明した。従って、シソについては、7-8年程度の期間で定期的に継代栽培を行う必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 増本直子, 伊藤美千穂, 木内文之, 4℃保存したシソ分果の発芽率, 日本生薬学会第55回年会(2008年9月, 長崎).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

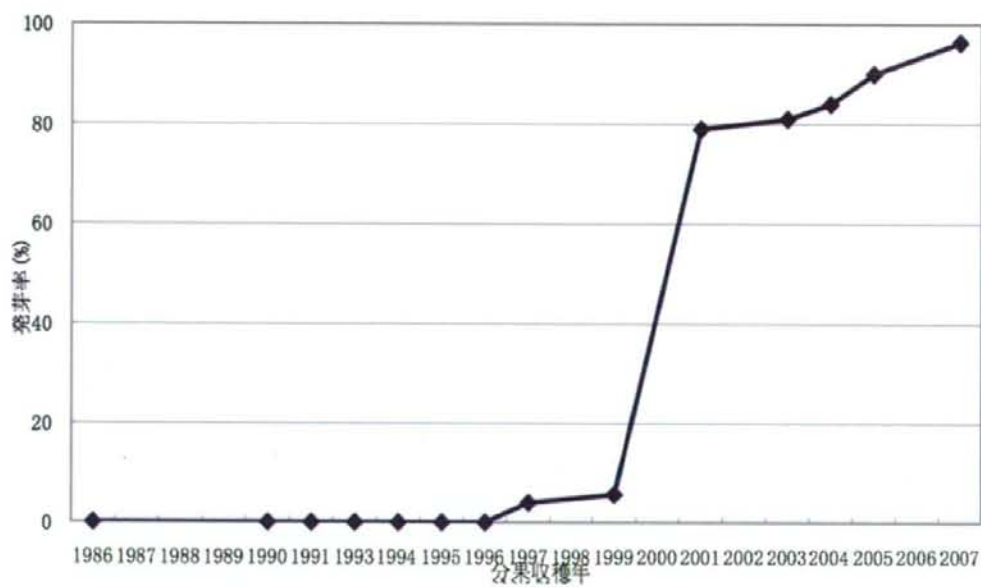


図1 3つの系統の平均発芽率

薬用植物培養物の長期保存法に関する研究

分担研究者 吉松嘉代 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部・
育種生理研究室長

継代維持中のセリバオウレン9系統(形質転換及び非形質転換)、オウレン属植物(中国産)5系統、オニゲシ1系統、ケシーオニゲシ種間雑種7系統を材料にガラス化法による超低温保存条件を検討した。セリバオウレンカルスのうち、検討条件下で再生が認められたのは、非形質転換体のCj、形質転換体のCjAntill627-6-1及びCjGUSII627-7-2の3種であり、Cjは最も高い再生率36.3%を示した。オウレン属植物カルスでは、セリバオウレンより再生率は低いものの、Cjで良好な再生が認められたのと同条件の処理により、3種に再生が認められた。オニゲシは、9.1%再生した。ケシーオニゲシ種間雑種カルスは4系統で再生が認められ、オニゲシカルスと同条件で保存したPO♀×PSIK♂2-6Mで最も高い再生率17.3%が得られた。

保存のための優良クローン選抜のため、8系統のニチニチソウ及び2系統のウラルカンゾウ培養植物体の育成、クローン化、継続栽培と薬用成分含量調査を行った。ニチニチソウでは、シュート培養の葉およびその再生植物体の葉で高アルカロイド含量を示すCrI2、土壌で栽培した再生植物体の葉のアルカロイド収量が高いCrIW1①、シュート培養の葉でのアルカロイド収量が高いCrIP2⑨、未熟果実からの不定胚形成が高い矮生のCrI4を得、特にシュート培養での保存に適した植物であると判断した。

ウラルカンゾウでは、1年目の鉢栽培でグリチルリチン含量、収量ともに高かったGuが根の収量、グリチルリチン含量及び収量が優れ、2.7年の栽培で、径1mm以上の根のグリチルリチン含量が2.6%に達した。また、Guサブクローンの養液栽培のうち、特にGu2-3-2の生育が優れ、1.1年栽培株の根(径1mm以上)のグリチルリチン含量は約3%に達し、保存に適したクローンであると判断した。

A. 研究目的

熱帯多雨林地帯をはじめ地球上に分布する多様性に富んだ植物資源は、現代医

療でも完治が難しいとされるアレルギー等の各種疾患や新興感染症等に有効な次世代の新薬開発原料として重要であり、

欧州、米国等の先進国で特に注目されている。しかしながら、アジア、アフリカ地域での急激な人口増加、大気汚染、森林伐採の継続ならびに大気中二酸化炭素の増加による地球温暖化にともなう世界的な環境破壊および砂漠化により、地球上の植物の遺伝的多様性が失われつつある現状にあり、これらの多様性の維持および保存技術の確立は緊急性の高い課題である。本研究では、最新技術によるこれらの多様性の保存法の構築を行う。この研究で得られた技術により、現在、需要が増しながらも絶滅の危機にさらされている貴重な薬用植物資源の迅速な保護及び将来に渡っての活用が期待できる。また、現在、活発に研究が進められている宇宙開発においても、人類にとって重要である植物多様性の宇宙空間および地球外惑星への搬出が可能となる。

B. 研究方法

1) 薬用植物カルスの超低温保存

材料植物 ショ糖3%、ナフタレン酢酸(NAA)1mg/l、カイネチン(Kin)2mg/l及びグルタミン10mg/l含有Woody Plant

(WPG) 培地(WPGN1K2)で継代中(20℃、暗所)のセリバオウレン(形質転換及び非形質転換)カルスおよびショ糖3%、NAA1mg/l、Kin 2mg/l 含有Murashige and Skoog (MS) 培地(MSN1K2)で継代中(20℃、暗所)のオニゲシ、ケシーオニゲシ種間雑種植物カルスを材料とした。

超低温保存(図1) 径約2-3mmに調製

したカルスを0.2Mショ糖と1Mグリセリンを含有するGamborgB5(B5)液体培地またはショ糖10%、NAA 2mg/l、Kin 2mg/lを含むWPG液体培地に植付け、20℃、暗所で1-3日間前培養した。前培養後の切片は、0.4Mショ糖と2Mグリセリンを含有するB5培地で前処理後、あるいはそのまま、ガラス化液(PVS2液)、室温(24℃)または氷上(0℃)で5-60分間処理後、液体窒素中に保存した(PVS2液1ml内で保存)。再培養は、クライオチューブを解凍(40℃、1分間)後、1Mショ糖含有B5液体培地で10-20分間洗浄、あるいはさらに0.5Mショ糖含有B5培地で10分間洗浄し、保存前と同条件で培養した。

2) 新規導入ニチニチソウの育成とインドールアルカロイド含量

材料植物 シュート培養として継代維持中のニチニチソウ[Cr:植物ホルモン無添加(HF)MS培地、3%ショ糖、23℃/14時間明]および新規導入種子(表2)を用いた。

発芽条件 常法により殺菌後、HF1/2MS固形培地(2%ショ糖)、24℃/14時間明 20℃/10時間暗、後に暗所(24時間)で培養した。発芽後のシュートは、Crと同様にHFMS培地で継代維持し、同クローンを植木鉢に植出し、グロースチャンパー(GC)内で栽培した。一部(CrMW2、CrMP2)は殺菌後の種子を直接植木鉢に播種し、同様に栽培した。

栽培条件 3号鉢（赤玉土-クレハ培養土-堆肥=3:1:1）、24℃/12時間明20℃/12時間暗、相対湿度60%、GC2室で栽培した。選抜後は5号鉢（同条件）に植え替え、非閉鎖温室1（20℃、相対湿度50%、日長なりゆき）で栽培した。

アルカロイド抽出 栽培植物上部の葉あるいはシュートの葉及び茎を凍結乾燥後粉末にし、日本ウォーターズ社製固相抽出カラムOasisMCX1cc/30mgを用いたアルカロイドの抽出と精製を行った。植物試料約50mgを精密に量り取って15ml容コニカルチューブに入れ、5%酢酸溶液5mlを正確に加え、超音波洗浄機で30分間、ボルテックスミキサーで1分間抽出した。OasisMCX1cc/30mgカラムにメタノール1mlを入れて洗浄後、ミリQ水1mlを入れて洗浄した。5%酢酸抽出液を遠心分離（4,500rpm、3分間）後、上清1mlを正確に量りとり、OasisMCXカラムに負荷した。マニホールドを用いながらOasisMCXカラムにメタノール1mlをいれ洗浄し、さらに2%ギ酸溶液1mlで洗浄した。その後、OasisMCXカラムにアンモニア水/メタノール混液（5:95）1mlを入れ、アルカロイドを溶出、溶媒を留去後、メタノール500 μ lに再溶解してウルトラフリーMC（ミリポア社製）、15,000rpm、20℃で1分間遠心濾過し、HPLC分析試料とした。

HPLC条件 Waters Alliance PDA HPLC system（セパレーションモジュール:2795、フォトダイオードアレイ検出器:2996）を用い、以下の条件で分析した。

Column: TOSOH TSKgel ODS-100V 5 μ m 4.6 i.d. \times 250mm、Solv.A: 10 mM Sodium 1-heptanesulfonate pH 3.5、Solv.B: MeCN、Gradient (B%): 0-20 min 36%、27 min 43%、32-34 min 63%、35 min 36%、Column temp: 28℃、Flow: 0.8 ml/min、Detection UV 254 nm（定量）、200 nm-400 nm（定性） Ajmaline、Vincamine、Ajmalicine、Catharanthine、Serpentine、Vindoline、Vincristine、Vinblastineを同時分析。

形態観察 選抜植物について形態的特性を調べた。

3) ウラルカンゾウ苗の大量増殖と養液栽培法の確立

材料植物 ウラルカンゾウ種子（北海道医療大学系統HK13905-96）無菌発芽個体より誘導した培養植物体（GuH、TS291-04）及び筑波研究部栽培圃場保存植物（北海道医療大学系）シュートより誘導した培養植物体（Gu、TS301-07）を材料とした。増殖は、ショ糖3%含有植物ホルモン無添加WPG固形培地での継代培養により行った。

ストロン様組織の誘導による苗の増殖（高上馬ら：特開2005-137291） 継代培養を行っているGuシュートをクローン化し、それぞれのクローンシュートの2節茎切片を、6%ショ糖とNAA0.01mg/l添加MS液体培地に植付け、20℃、暗所、60-100rpmで培養しストロン

様培養物を得た。約2ヶ月毎に継代培養を繰り返し、生育良好なサブクローン Gu2-2-1、Gu2-3-2およびGu2-5-2を得た。ストロン様培養物の節あるいは頂芽切片をNAA 0.1mg/l、Kin 0.5mg/l、1%ショ糖を含むWPG液体培地（WPG(1)N0.1K0.5）（20ml/40φ培養試験管、支持体：フロリアライト）に移植して、20℃、14時間照明下で培養し、再生植物体を得た。

鉢栽培条件 閉鎖温室：温度20℃、相対湿度50%、日長14時間（補光照明を使用）、土壌条件：ベラボン土（赤玉土・クレハ培養土・堆肥=3:1:1）=1:1、鉢：径15cm×高さ30cmポリエチレンポット、肥料：ハイポネックス(NPK6-10-5) 1000倍液を週1回散布

養液栽培 ストロン様組織の培養により増殖させたウラルカンゾウ再生植物体（Gu2-2-1及びGu2-3-2）は、支持体を詰めた径15cm×長さ30cmのポリエチレンポットに植え、肥料養液を入れたコンテナ内で栽培した。

グリチルリチン分析 植物体を収穫して各部位に分割し50℃で数日間温風乾燥後粉末にし、その約100mgを精密に秤量後、50%エタノール7mlを正確に加え、超音波洗浄機で30分間、ポルテックスミキサーで1分間抽出した。抽出液を遠心分離（4,500rpm、3分間）後、上清500μlをウルトラフリーMCに入れ、15,000rpm、20℃で1分間遠心濾過し、上清をHPLCに注入した。

HPLC条件：カラム TSKgel ODS-100V（TOSOH、径4.6mm×250mm、5μm）、移動相 アセトニトリル（溶媒A）-2%酢酸（溶媒B）=2：3、流速：1.0 ml/分、カラム温度 20℃、検出 UV 254 nm（定量）、200-400 nm（定性）

C. 研究結果

1) 薬用植物カルスの超低温保存

継代維持中のセリバオウレン（形質転換及び非形質転換）、オウレン属植物、オニゲシ、ケシーオニゲシ種間雑種を材料にガラス化法による超低温保存条件を検討した（図1）。結果の概要を表1に、また、再生後のカルスを図2に示す。

実験に供した9種のセリバオウレンカルスのうち、検討条件下で再生が認められたのは、Cj、CjAntiII627-6-1、CjGUSII627-7-2（昨年度の結果）の3種であった。最も再生率が高かったのは、0.2Mショ糖+1Mグリセロール含有B5培地で1日間前培養し、前処理なし、室温（24℃）でPVS2液で30分間処理後保存したCjであった（再生率36.3%）。

実験に供した5種のオウレン属植物（中国産）カルスは、セリバオウレンより再生率は低いものの、Cjで良好な再生が認められたのと同条件の処理により、3種に再生が認められた。

オニゲシは、0.2Mショ糖+1Mグリセロール含有B5培地で1日間前培養し、前処理なし、室温（24℃）、PVS2液で20分間処理後保存したカルスで9.1%再生した。ケシーオニゲシ種間雑種カルスは、7

系統のうち4系統で再生が認められた。最も再生率が高かったのは、オニゲシカルスと同条件で保存したPO♀×PSIK♂2-6Mの17.3%であった。

2) 新規導入ニチニチソウの育成とインドールアルカロイド含量

新規導入ニチニチソウ種子の特徴と発芽率を表2に、1986年から培養シュートとして継代維持しているCr及び新規導入種子から誘導した植物・再生植物体をGC内で栽培し、その葉のアルカロイド含量を調べた結果を図3に示した。同時分析を行った7種のアルカロイドのうち、葉からはcatharanthine、vindoline、vinblastineの3種のアルカロイドが検出された。同ロットの種子由来植物であっても個体間のアルカロイド含量の差は大きかったが、概してCr、CrI、CrIW1、CrIW2、CrIP2由来植物の含量が高い傾向を示した。この結果及びシュート形成能の高さより、図4に示す11系統をシュート培養で維持する系統とした。インドの白花植物由来のCrIW2は、植物1個体の種子集団から得た植物であったが、桃花及び白花が3：1の比で出現した（開花した19個体のうち、桃：15個体、白：4個体）。CrIW2は白花植物に桃花植物の花粉が交配した植物と推察され、野生植物由来の導入種子は保存前に十分な形質調査が必須であることを示唆している。なお、花色の違いによるアルカロイドパターン・含量の差は認められなかった。

選抜植物は、5号鉢に植え替え、非閉鎖温室でさらに栽培を継続し、形態観察(表

3) 及び葉中のアルカロイド含量(図5)及び1葉あたりのアルカロイド収量(図6)を調べた。葉試料収穫時の栽培日数及び収量を表4に示す。葉中のアルカロイド含量は、CrI2が最も高く、乾燥重量あたりcatharanthine：0.25%、vindoline：0.43%、vinblastine：0.0015%であった。1葉あたりのアルカロイド収量は、CrIW1①が最も高く、catharanthine：134.45mg、vindoline：167.0mg、vinblastine：2.4mgであった。

選抜植物について、シュート培養の葉のアルカロイド含量(図7)及び1培養試験管あたりのアルカロイド収量(図8)を調べた。シュート培養では栽培植物の葉と同様に、CrI2が最も高く、乾燥重量あたりcatharanthine：0.88%、vindoline：1.16%、vinblastine：0.0038%であった。1試験管あたりのシュート培養葉のアルカロイド収量は、CrIP2⑨が最も高く、catharanthine：991.36mg、vindoline：1058.12mg、vinblastine：3.53mgであった。

3) ウラルカンゾウ苗の大量増殖と養液栽培法の確立

培養植物体として継代維持中の2種のウラルカンゾウ(GuH及びGu)のうち、より優れた形質を持つものを選抜するため、それぞれの植物体を土壌へ移植し閉鎖温室内での栽培を継続した。また、Guよりクローン化したGu2-2-1、Gu2-3-2の養液栽培を継続し、上記のGuH及びGuとともに生育(図9)、根及び根茎の収量(図10)、地下部のグリチルリチン含量(図11)・グリチルリチン収量(図12)を調査した。

GuH及びGu鉢栽培の2.7年生株では、1、

2年生株での結果と同様に、Guの方が根の収量、根のグリチルリチン含量ともに高く、Gu根のグリチルリチン含量は局方値2.5%以上であった。養液栽培のGu2-2-1及びGu2-3-2の1.1年生株の生育は、Gu鉢栽培2.7年生株の生育を上回り、根のグリチルリチン含量は局方値2.5%以上であった。また、サブクローンのうち、特にGu2-3-2の生育が優れていた。

D. 考察

継代維持中の薬用植物カルスを材料に、保存前の培養状態（固形/液体）、前培養、PVS2 処理温度及び時間、洗浄方法を検討した。セリバオウレン非形質転換カルスでは、比較的良好な再生が認められたが、形質転換体で再生が認められたのは8系統中2系統であった。オニゲシカルスでは超低温保存後の再生が認められ、ケシーオニゲシ種間雑種植物カルスでは7系統中5系統で再生が認められた。いずれの培養物も、保存後の再生が認められたカルスは、いくつかの処理条件で再生が認められており、確実な再生が認められる超低温保存のためには、植物材料の生育状態が重要であると思われる。

ニチニチソウでは、特にインドから導入した植物の中から、高アルカロイド含量、高アルカロイド収量、高形態形性能等の優れた形質を持つクローン植物が得られた。これらはアルカロイド生産研究の材料として優れており、また、継代維持・保存・超低温保存を行う上で特に重要と思われる。

シュート培養として維持している

GuH 及び Gu はいずれも北海道研究部の同じ系統に由来するものであるが、再生植物体の形質は異なっており、鉢栽培での栽培を継続しても、生育及びグリチルリチン収量は Gu の方が良好であった。GuH は北海道において種子で更新されているため、種子がつかず栄養繁殖で維持されてきた筑波の Gu とは形質が異なってしまったものと思われる。植物組織培養によるクローン化と選抜により、Gu から、さらに根の収量・グリチルリチン含量の高いクローン Gu2-3-2 が得られた。このことは植物組織培養による培養変異体の作成が、優良個体の育成に有効であることを示している。また、栽培初期（1年目）での形質調査は、閉鎖温室における高収量・高グリチルリチン含量株の選抜に有効であることが確認できた。

E. 結論

継代維持中のセリバオウレン9系統（形質転換及び非形質転換）、オウレン属植物（中国産）5系統、オニゲシ1系統、ケシーオニゲシ種間雑種7系統を材料にガラス化法による超低温保存条件を検討した。セリバオウレンカルスでは、非形質転換カルス及び形質転換カルス3種で超低温保存後の再生が認められ、非形質転換カルスCjが最も高い再生率36.3%を示した。オウレン属植物カルスでは、Cjより再生率は低いものの、5種中3種に再生が認められた。オニゲシは、超低温保存後、9.1%が再生した。ケシーオニゲシ種間雑種カルスは7系統中4系統で再生が認められ、PO♀×PSIK♂2-6Mが最も

高い再生率 17.3%を示した。

保存のための優良クローン選抜のため、8系統のニチニチソウ及び2系統のウラルカンゾウ培養植物体の育成、クローン化、継続栽培と薬用成分含量調査を行った。ニチニチソウでは、シュート培養の葉およびその再生植物体の葉で高アルカロイド含量を示す Cr12、土壌で栽培した再生植物体の葉のアルカロイド収量が高い Cr1W1①、シュート培養の葉でのアルカロイド収量が高い Cr1P2⑱、未熟果実からの不定胚形成が高い矮生の Cr14 を得、特にシュート培養での保存に適した植物であると判断した。

ウラルカンゾウでは、1年目の鉢栽培でグリチルリチン含量、収量ともに高かった Gu が根の収量、グリチルリチン含量及び収量が優れ、2.7年の栽培で、主根

のグリチルリチン含量が 2.6%に達した。

また、Gu サブクローンの養液栽培のうち、特に Gu2-3-2 の生育が優れ、1.1年栽培株の根のグリチルリチン含量は約 3%に達した。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

吉松嘉代, Mondher El JAZIRI, Christian RABEMANANTSOA, Prakash Kumar TEWARY, 木内文之: ニチニチソウの形態形成能とアルカロイド生産能、日本薬学会第129年会(京都)、2009年3月27日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



図1. ガラス化法による超低温保存の手順

表1. ガラス化法による薬用植物カルの超低温保存結果の概要

植物名	種類	記号	培養物	前培養	前処理	PVS2処理	洗浄	再生率%
セルバオウレン	非形質転換体	Cj	固形	10%sucN2K2 1d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	4.8 (40m)
				0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 30m	1Mauc 20m	36.3 (30m)
	Cjmdr1センス導入体	CjSense2	固形	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	0°C: 15-60m	1Mauc	0
				液体	10%sucN2K2 3d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc
		CjSenseB627-12-5	固形	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	0°C: 15-60m	1Mauc	0
				液体	10%sucN2K2 3d	0.4Mauc 2Mgl	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc
	Cjmdr1アンチセンス導入体	CjAntiB627-6-1	固形	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	0°C: 15-60m	1Mauc	18.8 (60m)
				液体	10%sucN2K2 3d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc
		CjAntiB627-12-2	固形	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	0°C: 15-60m	1Mauc	0
				液体	10%sucN2K2 3d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc
	CjAntiB701-9-2	固形	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	0°C: 15-60m	1Mauc	0	
			液体	10%sucN2K2 3d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	0
eGFP導入体	CjsGFPC525-2	液体	10%sucN2K2 3d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	0	
			液体	10%sucN2K2 3d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	0
GUS導入体	CjGUSB627-7-2	固形	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 30m	1Mauc 10m	4.2	
オウレン属植物	非形質転換体: ミレン	M(0.5/1P1)	固形	10%sucN2K2 1d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	0
				0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 30m	1Mauc 20m	0
	非形質転換体: ミレン	M(MS0.5/1L)	固形	10%sucN2K2 1d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	0
				0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 30m	1Mauc 20m	0
	非形質転換体: ミレン	M(MS0.5/1P)	固形	10%sucN2K2 1d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	0
				0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 30m	1Mauc 20m	5.6 (30m)
	非形質転換体: ガレン	G(0.5\1P)	固形	10%sucN2K2 1d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	0
				0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 30m	1Mauc 20m	9.4 (30m)
非形質転換体: 中国産	Comp(1/2)	固形	10%sucN2K2 1d	0.4Mauc 2Mgly	24°C: 10-40m	1Mauc, 0.5Mauc	0	
			0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 30m	1Mauc 20m	5.0 (30m)	

植物名	種類	記号	前培養	前処理	PVS2処理	洗浄	再生率%
オニゲシ	非形質転換体	POL2 1-IHO	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 20m	1Mauc 10m	9.1 (20m)
ケシーオニゲシ種間雑種	非形質転換体	PSIK♀ × PO♂N1IK4 2-8M	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 20m	1Mauc 10m	5.0 (20m)
			0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 20m	1Mauc 10m	0
		PSIK♀ × PO♂N5IK4 1-5HT	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 20m	1Mauc 10m	0
			0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 20m	1Mauc 10m	0
		PSIK♀ × PO♂N1IK4 2-2M	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 20m	1Mauc 10m	0
			0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 5-20m	1Mauc 10m	3.3 (10m) 13.3 (20m)
		PSIK♀ × PO♂N8IK2 1-1HM	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 5-20m	1Mauc 10m	3.3 (5m) 3.7 (15m) 6.7 (20m)
			0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 5-20m	1Mauc 10m	0
PO♀ × PSIK♂2MOT	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 5-20m	1Mauc 10m	6.7 (15m) 17.3 (20m)		
PO♀ × PSIK♂2-6M	0.2Mauc 1Mgly 1d	-	24°C: 5-20m	1Mauc 10m	0		



図2. 超低温保存後再生した薬用植物カルス・不定胚

表2. 新規導入ニチニチソウ種子の特徴と発芽率

記号	導入番号	特徴	導入国名	Wild/Cultivated	導入日	発芽率	観察日数
CrI	001-06	Mixture	India	Cultivated	2006.1.23	10.0% (5/50)	125
CrMP1	051-06	Pink flower	Madagascar	Wild	2006.4.22	0.0% (0/50)	125
CrMW1	052-06	White flower	Madagascar	Wild	2006.4.22	10.0% (5/50)	125
CrMW2	341-06	White flower	Madagascar	Wild	2006.8.15	14.0% (7/50)	27
CrMP2	342-06	Pink flower	Madagascar	Wild	2006.8.15	32.0% (16/50)	27
CrIP2	394-06	Pink flower, 1 plant	India	Cultivated	2006.10.23	72.0% (36/50)	84
CrIW	401-06	White flower, 1 plant	India	Wild	2006.12.25	23.1% (3/13)	84
CrIW2	003-07	White flower, 1 plant	India	Wild	2007.2.7	73.3% (22/30)	47

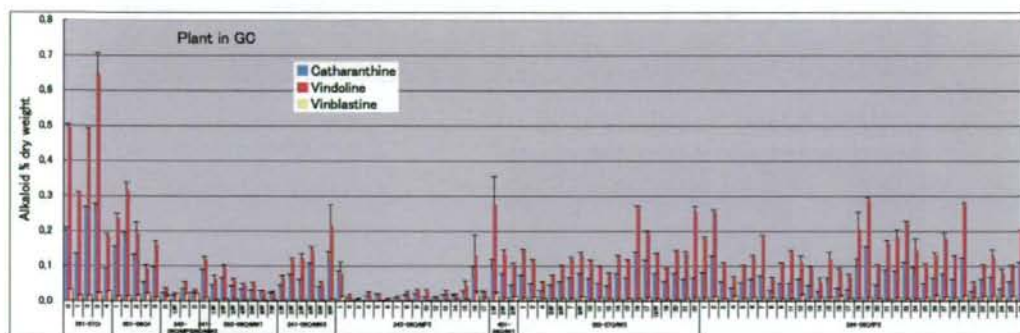


図3. GC2室で栽培したCr及び新規導入ニチニチソウの葉中のアルカロイド含量



図4. ニチニチソウ選抜植物

表3. 選抜植物の形態的特徴

記号	観察日	花色	花直径cm	花型	花卉の根元	備考	アルカロイド
Cr	2008.7.4	ピンク	5.17	大型	開	分枝3	最高
CrI2	2008.7.4	サーモンピンク	5.15	大型	重	分枝3	高
CrI3	2008.7.4	濃ピンク	4.42	中型	重	分枝2	高
CrI4	2008.7.4	濃ピンク	3.71	小型	重	矮性、分枝多、不定胚形成能	中
CrMW1①	2008.7.4	白	4.84	中型	開	分枝3	中
CrMW2⑥	2008.7.4	白	4.65	中型	開	分枝2	高
CrMP2⑯	2008.7.4	ピンク	4.31	中型	開	分枝3	中
CrIW1①	2008.7.4	白	6.07	大型	開	分枝2	高
CrIW2⑮	2008.7.4	ピンク	5.58	大型	開	分枝2	高
CrIW2⑳	2008.7.4	白	6.08	大型	開	分枝2	高
CrIP2⑲	2008.7.4	ピンク	5.09	大型	開	分枝1	高
CrIP2㉑	2008.7.4	ピンク	4.74	中型	開	分枝1	高

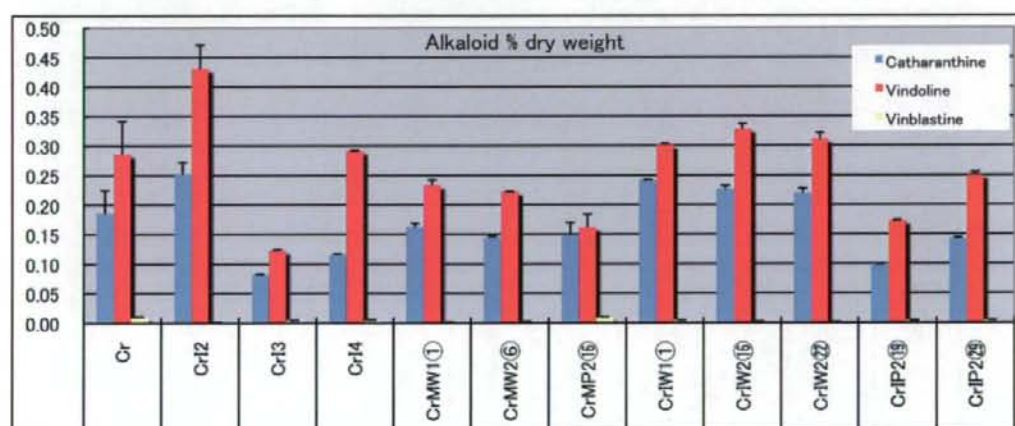


図5. 非閉鎖温室1で栽培した選抜植物の葉のアルカロイド含量

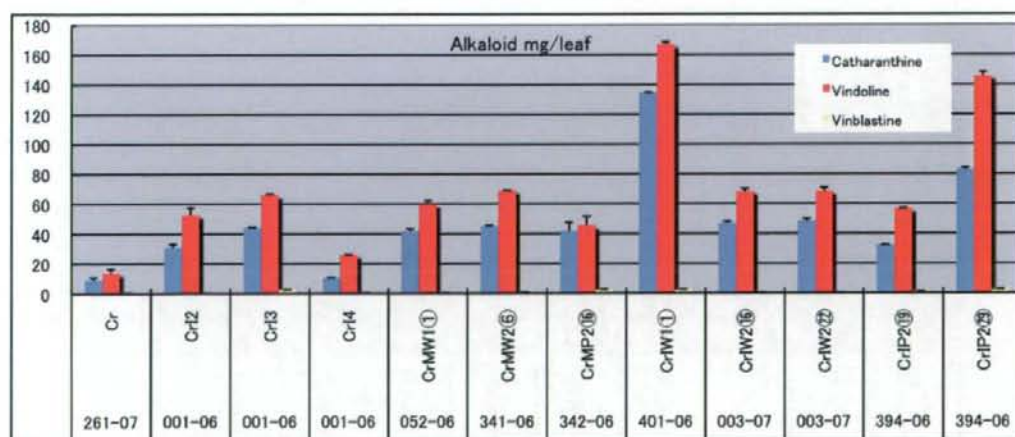


図6. 非閉鎖温室1で栽培した選抜植物の葉のアルカロイド収量(1葉あたり)

表 4. 非閉鎖温室 1 で栽培した選抜植物の葉の収量と栽培日数

記号	新鮮重量g	植出日	植替日	収穫日	栽培日数
Cr	0.20	2006.8.9	2007.9.25	2008.6.23	684
Cr12	0.36	2006.8.9	2007.9.25	2008.6.23	684
Cr13	1.08	2006.8.9	2008.5.1	2008.6.23	684
Cr14	0.26	2006.8.9	2007.9.25	2008.6.23	684
CrMW1①	0.37	2006.12.13	2007.9.25	2008.6.23	558
CrMW2⑥	0.52	2006.12.15	2007.9.25	2008.6.23	556
CrMP2⑬	0.52	2006.12.15	2007.9.25	2008.6.23	556
CrIW1①	0.96	2007.7.10	2008.4.18	2008.6.23	349
CrIW2⑯	0.51	2007.7.10	2008.4.18	2008.6.23	349
CrIW2⑳	0.59	2007.7.10	2008.4.18	2008.6.23	349
CrIP2⑱	0.83	2007.7.10	2008.4.18	2008.6.23	349
CrIP2㉑	1.22	2007.7.10	2008.4.18	2008.6.23	349

上部から5、6、7、8枚目を収穫

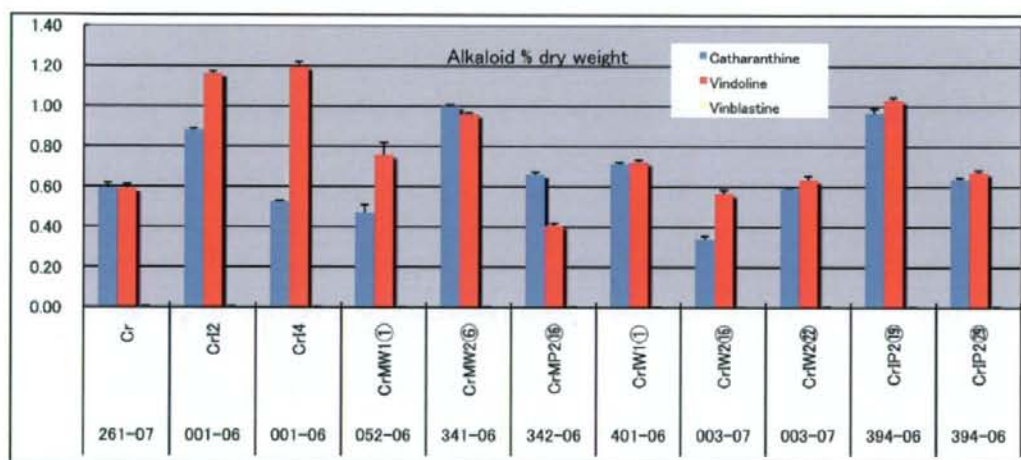


図7. シュート培養の葉のアルカロイド含量

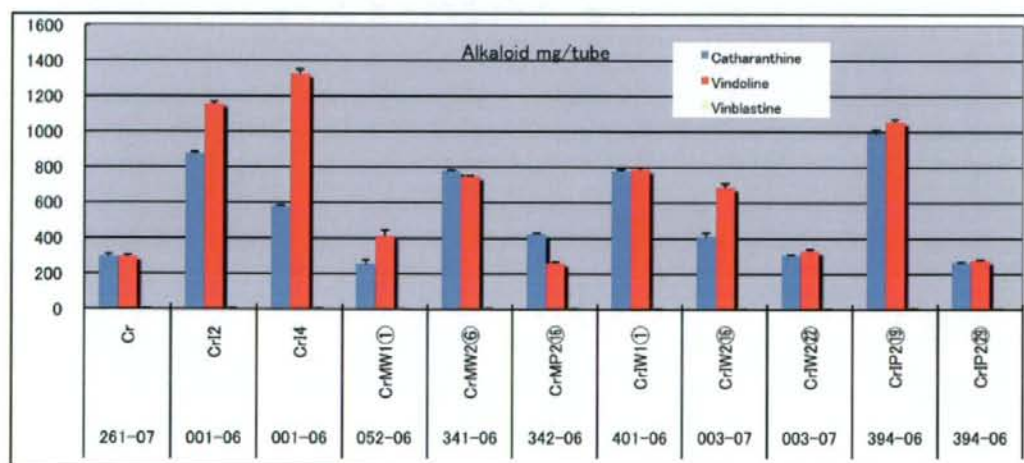


図8. シュート培養の葉のアルカロイド収量 (培養7ヶ月間、1試験管あたり)

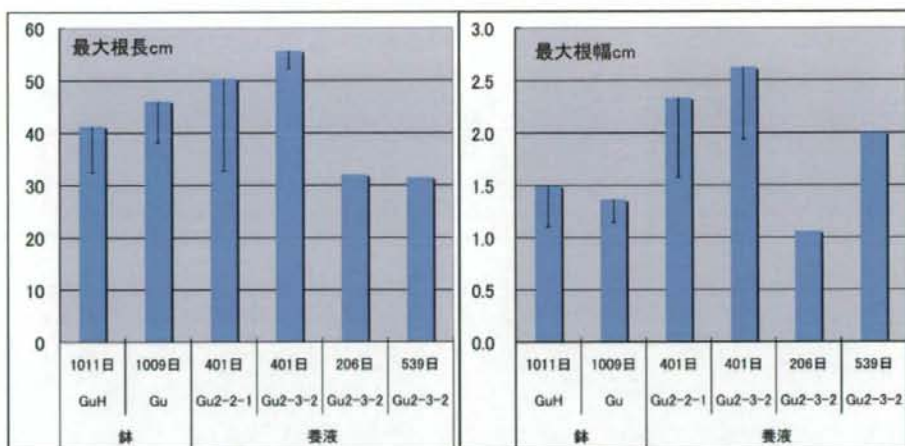


図9. 閉鎖温室栽培ウラルカンゾウ再生植物体の根の形質

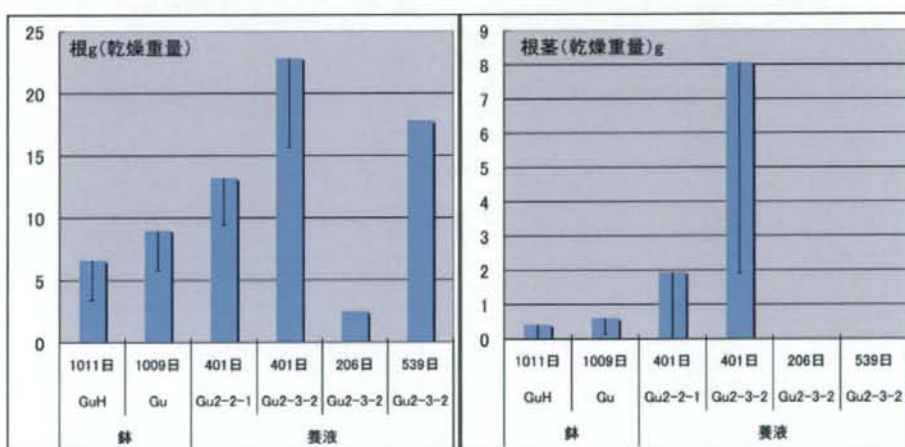


図10. 閉鎖温室栽培ウラルカンゾウ再生植物体の収量

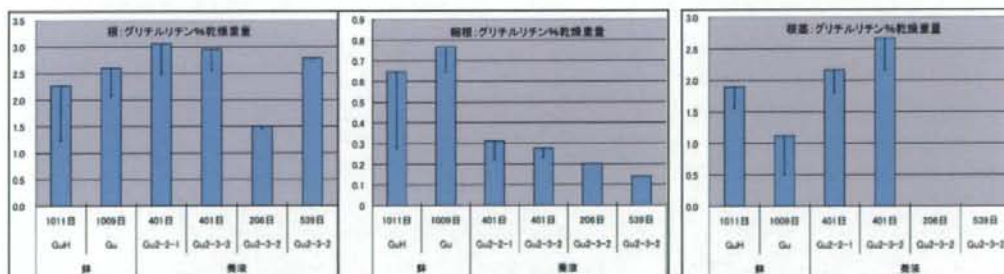


図11. 閉鎖温室栽培ウラルカンゾウ再生植物体のグリチルリチン含量