

図12. 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収量

分担研究報告書

分担研究課題：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

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た後、圃場に定植する方法で行われるが、根菜類用掘取機によるトウキ苗の掘上げ作業を検討し、これまでの手作業では3,000本の苗の掘取りに約2時間半要したが、本機の使用により同一人数で約50分程度に短縮されることを明らかにした。また、アスパラ収穫物選別用の選別機を用いて苗の選別作業を検討した結果、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り、10a定植に必要な苗選別に要する時間は作業員10名で2時間29分～3時間2分と推定した。

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、野菜用定植機の応用を検討した。トウキ苗の定植について、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、作業員の疲労度が低下し、作業時間もやや短縮する結果が得られたが、移植の失敗から人為的なサポートが必要なケースが約37%みられることが判明し、実用化にはさらに工夫が必要である。また、センキュウ種イモの定植に応用した結果、萌芽の遅れや秋に収穫された根茎のソロバン根割合が極めて高くなり、現状では応用不可能と判断した。

3) 根を利用する種類における収穫後の根頭部残茎の切り取り作業について、ゴボウ用根切断機の応用を昨年引き続いて検討した結果、形状が類似のオウギやトウキ半乾燥物では応用可能であったが、ミシマサイコなど根が比較的短い試料や、強い繊維質のストロンを有するカンゾウでは切断されたストロンが機械の各所の回転部に巻き付きトラブルが発生するなど、改良が必要であることが判明した。

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。

そこで、既存の農業機械を活用した薬

用植物の大規模機械化栽培生産の実用化に向けた栽培・調製法の確立を図るべく検討を行った。

20年度においては、19年度に引き続き、トウキの栽培生産における苗の掘り取り、選別・定植作業の機械化を検討するとともに、センキュウ種イモの定植作業の機械化、オウギ、トウキ、カンゾウ等の収穫後の残茎の切り取り作業の機械化につい

て詳細に調査し、また、野菜用自動洗浄機の薬用植物への応用について予備的に検討した。

B. 研究方法

1) 根菜類用掘取機を用いたトウキ苗の掘取りに関する研究

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2007年6月4日に幅1m、長さ10mの床に播種して育成した苗を用いた。

作業機：ニンジン等根菜類収穫に開発されたパイプロスーパーソイラーII型(カワベ)を30馬力トラクターに装着して行った。

調査：トウキ、ホッカイトウキの苗床での苗掘り取り調査を2008年4月17日に行い、作業時間を計測した。

2) 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：1) で掘り上げたトウキ、ホッカイトウキ苗を材料とした。

選別用作業機と運転条件：アスパラ選別機(AS-lin, オギワラ精機)を用いた。昨年同様にコンベア一部の板上にそれぞれ約4gの重りを付加して、1:13g<, 2:10g, 3:7g, 4:4g, 5:1g, 6:1g>, 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, 542(前年152)本, ホッカイトウキ苗, 366(前年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。また、トウキ苗, 2,6312本, ホッカイトウキ苗, 3,296本を材料にして、作業員7~10名にて作業時間を測定した。

3) 野菜移植機を使った苗の機械定植に関する研究

材料：1) 及び2) で掘上げ、選別したトウキ、ホッカイトウキ苗を材料とした。また、2007年10月4日にベジータキッド KP-1K により定植したセンキュウを

材料とした。

作業機と定植：半自動野菜移植期ベジータキッド(KP-1K, クボタ製)を用いて、2008年4月18日に長さ48mの畝に畝幅60cm、株間32cmにて定植した(トウキ:11列, ホッカイトウキ:9列)。比較のため両種ともに長さ48mの畝に2列ずつ、株間30cmで手植えにて定植を行った。

調査：トウキは定植時における定植状況、定植の作業効率を調査した後、2008年5月15日(定植後28日)に活着状況を調査した。センキュウについて、50%萌芽日を調査した後、2008年5月13日に萌芽率を、同年9月30日に根茎を収穫し、50株を選んでソロバン根発生状況を調査した。

4) 根切機を使った根頭部の残茎切断作業に関する研究

材料：5年生ウラルカンゾウを2008年8月27日に収穫後、日陰にて乾燥した地下部110本、2年生トウキの抽苔株を2008年8月18日に掘り上げて日陰乾燥させた根139本、及び2008年10月18日に収穫して水洗したミシマサイコ生根91本を用いた。

作業機：連続ごぼう自動根切機(GCB-195A型, 岡山農栄社)を用いた。

調査：切断状況及び作業時間の測定を行った。比較として、剪定バサミを用いた場合の作業時間について計測した。

5) 自動洗浄機による数種の薬用植物の収穫物の洗浄に関する研究(予備調査)

回転ブラシと高圧水の組み合わせによる自動洗浄機(CSS-15-AR型, 佐藤農機)による洗浄について、カンゾウ及びトウキの各半乾燥根、センキュウ、キバナオウギ、カラスビシャク及びカノコソウの各新鮮根を材料にして予備試験を実施した。

C. 研究結果

1) 根菜類用掘取機を用いたトウキ苗の掘取りに関する研究

トウキ、ホッカイトウキともに9~10人の人数で10m²当たり50分程度で終了することが判明した(表1)。

2) 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

6つのランクに選別された苗の内、ランク3が従来の基準の「大一中」に、ランク4が「中一小」に、ランク5が「小一極小」に相当することが明らかになり、栽培用にはランク4及び5のものを用いるべきであることが判った(表2)。このことは、ホッカイトウキにおいても同様の傾向であった。ランク3~5の苗の範囲で抽苔に敏感なトウキについて抽苔率を調査した結果、ランク3では50%以上が抽苔し、苗サイズの割合と良く一致した。また、ランク4でも7~8%の抽苔率であったことから、栽培用にはランク5サイズのものが望ましいと考えられた。苗選別の作業効率は、10m²の苗床から得られる約3,300本の苗の仕分けに1本当たり10.74~13.09秒/人を要した。

3) 野菜移植機を使った苗の機械定植に関する研究

トウキ類苗の機械定植について、完全に成功する率は62.5~63.5%で、補植が必要な場合や根の上部が露出している又は埋もれて葉を露出させる必要があるなど、人為的サポートが必要なケースが36.5~37.5%みられることが判明した(昨年の結果、移植成功率:64%±10%, 何らかの手直し作業が必要:36%±10%)。作業時間は、7人の人員配置で手植え2時間48分~3時間7分/10aに対して機械植えは2時間18分~2時間41分/10aと推定された(昨年の結果、10a当たり、手植え:3時間34分、機械植え:2時間54分±15分)。定植した苗の活着率はト

ウキ、ホッカイトウキともに手植えと差は認められず、93~97%であった。一方、前年秋に種イモを機械定植したセンキュウの生育について、50%萌芽日は手植えが4月14日に対して機械植えは7日遅れ、また、5月13日における萌芽率は手植えが98.3%に対して機械植え78%と有意差が認められた。また、秋に掘り上げて根茎のソロバン根の発生割合を調べた結果、機械植えでは94%に認められ(手植え:22%)、機械植えで著しく劣ることが明らかとなった。

4) 根切機を使った根頭部の残茎切断作業に関する研究

自然乾燥したトウキにおいては成功率83.4%、作業効率は1本当たり4.14秒/人(手切り:9.55秒)と良好な結果が得られた(表3)。一方、カンゾウの場合、成功率88.3%、作業効率は1本当たり8.01秒/人(手切り:12.13秒)であったが、切断されたストロンが機械の回転部に巻き付き機械を停止せざるを得ないトラブルが発生した。また、ミシマサイコでは、成功率85.7%、作業効率は4.1秒/本・人であったが、廃棄される残茎側へ根が多く付着し重量換算で18.6%に達し、ロスが大きいことが判明した。

5) 自動洗浄機による数種の薬用植物の収穫物の洗浄に関する研究(予備調査)

トウキの各半乾燥根、センキュウ、キバナオウギ及びカラスビシャクの各新鮮根についてはきれいに洗浄された。一方、カンゾウでは洗浄中にストロンが回転ブラシに巻き込まれるなどのトラブルが発生し、応用は困難であることが判明した。また、カノコソウ新鮮根でも株によってはカンゾウ同様に根が回転ブラシに巻き込まれ、加えて、大きな株においては中心部の土砂が除去されないことがわかり、洗浄方法の改良が必要であることが判明した。

D. 考察

1) 従来のスコップ等を利用した掘取り作業では9~10人で約2時間半/10m²要したトウキ苗の掘り取り作業を、パイプロースーパーソイラーII型を使用することにより同一人数で50分程度に短縮できることが判明し、大量の苗を扱う場合には作業効率の向上に極めて効果的と考えられた。

2) トウキ類苗の選別作業へのアスパラ選別機の応用を2年間検討した結果、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、特にランク5サイズのものが栽培用の苗として望ましいと考えられた。コンベアー1回転25秒の設定において、10m²の苗床から得られる約3,300本の苗の仕分け効率の結果より、苗選別の作業効率は1本当たり10.74~13.09秒/人(昨年の結果:10.3~11.0秒/人)と考えられた。この結果に基づくと、10a定植に必要な苗(8,333本)の確保には10人の作業員で2時間29分~3時間2分要すると推定された。

3) 野菜移植機を使ったトウキ、ホッカイトウキ苗の機械定植について、5a規模の4回反覆試験の結果、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、作業員の疲労度が低下し、作業時間もやや低下する結果が得られたが、移植の失敗から人為的なサポートが必要なケースが約37%みられることが判明した。この原因は、葉の展開の程度により苗の落下が妨げられ、その結果成功率が低下するためであり、実用化にあたってはさらに工夫が必要である。一方、センキュウ種イモの定植に応用した結果、種イモの芽が上向きに定植されなかったこと及び深植えにより生ずる萌芽の遅れ、及び秋に収穫された根茎のソロバン根割

合が極めて高くなることが判明し、手植えと比べて著しく劣ることが明らかとなり、現状では応用不可能と判断した。

4) 連続ごぼう自動根切機を使った根頭部残茎の切断作業について、本機は長い直根の上部に付いた残茎の切断用に開発された機械であるため、形状が類似のオウギ類には十分応用可能であり、また、今回トウキにも応用可能であることが判明したが、ミシマサイコのように根が比較的短い試料では切断時に試料が固定されずにロスが多くなり、機械の改良が必要である。また、カンゾウのように強い繊維質のストロンが切断作業の妨げとなり、切断されたストロンが機械の各所の回転部に巻き付き機械を停止せざるを得ないトラブルが発生するなど、機械の改良が必要であることが判明した。

E. 結論

1) 根菜類用掘取機によるトウキ苗の堀上げ作業を検討し、これまでの手作業では約3,000本の掘り上げに約2時間半要したが、本機の使用により同一人数で約50分程度に短縮されることが明らかになった。

2) アスパラ収穫物選別用の選別機を用いてトウキ類の苗の選別作業の機械化を昨年に引き続いて検討した結果、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り、特にランク5サイズのものが栽培用の苗として望ましいと考えられた。作業効率は10.7~13.1秒/1本と考えられ、10a定植に必要な苗選別に要する時間を作業員10名で2時間29分~3時間2分と推定した。

3) 苗の定植作業について、野菜用定植機の応用を検討した結果、トウキ類苗の定植は従来の手植えの場合とほぼ同じ活着率が得られ、作業時間もやや短縮する結果が得られたが、移植の失敗から人為的

サポートが必要なケースが約 37%みられることが判明し、実用化にはさらに工夫が必要である。また、センキュウ種イモの定植に応用した結果、萌芽の遅れや秋に収穫された根茎のソロバン根割合が極めて高くなり、現状では応用不可能と判断した。

4) 根を利用する種類におけるゴボウ用根切断機を用いた残茎の切取り作業について検討した結果、形状が類似のオウギやトウキ半乾燥物には応用可能であったが、ミシマサイコなど根が比較的短い試料や、強い繊維質のストロンを有するカンゾウでは改良が必要であることが判明した。

5) 野菜用自動洗浄機による洗浄について、トウキの半乾燥根、直根状のキバナオウギ、塊状のセンキュウ及びカラスビシャクの各新鮮根については応用可能であったが、細い根が密生しているカノコソウ

や強い繊維質のストロンを有したカンゾウでは改良が必要なが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 柴田敏郎：国内自給率向上を目指した薬用植物の大規模機械化栽培研究，BioJapan 2008 (World Business Forum) セミナー，2008年10月15日（横浜市）。

2) 大津英子，村上則幸，柴田敏郎：生薬オウギの収穫作業機械化による作業改善の可能性，日本農作業学会春季大会，2008年5月16日。（埼玉市）。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 パイプスーパーソイラーII型（カワベ）によるトウキ苗の掘上げ効率

	苗床面積 m ²	掘上苗数 本	作業人数 人	掘上時間	作業効率	
					本/人・分	秒/本・人
トウキ	10	2,631	10	49分18秒	5.34	11.24
ホッカイトウキ	10	3,296	9	48分5秒	7.62	7.88

2007年6月4日に苗床に播種して育成した苗を2008年4月17日に掘り上げた。

表2 アスパラ選別機（AS-11n, オギワラ精機）によるトウキ苗のサイズ別選別割合

選別機の ランク	選別数	従来の苗選別基準（根頭径）による選別割合（%）				実測による根頭径	
		大 (9mm<)	中 (7~9mm)	小 (5~7mm)	極小 (3~5mm)	mm	調査数
1	80	95.0	5.0	0	0	12.9 ± 2.1	40
2	72	97.2	2.8	0	0	11.3 ± 1.2	36
3	80	57.5	42.5	0	0	9.7 ± 1.4	40
4	109	10.1	49.5	39.4	0.9	7.4 ± 1.1	69
5	120	0	0.8	52.5	46.7	5.0 ± 0.9	80
6	81	0	0	2.5	97.5	3.3 ± 0.5	54

各選別ランクは 1:17g<, 2:14g, 3:11g, 4:8g, 5:5g, 6:5g>にセットされているため、コンベアーの各板に約4gのおもりを乗せ、1:13g<, 2:10g, 3:7g, 4:4g, 5:1g, 6:1g>の苗が選別されるように調節して実施した。1回転25秒で運転した。

2008年4月14~18日、ランダムに選んだ542本の苗を材料として実施した。

表3 連続自動根切機^{*)}による2年生トウキ根頭部（自然乾燥品）の切断作業効率

	試行 本数	切断 成功 本	再試行 必要 本	成功率 %	所要時間	作業 者数		備考
						人	秒/本・人	
自動根切り機	平均 34.8	29.0	5.8	83.4	2分22秒	1	4.14*	4反復, 合計139本
	SD 4.3	4.3	1.7	5.1	27秒		0.93	作業者: 男性
					(1分55秒~2分49秒)		(3.2~5.1秒)	
剪定バサミ	38	38	0	100	6分3秒	1	9.55**	作業者: 男性

*GCB-195A型, 岡山農業社製。 材料: 2008年8月に掘り上げた抽苔株を日陰乾燥させた根。

10a当たり推定収穫数 (8,333本) の切断に要する単純推定時間 (換算値) は, *9時間35分/10a・1人,

**22時間6分/10a・1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: 2008年11月5日, 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イ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事を目的とする。今年度はケシおよびハトムギを材料とした種子への遺伝子導入法、ケシ花粉形質転換法、および新規蛍光マーカー遺伝子を保有する形質転換ベクターの作成を行った。その結果、ケシ種子への遺伝子導入は、催芽前に 9M 硫酸で処理する事により一過的遺伝子導入効率を 10.5%まで向上させる事に成功した。ハトムギ種子への遺伝子導入を行い、抗生物質を用いて形質転換体を選抜した結果、約 3 割の個体で耐性を示すことが明らかになった。ケシの花粉形質転換では、遺伝子導入を試みた個体から野生株とほぼ同量の種子を得ることに成功した。また、赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を今後の選抜マーカーとして利用するため、各種遺伝子組換え用ベクターを構築した。

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イクスルーとなる可能性が高い(図1)。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。

我々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の薬用植物への適用を検討してきており、昨年度までに、発芽組織におけるGFPの一過的発現を指標として、催芽時間、DNA濃度、電圧条件等について種々検討し、催芽時間6時間、DNA濃度0.1 µg/µl、電圧50 V/cmにおいて最も高い形質転換効率 (34/400粒、8.5%)を示す事を明らかにした。しかしながら、未だ安定的に遺伝子が発現する条件は分かっておらず、より高効率の遺伝子導入法の開発が必要である。

そこで今年度は、①ケシ種子における一過的遺伝子発現効率の向上と安定的に遺伝子が発現する条件の検討、②他の薬用植物種子への遺伝子導入、③他の形質転換法によるケシへの遺伝子導入法の検討および④新規蛍光タンパク質発現ベクターの構築の4つ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）の種子（平成13年採取 優良果）を用いた。また、②他の薬用植物種子への遺伝子導入として血糖降下作用・抗腫瘍作用が報告されているハトムギの種子（医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部、2007年度収穫）を選択した。

遺伝子導入用ベクター

pWI-GUS、pWI-sGFP、pUC-EL2Ω-GUS、pUC-EL2Ω-sGFP vector

これらベクターは、平成19年度までに当研究部で構築済みであるものを用いた。pDsRed2、pT7blue-DsRed2、pBI-DsRed2、pUC-EL2Ω-DsRed2、pWI-DsRed2 vector pDsRed2 vectorは、Clontech 社から販

売されているものを購入した。

① pT7blue-DsRed2 vector の構築：pDsRed2 vectorを鋳型にDsRed2遺伝子全長をKODポリメラーゼを用いてPCRで増幅した。電気泳動後、DsRed2遺伝子を含むDNAフラグメントをゲルから回収し精製した。次にマルチクローニングサイトを有するpT7blue vector を制限酵素EcoRVを用いて消化し、脱リン酸化処理した。上記DsRed2遺伝子とpT7blue (EcoRV/脱リン酸化済)をライゲーションし、大腸菌DH5αに形質転換し、プラスミドを回収した。得られたプラスミドDNA(pT7blue + DsRed2)を用い、DNAシーケンスによってDsRed2遺伝子に変異が起きていない事を確認し、これをpT7blue-DsRed2 vectorとした。

② pBI-DsRed2 vectorの構築：①で構築したpT7blue DsRed2 vectorを用い、制限酵素XbaI, SacIを用いてDsRed2遺伝子を切り出した。電気泳動後、DsRed2を含むDNAフラグメントを抽出・精製し、これをインサートDNAとした。次に、pBI121 vectorを同制限酵素で消化し、電気泳動後、12 kbp付近のDNAフラグメントを抽出・精製し、脱リン酸化処理し、これをpBI121フラグメントとした。これら二つのDNAフラグメントをライゲーション、トランスフォーメーションし、得られたコロニー数個からプラスミドを回収した。得られたプラスミドを制限酵素XbaI, SacIで消化し、電気泳動によってpBI-DsRed2 vectorの完成を確認した。

③ pUC-EL2Ω-DsRed2 vectorの構築：② pBI-DsRed2 vectorの構築と同様にpT7blue-DsRed2 vectorから制限酵素XbaI, SacIを用いてDsRed2遺伝子を切り出し、同様に制限酵素消化・脱リン酸化処理したpUC-EL2Ω vector にライゲーションし、②と同様の方法で確認した。

④ pWI-DsRed2 vectorの構築：pT7blue-DsRed2 vectorを制限酵素HincIIおよびSmaIで消化し、電気泳動でDsRed2フラグメントを抽出・精製し、これをインサートDNAとした。次に、pWI-MCS vectorを制限酵素SmaIで消化し、エタノール沈澱、脱リン酸化処理を行った。このpWI-MCS(SmaI/脱リン酸化)フラグメントおよびインサートDNAを平滑末端ライゲーション、トランスフォーメーションし、得られたコロニー数個からプラスミドを回収した。得られたプラスミドを制限酵素KpnIおよびXbaIで消化し、電気泳動によってベクターの完成を確認した。pWI vectorに挿入されたDsRed2遺伝子の方向の確認は制限酵素KpnIおよびStuIで消化し、電気泳動によって確認した。

種子の硫酸処理

ケシ種子の硫酸処理で使用した硫酸は、市販の硫酸原液(18M)をそのまま、または超純水で希釈(9.0 M, 3.6 Mおよび1.8 M)したものを用いた。希釈時に熱が発生するため、氷中で十分に冷やしてから使用した。種子の硫酸処理は、50 ml容ビーカーに各濃度の硫酸15 mlおよび攪拌子を入れ、攪拌しながら行った。反応時間は2分間とし、終了後すぐに大量の冷純水で3回洗浄した。至適硫酸濃度を決定するため、処理後のケシ種子は、ろ紙2枚上に巻き、発芽バッファー2 ml、ベンレート100倍液500 µlを入れた90 mmシャーレ上で育成した。生育条件は20°C、暗所で3日間育成を行った。発芽率は、育成3日後に観察し計測した。

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前処理条件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] ケシ: 1.5 ml容マイクロチュー

ブにケシ完熟種子200粒(100 mg)を秤取り、下記の組成のエレクトロポレーション(EP) buffer 500 µlを加え、20°C暗所で3時間催芽処理を行った。実験に使用したプラスミドDNAは、QIAfilter plasmid maxi kit(QIAGEN)で精製したものを、最終濃度が0.1 µg/µlとなるように調製した。

ハトムギ: 60または90 mmシャーレに実験に使用する個数の種子を重ならないように入れ、発芽用bufferを種子が十分浸る程度(5 ml位)に加え、25°C暗所で16, 40時間催芽処理を行った。

[減圧・冷却] 催芽処理を行った種子及びEP bufferを1.5 ml容マイクロチューブ(ケシ)またはシャーレ(ハトムギ)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た。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。ハトムギ種子は、エレクトロポレーション用チャンバー(CUY495P10)に減圧処理したハトムギ種子を入れ、電極をセットした。その後、抵抗値が30-50Wである事を確認した後、下記記述のエレクトロポレーション条件でパルスを加え、氷上で2分放置した。この際の電流値は0.3-0.5Aを示した。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1.5 ml容マイクロチューブ(ケシ)、60または90 mmシャーレ(ハトムギ)に移し、氷上で1時間静置した。

[養生] EPが終了した種子は、EP buffer に浸した状態のまま20°C (ケシ) または25°C (ハトムギ)、暗所で1日間養生した。

[発芽・育成] ろ紙を2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 µl加え、種子間隔が5 mm程度になるように種子を移動した。ろ紙に吸収されなかった溶液はピペットで吸い取り、20°C暗条件で5-10日育成した。ハトムギの場合、上記buffer組成にジェネティシン濃度が50 ppmになるように添加し、育成した。1週間ごとに50 ppmずつジェネティシン濃度を増やし、比較として野生型ハトムギの生存率が1%以下になるまで育成した。

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

[GUS活性測定] 下記のGUS assay用反応液を調製し、15 ml容チューブに3 mlずつ小分けした。育成後、3-5日目(発芽部位が5 mm以上)に反応溶液に浸し、25°C (ハトムギ) 暗所で一昼夜反応させ、光学顕微鏡 (Leica MZ16, Leica) で観察した。

エレクトロポレーション (EP) buffer

	ケシ	ハトムギ
滅菌水	235 µl	940 µl
1.0%ポリビニルピロリドン	125 µl	500 µl
Silwet L-77	0.5 µl	0.5 µl
0.1M スペルミジン	25 µl	100 µl
Plasmid DNA (1.0 µg/µl)	50 µl	200 µl

0.1 g/ml セルラーゼ	25 µl	100 µl
2.5M 塩化カルシウム	40 µl	160 µl
Total	500 µl	2,000 µl

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
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用チャンパー
(CUY495P10, Nepa Gene社)

エレクトロポレーション条件

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)

GUS assay 用反応液組成

Stock Solution

X-Gluc 50 mg/ml in N,N-Dimethylformamide (-20°C)

Potassium Ferricyanide: $K_3Fe(CN)_6$ 12.5 mM (4°C)

Potassium Ferrocyanide $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 12.5 mM (4°C)

*X-Gluc: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-

glucuronide Cyclohexylammonium Salt

Recipe for 10.0 ml

0.1 ml X-Gluc Solution

0.4 ml Potassium Ferricyanide

0.4 ml Potassium Ferrocyanide

30.0 µl Triton X-100

2.0 ml Methanol

1.41 ml Phosphate Buffer (500 mM, pH 7.0)

5.66 ml st. d. H₂O

ウイスキー処理

まず、ウイスキー処理がケシ発芽率に与える影響について調べるために滅菌水500 µlにウイスキー（下記に詳細を記す）を10 mg添加し、そこにケシ種子を100粒入れた。これを6つ作製し、ボルテックスミキサーに設置し、0, 3, 5, 10, 30, 60分振盪した。その後、氷上で1時間静置し、90 mmシャーレにろ紙を2枚敷き、発芽用buffer 2 mlとベンレート100倍液を500 µl加え、種子間隔が5 mm程度になるように種子を播き、20°C、暗所で3日間育成した。その後発芽個体数を計測し、発芽率を算出した。

ウイスキー（丸尾カルシウム）：炭酸カルシウムが結晶表面から外側に向けて髭状に成長した結晶（ウイスキー）であり、強度・弾性率が高く、耐アルカリ性および屈折率が1.53~1.68と樹脂に近い値を持つ白色針状結晶の機能性材料。

花粉形質転換法

超音波法

ケシの蕾が垂れ下がっている状態で、蕾を開き未開裂の薬を回収した。薬の重量を測定し、0.1 g（薬湿重量）/15 ml（0.05 M スクロース）になるようにスクロース溶液を添加した。1 µgのプラスミドDNAを添加し、超音波をあて（300 W, 10 秒 x 4, インターバルは4 秒）、その後、遠心処理（3,000 x g, 10 分）を行い、花粉のみを取り出した。その花粉を蕾が直立状態の未受粉ケシ柱頭にのせ、受粉させた。なお、花粉の生存確認は下記のTTC法で行った。

アグロバクテリウム法

- ・アグロバクテリウム種類: *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404
- ・使用ベクター: pBI-sGFP
- ・培養液: YEP medium (10 g/L Bactopeptone, 10 g/L Bacto yeast extract, 5 g/L NaCl (pH7.2))
- ・アグロバクテリウム培養条件: 28°C、220 rpm、2 日 (OD: 0.8 以上)
- ・薬回収時期: 蕾が垂れ下がっている時
- ・薬の処理: Pollen germination medium (20% sucrose, 100 ppm H₃BO₃, 300 ppm CaCl₂ · 2H₂O) 1 ml あたり 50 mg の薬を入れ混濁した。

Vacuum 法

培養後のアグロバクテリウム液 1 ml を 18,000 x g, 3 分 遠心分離した。上清を捨て、ペレットに 1 ml の薬を入れた pollen germination medium を加え、懸濁。吸引チャンパーに入れ、減圧処理 (-80 Pa, 20 分) 後、ゆっくりと大気圧に戻し、遠心処理(13,000 x g, 3 分)した。上清を捨て、ペレットを柱頭に付け、受粉させた。

Drop 法

上記 B-1 の減圧処理を行わないペレットを柱頭に付け受粉させた。

Vacuum 法、Drop 法ともに、受粉後 Isolation bag を被せ、育成。種子収穫。

TTC 法 (花粉生存確認)

0.1% TTC (2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride) 溶液を、500 µlをマイクロチューブに小分けし、花粉(薬)を入れ、25°C、暗所で2時間静置し、顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

①ケシ種子における一過的遺伝子発現効率の向上と安定的に遺伝子が発現する条件の検討

形質転換ベクターは、遺伝子の導入効

率の向上および安定的な発現を目的に、pUC-EL2 Ω -sGFPおよびpUC-EL2 Ω -GUSベクターを用いた。遺伝子導入は、昨年度までの方法を基本プロトコルとして、遺伝子導入効率の向上を検討するため、催芽前処理として硫酸処理、催芽後処理としてウイスキー処理を行う条件を組み合わせた。まず、硫酸処理に使用する硫酸濃度の検討を行った。1.8、3.6、9.0および18 Mの硫酸を用いて2分間の硫酸処理を行った種子の発芽率を測定した結果、それぞれ91、85、87および1.0%であった。このことから、ケシ種子の硫酸処理は硫酸濃度9.0 M以下で行う事が望ましいと考えられた。次に、1.8、3.6および9.0 M硫酸処理を行った後、エレクトロポレーションを行い、遺伝子導入効率を調べた。試験は2回行い、2回の平均値を遺伝子導入効率とした。その結果、それぞれの遺伝子導入効率は、5.0% (無処理区)、4.0% (1.8 M硫酸処理区)、7.0% (3.6 M硫酸処理区) および10.8% (9.0 M硫酸処理区) であった (図2)。

次に、催芽後処理として、ウイスキー処理を行った。硫酸処理同様、ウイスキー処理がケシ種子の発芽に及ぼす影響を調べるため、催芽buffer 1 mlあたり20 mgのウイスキーを添加し、ボルテックスで0、3、5、10、30、60分振盪した後、発芽処理を行い、発芽個体数を計測した。その結果、各振盪時間における発芽率は、90%(0分)、92%(3分)、80%(5分)、86%(10分)、88%(30分)、88%(60分)であった。このことから、ウイスキー処理はケシの発芽率を低下させないことが明らかになった。そこで、ウイスキー処理後、エレクトロポレーションを行ったが、無処理時の遺伝子導入効率と同じであった。これらの結果から、エレクトロポレーションによるケシ種子への遺伝子導入は、催芽前に9.0 M硫酸で2分間処理を行う事により遺伝子導入効率が向上することが明らかとなった。

②他の薬用植物種子への遺伝子導入

薬用植物種子試料として、血糖降下作用・抗腫瘍作用が報告されているハトムギの種子を選択した。遺伝子導入用ベクターには、pWI-sGFP、pWI-GUS、pWI-H5Kを用いた。遺伝子導入を行い、GFPの一過的発現解析を行った結果、ハトムギの自家蛍光が強く判断が出来なかった。そのため、GUS assayで遺伝子導入の可否を判断した。その結果、種皮でGUS活性が確認され、そのときの形質転換効率は12% (催芽16時間) および14% (催芽40時間) であった (図3)。比較的高効率で遺伝子の導入が可能である事が明らかになったため、導入遺伝子が安定的に発現しているハトムギ形質転換体を得るために、ジェネティシン耐性遺伝子を保有するpWI-H5Kベクターを用い、同条件で遺伝子導入を行った。ジェネティシンを用いて耐性株を選抜した結果、育成日数14日、ジェネティシン濃度100 ppmで、平行処理した野生株の生存率が1%を切ったため、その時点で生存している植物体を滅菌土 (赤玉土:培養土:堆肥=3:1:1) を入れたプラスチックポットに移植し、育成した。ジェネティシン選抜完了時の耐性植物体数は200株中57株であり、これらが全て遺伝子組換え体であると仮定すると遺伝子導入効率は28.5%であった。これらジェネティシン耐性株は現在育成中である。

③他の形質転換法によるケシへの遺伝子導入法の検討

エレクトロポレーション以外の遺伝子導入法で高効率かつ簡便な遺伝子導入法を検討するため、花粉形質転換法が適用出来るか否かを検討した。実験では、pUC-EL2 Ω -sGFP ベクターを用いた。

花粉形質転換法 (超音波法)

まず、至適スクロース濃度を決定する

ため、蕾が垂れ下がっている状態のケシから未裂開の葯を取り出し、0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4および0.5 Mのスクロースを添加し、3分間放置後、蛍光顕微鏡BIOREVO (KEYENCE)で観察した。その結果、上記スクロース濃度下においてケシ葯および花粉の形状に変化は見られなかった。次に、至適超音波処理条件を決定するために、スクロース濃度0.3 M、溶液量4 ml、処理時間8秒に固定し、出力 (Output) について検討した。その結果、出力5以上にすると溶液が泡立つため、出力は5に設定した。次に至適処理回数を調べるために、同条件で、0-5回超音波処理を行った。その結果、花粉は処理4回で破裂したため、処理回数は3回に設定した。これら設定した条件で超音波処理を行い、受粉・育成したが、種子は形成されなかった。そこで、超音波処理後の花粉をTTC法で活性測定した結果、花粉が死滅している事が明らかになった。

花粉形質転換法(アグロバクテリウム法)

葯および花粉をアグロバクテリウム (pBI-sGFP保有)菌液と混和し減圧処理 (Vacuum法) またはアグロバクテリウムを直接柱頭に塗布 (Drop法) により花粉への遺伝子導入→受粉によって遺伝子組換えを試みた。現在までに、Vacuum法3個体、Drop法10個体から種子を得た。得られた種子の平均値は203粒 (Vacuum法)、681粒 (Drop法) で、同条件で育成していた野生株5個体から得られた種子の平均662粒と比較すると、Vacuum法では約1/3、Drop法ではほぼ同量の種子が得られた。現在、得られた種子を育成し、遺伝子の導入を確認中である。

④新規蛍光タンパク質発現ベクターの構築

DsRed2遺伝子を、多種の制限酵素サイトをもつpT7blue vector、アグロバクテリウムを用いたパイナリーベクター法用の

pBI121 vector、pUC18ベクターを基本骨格としてEL2 Ω エンハンサー配列をもつpUC EL2 Ω vector、単子葉植物への遺伝子導入に実績のあるpWI vectorにそれぞれ組み込み、pT7blue-DsRed2, pBI-DsRed2, pUC-EL2 Ω -DsRed2, pWI-DsRed2 vector の4種のDsRed2ベクターを構築した (図4)。

D. 考察

昨年度と比較して、①では硫酸処理を行う事により遺伝子導入効率の向上、②ではケシ以外の薬用植物としてハトムギ種子への遺伝子導入、③ではこれまで行ってきたエレクトロポレーション法以外での簡便で迅速な遺伝子組換え法の開発、および④では新規蛍光マーカーを保有する種々ベクターの作製をほぼ達成できた。今後の改善点として、①に関しては一過的遺伝子発現を指標とした時の遺伝子導入効率は向上しているが、恒常的に導入遺伝子が発現する条件を今後検討していく必要がある。②に関しては、抗生物質耐性による一時スクリーニングが完了した段階であるため、育成を続け、ゲノムDNAに遺伝子が組込まれているか、キメラになっていないか等、調べていく必要がある。③に関しては、超音波の出力等を詳細に検討し、まず花粉への遺伝子導入に成功しているか否かを検討する必要がある。アグロバクテリウム法では、実験を行ったケシから種子が得られているので、これらの種子を育成し、形質転換体を選抜する必要がある。④に関しては、全てのベクター構築が完了しているため、上記①②③の実験で使用し、マーカーとして有用であるか否かを調べる必要があると考えられた。

E. 結論

薬用植物への新規遺伝子導入法の開発のため、ケシおよびハトムギを材料とした種子への遺伝子導入法、ケシ花粉形質

転換法、および新規蛍光マーカー遺伝子を保有する形質転換ベクターの作成を行った。その結果、ケシ種子への遺伝子導入は、催芽前に 9M 硫酸で処理する事により遺伝子導入効率を 10.5%まで向上させる事に成功した。ハトムギ種子への遺伝子導入を行い、抗生物質を用いて形質転換体を選抜した結果、約 3 割の個体で耐性を示すことが明らかになった。花粉形質転換に関しては、アグロバクテリウム法により遺伝子導入を試みた個体から野生株とほぼ同量の種子を得ることに成功した (Drop 法)。赤色蛍光タンパク質 DsRed2 を今後の選抜マーカーとして利用するために、各種遺伝子組換え用ベクターを構築した。

本法の利点は、種子植物全般への遺伝子導入が短期間に完了する点にあり、昨年度のケシに引き続き、今年度はハトムギへの適用を検討した結果、催芽 16 時間、減圧浸透処理 3 時間の実質 19 時間で導入操作は完了し、その後、約 2 週間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、ハトムギに対し本法が適用可能であることが示されたことから、今後、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。

また、花粉を介した遺伝子導入法など、薬用植物への新しい遺伝子導入法を確立する事で、より簡便な薬用植物の形質転換が可能になるものと期待される。

さらに、新規の蛍光マーカーを保有する遺伝子導入ベクターを構築できた事で、遺伝子が導入された個体を迅速に選抜できるようになると考えられ、本年度行った全ての研究を組み合わせる事で、これまで遺伝子組換え体を得るまでに数ヶ月～数年かかっていたものを大幅に短縮で

きると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

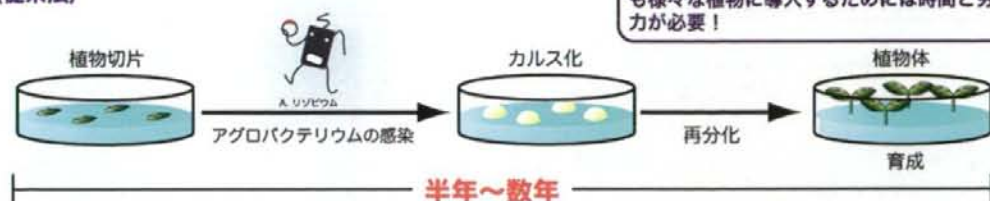
1. 薬用植物への直接遺伝子導入法の開発、千田浩隆、河野徳昭、萩尾高志、吉松嘉代、木内文之、第 26 回植物細胞分子生物学会、平成 20 年 9 月 1-2 日、大阪、大阪大学
2. 薬用植物への直接遺伝子導入法の検討、千田浩隆、河野徳昭、萩尾高志、吉松嘉代、木内文之、第 29 回種子生理生化学研究会、平成 20 年 10 月 23-24 日、北海道、マリンヒルホテル小樽
3. ハトムギ種子への直接遺伝子導入法の検討、千田浩隆、河野徳昭、萩尾高志、吉松嘉代、木内文之、日本農芸化学会 2009 年度年会、福岡、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

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)



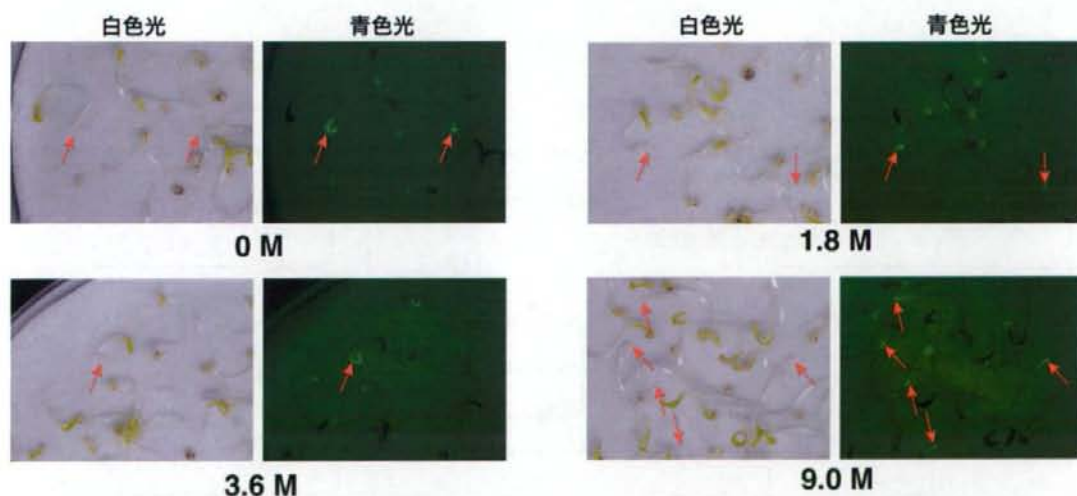
再分化条件は植物の種類によって異なるため、その条件検討には数ヶ月～数年を要する。そのため、有用な遺伝子が発見されても様々な植物に導入するためには時間と労力が必要！

(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



硫酸処理濃度	0 M	1.8 M	3.6 M	9.0 M
形質転換効率				
1回目	5.0%	4.0%	6.5%	9.0%
2回目	5.0%	4.0%	7.5%	12.5%
平均	5.0%	4.0%	7.0%	10.8%

図2 硫酸処理によるケシ種子遺伝子導入効率の変化

ハトムギへのGUS遺伝子の導入

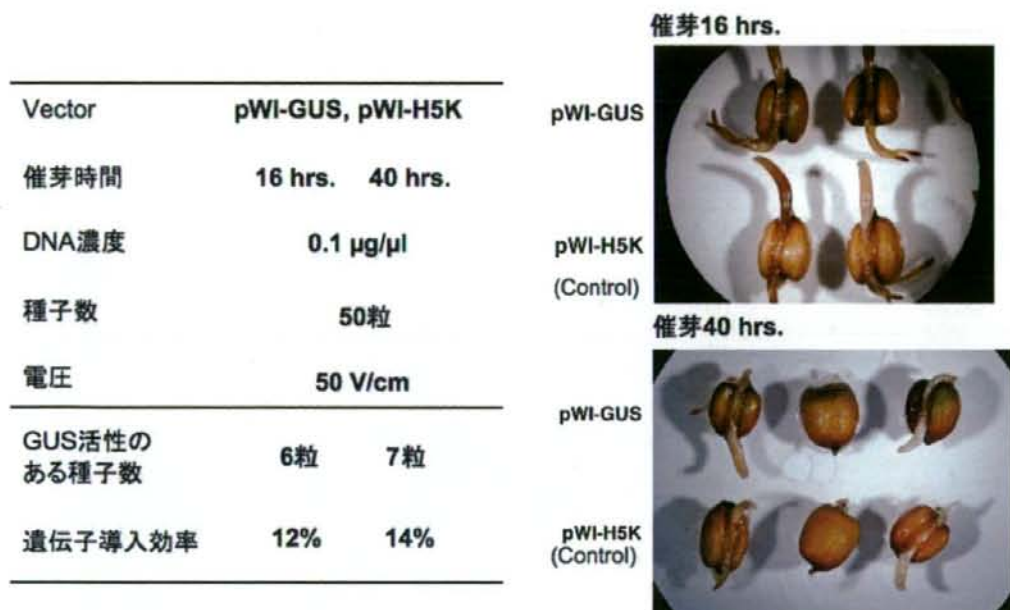


図3 エレクトロポレーション後のハトムギ (GUS assay 結果)

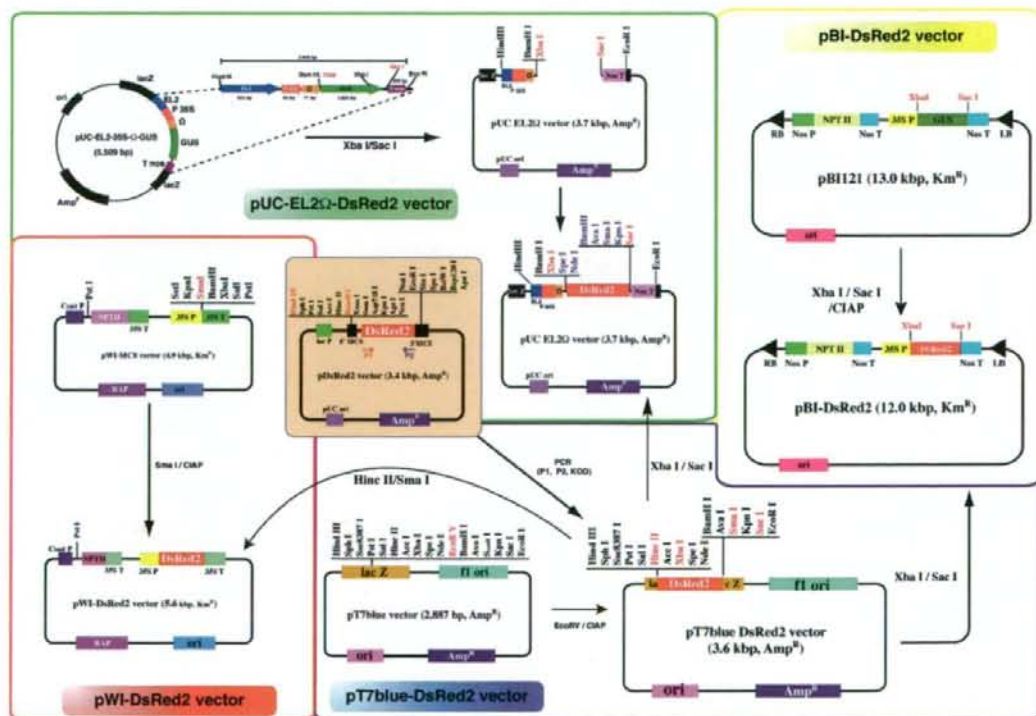


図4 各種 DsRed2 ベクターの構築図

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍・論文による成果の発表なし