

201110022A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

優良形質を持った薬用植物新品種の育成  
及びそれら種苗の安定供給体制構築のための保存、  
増殖に関する基盤的研究

平成23年度 総括・分担研究報告書  
(H22-創薬総合-指定-015)

研究代表者 飯田 修

平成24(2012)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための保存、増殖に関する基盤的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・1  
飯田 修

### II. 分担・協力研究報告

1. 選抜育種による新品種育成と普及および種苗増殖に関する研究・・・・・・・・・・19  
川原信夫、飯田 修、菱田敦之、林 茂樹、 browse 裕之、熊谷健夫、杉村康司
2. 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究  
-シャクヤクの新品種育成およびその普及-・・・・・・・・・・26  
林 茂樹、菱田敦之
3. 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究  
-カンゾウのグリチルリチン酸高含量系統の育成-・・・・・・・・・・32  
林 茂樹、菱田敦之、高上馬希重
4. 選抜育種による品種育成と種苗の増殖、普及  
-種子島在来種選抜系統ハトムギの栽培試験研究-・・・・・・・・・・40  
杉村康司、飯田 修、香月茂樹
5. 外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究・・・・・・・・・・43  
河野徳昭、乾 貴幸
6. 遺伝子マーカーの解明による品種識別技術の確立・・・・・・・・・・55  
河野徳昭、乾 貴幸
7. DNA塩基配列情報に基づく薬用植物の品種識別法の開発に関する研究・・・・・・・・67  
菱田敦之、林 茂樹
8. 薬用植物の新規品質評価方法の構築-カンゾウの一斉成分分析について・・・・74  
 browse 裕之
9. 薬用植物の発芽試験法および効率的増殖法に関する研究・・・・・・・・・・85  
熊谷健夫
10. 保存種子の形質変異に関する実証試験研究・・・・・・・・・・98  
-ハトムギ保存種子の形質変異に関する栽培研究-  
杉村康司、飯田 修、香月茂樹
11. センキュウ培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験・・・・・・・・102  
林 茂樹、菱田敦之、吉松嘉代、飯田 修
12. ウコンおよびショウガ培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験・106  
飯田 修、杉村康司、吉松嘉代、林 茂樹
13. 人工環境制御下での種苗の保存と効率的増殖に関する研究・・・・・・・・・・109  
吉松嘉代
14. 種苗の効率的増殖法に関する研究・・・・・・・・・・115  
飯田 修、杉村康司
15. 薬用植物栽培における農薬の適正使用に関する研究・・・・・・・・・・118  
菱田敦之、林 茂樹

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・125

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成23年度総括研究報告書

優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のため  
の保存、増殖に関する基盤的研究

（H22-創薬総合-指定-015）

研究代表者

飯田 修 （独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 種子島研究リーダー

薬用植物の国内栽培を推進するためには、各地域の環境に適した収量性の高い、日本薬局方の品質基準を満たす品種の育成と、それらの種苗の安定供給が必要である。そこで、本研究では新品種の育成に関する研究、種苗の保存に関する研究および種苗の効率的増殖法に関する研究を行う。本年度、以下の研究について行った。

薬用植物資源研究センターで育成したハトムギ品種‘北のはと’および‘はとろまん’の普及の促進と拡大を図るため、商業生産および試験栽培の現地実態調査と栽培指導を行った。平成23年度北海道内における‘北のはと’の商業生産量は、作付面積が19.24 ha、規格品の収穫量が20,086 kg、規格品外と合わせた総生産量が22,388 kgであった。埼玉県秩父市で‘はとろまん’の試験栽培を行い、5,077m<sup>2</sup>の畑から合計848.19 kgの乾燥果実を収穫した(170.0 kg/10 a)。新品種の育成に関する基盤的研究では、シャクヤクの次期新品種候補 No.513 の特性調査、カンゾウの優良系統 No.10 と No.70 の選抜およびハトムギ種子島在来選抜系統の特性調査を行った。また、ナイモウオウギの種子への直接遺伝子導入法について種々検討し、sGFP 遺伝子を導入した系統特異的に約6%の芽生えで顕著な緑色の蛍光を認め、ナイモウオウギ種子への遺伝子導入に成功した。さらに、約4%の芽生えにおいて、sGFP 遺伝子の導入をPCR法により確認した。ウラルカンゾウのグリチルリチン生合成経路の鍵酵素の CYP88D6 遺伝子のゲノム DNA 配列をもとに系統間の識別を試みた結果、市場品試料の多くに優良系統に特徴的な配列と相同な配列が含まれること、また、クローニングした甘草市場品生薬の塩基配列のうち優良系統と相同な配列の出現頻度とグリチルリチン含量との間には高い相関性があることを見出し、本配列が優良系統の選抜を可能とする遺伝子マーカーとして利用できることが示唆された。ハトムギ‘北のはと’の品種識別を行うため、葉緑体 DNA の部分配列3領域、リボソーム DNA の部分配列1領域を決定して他の7系統の塩基配列と比較したところ、何れの領域でも品種を区別できる塩基の変異は認められなかった。育成品種の成分的品質評価法について、カンゾウ9成分の一斉定量を LCMS を用いて検討した。

種苗の保存に関する基盤的研究では、種子の発芽条件の規格化を図るため、キバナオウギ、ダイオウ、モッコウ、ホッカイトウキ、ヤマトトウキ、オケラ、エビスグサ、ハトムギ、トウゴマ、ハブソウについて15、20、25、30℃の恒温条件、明期12時間、3反復で発芽試験を行い、発芽率、出葉率および発根と出葉の所要日数を調査し、発芽試験における温度設定を明らかにした。保存種子の形質変異に関する

実証試験では、貯蔵2年目のハトムギ種子における生育特性、外部形態特性、果実の収量性に大きな変化がなく、生産栽培可能な特性を十分に維持していると考えられた。培養苗由来の再生植物体について、センキュウの培養苗と圃場苗についてポット試験により生育関連形質を比較した結果、根茎増加率においては有意差が認められなかったが、培養苗由来株では抽苔が促進され、ソロバン根の数が圃場苗由来株よりも有意に多くなることが判明した。培養苗由来のウコンおよびショウガの馴化2年目の根茎を温室内で鉢栽培した結果、栽培期間8ヶ月後の1株当たり根茎生重量は、植え付け時のそれぞれ14.1倍、20.5倍に増殖した。

種苗の効率的増殖法に関する研究では、薬用植物資源研究センター保有のホソバオケラ、オケラ、コガネバナ、ショウガおよび新たに導入したショウガを材料に、植物組織培養による効率的増殖法を確立し、人工環境制御下での生産技術構築のための基盤を確立した。挿し木増殖について、ゴシュユでは3月と9月に、カギカズラおよびインドボダイジュでは9月に挿し木処理を行った。カノコソウの効率的増殖法について検討し、根収量に及ぼす圃場への被覆材の効果は、稲わら被覆処理が最も有効であった。農薬の適正使用について検討し、ベンレート水和剤による種子消毒がキバナオウギでも適用できること、また、シソ栽培においては、ダコニールおよびベンレート水和剤の施用は、その適用方法に従い施用すればシソの生育に影響を与えないことを確認した。

研究分担者

川原信夫

(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

荻野裕之

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究室長

吉松嘉代

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究室長

菱田敦之

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 北海道サブリーダー

熊谷健夫

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 主任研究員

河野徳昭

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 主任研究員

杉村康司

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 研究員

林 茂樹

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究

センター 研究員

研究協力者

乾 貴幸

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 特任研究員

高上馬希重

北海道医療大学薬学部 准教授

香月茂樹

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究  
センター 客員研究員

新井 玲子 東京理科大学薬学部

#### A. 研究目的

長寿社会で重要な役割が期待される漢方薬やサプリメントの原料生薬や薬用植物は、現在国内使用量の80%以上が低価格な中国やアジア諸国など海外からの輸入に依存している。しかし、それらの国々の経済発展並びに乱獲等による資源枯渇にともない価格が高騰しつつある。一方、中国における土壌汚染および農薬問題等、安全性の面から生産履歴の明確な国内生産品を求める意見が業界からも高まって

おり、品質の一定した安全な生薬を生薬を医療の場へ安定的に供給することは、国民の健康を保証する立場からも必要となっている。薬用植物の国内栽培を推進するためには、栽培技術の改良研究とともに、各地域の気象条件や環境に適した収量性の高い、日本薬局方の品質基準を満たす品種の育成が必要であるが、それらの組織的な研究は行われておらず、新品種の育成は急務である。新品種の育成には、従来の選抜育種法とともに、組織培養や外来遺伝子の導入による短期間での育成技術の確立や、育成品種の知的財産権保護のためのDNAマーカーの解明が必要であり、一部の農産物では既に実用化されている。

このような状況に対処するために、薬用植物の選抜育種法による新品種育成、遺伝子導入など先端的な品種育成技術や品質評価法の研究、および育成品種の権利保護のためのDNAマーカーに関する研究を行い、品種の育成を促進するとともに種子の発芽能力の簡易検定法の確立や長期保存の影響、培養苗由来再生植物体の形質への影響および種苗の効率的増殖方法を明らかにし、育成された品種の種苗を安定して供給可能とする体制を構築することを目的として研究を行った。

本研究の結果は国内での薬用植物栽培生産を促進し、生産履歴の明確な生薬や薬用植物の安定確保に貢献できるものであり、品質が均一で安全な原料生薬を将来にわたって医療の場へ安定的に供給することによって医療の安心や国民の健康に大きく貢献することが期待される。

## B. 研究方法

### 【新品種の育成に関する基盤的研究】

#### (1) 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究

1) 薬用植物資源研究センターで育成したハトムギ品種‘北のはと’の商業栽培と試験栽培および‘はとろまん’の試験栽培を行い、普及状況および生育状況を

調査し、栽培指導を行った。‘北のはと’の商業栽培は北海道士別市、二海郡八雲町、滝川市、有珠郡壮瞥町、虻田郡豊浦町で、試験栽培は名寄市、虻田郡洞爺湖町の荒れ地圃場、連作圃場および新規栽培地の条件下で行った。‘はとろまん’の試験栽培は、埼玉県秩父市上吉田の休耕田を利用して行った（川原、飯田、菱田、林、渕野、熊谷、杉村）。

2) シャクヤク新品種‘べにしずか’に次ぐ新品種候補の探索を目的として、成分・収量・根の色を指標として選抜した6系統から、昨年度収量が極めて高い系統No. 513を選抜した。6系統に‘北宰相’と‘べにしずく’を加えた8系統について、栽培3年目株の形質調査を行い、系統No. 513の品種特性を評価した（林、菱田）。

3) カンゾウの栄養繁殖3年目の優良系統株およびその他の比較系統について、根重とグリチルリチン酸（GL）含量の再現性評価を行い、第2次選抜を行うとともに、品種登録へ向けて区別性を示すための有用な特性調査項目を検索した（林、菱田、高上馬）。

4) 種子島など九州地域で生産栽培可能なハトムギの新品種の育成を目指して、種子島在来種選抜系統の栽培試験を行い、生育特性を明らかにした（杉村、飯田、香月）。

#### (2) 外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究

従来法による形質転換が困難なマメ科のナイモウオウギを材料に、種子への高効率直接遺伝子導入のため、種子の硬実打破条件、並びにエレクトロポレーション後の種子の育成条件について検討を行うとともに、ナイモウオウギ種子へのsGFP遺伝子の導入を試みた。

##### 1) 硬実打破条件の検討

サンドペーパー、乳鉢・乳棒、ビーズ破砕装置MS-100（トミー精工）等を用いて、様々な条件下で種子を処理した後、種子を6 cm培養シャーレに満たしたエレ

クトロポレーション (EP) buffer に浸して催芽を行い、種子の吸水・発芽過程を観察した。

2) エレクトロポレーションによる種子への直接遺伝子導入

催芽処理後の種子を氷上で 2.5 時間減圧処理 (0.098 MPa 前後) し、プラスミドを含む EP buffer を種子内へ浸透させた。減圧処理後の種子を氷上で冷却した EP 処理用のチャンバー (CUY495P10) に入れ、電極をセットした後、抵抗値が 35-50 Ω になるようにキュベット内の EP buffer 量を調節し、EP 装置 (CUY21、NEPA GENE) により処理を行った。処理した種子および芽生えを育成し、3-7 日後に、実体蛍光顕微鏡 VG-05 シリーズ (キーエンス)、バンドパスフィルター sGFP: FF01-513/17-25 を用いて緑色蛍光を観察した。芽生えのゲノム DNA を鋳型に、GoTaq Green Master Mix (Promega) を用い PCR を行い、1% アガロースゲル電気泳動により、目的遺伝子のゲノム DNA への挿入の有無を確認した。

3) エレクトロポレーション後の種子の育成条件の検討

EP 処理を行った後、従来通り、シャーレ内のろ紙上で種子を育成するとともに底面吸水により MilliQ 水で湿らせたビーナスライト 5 号上でも種子の育成を行い、育成法の違いによる発根種子率・子葉展開種子率・芽生えの生育等の違いについて比較した (河野、乾)。

### (3) DNA マーカーによる品種識別技術の確立

1) 生薬カンゾウの基原植物のひとつであるウラルカンゾウの優良系統をモデルとして、グリチルリチン生合成経路の鍵酵素の CYP88D6 遺伝子のゲノム DNA 配列に着目し、それらの多型情報をもとに系統間の識別を試みた。本年度は、カンゾウ属植物について塩基配列情報を収集するとともに、甘草市場品生薬試料についても同領域の配列情報を収集し、優良系統と

の配列の比較を行った。

### カンゾウ属植物試料・生薬試料

本実験では、以下のカンゾウ属植物 14 系統および市場品生薬 16 試料を対象とした。

ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

・優良系統等 6 系統

GuTS71-08:5 系統 (GuTS71-08 IV2、C2、C5、#11、IV1) (北海道農業試験場系統由来の実生)

Gu2:1 系統 (Gu2-3-2) (北海道医療大学系統 導入番号 TS301-07 シュートより誘導した培養植物のサブクローン)

・(独) 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部圃場において保存栽培されている下記 2 系統

導入番号: 0125-93 (Gu)、導入番号: 0366-95 (甘草屋敷系統; GuKY)

スペインカンゾウ 2 系統 (*Glycyrrhiza glabra* L.)

導入番号等: 0469-79 (Gg1)、SC-15 (Gg2)

ロシアカンゾウ 1 系統 (*Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* (Waldst. et Kit.) Reg. et Herd.)

導入番号: 1659-84 (Ggg)

イヌカンゾウ 1 系統 (*Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim.) 導入番号: 0330-80 (Gp)

シナカンゾウ 1 系統 (*Glycyrrhiza echinata* L.)

導入番号: 0451-79 (Ge)

シンキョウカンゾウ 1 系統 (*Glycyrrhiza inflata* Bat.) (Gi)

甘草市場品生薬 16 試料 (表 1)

上記のうち、GuTS71-08 IV2、GuTS71-08 IV1、そして Gu2-3-2 の 3 系統が、養液栽培の可能な高グリチルリチン含有系統として、特許出願を行った株である。

### CYP88D6 遺伝子のイントロン 7 配列の解析

識別対象試料より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて調製したゲノム DNA を鋳型とし、KOD plus (TOYOBO) を

用いて、イントロン7の全長を含む配列は、プライマーセット①により、また、イントロン7の部分配列は、プライマーセット②により増幅し、電気泳動により増幅を確認した。

得られた PCR 産物の一部には、ExoSAP-IT (GE healthcare) を加え、未反応のプライマー等を除去した後、ABI PRISM 3100 (3130)-Avant Genetic Analyzer、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて塩基配列を解析した。また、残りの PCR 増幅産物の一部は、A-Attachment mix (TOYOBO) を用いて 3' 末端に dA を付加した後、DNA ligation kit ver2.1 (TAKARA BIO) を用いて pT7blue T-vector にクローニングし、DH5  $\alpha$  z-competent cells (ZYMO RESEARCH) に導入した。LB-Ampicillin 培地で、37°C、一晚培養後、GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いてコロニー PCR により目的ベクターの導入を確認した。陽性の PCR 産物については、上記と同様に、ExoSAP-IT を用いて PCR 溶液を精製し、塩基配列を解析した(河野、乾)。

2) ハトムギ品種‘北のはと’の品種識別法を開発する目的で、‘北のはと’および国内外の流通品7系統8系統を実験材料として、種間および品種間の識別に汎用される葉緑体 DNA の遺伝子および遺伝子間配列の3領域とリボソームDNAの遺伝子間領域の配列を決定して比較した。

粉碎した玄穀は、DNAの抽出材料として DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により 鋳型DNAを調製した。

植物の種および品種の識別で汎用される葉緑体DNAおよびリボソームDNAの次の領域を目的領域(target region)とした。

(1) *rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域、(2) *atpF-atpA*介在配列領域、

(3) *trnS-trnT*領域および (4) ITS4 - ITS5遺伝子間領域を特異的に増幅するプライマーセットを用いPCR法で増幅した。

塩基配列の決定はダイレクトシーケン

ス法で行った。精製したPCR産物を鋳型とし、BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies K. K.) を用いてサイクルシーケンス法を行い目的領域の塩基配列を決定した(菱田、林)。

#### (4) 育成品種の成分的品質評価法の確立研究

カンゾウの成分を LCMS を用いて一斉定量を行うことを試みた。カンゾウを一斉に HPLC で定量するには極性の問題などがあり非常に困難である。そのためにはカラムの選定など条件の検討を行う必要があるため、カラム選定や測定条件の検討、ならびに LCMS 法を用いた定量についても検討を行なった。

材料は市場流通品 16 サンプルおよび北海道研究部にて育成中の 12 サンプルを用いた。

カンゾウ市場品サンプルを用いて、粉碎後に遠沈管に採取し、各種溶媒にて室温下 15 分間振り混ぜて抽出し、遠心分離後の上澄み液を試料溶液とし、HPLC にて分析を行なった。

定量法は以下のとおり。本品の粉末約 0.5g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、70%エタノール 70mL を加えて 15 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物は更に希エタノール 25mL を加え、同様に操作する。全抽出液を合わせ、希エタノールを加えて正確に 100mL とし、試料溶液とする。別にグリチルリチン酸標準品約 25mg を精密に量り、70%エタノールに溶かして正確に 100mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20  $\mu$  L ずつを正確にとり、液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のグリチルリチン酸のピーク面積  $A_1$  及び  $A_2$  を測定する(渕野)。

#### 【種苗の保存に関する基盤的研究】

##### (1) 発芽試験法の体系化

薬用植物種子の発芽条件の規格化を図

るため、キバナオウギ、ダイオウ、モッコウ、ホッカイトウキ、ヤマトトウキ、オケラ、エビスグサ、ハトムギ、トウゴマ、ハブソウの発根、出葉に及ぼす温度条件の影響について調査し、それぞれの植物について発芽試験法の規格化の検討を行った。

種子は2010年産を用いた。蓋付きスチロール角形ケース（148×84×32 mm）1個に種子50粒置床。下記温度条件下でそれぞれ3反復で実施。発芽チャンバーを用い、試験温度は15、20、25、30℃の恒温条件で行った。照明条件：明暗各12時間。発芽の確認は発根時および出葉（子葉展開）時の2段階で確認した。

カノコソウの効率的な増殖法を検討するため、圃場で稲わら被覆、黒マルチ被覆および裸地栽培について比較試験を行った。定植は平成22年10月7日、収穫は平成23年9月27日に行い、根の収量を比較した（熊谷）。

## (2) 保存種子の形質変異に関する研究

長期保存した種子の形質の変異を確認するため、2009年に採種し冷蔵保存したハトムギ種子を用い、2010年から2年間継続して栽培を行い、形質について調査した。

2009年に種子島研究部で採取した種子島在来種の種子を用い、種子島研究部第9圃場で栽培した。播種は、2010年と2011年共に3月17日と4月19日に固定した。畝幅60cm、株間20cmに統一し、2粒ずつ点播した。

生育相調査は、発芽開始日、発芽揃い日、出穂開始日、出穂期、開花開始日、開花盛期に加えて、収穫日、発芽率を記録し、2010年と2011の調査結果を比較した。特性調査は3月播種が8月上中旬、4月播種が8月中下旬に実施した。調査は、草丈、最上位果の高さ、茎数、稈数、稈径、主稈節数、分枝数、果実（稔実、不稔）粒数、稔実率、穂発芽数、稔実果実

の乾燥重量について行い、2010年と2011の調査結果を比較した（杉村、飯田）

## (3) 培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験

1) センキュウ培養苗由来植物と圃場で生産された苗（圃場苗）の生育関連形質を調査し、培養苗由来の再生植物体が形質へ及ぼす影響を検討した。

筑波育種生理研究室において、継代培養された培養苗を、2010年5月13日に赤玉が充填されたポリポットに定植後、常温で順化した。圃場苗は北海道研究部で保存する圃場栽培2年目株を用いた。

2011年4月21日にコーネルミックス（バーミキュライト：ピートモス＝1：1）が充填された1/5000aワグネルポットを作成し、培養苗および圃場苗それぞれ7個体について種イモ重を測定後、定植した。追肥として、ハイポネックスを6月21日および8月12日に施用した。

2011年10月13日に各試験区から7個体を収穫し、それぞれ草丈、茎数、茎葉重、根茎重、抽苔個体数およびソロバン根の数を調査した。ソロバン根については、ソロバンが発生した芽の数をカウントした。また、種イモ重と収穫した根茎重（新鮮重）から根茎の増加率を算出した（林、菱田、吉松、飯田）。

2) ウコンおよびショウガにおける培養苗由来の再生植物体の形質変異について、圃場で生産された種苗との比較試験を行うため、培養苗由来のウコンおよびショウガの馴化2年目の根茎を温室内で鉢栽培による増殖を行った。

筑波育種生理研究室において、継代培養された培養苗を、2010年5月18日および7月21日に、腐葉土を用いポリポットに移植後温室内で馴化し、2011年1月24日に根茎を温室内の土中に保存した。

2011年5月16日に根茎を取り出し、直径15cmの素焼き鉢に1鉢1根茎を植え付けた。植え付け前に種根茎の生重量を1個ずつ測定した。培養土は腐葉土を



用い、施肥は行わなかった。栽培はガラス温室内で行った。

同年 11 月 25 日に地上部の生育調査を行い、翌年 1 月 27 日に根茎の生育調査を行った。1 月 30 日に根茎を温室内の土中に保存した（飯田、杉村、吉松、林）。

### 【種苗の効率的増殖法に関する研究】

#### (1) 薬用植物ファクトリー構築に関する研究

植物組織培養による効率的増殖法を確立し、人工環境制御下での生薬生産技術構築のための基盤を確立するため、ホソバオケラ (*Atractylodes lancea* DC. : Al) およびオケラ (*Atractylodes japonica* Koidz. ex. Kitam. : Aj) の根茎に形成したシュートより誘導および増殖させた培養苗を閉鎖温室内 (20°C、14 時間照明、相対湿度 55%) で養液栽培した。

コガネバナおよびショウガについて、培養植物体として継代・維持してきた系統 (保存系統) の増殖および植物体再生効率を調査するとともに、コガネバナでは筑波研究部産種子 (SbT) より、ショウガでは新規導入の 4 品種の根茎に形成している新芽より新たな組織培養系の確立を行い、増殖および植物体再生効率を調査した (吉松)。

#### (2) 種子繁殖が困難な植物の効率的増殖法に関する研究

栄養繁殖を主とする植物の効率的な種苗の増殖を図るため、ゴシユ *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、カギカズラ *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq.、インドボダイジュ *Ficus religiosa* L. の挿し木による増殖法を検討した。

挿し木処理は利用部位を概ね先端部と基部に分け、ゴシユが 2011 年 3 月 22 日および 9 月 15 日に、カギカズラとインドジャボクは 9 月 15 日に行った。用土は小粒の赤玉土を用い、挿し木した鉢は加温式のガラス温室内の遮光下で管理した。ゴシユの 3 月挿し木は 9 月 14 日に、その他は 12

月 13 日に挿し穂を掘り起こし、発根状況を確認した (飯田、杉村)。

#### (3) 薬用植物栽培における農薬の適正使用についての検討

既存の農薬を利用したキバナオウギの病害対策の基礎的な研究を目的に、一般農作物で利用されている種苗用殺菌剤ベンレート水和剤を用い、種子消毒がキバナオウギの発芽や生育に及ぼす影響を調査した。

供試材料：キバナオウギ *Astragalus membranaceus* Bunge の種子。

500 倍ベンレート溶液に 12 時間浸漬した種子を用い、発芽試験は 20°C に設定したインキュベータ内で発根、発芽を観察した。圃場試験は 2010 年 5 月 25 日に殺菌処理した種子を播種し、2010 年 8 月 19 日に畦 5 m の間に発芽した株数を調査し、各試験から 30 個体の草丈を調査した。

生薬「蘇葉」の生産を目的としたシソ栽培において、シソ登録農薬である殺菌剤のダコニールおよびベンレート水和剤を施用し、薬剤が生育に及ぼす影響と収穫後の各薬剤の残留値を評価した。

供試材料：シソ *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo f. *crispa* Makino の種子。

2011 年 6 月 10 日に 1/2000a ワグネルポットに育苗した苗を定植し、野外で育成した。

対照区は、薬剤を散布しない無処理とした。ダコニール撒布区は、2011 年 8 月 3 日および 11 日に 0.2% Tween 20 を添加した 1000 倍ダコニール溶液希を 7.5 mL/pot (150 L/10a) 葉面散布した。ベンレート散布区は、2011 年 8 月 3 日および 11 日に 0.2% Tween 20 を添加した 2000 倍ベンレート溶液を 7.5 mL/pot (150L/10a) 葉面散布した。

8 月 18 日に各試験区において草丈 (10 株)、葉重 (5 株) を調査し、各試験区で葉を混合し、30°C、3 日間で温風乾燥したものを微生物試験用サンプルとした。9

月13日に各試験区5株から50gの葉を収穫し、生葉を残留農薬の分析に供した（菱田、林）。

## C. 研究結果

### 【新品種の育成に関する基盤的研究】

#### (1) 選抜育種による品種育成、種苗の増殖および普及に関する研究

1) 平成23年度北海道内におけるハトムギ品種‘北のはと’の商業生産量は、作付面積が19.24 ha、規格品の収穫量が20,086 kg、規格品外と合わせた総生産量が22,388 kgであった。本年度は、北海道全域において降雨が続き低温傾向であったため、各地域で‘北のはと’は不作であった。八雲町でタマナガヤの幼虫によるハトムギの食害があり、収穫面積が減少した。本種は、本来北海道に分布しない農業害虫のため、成虫が中国大陸からの気流に乗って飛来して産卵し、幼虫が発生したと思われる。

名寄市の北海道研究部における試験栽培では、10a当たり果実収量は、荒れ地圃場が15.7 kgと極めて低く、連作圃場直播栽培が36.5 kg、移植栽培が65.8 kgで、新規栽培地は67.3～118.9 kgであった。

埼玉県秩父市における‘はとろまん’の試作栽培では、作付面積8,871m<sup>2</sup>のうち、5,077m<sup>2</sup>の畑から合計848.19 kg

(170.0 kg/10a)の乾燥果実を収穫した。

2) シャクヤク新品種候補No. 513は草丈、茎葉重、葉緑素値およびさび病抵抗性が最も高かった。茎葉重と収量の間には正の相関関係 ( $r=0.824$ ,  $P<0.05$ ) が、さび病被害指数と収量の間には負の相関関係 ( $r=0.810$ ,  $P<0.05$ ) がそれぞれ認められたことから、本研究の範囲では両形質がシャクヤクの収量性を決定づける主要因であることが明らかとなった。系統No. 513は旺盛な生育量と高いさび病抵抗性により高収量を獲得していることが判明した。また、新品種‘べにしずか’について、2011年12月より埼玉県秩父市において実証栽培を開始した。

3) カンゾウの根重については、親株と栄養系の高に高い再現性が認められなかった。GL含量については、親株と栄養系の高に強い相関関係 ( $r=0.903$ ,  $P<0.001$ ) が認められたことから、異なる環境下でも形質の再現性が高いことが判明した。親株および栄養系ともに根重およびGL含量が安定的に高かった系統 No. 10 (GL 3.42%) および No. 70 (GL 3.19%) を第2次選抜系統とした。開花期、花色、小葉の形、開花株率、葉長、葉幅、葉長/葉幅、小葉長、小葉数、草丈、分枝数については、系統間で異なる形質であり年次間での形質再現性が高いことから ( $r>0.75$ )、系統間の区別性を示す有用な特性調査項目となることが判明した。

4) ハトムギ種子島在来選抜系統は、3月の低温時でも十分に発芽し成長が比較的早いこと、果実の生長期間に乾燥状態が続く状況でも登熟し、品質の整った果実を収穫できること、さらに1株当たりの稔実果実数が多く、不稔果実数が少ない特性を持つ優良種と考えられた。

#### (2) 外来遺伝子導入による品種作出を目指した基盤的技術の研究

##### 1) 硬実打破条件の検討

サンドペーパー処理では、種子の両面を1回ずつ約2 cm引く方法が最も有効であったが、本処理は手間がかかるため、多量の種子の調製には不向きであった。乳鉢・乳棒処理では、種子とビーナスライトの粉末にMilliQ水を1 mL加えることにより、吸水種子率80%以上を達成しつつ、種子の内部胚へのダメージを低減可能であった。ビーズ破碎装置による処理では、アシストチューブ（非自立）内に、MilliQ水、ビーナスライトの粉末、ステンレスビーズおよび種子約20粒を加え、MS-100 を用いて2,000 rpmで2 or 5 or 10 分間処理を基本にして種々検討を行い、16～18 時間後の吸水種子率を観察した結果、良好な吸水種子率を保ちながら種子へのダメージを減らすことに成功した。

2) エレクトロポレーションによる種子への直接遺伝子導入

EP処理後5日目にsGFP蛍光の観察を行ったところ、sGFP遺伝子導入系統特異的に顕著な緑色蛍光を示す株を8株認めた(約6%)。さらに、EP処理後8日目にゲノムDNAを抽出し、PCRによりsGFP遺伝子の挿入確認を行ったところ、5クローンで導入が確認された(約4%)。

3) エレクトロポレーション後の種子の育成条件の検討

EP処理後の種子について、ろ紙上とビーナスライト5号上に置床した場合で、生育の比較を行った。ビーナスライト上の種子は、催芽3日目には、すでに80%以上の種子が発根しており、ろ紙上の種子に比べて発根が早く、揃っていた。また、その後の生育も良好で、催芽6日目には子葉が展開し始め、催芽9日目には、40~50%の芽生えで子葉の展開が認められた。その後、本葉が伸び始めてから本葉が展開するまでの間に、ジフィーセブン種まきポットに植出したところ、植出し2週間後の時点で、80%以上の芽生えが活着し、良好な生育を示した。

### (3) DNAマーカーによる品種識別技術の確立

#### 1) カンゾウ: *G. glabra*, *G. echinata*, *G. inflata*のCYP88Dイントロン7配列の解析

CYP88D6intronS1179、CYP88D6intronA1420プライマーセットを用いて増幅した*G. glabra* (SC-15)のCYP88D6相同遺伝子のイントロン7配列をPCRダイレクトシーケンスにより解析し、前年度までに得られていた*G. glabra*および*G. glabra* var. *glandulifera*のイントロン7配列と比較した結果、*G. glabra*の変種間の識別が可能であった。

CYP88D6intronS1179、CYP88D6intronA1420プライマーセットを用いて増幅した*G. echinata*のCYP88D6相同遺伝子のイントロン7配列をPCRダイレクトシーケンスにより解析したところ、*G. echinata*の

イントロン7配列は、*G. ularensis*、*G. glabra*、*G. glabra* var. *glandulifera*、*G. inflata*、*G. pallidiflora*のうち、*G. echinata*と同様にグリチルリチン非生産性の*G. pallidiflora*と最も相同性が高かった。さらに、*G. echinata*に特異的な変異も見出され(295番目がC)、カンゾウ属の他の植物との識別が可能であった。

CYP88D6intron7Fw、CYP88D6intron7Rv2プライマーセットを用いて増幅した*G. inflata*のCYP88D6相同遺伝子のイントロン7部分配列について、pT7blue T-vectorにクローニング後、シーケンスを行ったところ、*G. ularensis*と相同な配列と*G. glabra*と非常に相同性の高い配列が含まれていた。このうち、*G. glabra*と高い相同性を示す配列では、*G. glabra*の配列と比べ塩基の変異が認められ(149番目が特異的にG)、カンゾウ属の他の植物と区別が可能であった。

#### 甘草市場品生薬のCYP88D6イントロン7部分配列の解析

CYP88D6intron7Fw、CYP88D6intron7Rv2プライマーセットを用いて増幅した甘草市場品生薬試料のCYP88D6遺伝子のイントロン7部分配列をダイレクトシーケンスにより解析したところ、多くの試料で、養液栽培において比較的生育がよく短期間の栽培で比較的高グリチルリチン含量を示す優良系統であるGuTS71-08 IV1やIV2系統と同様の、もしくは、それらが混合した波形のパターンを示した。また、一部試料では、*G. ularensis*様の配列に加えて*G. glabra*と相同性が高い配列が混合した波形パターンを示した。16試料のうち、8試料のPCR増幅産物をそれぞれ約16クローンずつ、pT7blue T-vectorにクローニング後、塩基配列の解析に供した結果、市場品試料からは、Gu系統と相同性の高い配列に加え、優良系統に特徴的な配列あるいは*G. glabra*と相同性の高い配列を得た。

## 甘草市場品生薬のCYP88D6イントロン7部分配列の出現頻度と成分含量の関係

CYP88D6遺伝子のイントロン7部分配列について甘草成分含量の遺伝子マーカーとしての利用の可能性を検討するため、得られた配列の出現頻度と成分含量の関係について解析した。*G. ularensis*に広く認められる配列 (a)、GuTS71-08 IV2系統に特徴的な配列 (b)、GuTS71-08 IV1系統に特徴的な配列 (c)、*G. glabra*と相同性の高い配列 (d)およびそれらの組合せについて、それぞれの試料からクローニングされた全配列に占める出現頻度を計算し、成分含量との相関性を比較した。その結果、グリチルリチン含量は、dと強い負の相関性を示した ( $R = -0.769$ , t検定により  $P < 0.05$ )。また、グリチルリチン含量は、a~cのおおの配列出現頻度とは高い相関性は認められなかったが ( $|R| = 0.418 \sim 0.532$ )、bとcを合わせた出現頻度との間には、強い正の相関性が認められた ( $R = 0.874$ , t検定により  $P < 0.01$ )。同様に、bとcを合わせた出現頻度は、リキリチン含量 ( $R = 0.926$ , t検定により  $P < 0.01$ )、イソリキリチン含量 ( $R = 0.760$ , t検定により  $P < 0.05$ )、グリシクマリン含量 ( $R = 0.877$ , t検定により  $P < 0.01$ )とも高い相関性を示し、dの出現頻度は、リキリチン含量 ( $R = -0.789$ , t検定により  $P < 0.05$ )、グリシクマリン含量 ( $R = -0.892$ , t検定により  $P < 0.01$ )とも高い負の相関性を示した。さらに、aの出現頻度とリキリチゲニン含量 ( $R = 0.755$ , t検定により  $P < 0.05$ )、cの出現頻度とグリシクマリン含量 ( $R = 0.783$ , t検定により  $P < 0.05$ )の間にも良い相関性を認めた。

## 2) ハトムギ:

‘北のはと’の目的領域の部分配列を決定した結果、*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域の塩基長は536bpであった。*atpF-atpA*介在配列領域の塩基長は350bpであった。*trnS-trnT*領域の塩基長は

1238bpであった。リボソームDNAのITS4-ITS5の遺伝子間配列の塩基長は574bpであった。他の7系統の塩基配列を決定して比較したところ、比較した領域では品種を区別できる塩基の変異は認められなかった。

## (4) 育成品種の成分的品質評価法の確立研究

カンゾウの成分について HPLC 条件を検討した結果、0.1%TFA/H<sub>2</sub>O と CH<sub>3</sub>CN 混液のグラジエント条件がもっとも分離がよかった。市場流通品の70%エタノール抽出エキスの比較を行ったところ、Glycyrrhizin と Liquiritin のピークは明瞭に現れたが、それ以外の7種類のピークは検出困難であった。よって、HPLCにおける定量においては Glycyrrhizin と Liquiritin の2種類において検討を行った。この条件において、Liquiritin はどの試料においても重なりがみられずに定量は可能と考えられたが、Glycyrrhizin においては、一部の試料 (No. 18, No. 21 など) において分離が悪いピークとなったが、この二種類の成分に関しては十分 HPLC における同時定量は可能と考えられた。

LCMSによる定量を試みた結果、四重極を用いた LCMS においては定量が可能であり、当センター所有のAPI3000 (ABSciex 社製) はイオン源として ESI および APCI が用いることができ、さらに MS/MS 測定を行うことが可能であり、これにより広範囲の成分における MRM (Multiple Reaction Monitoring: 多重反応モニタリング) 定量を行うことが可能であった。

## 【種苗の保存に関する基盤的研究】

### (1) 発芽試験法の体系化

キバナオウギの発芽は 15~20°C で発根率、出葉率が高く、15°C で発根率 95.3%、出葉率 60%を示した。ダイオウの発芽は 15~20°C の発根、出葉率が高く

15℃で85.3%、20℃で90.7%の発根率を示した。出葉率は温度が上がるにつれて、低下した。モッコウの発芽は25℃の発根率、出葉率が高く、発根率は70.7%、出葉率は69.3%を示した。ホッカイトウキは15~20℃の発芽率が高く、15℃で発根率は48.0%、出葉率28.0%、20℃で発根率は33%、出葉率21%を示した。ヤマトトウキは15~20℃の発芽率が高く、15℃で発根率は23%、出葉率11%、20℃で発根率は20%、出葉率11%を示した。オケラの発芽は15℃で高く、発根率10%、出葉率5%を示した。エビスグサの発芽は30℃で最も高く、発根率、出葉率64.7%であった。ハトムギ(岡山在来)の発芽は25~30℃で高く、25℃の発根率78.7%、出葉率76.7%、30℃の発根率77.3%、出葉率67.3%であった。トウゴマの発芽は25℃で最も高く、25℃の発根率72.0%、出葉率72.0%であった。ハブソウ(白花早生)の発芽は20~30℃で発根率は61~68%であった。ハブソウ(白花中生)の発芽は15~30℃で発根率は40~45%、出葉率34~38%であった。ハブソウ(白花早生)、ハブソウ(白花中生)ともに発根所要日数、出葉所要日数ともに温度が高くなるにつれて短くなった。

カノコソウの根収量に及ぼす圃場への稲わら被覆処理の効果および黒マルチ処理の効果についての検討を行ったところ、稲わら処理区で最も高く、黒マルチ区、裸地区で減収した。10a当たり根の風乾収量は稲わら処理区30.8kg、黒マルチ区9.1kg、裸地区3.5kgで、黒マルチ処理区、裸地区は稲わら処理区に比べて、それぞれ、71%、89%根収量が減少した。カノコソウ栽培において稲わらの被覆処理は有効であることを確認した。

## (2) 保存種子の形質変異に関する研究

2009年に保存を開始した種子島在来種の種子を用いた2010年と2011年の栽培試験の比較では、発芽、出穂、開花、収穫に関する時期などの生育相に大きな変化

がないことが明らかになった。

さらに、草丈、茎数、分枝数などの外部形態に加えて、1株当たりの稔実果実の粒数や乾燥重量にも大きな変化は認められず、果実は問題なく収穫可能な特性を維持していることが明らかになった。

## (3) 培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験

1) センキュウの培養苗と圃場苗の成長を比較した結果、草丈は培養苗由来株が圃場苗由来株よりも有意に高かったのに対し、茎数については圃場苗由来株が培養苗由来株よりも有意に大きかった。

茎葉重では試験区間で有意差が認められなかったが、根茎重および根重では圃場苗由来株が培養苗由来株よりも有意に大きかった。

種イモ重と収穫した根茎重の間には0.1%水準で有意な相関関係が認められた( $r=0.938$ 、 $P<0.001$ 、 $n=14$ )。一方、根茎の増加率については試験区間で有意差が認められなかった。

抽苔についてみると、培養苗由来株ではすべての個体で抽苔・開花が認められたのに対し、圃場苗由来株では抽苔が認められなかった。

培養苗由来株のソロバン根の数は圃場苗由来株よりも有意に多かった。

2) ウコンおよびショウガの培養苗由来根茎を2011年5月から2012年1月までの8ヶ月間、ガラス温室内で鉢植え栽培を行った。両種の地上部および地下部根茎の形質には、圃場由来株との差違はみられなかった。

栽培期間6ヶ月後の草丈は、ウコン $110.7 \pm 10.8$  cm ( $n=16$ )、ショウガ $71.6 \pm 5.7$  cm ( $n=10$ ) であった。栽培期間8ヶ月後の1株当たり根茎生重量は、ウコン主根茎 $38.50 \pm 5.80$  g、側根茎 $56.86 \pm 14.14$  g、合計 $95.36 \pm 19.94$  g ( $n=16$ )、ショウガ $43.11 \pm 14.43$  g ( $n=10$ ) で、植え付け時根茎重量のそれぞれ14.1倍、20.5倍の増殖であった。

## 【種苗の効率的増殖法に関する研究】

### (1) 薬用植物ファクトリー構築に関する研究

養液栽培したオケラ属再生植物体は、元苗の葉の生長は認められるものの、新葉や花芽の形成は認められず、ホソバオケラおよびオケラの養液栽培には、低温処理等が必要であることが示唆された。

コガネバナでは、保存系統、新規系統とも頂芽切片よりも茎切片を植付け片として用いた方が増殖・植物体再生が良好であった。コガネバナ保存系統では72日間の培養で1茎切片より、平均シュート長7.7cm、平均シュート数3.7本、平均発根数9.9本の培養植物体を得られたが、新たに種子から誘導したクローンは56日間の培養で1茎切片より、平均シュート長14.2cm、平均シュート数17.0本、平均発根数7.3本の培養植物体を得られ、増殖効率、植物体再生効率が飛躍的に向上したクローンが得られた。

ショウガ保存系統の継代培養によるシュートの増殖は、61日間で4.8本であり、全てのシュートが発根し植物体が再生した。新たに入手したショウガ根茎を材料に、茎頂培養による組織培養系の確立を行った結果、3品種から初代培養物を得られた。得られた3品種の培養植物体より頂芽切片を調製しMS培地に植付けたところ、49日後の形成シュート数及び最大シュート長は、金時 (ZoK) : 9.0本、10.3 cm、三州 (ZoS) : 7.5本、10.5 cm、お多福 (Zo0) : 8.5本、9.9 cmであり、培養植物体として継代維持してきたZoよりも高効率な増殖能を示し、成長の良好なショウガ培養植物体が確立でき、それぞれの品種より、増殖効率が高く成長が良好なクローンを選抜した。

### (2) 種子繁殖が困難な植物の効率的増殖法に関する研究

ゴシュユの3月挿し木は先端部、基部ともに93.3%の高い発根率を示した。9月挿

し木では両部位ともに10.0%と低い発根率であった。

カギカズラの9月挿し木は、太い枝の先端部が33.3%と最も高い発根率で、次いで、細い枝の先端部の18.2%であった。基部は太い枝も細い枝もともに9~10%で、低い発根率であった。

インドボダイジュの9月挿し木は、先端部の発根率が30.0%であったが、基部は0%であった。

### (3) 薬用植物栽培における農薬の適正使用についての検討

キバナオウギ種子は種子消毒の有無に関わらず、置床後2日目に発根が開始した。発根は、4日目で最大に達し、無処理区の発根率が88.7%、ベンレート処理区が96.7%であった。ベンレート処理区の発根率はやや高い傾向にあった。

圃場試験における種子消毒処理が生育に及ぼす影響を調査した結果、畦5mの間に発芽した株数は、無処理区が38.0株、ベンレート処理区が40.3株であった。Dunnetの検定を用いた無処理区とベンレート処理区の間には有意差は認められなかった。草丈の調査では、無処理区が73.8cm、ベンレート処理区が65.5cmであった。Dunnetの検定を用いた無処理区とベンレート処理区の間には有意差 ( $P < 0.05$ ) は認められた。

殺菌剤の施用がシソの生育へ及ぼす影響について検討した結果、草丈および葉重においては顕著な差が認められなかった。また、農薬の残留性については、ダコニール区ではクロロタロニルが0.02 ppm (基準値 2 ppm)、ベンレート区ではベノミルが0.44 ppm (基準値 3 ppm) 検出されたが、いずれも基準値以下の値であった。

## D. 考察

### 【新品種の育成に関する基盤的研究】

北海道研究部におけるハトムギ‘北のはと’の本年度の収量は、67.3 ~ 118.9

kg/10a で、不作であると判断した。不作の主な原因は、北海道全域で5月～7月にかけて降雨が続き低温傾向にあったため、生育温度が高い条件を好むハトムギでは、植物体が十分に生育できず収量に影響したと思われる。

今年度、道北地域における‘北のはと’は不作であった。特に道北地域の生産地の減収は顕著であった。気象災害に関わらず道北地域の栽培において増収につながる施肥方法（時期や施用量）を検討する必要があると思われる。

生産地が南下するに従い概ね収量が増加する傾向が認められた。これは、生産地の平均気温に依存する現象と考えられ、‘北のはと’は生育温度と収量との間に関係があることが示唆された。

二海郡八雲町で発生したタマナヤガの幼虫によるハトムギの食害は、本来北海道に分布しない農業害虫による被害である。タマナヤガは、北海道では越冬できないので、発生初期に十分に駆除することにより、圃場への蔓延や翌年の発生を防ぐことができる。

‘はとろまん’の試験栽培では、10a当たり300～350 kgの果実収量を期待したが得られなかった。原因とし、播種期が遅れたこと、施肥量が多かったため、栄養成長期間が長く、登熟期が遅れ、十分完熟する前に収穫を強いられたため、未熟果が多かったことなどがあげられる。精白調製において、破碎する種子が多く生じたが、種子の登熟が十分でなかったこともその要因と考えられる。今後、播種期を早め、施肥量、特に基肥のチッ素肥料の量を減らした栽培を検討する必要がある。

シャクヤク次期品種登録候補の系統No.513は、地上部の旺盛な生育量と高いさび病抵抗性により高収量を獲得していることが判明した。No.513のpaeoniflorin含量(3.97%)はJP16規定値を十分に満たし、albiflorin含量は0.22%と北宰相を上回る値であり、根の横断面の色は白く

‘北宰相’よりも優れている。

カンゾウの実生由来株から選抜した優良系統を栄養繁殖し、その栽培3年目株における根重とGL含量の再現性を検証した結果、根重については親株と栄養系の間の高い再現性が認められなかったが、GL含量については親株と栄養系の間強い相関関係が認められたことから、異なる環境下でも形質の再現性が高いことが判明した。

葉長、葉幅、葉長/葉幅、小葉長、小葉数、草丈、分枝数、開花期、花色、花色、小葉の形、開花株率については、系統間で異なる形質であり年次間での形質再現性が高いことから、系統間の区別性を示す有用な特性調査項目となることが判明した。

ハトムギ種子島在来種選抜系統は、3月の低温時でも十分に発芽し成長が比較的早いことに加えて、一株当たりの稔実果実数が多く、不稔実果実数が少ないこと等、耐寒性に優れた種であること、また、果実の生長期間に乾燥状態が続く状況でも登熟し品質の整った果実を収穫できることから、九州地方で生産栽培可能な特性を有していると考えられる。

ナイモウオウギの種子への高効率遺伝子導入を実現するための種子の硬実打破処理として、下記の条件を見出した。

ナイモウオウギ種子20粒、ビーナスライト粉末300 mg、滅菌MilliQ水500  $\mu$ L、および、ステンレスビーズ2個を2 mL容のアシストチューブ(非自立)にとり、MS-100で2,000 rpm、150秒間処理を2回行う。途中、インターバルの間にMS-100処理時の力の偏りがなくなるように中身をよく振り混ぜる。その後、8～24時間後に吸水した種子をエレクトロポレーション処理に用いる。

エレクトロポレーションによる種子の形質転換を行った結果、約6%の芽生えで導入したsGFP遺伝子によると考えら

れる顕著な緑色蛍光が認められ、従来法では形質転換が困難なナイモウオウギ種子の形質転換に成功した。さらに、約4%の芽生えにおいて、sGFP 遺伝子の導入をPCR 法により確認した。

エレクトロポレーション処理後の種子の育成条件を検討し、種子を EP 処理翌日にビーナスライト 5 号上に置床することにより、生育が大幅に改善されることを見出した。

カンゾウのグリチルリチン生合成経路において  $\beta$ -amyrin の 11 位の酸化を触媒する CYP88D6 のイントロン 7 の配列情報の蓄積を進め、本配列をダイレクトシーケンスにより比較することで、カンゾウ属の多くの植物 (*G. ularensis*, *G. glabra*, *G. glabra* var. *glandulifera*, *G. inflata*, *G. pallidiflora*, *G. echinata*) を識別可能であることを示した。

甘草市場品生薬についても、CYP88D6 のイントロン 7 部分配列をダイレクトシーケンスにより解析し、すべての試料に *G. ularensis* の優良系統である GuTS71-08 IV2 あるいは IV1 に特徴的な配列と相同な配列が含まれることを示唆する結果を得た。甘草市場品生薬の分析から、上記優良系統に特徴的に認められた配列の出現頻度とグリチルリチン含量との間に良い相関性があることを明らかとした。

これらのことから、本配列は高グリチルリチン含量カンゾウ育種のための遺伝子マーカーとしての応用が期待される。

ハトムギの品種識別を行うため、葉緑体 DNA およびリボソーム DNA の部分配列について比較検討を行ったが、*rpl16* および *rpl16-rpl14* 介在配列領域、*atpF-atpA* 介在配列領域、*trnS-trnT* 領域およびリボソーム DNA の ITS4-ITS5 遺伝子間領域のいずれにおいても系統間を判別する領域は見い出せなかった。今後、DNA 上に多く存在するリピート配列領域（マイクロサテライト領域）を利用した識別法を検

討する必要があると判断した。

成分的品質評価法の確立では、カンゾウの 9 種類の成分の一斉定量を HPLC および LCMS において検討したが、抽出溶媒の検討において、配糖体類の定量には 70% エタノールが良いと判断したが、一部の非糖体においては抽出効率が必ずしも良いとは言えず、100% メタノールあるいは加熱抽出条件の検討も必要と考えられた。

HPLC による定量においては、Liquiritin と Glycyrrhizin の同時定量は可能と考えられたが他成分については含量が低く、高感度の LCMS を用いる必要性があり、LCMS による定量を検討したが、一部の同一分子量の化合物の重なりが見られたもののほぼすべての成分の定量が可能と思われた。

#### 【種苗の保存に関する基盤的研究】

発芽試験における温度設定は発根率、出葉率、発根と出葉の所要日数から判断して、キバナオウギは 15–20°C、ダイオウは 15–20°C、モッコウは 20–25°C、ホッカイトウキは 15–20°C、ヤマトウキは 15–20°C、オケラは 15–25°C、エビスグサは 20–30°C、ハトムギは 25–30°C、ハブソウは 20–30°C に設定するのが最適と考えられた。

保存種子の形質変異に関する実証試験では、2009 年保存種子を用いた 2010 年と 2011 年の栽培比較試験の結果、発芽、出穂、開花期、収穫期、草丈、茎数、分枝数、稔実率などに大きな変化が見られなかったため、種子はほとんど劣化していないと考えられる。

培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験について、センキュでは種イモ重と根茎重の間に強い相関が認められることから、試験区間の根茎重の差は



種イモの重量の差に起因すると考えられる。根茎増加率においては試験区間で有意差が認められなかったことから、本試験の範囲内では培養苗由来株と圃場苗由来株の間の生育量差は顕著でなかった。培養苗由来株では抽苔が促進され、ソロバン根が増加することが判明した。

ウコンおよびショウガでは、共に根茎の成長は旺盛で、直径15 cmの鉢では成長が抑えられたようであった。次年度、圃場で成長量の変化を調査する予定である。また、地上部および地下部根茎の形質には、両種共に一般株との差違はみられなかったが、圃場栽培において引き続き比較検討する予定である。

#### 【種苗の効率的増殖法に関する研究】

組織培養で得たホソバオケラおよびオケラ苗は、閉鎖温室での養液栽培では圃場栽培と同様の花芽形成が認められなかった。また、養液栽培では葉数の増加や草丈の増加がほとんど認められなかった。ホソバオケラおよびオケラの成長促進には低温処理が必要であることが報告されており、一定温度での栽培は、これらの植物の根茎を原料とする生薬の生産には適さず、低温処理等の特殊な処理が必須であると思われる。

コガネバナおよびショウガについて、これまでに培養植物体として継代維持してきた系統に加え、新たな入手材料からの組織培養系の確立を行い、これまでの系統よりもさらに増殖効率が高く、成長の良好なクローンが得られた。今回選抜したクローンの圃場栽培時および養液栽培時の形質調査が今後の課題である。

ゴシュユの3月挿し木は先端部、基部ともに高い発根率を示した。3月のゴシュユはまだ芽吹き前で、挿し穂は加温温室内で芽吹き、地上部の成長に伴い発根が誘発されたと思われる。カギカズラの9月挿し木の発根率は最高でも33.3%と低かった。今後3月挿しについて検討する必要がある。

ある。インドボダイジュの先端部の発根率は30%と低かったが、これまでに行った春から梅雨にかけての処理では全く発根しなかったため、大きな成果であった。今後、処理時期についてさらに検討する必要がある。

カノコソウの効率的増殖法について、根収量に及ぼす圃場への稲わら被覆処理及び黒マルチ処理の効果について検討を行ったところ、根収量は稲わら処理区で最も高く、カノコソウ栽培において稲わらの被覆処理は有効であることを確認した。夏の高温が根収量に大きく影響を及ぼしたと考えられた。

農薬の適正使用の検討では、現在、キバナオウギでは、種子消毒用殺菌剤としてベンレート水和剤は未登録であるが、本年度の研究からベンレート水和剤を用いたキバナオウギの種子消毒はその発芽および生育に影響を与えないことが示されたことから、一般農作物の栽培で用いられている種苗消毒法がキバナオウギでも適用できることが明らかとなった。

シソの栽培において殺菌剤のダコニールおよびベンレート水和剤を施用し、薬剤が生育に及ぼす影響と収穫後の各薬剤の残留値を評価した。ダコニールおよびベンレート水和剤の施用は、その適用方法に従い施用すればシソの生育に影響は与えないことを確認した。

#### E. 結論

薬用植物資源研究センターで育成したハトムギ品種‘北のはと’および‘はとろまん’の普及の促進と拡大を図るため、商業生産および試験栽培の現地調査を行い、普及状況並びに生育状況を調査し、栽培指導を行った。平成23年度北海道内における‘北のはと’の商業生産量は、作付面積が19.24 ha、規格品の収穫量が20,086 kg、規格品外と合わせた総生産量が22,388 kgであった。本年度は、北海道全域において降雨が続き低温であった

ため、各地域で‘北のはと’は不作であった。二海郡八雲町でタマナヤガの幼虫の食害によるハトムギの被害が発生し、減収となった。埼玉県秩父市で‘はとろまん’の試験栽培を行い、5,077m<sup>2</sup>の畑から合計 848.19 kg の乾燥果実を収穫した(170.0 kg/10 a)。

新品種の育成に関する基盤的研究では、当センターで育成した品種登録申請中のシャクヤク‘べにしずか’について、埼玉県で実証栽培が開始された。また、次期新品種候補 No.513 は、地上部の旺盛な生育量と高いさび病抵抗性により高収量を獲得していることが判明した。

第1次選抜したカンゾウ優良系統の栄養繁殖3年目株について再現性評価を行い、再選抜を実施した結果、親株、栄養系ともに根重と GL 含量が高かった No.10 と No.70 を選抜した。また、系統間の区別性を示すために有用な形質が明らかとなった。

ハトムギ種子島在来選抜系統は、耐乾性と耐寒性の両方を兼ね備えた適応範囲が広く、九州地域の環境に適した栽培特性を有しており、本地域において生産栽培可能な優良系統であると考えられる。

ナイモウオウギの種子への直接遺伝子導入法の各種条件について検討した結果、種子の硬実打破条件についてビーズ破碎装置等を用いることで簡便に硬実打破が可能な条件を見出した。エレクトロポレーションにより sGFP 遺伝子導入ベクターをナイモウオウギ種子へ導入したところ、ベクターコントロール導入系統と比較し、sGFP 遺伝子を導入した系統特異的に約6%の芽生えで顕著な緑色の蛍光を認め、ナイモウオウギ種子への遺伝子導入に成功した。さらに、これら芽生えより、ゲノムDNAを抽出し、PCRにより約4%の芽生えでゲノムDNAへのsGFP遺伝子の挿入を確認した。エレクトロポレーション後の芽生えは、ナスライト上に種子を置床することで、迅速に発根し、良

好な生育を示すことを見出した。

ウラルカンゾウの優良系統をモデルとして、グリチルリチン合成経路の鍵酵素のCYP88D6遺伝子のゲノムDNA配列に着目し、それらの多型情報をもとに系統間の識別を試みた。カンゾウ属植物の塩基配列情報および甘草市場品生薬試料についても同領域の配列情報を収集し、優良系統との配列の比較を行った結果、市場品試料の多くに優良系統に特徴的な配列と相同な配列が含まれることを明らかとし、また、クローニングした甘草市場品生薬の塩基配列のうち優良系統と相同な配列の出現頻度とグリチルリチン含量との間には高い相関性があることを見いだした。これらの結果から本配列が優良系統の選抜を可能とする遺伝子マーカーとして利用できることが示唆された。

ハトムギ‘北のはと’の品種識別を行う目的で、葉緑体DNAの部分配列3領域、リボソームDNAの部分配列1領域を決定して他の7系統の塩基配列と比較したところ、何れの領域でも品種を区別できる塩基の変異は認められなかった。

育成品種の成分的品質評価法の確立研究では、カンゾウ 9 成分の一斉定量は LCMS を用いて行うことが可能と考えられたが、今後はさらに抽出溶媒の検討が必要である。

種苗の保存に関する基盤的研究では、種子の発芽条件の規格化を図るため、キバナオウギ、ダイオウ、モッコウ、ホツカイトウキ、ヤマトトウキ、オケラ、エビスグサ、ハトムギ、トウゴマ、ハブソウについて 15、20、25、30℃の恒温条件、明期 12 時間、3 反復で発芽試験を行い、発芽率、出葉率および発根と出葉の所要日数を調査し、発芽試験における温度設定を明らかにした。

保存種子の形質変異に関する実証試験では、2009 年に保存を開始した種子島在来種ハトムギの種子は、貯蔵 2 年目をむ

かえても生育特性、外部形態特性、果実の収量性に大きな変化がなく、生産栽培可能な特性を十分に維持していると考えられる。

培養苗由来の再生植物体について、センキュウの培養苗と圃場苗についてポット試験により生育関連形質を比較した結果、根茎増加率においては有意差が認められなかったが、培養苗由来株では抽苔が促進され、ソロバン根の数が圃場苗由来株よりも有意に多くなることが判明した。培養苗由来のウコンおよびショウガの馴化2年目の根茎を温室内で鉢栽培した結果、栽培期間8ヶ月後の1株当たり根茎生重量は、植え付け時のそれぞれ14.1倍、20.5倍に増殖した。

種苗の効率的増殖法に関する研究では、薬用植物資源研究センター保有のホソバオケラ、オケラ、コガネバナ、ショウガ及び新たに導入したショウガを材料に、植物組織培養による効率的増殖法を確立し、人工環境制御下での生薬生産技術構築のための基盤を確立した。

挿し木増殖について、ゴシュユでは3月と9月に、カギカズラおよびインドボダイジュでは9月に挿し木処理を行った。ゴシュユの3月処理では先端部、基部ともに93.3%の高い発根率を示した。

カノコソウの効率的増殖法の検討を行い、根収量に及ぼす圃場への被覆材の効果は稲わら被覆処理が最も有効であることを確認した。

ベンレート水和剤による種子消毒がキバナオウギでも適用できることが明らかとなった。シソ栽培において、ダコニールおよびベンレート水和剤の施用は、その適用方法に従い施用すればシソの生育に影響は与えないことを確認し、各薬剤の残留値は、いずれも基準値よりも十分に低い値であった。

## F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすよ

うな情報はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kawano, N., Kiuchi, F., Kawahara, N., Yoshimatsu, K.: Genetic and Phenotypic Analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA Insertional Mutant with Altered Alkaloid Composition, *Pharmaceuticals*, **5**,133-154 (2012).
- 2) Inui, T., Kawano, N., Shitan, N., Yazaki, K., Kiuchi, F., Kawahara, N., Sato, F., Yoshimatsu, K.: Improvement of benzylisoquinoline alkaloid productivity by overexpression of 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase in transgenic *Coptis japonica* plants, in press (2012).
- 3) Yoshimatsu, K.: Innovative cultivation: Hydroponics of medicinal plants in the closed-type cultivation facilities, *Journal of Traditional Medicines*, **29**,30-34 (2012).
- 4) 林 茂樹、菱田敦之、熊谷健夫、佐藤正幸、青柳光敏、林 隆章、姉帯正樹、柴田敏郎：摘花作業が省力可能な低開花率の薬用シクヤク品種の育成、*生薬学雑誌*、65(2)、129-133(2011).
- 5) Kojoma, M., Hayashi, S., Shibata, T., Yamamoto, Y. and Sekizaki, H. : Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants cultivated under the same conditions, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1334-1337(2011).
- 6) Yoshimatsu, K. : Innovative cultivation: Hydroponics of medicinal plants in the closed-type cultivation facilities, *Journal of Traditional Medicines*, **28**, Supplement,44, The 28th Annual Meeting of Medicinal and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, August 27-28, Toyama, p.44, S2-3(2011).
- 7) Yoshimatsu, K., Kawano, N., Inui, T.: Efficient glycyrrhizin production by hydroponic cultivation of Chinese licorice, *BIOINDUSTRY*, **28**(12), 13-20 (2011).

8) 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の紹介，和漢薬，No.702(2011.11)，3-4(2011).

## 2. 学会発表

1) 乾 貴幸、河野徳昭、萩尾高志、吉松嘉代、柴田敏郎、川原信夫、飯田 修：ナイモウオウギへの遺伝子導入法の開発、日本薬学会第132年会（2012.3.28-31、札幌）。

2) 吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、川原信夫、松本敏一、岩本 嗣：漢方薬に使用される薬用植物の組織培養及び効率的増殖法に関する情報整備（1）。日本薬学会第132年会（2012.3.28-31、札幌）。

3) 熊谷健夫、渕野裕之、川原信夫：薬用植物の種子発芽に関する研究—メハジキ、アマ、アイ、ジギタリス、カワラケツメイ、ケイガイ、トロロアオイの種子発芽に及ぼす温度の影響、日本薬学会第132年会(2012.3.28-31、札幌)。

4) 若菜大悟、丸山卓郎、内山奈保子、合田幸弘、神谷 洋、川崎武志、山本 豊、林 茂樹、柴田敏郎：メタボローム解析によるシャクヤクの品質評価（第2報）、日本生薬学会第58回年会（2011.09.24-25、東京）。

5) 高上馬希重・林 茂樹・柴田敏郎・川原信夫、山本 豊：高品質甘草の開発研究：ウラルカンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis*)のグリチルリチン酸高含有系統におけるリクイリチン特性、日本生薬学会第58回年会（2011.09.24-25、東京）。

6) 乾 貴幸、河野徳昭、吉松嘉代、柴田敏郎、川原信夫、飯田 修：薬用植物優良品種育成を指向した遺伝子鑑別法の開発(2)、日本生薬学会第58回年会（2011.9.24-25、東京）。

7) 熊谷健夫、北澤 尚、渕野裕之、川原信夫：ハマボウフウの直播栽培の生育、収量に及ぼす栽植密度と施肥量の影響、

日本生薬学会第58回年会（2011.9.24-25、東京）。

8) 吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、千田浩隆、柴田敏郎、川原信夫：閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産に関する研究(2)ウラルカンゾウ優良株の作出と増殖。日本生薬学会第58回年会（2011.9.24-25、東京）。

9) 菱田敦之、林 茂樹、川原信夫、柴田敏郎：ハトムギ新品種「北のはと」の育成と道内普及 第22回北海道東洋医学シンポジウム（2011.9.3-4、札幌）。

10) 吉松嘉代：栽培技術の革新：閉鎖系栽培施設における薬用植物の養液栽培。第28回和漢医薬学会学術大会(2011.8.27、富山)。

11) 高上馬希重・林 茂樹・柴田敏郎・川原信夫、山本 豊：生薬「甘草(カンゾウ)」の原植物*Glycyrrhiza uralensis*におけるグリチルリチン高含有系統の選抜について、日本生薬学会北海道支部第35回例会（2011.05.21、札幌）。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1) 品種登録出願：[出願番号] 第24217号、[種類] *Paeonia lactiflora* Pall.、[品種名] ベにしずか、[出願日] H21.10.15.

2) 品種登録出願：[出願番号] 第24630号、[種類] *Coix ma-yuen* Roman.、[品種名] はとろまん、[出願日] H22.2.26

3) 特願2009-200179 [発明者] 林 茂樹、柴田敏郎、高上馬希重 [発明の名称] 新規ウラルカンゾウ及びその栽培用ストロン。

4) 特願2011-245757 [発明者] 吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、千田浩隆 特許出願人、識別番号(団体名及び弁理士事務所) 鹿島建設株式会社(000001373) 代理人：丹羽俊輔(100129300) 発明の名称 カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法 提出日 平成23年11月9日。