

表3 栄養繁殖3年目のカンゾウ各系統における特性分類調査結果 (その2)

分類	系統名 No.	栽培 年数	n	萌芽期	開花期	花色	開花株率 (%)	花序数	茎葉の毛 の多少	茎の色	葉の波打	小葉の形
高GL	5	3	8	5月25日			0	0.0	7	5	5	5
高GL	20	3	4	5月27日	7月17日	5	75	4.3	5	3	5	3
高GL	70	3	5	5月30日			0	0.0	5	7	3	5
高GL	75	3	4	6月6日			0	0.0	5	7	5	7
高収	10	3	6	5月25日	7月7日	5	67	1.3	5	5	5	5
高収	15	3	4	5月27日	7月10日	7	25	1.3	5	5	5	5
低GL	21	3	8	5月27日	7月10日	5	50	1.3	7	5	5	5
低GL	33	3	7	5月23日	7月10日	5	57	2.3	7	7	5	3
低GL	55	3	6	5月27日			0	0.0	5	3	5	3
低GL	59	3	6	5月23日	7月10日	5	17	0.5	5	5	5	5
低GL	84	3	2	6月6日	7月14日		50	3.5	3	3	5	5
比較	北大系	2	6	5月23日	7月1日	5	50	2.5	3	3	7	5
比較	北農試系	2	1				0	0.0				
比較	医療大系	2	6	5月23日	7月6日	5	50	0.7	3	3	7	5
比較	甘草屋敷系	2	3	5月30日			0	0.0	3	5	5	5
	調査日				開花日		8月15日	8月15日	8月15日	8月15日	8月15日	8月15日
	2年目株との相関係数(r)			0.304	0.820	0.919	0.767	0.017	0.261	0.714	0.742	0.866
	有意性			ns	*	*	**	ns	ns	*	**	***

萌芽期：50%の株の芽が地上に1cm以上出現した日。

開花期：花茎を持った株の中で開花始の株が50%。

花色：1淡い，5中間，9濃い。

開花株率：全株における開花株の割合。

全花序数：各株における花序の数。

茎葉の毛：1無，5中，密。

茎の色：1緑，5中間，9赤。

葉の波打：1無し，5中間，9大きい。

小葉の形：主茎上位から3-5葉の完全葉の形，1細，5中，9丸。

2年目株との相関係数：各系統における形質の再現性を評価するために，2010年に調査した栄養繁殖2年目株と2011年に調査した3年目株における同一項目間の相関係数を算出(比較系統を除く)。nsは有意性がないことを，*，**および***はそれぞれ5%，1%および0.1%水準で有意な相関があることを示す(開花期はn=6，花色はn=5，その他はn=11)。

平成23年度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（H22-創薬総合-指定-015）

分担研究報告書

分担研究課題：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—

研究分担者 杉村 康司（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部研究員
研究協力者 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部リーダー
研究協力者 香月 茂樹（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部客員研究員

要旨：本研究では、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った。その結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 本選抜系統は、3月の低温時でも十分に発芽し成長が比較的早いこと、さらに、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が明らかになった。
- 2) 本選抜系統は、一株当たりの稔実果実数が多く、不稔実果実数が少ない優良種であると考えられる。
- 3) 耐乾性と耐寒性の両方を兼ね備えた適応範囲が広い本選抜系統は、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。

A. 研究目的

現在日本国内で使用されているハトムギは、中国やタイなどからの輸入品に多くを依存している。その一方で、より安全性が高く品質が安定した国内生産が期待されている。しかし、ハトムギが栽培されている地域は、北海道、福島、栃木、富山、島根、岡山などに限られており、九州地域においてはあまり栽培されていない。

そこで、本研究では、種子島など九州地域で生産栽培可能な系統を検討するため、種子島在来種選別系統の栽培試験を行い、生育特性を明らかにした。

B. 研究方法

材料：種子島で2009年に採取した種子島在来

種選抜系統の種子を用いた。

栽培圃場と面積：種子島研究部第9圃場、18 m²。

栽培方法：畝幅60cm、株間20cmに統一し、2粒ずつ点播した。播種は、2010年3月17日と4月19日に行った。間引きは、草丈が10cm程度になった時に1本仕立てになるよう行った。

肥料：基肥として、10a当たり堆肥1000kg、苦土石灰100kg、窒素5kg、リン酸10kg、加里15kgを施肥した。追肥として出穂期に10a当たり窒素5kg、加里5kgを施肥した。

生育相調査：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、収穫日を記録した。

特性調査：3月播種は8月12日、4月播種は8

月30日に実施した。調査は、発芽率、草丈、最上位果の高さ、茎数、分枝数、稈数、稈径、主稈節数を調査した。さらに、果実に関する特性として稈実率、稈実果実数、不稈実果実数、穂発芽数、稈実果実の乾燥重量、果実と種子の100粒重と100ml容積重について調査した。

C. 研究結果

1) 栽培概要（生育相）を表 1に示す。3月播種は、4月3日に発芽開始、5月30日に出穂開始、6月10日に開花開始、8月12日に収穫を行った。4月播種は、4月30日に発芽開始、6月18日に出穂開始、6月30日に開花開始、8月30日に収穫を行った。このように、3月播種に比べて、4月播種の方が播種日から収穫日までの生育期間がやや短かった。また、3月播種、4月播種共に、順調に開花・結実し、病害虫の発生もほとんど見られず、生育状況は良好であった。

2) 栽培特性を表 2に示す。発芽率は、播種時期（3月、4月）の違いに関わらず78%以上と高かった。3月播種と4月播種の栽培特性を見ると、3月播種の茎数が9.0本とやや多いものの、草丈、最上位果高さ、分枝数、主稈節数、稈径については播種時期による大きな違いは見られなかった。3月播種と4月播種の2011年8月の生育状況とその後収穫した果実と種子の写真を示す（図1）。

3) 果実に関する特性を表3に示す。3月播種は4月播種に比べて、稈実率が高く、稈実果実数が多く、稈実果実乾燥重量、果実と種子の100粒重、100ml容積重が重かった。さらに、3月播種の不稈実果実数、穂発芽数を見ると、4月播種に比べて少ない傾向が見られた。

D. 考察

1) 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、一株当たりの稈実果実数が多く、不稈実果実数が少ないことから、耐寒性に優れた種であると考えられる。

2) 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種子島在来種選抜系統は、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。

3) 果実の収量を増加させるため、追肥の条件などを工夫し改良する必要があると考えられる。

E. 結論

耐乾性と耐寒性の両方を兼ね備えた適応範囲が広い本選抜系統は、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 種子島在来種選抜系統ハトムギの生育概要(2011年)

系統名	播種日	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	収穫日
種子島在来種 選抜系統 3月播種	3/17	4/3	4/14	5/30	6/4	6/10	6/19	8/12
種子島在来種 選抜系統 4月播種	4/19	4/30	5/9	6/18	6/25	6/30	7/5	8/30

表2 種子島在来種選抜系統ハトムギの生育特性(2011年)

系統名	発芽率 (%)	草丈* (cm)	最上位果 高さ* (cm)	茎数*	分枝数*	主稈 節数*	稈径* (mm)
種子島在来種 選別系統 3月播種	78.0	129.0 ±5.0	123.8 ±5.4	9.0 ±2.2	3.9 ±0.8	6.7 ±0.9	9.4 ±0.7
種子島在来種 選抜系統 4月播種	80.0	124.7 ±6.9	121.0 ±5.5	5.4 ±0.8	5.4 ±0.6	7.4 ±0.8	8.6 ±0.6

*: 平均値±標準偏差, n=20

表3 種子島在来種選抜系統ハトムギの果実に関する特性(2011年)

系統名	稔実率* (%)	稔実 果実数*	不稔実 果実数*	穂発 芽数*	稔実果 実乾燥 重量 *(g)	100粒重* (g)		100ml容積重* (g)	
						果実	種子	果実	種子
種子島在来種 選抜系統 3月播種	90.8 ±2.3	399.7 ±92.9	39.4 ±10.8	0.3 ±0.6	42.7 ±10.2	11.0 ±0.7	7.0 ±0.4	48.0 ±0.2	73.9 ±0.3
種子島在来種 選抜系統 4月播種	79.1 ±10.1	301.7 ±100.0	50.9 ±24.1	2.1 ±2.0	30.9 ±9.9	10.3 ±1.1	6.7 ±0.8	44.2 ±0.1	71.0 ±0.1

*: 平均値±標準偏差, n=20

稔実率, 稔実果実数, 不稔実果実数, 穂発芽数, 稔実果実乾燥重量は, 1株当たりの値

平成23年度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（H22-創薬総合-指定-015）

分担研究報告書

分担研究課題：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

研究分担者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部
主任研究員 河野 徳昭

研究協力者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部
特任研究員 乾 貴幸

要旨 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、生薬オウギの基原植物であ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、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詳細に検討した。また、種子への遺伝子導入の結果、約6%の芽生えにおいて顕著な sGFP 蛍光を認め、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。以上の結果は、本手法がナイモウオウギへの遺伝子導入に適用可能であることを示唆するものである。

A. 研究目的

遺伝子導入技術は、遺伝子の機能解析、及び、得られた有用遺伝子を用いた植物の機能改変において欠くことのできない技術である。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方法等が知られるが、薬用植物は、一般に形質転換が困難なことが多い。特に、未分化組織からの再分化段階が障壁となるケースが多く、そのステップを経ない高効率で簡便な新たな遺伝子導入法の開発が期待されている。そこで本研究では、(独) 農業生物資源研究所 萩尾高志博士のグループが開発した再分化過程を経ない、種子への遺伝子導入法等を利用し、従来法では

形質転換植物の作成が困難であった薬用植物への迅速かつ高効率な新規遺伝子導入法の開発を行う。種子への直接遺伝子導入による形質転換法は、従来法では外来遺伝子の導入・形質転換が困難であった薬用植物へ効率的に遺伝子導入ができる画期的手法として、種々の薬用植物への応用の可能性を有する。

本年度は、従来法による形質転換が困難であり、サポニン類、フラボノイド類を含み、強壮、利尿、血圧降下作用等が知られている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

に、ナイモウオウギ種子へのsGFP遺伝子の導入を試みた。

B. 研究方法

1) 硬実打破条件の検討

昨年度までの結果(文献1)から、精米機を用いた硬実打破処理条件(家庭用精米機マジックミル(サカタ)で6分精米、容量5合、2回処理)が強すぎた可能性が考えられたので、硬実打破条件について再検討を行った。サンドペーパー、乳鉢・乳棒、ビーズ破碎装置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6cm培養シャーレに満たしたエレクトロポレーション(EP)buffer*に浸して催芽を行った。以後、種子は滅菌水等で毎日洗浄し、その後の種子の吸水・発芽過程を観察した。

*EP buffer 組成

滅菌水	940 μ L
plasmid DNA 溶液	200 μ L [#]
1%PVP	500 μ L
Silwet L-77	0.5 μ L
0.1 M スペルミジン	100 μ L
0.1 g/ml セルラーゼ	100 μ L
2.5 M CaCl ₂	160 μ L
合計	2 mL

[#]条件検討等、実際に遺伝子導入を行わない際には、plasmid 溶液の代わりに同量の滅菌水を使用。

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

[プラスミド DNA 調製] カナマイシンを含む250 mLのLB培地で37°C、一晚培養した大腸菌より、Pure Yield Plasmid Maxiprep System (Promega) を用いて、プラスミドDNA (pWI-sGFP: 緑色蛍光遺伝子導入ベクター、pWI-MCS: ベクターコントロール) を抽出し、エタノール沈殿後、プラスミドDNA濃度が1 μ g/ μ LになるようにDNase Free水で希釈した。

[硬実打破] サンドペーパー(#40)上で力を入れずに表裏を変えて1回ずつナイモウオウギ種子1粒を約2cm押し引いた。もしくは、ナイモウオウギ種子20粒、ビーナスライトの粉末300mg、滅菌MilliQ水500 μ L、及び、ステンレスビーズ2個を2mL容のアシストチューブ(非自立)にとり、MS-100(トミー精工)で2,000rpm、150秒間の処理を2回行った。

↓

[催芽処理] EP buffer 2 mL (/6cm 培養シャーレ) 中に硬実打破した種子約50粒を入れ、20°C、暗所で18時間静置した。

↓

[減圧処理] 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。

↓

[EP 処理] 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、下記条件でEP装置(CUY21, NEPA GENE)によりパルスを加えた。さらに、氷上で2分間静置した後、電極を逆にして再度同条件でパルスを加えた。

*EP 処理条件

Voltage: 50 V/cm

Pulse: 50 ms square pulse

Interval: 75 ms

Number of pulse: 50

↓

EP処理した種子を使用したbufferとともに培養シャーレに戻し、氷上で冷却しながら1時間養生した。

↓

[種子洗浄] 有効塩素濃度0.2%に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液/1% (g/v) ベンレート(3:2)で15分間処理後、滅菌水で3回洗浄した。

↓

有効塩素濃度0.01%に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液/1% ベンレート(3:2)混液5 mL (/6cm 培養シャーレ)で20°C、暗所で

一晚静置した。

↓

有効塩素濃度 0.2%に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液/1% ベンレート (3:2)で5分間洗浄後、滅菌水で3回洗浄した。

↓

[種子育成] 有効塩素濃度 0.01%に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液/1% ベンレート/滅菌水 (3:2:5) 混液 2 mLで湿らせたろ紙上に種子を静置し、20°C、暗所で育成した。

↓

以後、毎日、滅菌水で種子を洗浄後、有効塩素濃度 0.01%に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液/1%ベンレート/滅菌水 (3:2:5) 混液で湿らせたろ紙上に種子を静置した。

[芽生えの蛍光観察] 上記条件で種子及び芽生えを育成し、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。

[ゲノム DNA 調製] 芽生えをサンプリングし、ビーズ破碎装置 MS-100 で破碎後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてゲノム DNA を抽出した。

[PCR による導入遺伝子の検出] 上記ゲノム DNA を鋳型に、下記プライマー及び条件にて 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。

PCR 反応液組成 : GoTaq Green Master Mix (Promega) 5 μ L、ddH₂O 2 μ L、プライマー(Fw, Rv)各 1 μ L、ゲノム DNA 溶液 1 μ L。

PCR 条件 : 94°C 2 min \rightarrow (94°C 30 sec. \rightarrow 60°C 30 sec. \rightarrow 72°C 30 sec) x 30 cycle \rightarrow 72°C 5 min \rightarrow 4°C ∞

プライマー配列は下記のとおり。

(Fw primer) sGFPFw182: 5'-tgc tga cca cct tca cct ac-3'

または 35Sp Fw: 5'-tga cgc aca atc cca cta tcc-3'

(Rv primer) sGFPRv496: 5'-agt tca cct tga tgc

cgt tc-3'

3) エレクトロポレーション後の種子の育成条件の検討

上記 2) に示す方法に従い 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 (ただし、EP 処理翌日以降、種子は滅菌水で湿らせたろ紙上に静置した)、底面吸水により MilliQ 水で湿らせたビーナスライト 5 号 (長野県諏訪地区和田峠付近埋蔵の黒曜石を約 1,000°C で焼成発泡した無機質超軽量礫状骨材) 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。

ビーナスライト 5 号上で生育が良好な芽生えは、あらかじめ吸水させてからオートクレーブしたジフィーセブン種まき土ポット (直径 30 mm、サカタのタネ) へ移植した。ポットの中心部にあけた穴の中にビーナスライトより取り出した芽生えを乗せ、土をかぶせた後、ポットをアラシシステム(BMS)の給水用バット上に並べ、グロースチャンバー内で、自動灌水装置で1日1回10分間給水し、明期14時間・暗期10時間、温度:20°C、相対湿度:60%の条件で育成した。なお、ジフィーポット植出し後1週間程度は、プラスチックカバーをかぶせることにより湿度を高く保ち馴化を行った。

C. 研究結果

1) 硬実打破条件の検討

1-1. サンドペーパー処理

ナイモウオウギの種子約10粒ずつをサンドペーパー (#40) で挟んで 5、10、20、30 往復、あるいは、種子1粒をサンドペーパー (#40) に押し当て約2cm引く等の処理を行い、その後の種子の吸水・生存・発根・子葉展開について観察した。その結果、20往復以上では処理直後に種皮内部の胚が損傷している種子が観察された (図1)。また、5往復以上では、吸水処理後2時間までに90%以上の種子が速やかに吸水した。しかし、処理後10

日目には、処理によるダメージのため、カビやバクテリアの発生や子葉・幼根の損傷等が増加し、生存種子が20%程度に減少した。その結果、処理10日後における発根・子葉展開種子率は未処理種子と同程度であった(表1、図2)。一方、サンドペーパーに種子を押し当てながら1回引く処理では、吸水処理後2時間における吸水種子率は50%程度であるが、一日後には、約90%と十分な種子が吸水した。また、10日目における生存種子率も約90%と高く、80%以上の芽生えで子葉展開が認められ、良好な生育を示した(表1、図2)。そこで、次項2)のエレクトロポレーションでは、この条件をもとに、サンドペーパー(#40)上で表裏を変えて1回ずつ力を入れずに種子を約2 cm押し引くことで硬実打破を行った。しかしながら、サンドペーパー処理による方法は手間がかかるため多量の硬実打破種子を調製するには不向きであることから、より簡便な硬実打破法の確立のため、処理条件のさらなる検討を行った。

1-2. 乳鉢・乳棒処理

乳鉢・乳棒で力をかけ過ぎないように注意しながら、約20粒の種子を3分間処理したところ、8時間後の吸水種子率は35%に上昇した(表2・図3の1)。また、処理の際、サンドペーパーの砂を5 mg添加することで吸水種子率は76%に上昇した(表2・図3の2)。また、ビーナスライトの粉末を添加することでも、吸水種子率が55%に上昇した(表2・図3の4)。さらに、その両方を加えることで、90%以上の種子が吸水したが、種皮及び種子の内部の胚へ強いダメージを受けた種子が認められた(表2・図3の3, 7)。一方、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(表2・図3の5, 6)。

1-3. ビーズ破碎装置による処理

アシストチューブ(非自立)内に、表3に示す組成で、MilliQ水、ビーナスライトの粉末、ステンレスビーズ、及び、種子約20粒を

加え、MS-100を用いて2,000 rpmで2 or 5 or 10分間処理し、16~18時間後の吸水種子率を観察した。その結果、ステンレスビーズを入れない場合は、吸水種子率は大きく低下し、ステンレスビーズが必須であることが明らかとなった。また、本条件下では、ステンレスビーズ及びビーズ破碎装置により、種子が完全に破壊されることはなかった(表3の1と3, 2と8の比較)。次に、ビーナスライトの粉末量について検討した結果、300 mg以上では、ビーナスライトの粉末量を増やすと吸水種子率は低下した(表3の3と5と6, 8と7の比較)。また、水の有無について検討した結果、ビーナスライトの粉末量が多いときは、滅菌MilliQ水を加えることによる顕著な吸水種子率及び内部胚への影響は認められなかったが(表3の6と7の比較)、ビーナスライトの粉末量が少ない時は、水を加えることで吸水種子率は高まるが、種子内部へのダメージも増加した(表3の3と8の比較)。そこで、種子へのダメージを低減するため、処理時間を短くしたところ吸水種子率は大きく低下した(表3の9)。逆に、吸水効率を高めるため吸水種子率が低い条件で処理時間を2倍に長くしたところ、吸水率が大きく改善し、種子へのダメージも少なかった(表3の4)。また、MS-100処理を2回に分け、種子への力の偏りを極力低減するため、2回のMS-100処理の間に内容物をよく混ぜることで、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(表3の10)。

2) 種子のエレクトロポレーションによる遺伝子導入

サンドペーパーで表裏1回ずつ傷をつけたナイモウオウギ種子を用いて、18時間の催芽及び2.5時間の減圧・浸透処理を行った後、エレクトロポレーションにより、sGFP遺伝子導入ベクター(pWI-sGFP: 137粒処理)及びそのコントロールベクター(pWI-MCS: 44粒処理)を種子へ導入した。その際の、抵抗、電流、電圧値は、表4に示す通りであった。EP処理後の種子は、氷上で冷却しながらEP buffer中で1時間養生した後、希釈した

次亜塩素酸ナトリウム溶液とベンレートの混液で湿らせたろ紙上に静置し、毎日洗浄を繰り返しながら、20°C、暗所で育成した。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%; 表5, 図4)。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%; 図5)。しかし、sGFP Fw 182/ sGFP Rv 496 (増幅サイズ: 約300 bp) と 35Sp Fw/sGFP Rv 496 (増幅サイズ: 約600 bp) の2組のプライマーセットを用いたPCRのうち、sGFP Fw 182/ sGFP Rv496 のプライマーセットでしか増幅しないクローンも認められた(図5)。

3) エレクトロポレーション処理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。ろ紙上の種子は、催芽3日目(EP処理後2日目)から発根が開始したが、6日目の時点でも30~40%程度しか発根しておらず(表6の1, 3)、発根した根の生育も遅かった(図6中央)。一方で、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(図6左)、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(表6の2, 4)。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(図6右)。

D. 考察

1) 硬実打破条件の検討

硬実打破処理条件について検討し、良好な吸水種子率とその後の生育を達成可能な条件を複数見出した。このうち、作業の効率性、再現性等を踏まえ、今後の実験では、下記の

条件で硬実打破処理を行うこととした。

「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 μ L、及び、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るべく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」

2) 種子のエレクトロポレーションによる遺伝子導入

サンドペーパーで表裏 1 回ずつ傷をつけた種子に対して催芽処理を行い、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。また、EP 処理後 8 日目のサンプルから、ゲノム DNA を抽出し、2 組のプライマーセットで PCR を行ったところ、sGFP 遺伝子導入系統特異的に陽性のクローンを約 4%検出し、少なくとも、EP 処理後 8 日目時点では、導入遺伝子がゲノムに挿入されているものと考えられた。しかしながら、必ずしも蛍光観察と PCR の結果が一致しない芽生えが認められたこと、また、プライマーセットによっては、増幅が認められないクローンも存在したことから、導入遺伝子が不安定な形で植物ゲノム内へ挿入されていることが疑われ、今後、成長した植物体における導入遺伝子の安定性についての解析やゲノムサザンによる解析等が必要であると考えられた。

3) エレクトロポレーション処理後の種子の育成条件の検討

本実験過程で、EP 処理後の種子は、シャーレ内のろ紙上でカビやバクテリア等の発生が多く、未処理種子に比べて生存率が極めて低かったため、生育条件の検討を行った。その結果、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、今後の実験では、EP処理後の種子は、ビーナスライト上で育成することとした。また、ジフィーポットへの植出し時期に関して、本葉が伸びる前では個体が小さすぎることからストレスが大きく、また、本葉が展開した後では根がすでに成長しているため、ビーナスライトから取り出す際やジフィーポットへの植出し時に根を傷つけやすく、いずれも活着率が低下した。したがって、本葉が伸び始めてから、本葉が展開する直前の状態が植出し時期として最適であると考えられた。

E. 結論

従来法による形質転換が困難であり、サポニン類、フラボノイド類を含み、強壮、利尿、血圧降下作用等が知られているマメ科のナイモウオウギを材料に、種子への直接遺伝子導入法の各種条件について詳細に検討した。

まず、種子の硬実打破条件について検討し、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。

また、エレクトロポレーション後の種子は、処理によるダメージから生育が悪く、枯死しやすいことが明らかとなったため、エレクトロポレーション後の芽生えの生育条件について種々検討し、ビーナスライト上に種子を置床することで、シャーレ内のろ紙上で管理するのに比べ、迅速に発根し、良好な生育を示す条件を見出すことに成功した。

参考文献

(文献 1) 研究代表者 柴田 敏郎, 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」(H22-創薬総合-指定-015), 平成 22 年度総括・分担研究報告書, pp. 31-35, 平成 23 年 3 月

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 硬実打破処理条件の検討① (サンドペーパー処理)

催芽処理後の 経過時間	2 h								1 d							
	生存	率	吸水	率	発根	率	子葉展 開	率	生存	率	吸水	率	発根	率	子葉展 開	率
サンドペー パー処理条件																
30往復	38	100	38	95	0	0	0	0	36	95	36	90	0	0	0	0
20往復	50	100	50	100	0	0	0	0	50	100	50	100	0	0	0	0
10往復	50	100	49	98	0	0	0	0	50	100	50	100	0	0	0	0
5往復	50	100	46	92	0	0	0	0	50	100	47	94	0	0	0	0
5往復以上平均	47	100	46	96	0	0	0	0	47	99	46	96	0	0	0	0
未処理	50	100	1	2	0	0	0	0	50	100	1	2	0	0	0	0
1回	13	100	8	62	0	0	0	0	13	100	12	92	0	0	0	0
1回	27	100	19	48	0	0	0	0	27	100	23	85	0	0	0	0
1回平均	20	100	14	55	0	0	0	0	20	100	18	89	0	0	0	0

催芽処理後の 経過時間	3 d								10 d							
	生存	率	吸水	率	発根	率	子葉展 開	率	生存	率	吸水	率	発根	率	子葉展 開	率
サンドペー パー処理条件																
30往復	36	95	36	90	2	5	0	0	5	13	5	13	3	8	2	5
20往復	50	100	50	100	4	8	0	0	10	20	10	20	8	16	5	10
10往復	50	100	49	98	1	2	0	0	12	24	12	24	6	12	2	4
5往復	50	100	46	92	5	10	0	0	15	30	14	28	11	22	7	14
5往復以上平均	47	99	45	95	3	6	0	0	11	22	10	21	7	15	4	8
未処理	50	100	2	4	1	2	0	0	50	100	14	28	12	24	11	22
1回	13	100	12	92	10	77	0	0	12	92	11	85	11	85	11	85
1回	27	100	23	85	19	70	5	19	23	85	23	85	23	85	21	78
1回平均	20	100	18	89	15	74	3	10	18	89	17	85	17	85	16	82

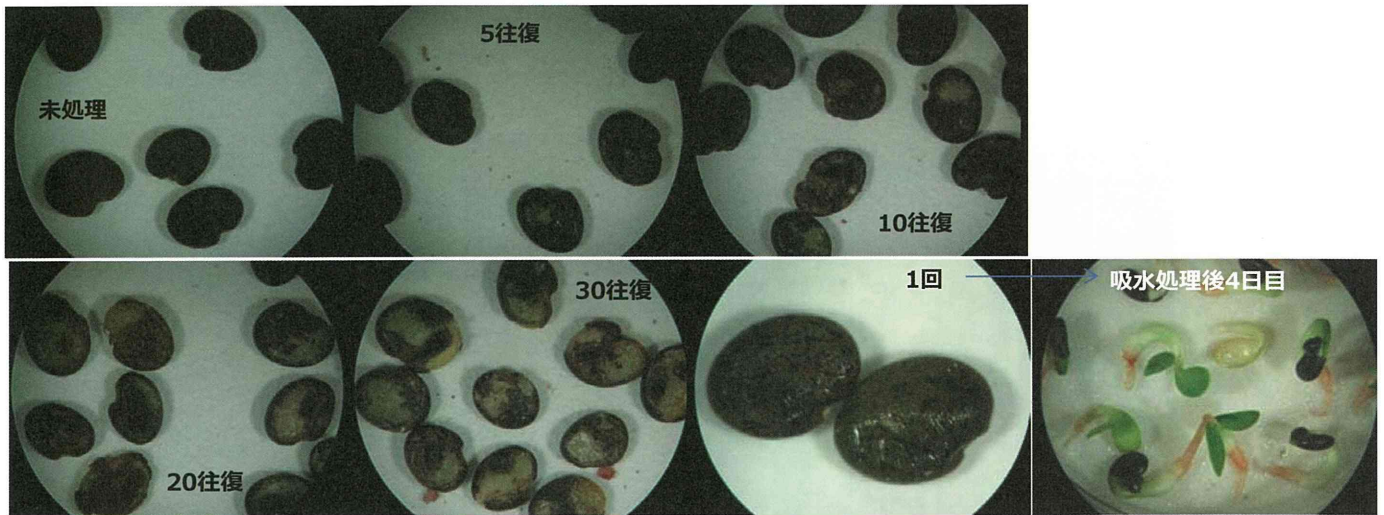


図1 サンドペーパー処理後の種子の比較

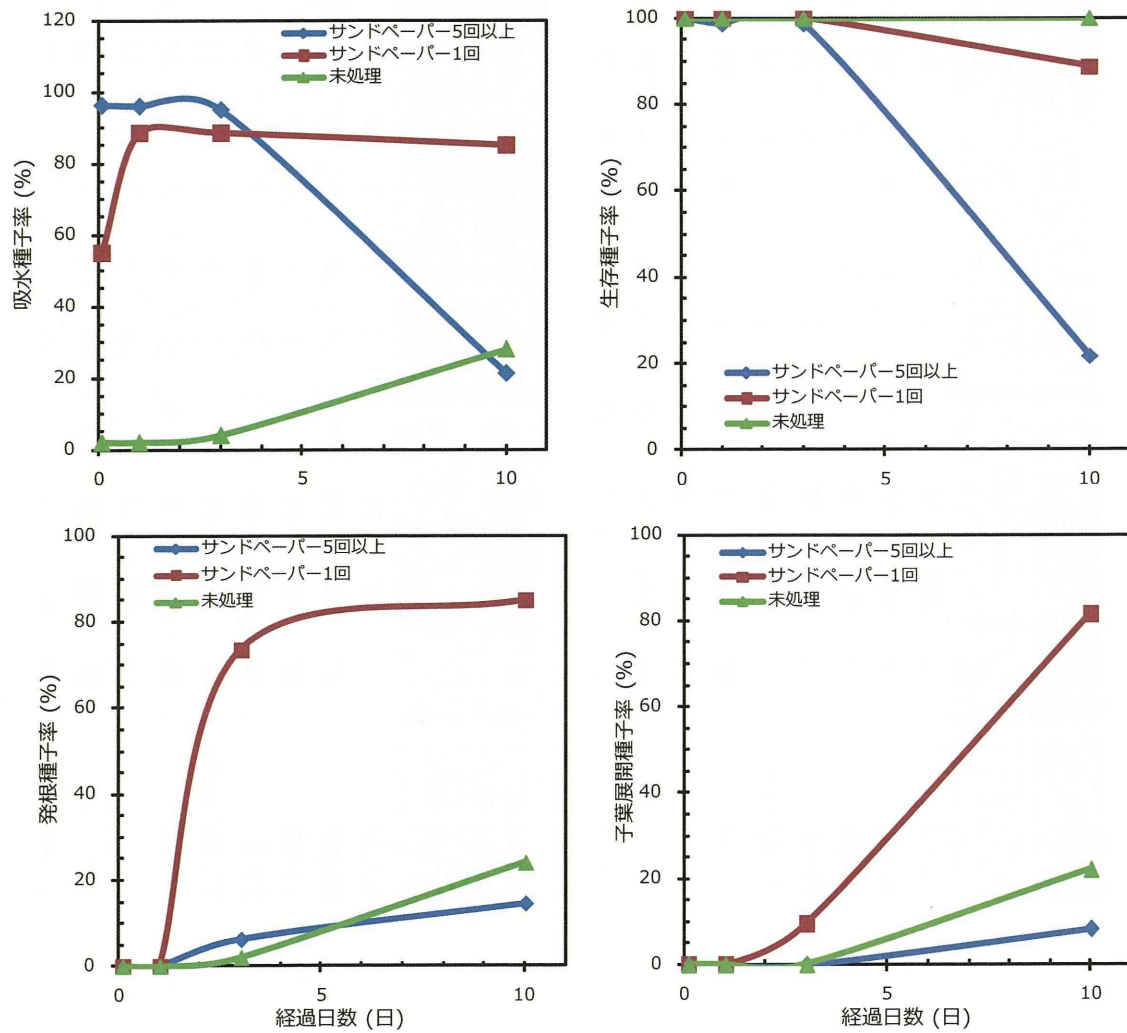


図2 サンドペーパー処理条件の違いによる吸水/生存/発根/子葉展開種子率の比較

表2 乳鉢・乳棒で種子約20粒を3分間処理した際の8時間後の吸水種子率を比較

	1	2	3	4	5	6	7
venuslite 粉末 [g]	0	0	1	1	1	1	1
Sand paper 砂 [mg]	0	5	5	0	0	0	5
MilliQ 水 [mL]	0	0	0	0	1	1	1
吸水種子 (個)	7	16	18	11	16	17	20
未吸水種子 (個)	11	3	1	6	4	3	0
内部胚損傷種子(個)	2	2	1	3	0	0	0
吸水種子率 (%)	35	76	90	55	80	85	100

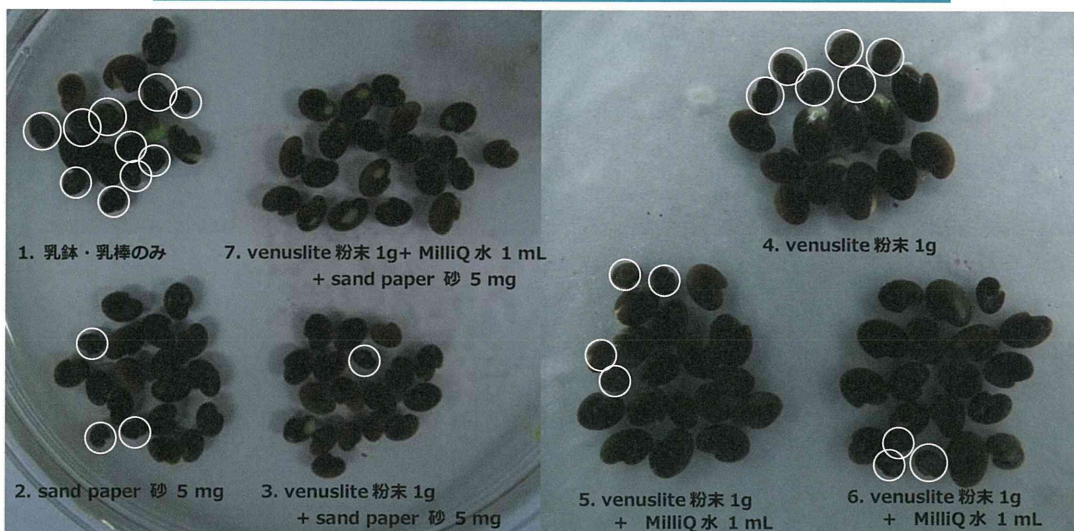


図3 乳鉢乳棒を用いて種々の条件で処理した種子の8時間後における吸水状態の比較
○は未吸水種子

表3 ビーズ破碎装置で処理した際の吸水種子率

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
venuslite 粉末 [g]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.6	1.2	1.2	0.3	0.3	0.3
ステンレス ビーズ [個]	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2
MilliQ 水 [mL]	0	0.5	0	0	0	0	1	0.5	0.5	0.5
MS100 処理 時間 [min]	5	5	5	10	5	5	5	5	2	2.5x2
吸水種子 (個)	5	6	13	20	4	5	5	18	7	17
未吸水種子 (個)	15	14	7	0	16	15	15	0	12	3
損傷種子 (個)	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
吸水種子率 (%)	25	30	65	100	20	25	25	90	35	85

表 4 EP 処理時の抵抗・電流・電圧値

	MCS1		sGFP1		sGFP2		sGFP3	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Ω	41.0	40.9	40.9	41.0	41.0	41.1	41.1	41.0
A	1.68	1.66	1.48	1.44	1.45	1.59	1.45	1.43
V	51	51	51	51	51	51	51	51

表 5 EP 処理 5 日後の種子の観察

	催芽	吸水	%	発根	%	子葉展開	%	傷害	sGFP 蛍光	%
MCS1	50	44	88	31	70	5	11	1	0	0
sGFP1	50	48	96	35	73	3	6	7	4	8
sGFP2	50	42	84	28	67	3	7	5	0	0
sGFP3	50	47	94	32	68	6	13	9	4	9
GFP 平均	50	46	91	32	69	4	9	7	3	6

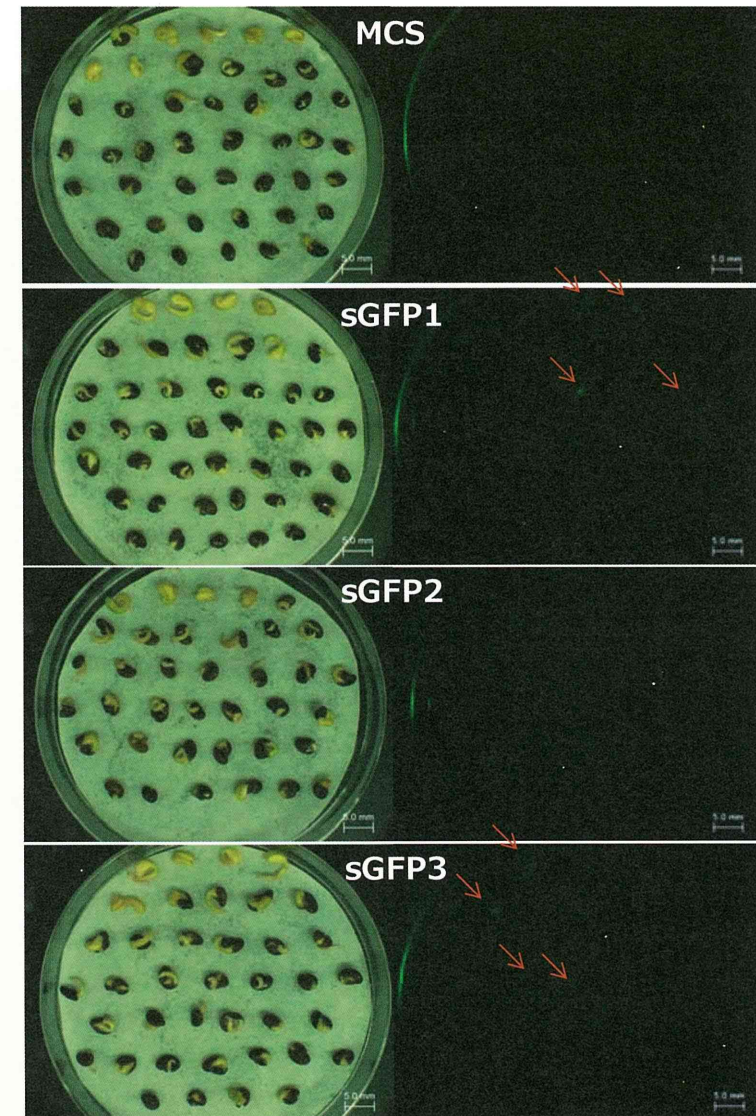


図 4 EP 処理 5 日後における形質転換種子芽生えの sGFP 蛍光観察
 矢印は、顕著な緑色蛍光を示したクローンを示す
 (露光時間 2 sec)

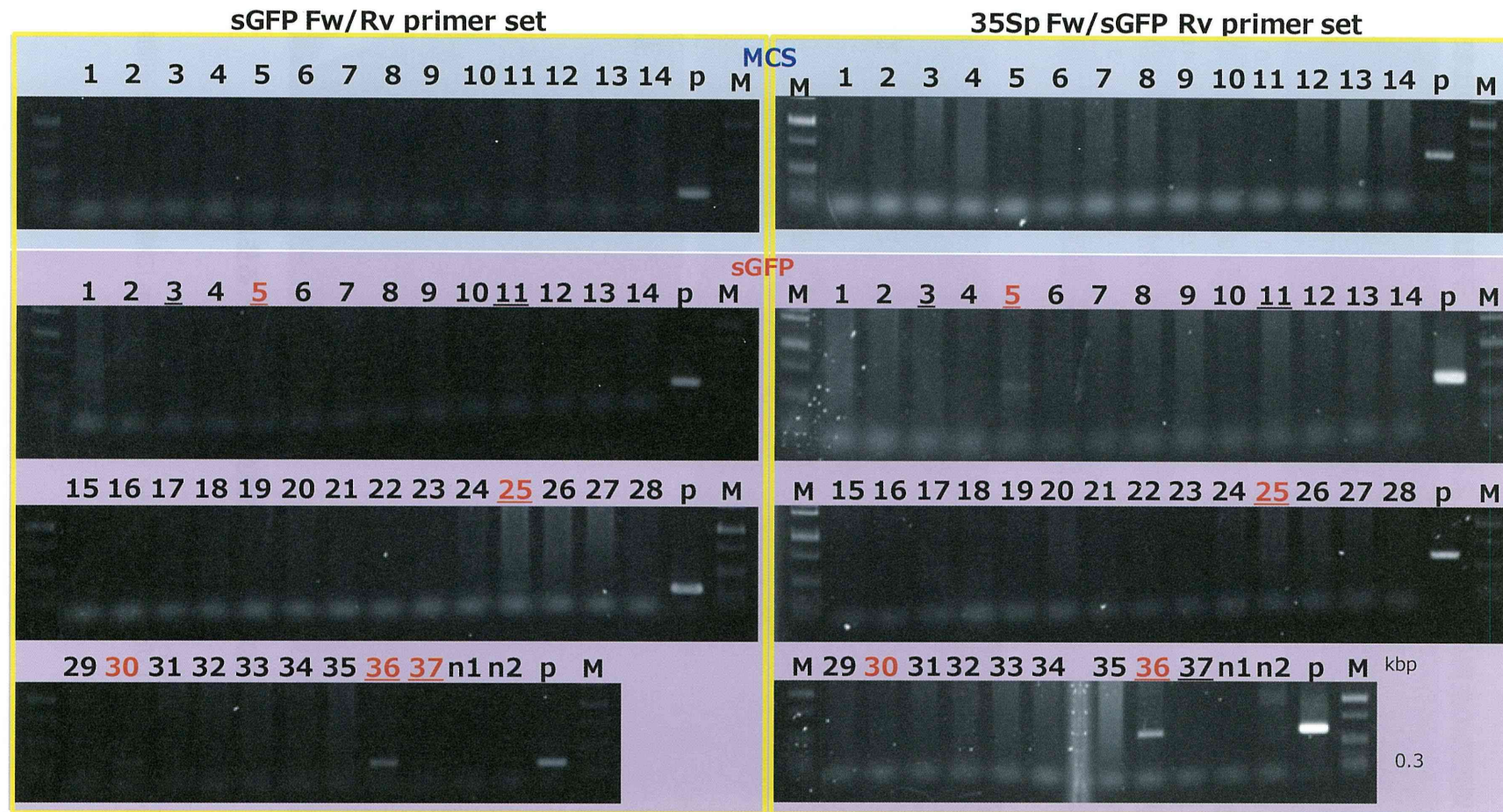


図5 EP処理8日後における形質転換ナイモウオウギ芽生えのゲノムDNAを鋳型とするPCRによる遺伝子導入の確認

下線：顕著なsGFP蛍光が観察されたクローン、赤字：PCRで陽性のクローン
 n1, n2: 非形質転換体 (wild type), p: ポジティブコントロール (プラスミド)
 M: DNAサイズマーカー (λ /PstI), 矢印は、目的バンドの位置を示す。

平成23年度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（H22-創薬総合-指定-015）

分担研究報告書

分担研究課題：遺伝子マーカーの解明による品種識別技術の確立

研究分担者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部
主任研究員 河野 徳昭

研究協力者 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部
特任研究員 乾 貴幸

要旨 優良形質を有する薬用植物新品種開発において、作出した優良系統の知的財産権の保護は今後重要な課題となると考えられる。これらの優良系統は主に有用物質の高生産能や環境耐性等を示すと期待され、それらを他の一般系統と客観的かつ迅速に区別するためには遺伝子レベルでの識別法の確立が望ましい。本研究では、資源の枯渇が危惧される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。その結果、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。以上の結果は、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の利用できることを示唆するものである。

A. 研究目的

カンゾウ属植物（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.及び*G. glabra* L.）の根部の乾燥物は、生薬甘草として、その緩和作用・止渴作用から、多数の漢方薬に配合されている。また、カンゾウの主成分であるグリチルリチンは、抗炎症作用等を有し、さらに強い甘みを有することから、医薬品、化粧品、甘味料などとして幅広く用いられている。カンゾウの生産は、海外からの輸入、特に野生植物の採取に強く依存しているが、乱獲による環境破壊や資源の枯渇が問題となっ

ている。そのため、カンゾウ属植物を安定供給するための栽培・増殖方法の確立が望まれており、栽培法の研究や効率的に増殖可能かつ短期間の栽培で高グリチルリチン含量を示すウラルカンゾウ優良系統の選抜などが精力的に行われている。これらの研究において新たに作出された優良系統を知的財産権の観点から保護するためには、新規優良系統と既存系統の識別法の開発が重要な課題であると考えられる。そこで、本研究では、優良系統の識別・保護のため、（独）医薬基盤研究所 筑波研究部で見出さ

れた養液栽培に適し、高グリチルリチン含有量を示す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酵素遺伝子を用いた迅速かつ簡便なカンゾウ系統の遺伝子識別法の開発を目的とした。

本研究においては、カンゾウ属植物の遺伝子判別法として、植物をはじめとする生物全般に普遍的に存在する遺伝子、たとえば、核リボソームDNAのITS領域、葉緑体DNAの *trnK* 遺伝子、*matK* 遺伝子、*rbcL* 遺伝子の塩基配列の変異(多型)を進化遺伝学的に解析し、分類するという手法ではなく、有用物質生産に関わる二次代謝酵素遺伝子群のうち、とくに鍵酵素と予想される反応段階に関わる酵素遺伝子について、塩基配列の種間、系統間変異のデータを集積し、それらの多型情報による植物種、系統、さらには個体間の識別が可能か否かを検討する点を特徴とし、本研究過程で蓄積された生合成酵素遺伝子の多型情報は、有用物質の生産性と直接リンクした有用物質高生産株の育種マーカーとしての利用の可能性も期待される。

B. 研究方法

二次代謝酵素遺伝子ゲノムDNA塩基配列の多型情報を使用するカンゾウ属植物の遺伝子識別

本研究で着目したのは、カンゾウ属植物の生産する二次代謝物グリチルリチンの生合成経路(図1)上で機能すると考えられる2種の酵素遺伝子、スクアレン合成酵素(SQS)及び、 β -amyrin 11位酸化酵素(CYP88D6)であり、これらの酵素遺伝子について、植物種間や個体間で変異が多く蓄積されると期待されるゲノムDNAのイントロン領域を中心に多型情報を収集・解析することにより、優良系統の識別が可能か検討した。

昨年度の本研究の成果により、上記両遺伝子の多型情報を用い、ウラルカンゾウ優良系統間のPCR法(SQS)またはPCR-RFLP法(CYP88D6)による遺伝子識別が可能なが示された(文献1)。本年度は、前年度までにカンゾウ属植物及び系統の識別に有用

な多型に富むことが示されたCYP88D6相同遺伝子のイントロン7領域について、カンゾウ属植物各種試料(検体)における多型情報の解析・収集を進めるとともに、それらのグリチルリチン酸含有量との関係について検討を行った。

なお、本年度は、より簡便にCYP88D6遺伝子のイントロン7領域の塩基配列の変異情報を蓄積するため、イントロン7全長の配列解析に加え、イントロン7配列のうち、識別に有用な部位を含み、かつ、カンゾウ属植物間で保存性の高い部分に増幅プライマーを設計し、PCR-ダイレクトシーケンスもしくは、クローニング後のコロニーPCRダイレクトシーケンスによる配列解析を行った。

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、及び、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、下記に示すプライマーセット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により下記条件にて増幅し、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 α -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。

・イントロン 7 PCR 条件

PCR 反応液組成: KOD-plus (Toyobo) 0.25 μ L、ddH₂O 17.25 μ L、10 x KOD-plus buffer 2.5 μ L、2mM dNTP mix 2.5 μ L、25 mM MgSO₄ 1 μ L、プライマー (センス、アンチセンス) 各 0.5 μ L、ゲノム DNA 0.5 μ L。

PCR 条件 (全長配列増幅用プライマー使用時): 94°C 2 min \rightarrow (94°C 15 sec. \rightarrow 60°C 30

sec. \rightarrow 68°C 1 min 30 sec) x 40 cycle \rightarrow 68°C 5 min \rightarrow 4°C ∞

PCR 条件 (部分配列増幅用プライマー使用時): 94°C 2 min \rightarrow (94°C 15 sec. \rightarrow 60°C 30 sec. \rightarrow 68°C 30 sec) x 30 cycle \rightarrow 68°C 5 min \rightarrow 4°C ∞

プライマー配列は下記のとおり。

①CYP88D6intronS1179: 5'-gtg cta att tgg gca aga gc-3',

CYP88D6intronA1420: 5'-agc tgg taa cgt gac att ctg g-3'

②CYP88D6intron7Fw: 5'-tag tgc ctt taa gca cat gg-3',

CYP88D6intron7Rv2: 5'-aga gat caa tca ggt agc tag aga g-3'

・コロニー PCR 条件

PCR 反応液組成: GoTaq Green Master Mix (Promega) 5 μ L、ddH₂O 3 μ L、プライマー (U-19, R-20) 各 1 μ L。

PCR 条件: 94°C 2 min \rightarrow (94°C 15 sec. \rightarrow 60°C 30 sec. \rightarrow 72°C 30 sec) x 30 cycle \rightarrow 72°C 5 min \rightarrow 4°C ∞

プライマー配列は下記のとおり。

U-19: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG T-3'

R-20: 5'-CAG CTA TGA CCA TGA TTA CG-3'

C. 研究結果

1) *G. glabra*, *G. echinata*, *G. inflata* の CYP88D6 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* 及び *G. glabra* var. *glandulifera* のイントロン 7 配列と比較した結果、ダイレクトシーケンスにおいて、2塩基が混合したピークが検出された部位が、*G. glabra* var. *glandulifera* とは異なる一方で *G. glabra* と完全に一致し、ダイレクトシーケンスによるイントロン 7 配列の比較により、*G. glabra* の変種間の識別が可能であることを示した (表

2)。

CYP88D6intronS1179、CYP88D6intron A1420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(表3のe1)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*(表3のf1)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、CYP88D6intron7 Rv2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(表3のa2, 4)と*G. glabra*と非常に相同性の高い配列(表3のd3~5)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。

2) 甘草市場品生薬のCYP88D6イントロン7部分配列の解析

CYP88D6intron7Fw、CYP88D6intron7 Rv2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(図2、表4)。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(表4)。そこで、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。その結果、市場品試料からは、Gu系統と相同性の高い配列(a1~5)に加え、優良系統に特徴的な配列(表3のb1~2, c1~5)あるいは*G. glabra*と相同性の高い配列(表3のd1~2)を得た。

3) 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。表3に示す*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)、及び、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(表5)、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(表6、図3)。