

また, paeoniflorin, oxypaeoniflorin および gallotannin 含量はそれぞれ収穫時期が遅くなるほど高くなる傾向にあった (Table 3).

1.3 乾燥方法が及ぼす影響

周皮を除去した後の乾燥工程における環境の違いが根の変色へ及ぼす影響は少なく, ほとんどの試験区では変色程度が小さかった (Table 4, Fig. 3). ただし, 12月5日から根雪となり湿度が100%となった後もしばらく屋外風乾場にて放置した14, 21区では, 根が黄茶, 浅黄茶, 濃黄橙または枯葉色を呈し, 明度は59.8~63.0と変色が確認された (Table 4, Fig. 3). なお, 乾燥期間中 (10月22日~1月13日) の各場所における9時の平均気温は, 温室が18.3°C, 無加温室内が2.0°C, 風乾場が0.1°Cであった (Fig. 2).

また, 乾燥工程における環境の違いが, 各種成分含量へ及ぼす影響は顕著ではなかった (Table 4). ただし, 風乾区における gallotannin 含量は, 野外での乾燥期間が長くなるのに伴い低下する傾向にあった (Table 4).

1.4 分光色差計を用いた根の横断面色評価と市場品との比較

分光色差計により測定した L^* , a^* および b^* 値は, 日本園芸植物標準色票を用いた観察による評価と密接に関連していた. すなわち, L^* 値では, 見た目の変色程度が小さいほど有意に数値が高い傾向にあった (Fig. 4A). a^* 値, b^* 値についても同様に, 変色程度が小さいほど a^* 値や b^* 値

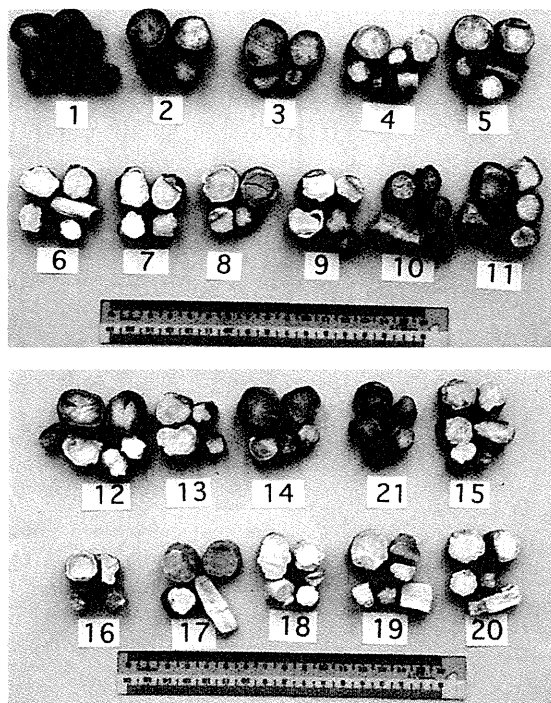


Fig. 3. Effects of storage process and drying process on colors of the cross-section of roots in the processing of *Paeonia lactiflora* Pallas. Each number indicates the experimental plots (see Table 1 and 2).

Table 4. Comparison of internal root color and chemical evaluation of the roots prepared by different drying methods in four-year-old *Paeonia lactiflora*.

Plots No.	Colors ^{#1}	L^* value	Pae % dw	Oxy % dw	Alb % dw	Gal % dw	Fru % dw	Glc % dw	Suc % dw	Total % dw	EtOH % dw
		Mean \pm SD									
12	pale brown (1917) and yellowish white (2901)	76.7 \pm 1.9 ^b	5.3	0.8	nd	0.45	2.0	1.4	25.7	29.1	47.5
13	pale brown (1917) and yellowish white (2901)	74.7 \pm 1.2 ^b	4.8	0.7	nd	0.40	2.2	1.7	30.0	33.9	51.5
14	yellowish brown (1909), light grayish brown (1918) and light yellowish brown (1915)	59.8 \pm 1.9 ^a	4.8	0.6	nd	0.26	2.2	1.7	29.4	33.3	50.1
21	deep yellowish brown (1908), yellowish brown (1909) and light yellowish brown (1915)	63.0 \pm 3.3 ^a	4.6	0.6	nd	0.18	2.2	1.9	28.4	32.5	47.7
15	pale brown (1917) and yellowish white (2501)	76.6 \pm 2.2 ^b	4.6	0.7	nd	0.39	2.0	1.5	30.0	33.5	50.5
16	pale brown (1917)	79.2 \pm 2.0 ^b	5.1	0.8	nd	0.48	2.0	1.3	28.7	32.0	50.5
17	pale brown (1917) and yellowish white (2501)	76.3 \pm 4.6 ^b	4.9	0.8	nd	0.43	2.3	1.8	28.6	32.7	51.3
18	yellowish white (2501)	80.0 \pm 1.1 ^b	5.5	0.8	nd	0.51	1.7	0.9	29.2	31.8	49.3
19	pale brown (1917)	79.1 \pm 3.1 ^b	4.7	0.9	nd	0.46	1.7	1.0	29.6	32.3	50.8
20	yellowish white (2501)	81.4 \pm 4.0 ^b	5.2	0.8	nd	0.48	1.6	1.1	28.1	30.8	50.0

^{#1}: The Japan color standard for horticultural plants.

L^* value (lightness) was measured by Spectrophotometer; NF333, Nippon Denshoku Industries Co., Ltd.

Values with different small letters are significantly different from each other at the 5% level using the Tukey's multiple comparison test ($n=3$).

nd < 0.1%.

Pae, paeoniflorin; Oxy, oxypaeoniflorin; Alb, albiflorin; Gal, gallotannin; Fru, fructose; Glc, glucose; Suc, sucrose; Total, total sugar; EtOH, dilute ethanol-soluble extract.

Detail of each plot was shown in Table 2.

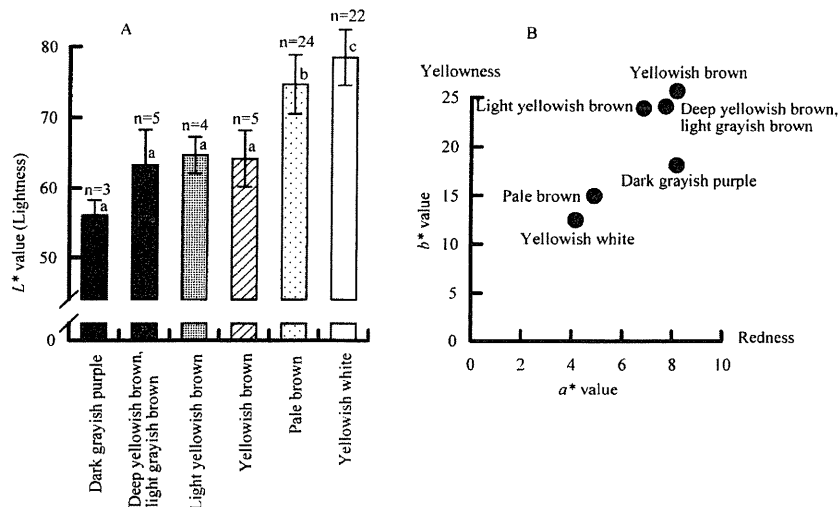


Fig. 4. Relationship between color evaluation by the Japan color standard for horticultural plants and L^* , a^* and b^* values by spectrophotometer in the root of *Paeonia lactiflora* Pallas. Values with different small letters are significantly different from each other at the 5% level using the Tukey-Kramer's multiple comparison test. Bars represent SD.

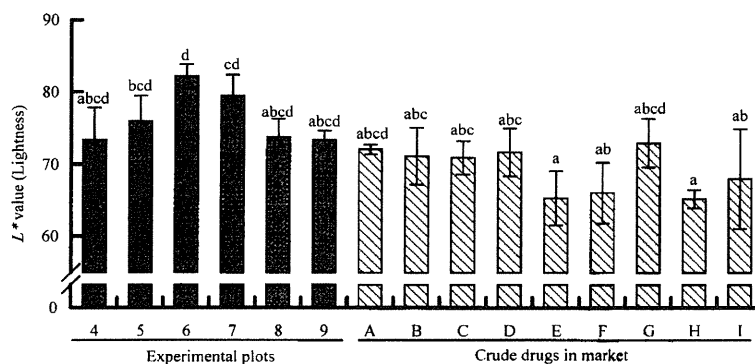


Fig. 5. Comparison of L^* value among No. 4-9 of experimental plots and crude drugs in market. Values with different small letters are significantly different from each other at the 5% level using the Tukey-Kramer's multiple comparison test ($n=3$). Bars represent SD. Each number indicates the experimental plots (see Table 1). A-I samples (color of flower, producing area) were purchased from Japanese market in 2001. A, white, Toyama; B, white, Toyama; C, red, Hokuriku; D, white, Mie and Fukui; E, red, Nara; F, unknown, Hokkaido; G, unknown, Aomori; H, white, Nara; I, white, Nara.

の絶対値が小さい傾向にあったが、 L^* 値ほど顕著ではなかった (Fig. 4B).

根の横断面における L^* 値について、各試験区と市場品を比較すると、収穫後、22~42 日間根を貯蔵してから周皮を除去した 4~9 区は、市場品の値を上回る傾向にあった (Fig. 5).

2. 実験 2: 実証試験

実験 1 の結果をもとに、本調製方法の実用化へ向けた実証試験を行った。すなわち、2007 年 9 月 19 日に収穫した後、株から切り分けた根を 2007 年 10 月 17 日 (28 日間) まで土の中に貯蔵後、周皮を除去して 2007 年 11 月 28 日 (42 日間) まで屋外風乾場にて乾燥後、2009 年 3 月 14 日まで

温室内にて仕上げ乾燥を行った。これより得られたサンプルの根の横断面における L^* 値は 76.5 ± 1.6 ($n=10$) であり、実験 1 における 4~9 区の L^* 値 73.3~82.3 (Table 3) とほぼ同水準であった。また paeoniflorin, oxypaeoniflorin, albiflorin および gallotannin 含量はそれぞれ 5.0%, 0.8%, 0.1% および 0.66% と、gallotannin 以外は実験 1 における 4~9 区 (Table 3) と同水準であったが、gallotannin はやや高い値を示した。

考 察

本研究では、シャクヤク調製後の根を白く仕上げることや各種活性成分含量を向上させることを目的とし、北海道

北部地域の気候に即した調製方法の検討を行った。

まず、シャクヤクの根の横断面の変色程度を評価するに当たり、分光色差計を用いた L^* 値 (明度) による評価が妥当であることが明らかとなった。すなわち、標準色票を用いた観察による評価と L^* 値は密接に関連しており、根の変色程度が少ないほど L^* 値が有意に高かった (Fig. 4A)。より客観的な評価が可能であることから、以後、各試験区の比較については L^* 値を用いた評価とする。

シャクヤクの根の調製において、収穫後の根を一時的に貯蔵するという工程は、内部の変色を抑える上で重要な役割を担っていた。すなわち、収穫後、直ちに根の周皮を除去した区では L^* 値が最も低く根の変色が著しかったのに対し、収穫後、日陰または冷蔵庫 (5°C) にて 22~42 日間乾燥しないように貯蔵してから周皮を除去した区では L^* 値が高く、根の変色がほとんど認められなかった (Table 3, Fig. 3)。また、収穫時期が遅くなるにつれて根の変色は緩和する傾向にあった (Table 3, Fig. 3)。

この要因として、シャクヤクの酵素的褐変へ関与するポリフェノールオキシダーゼ (以下、PPO) などの酵素活性の低下が関連している可能性が考えられる。野菜や果物では植物中のポリフェノール類が酵素的に酸化し、その後化学的に重合反応が起こり、結果として褐変する現象が知られているが、この原因酵素が PPO であるとされる⁹⁾。ただし、ポリフェノール類は液胞中に、PPO はプラスチド中に存在することから、細胞が破壊されない限りは酵素反応が始まらない⁹⁾。すなわち、シャクヤクでは周皮を除去する工程が酵素的褐変の引き金であると考えられる。Ding *et al.*⁹⁾ は、ピワ果実が生育・成熟に伴い PPO が急激に減少することや、収穫後の果実を 5°C で保存した場合、15 日経過後から PPO が減少することを報告している。すなわち、シャクヤク収穫後から周皮を除去するまでに貯蔵期間を設けること、または収穫時期を遅らせることにより、酵素活性が低下したと推察される。

これらのことから、収穫時期を遅くする、または収穫後、太陽光を当てずに 20°C 以下で 22 日間以上根を貯蔵してから剥皮すれば、酵素的褐変が抑制され、根がほとんど変色しないことが示された。

根の剥皮後の乾燥工程については、試験区間で顕著な差が認められなかったことから (Table 4, Fig. 3)、20°C 以下で速やかに乾燥を実施すれば、環境に関わらず変色は生じないことが明らかとなった。ただし、1 月以降まで屋外で乾燥した場合には、変色が認められた (Table 4)。室内区では 1 月 13 日まで放置しても変色が認められなかったことから、高湿度または強い低温が変色に関連している可能性が考えられるが、本研究の範囲内では明らかとはなっていない。いずれにしても、屋外風乾場で乾燥する場合には 12 月中には室内へ取り込む必要がある。

各試験区の根の横断面色を市場品と比較した結果、根を 22 日間以上貯蔵した 4~9 区の L^* 値は、市場品を上回っていた (Fig. 5)。このことは、品質が高い生薬を仕上げる上

で、本調製方法が妥当であることを示している。

一方で、収穫時期や根の貯蔵は各種成分含量にも影響を及ぼしていた。すなわち、paeoniflorin, oxypaeoniflorin および gallotannin 含量はそれぞれ収穫時期が遅くなるほど、または根の貯蔵期間が長くなるほど高い傾向にあった (Table 3)。清水ら¹⁰⁾ はシャクヤクの paeoniflorin, 西澤ら¹¹⁾ は paeoniflorin, oxypaeoniflorin, albiflorin および gallotannin について、収穫時期が秋遅くなるに従って含量が増加することを報告しているが、収穫した根を貯蔵することでも高含量になることが本結果により明らかとなった。著者らは、糖および希エタノールエキス含量に関して、根を 4°C で保存することによっても、今回と同様に増加することを、別の品種を用いた実験で明らかにしている¹²⁾。

また、本調製方法の実用化へむけた実証試験を行った結果、株から切り分けた根を地表面より 30~40 cm 下の土中で貯蔵したサンプルは、実験 1 で行った乾燥を防いだ条件下での日陰や冷蔵庫内貯蔵のサンプルと L^* 値や主要成分含量などにおいてほぼ同様の値を示し、大量の根収穫物を扱う方法として土中での貯蔵法は実用性が高いことが確認できた。

結 論

収穫後に根を株から切り取った後、乾燥を防いで 20°C 以下にて 22 日間以上根を貯蔵してから周皮を除去し、その後 20°C 以下で速やかに乾燥すれば、内部が白く仕上がった生薬が北海道北部地域においても作成可能であり、且つ paeoniflorin や gallotannin の含量の向上にも貢献することが明らかとなった。以上の結果に基づき、北海道北部地域における実用的なシャクヤクの調製作業工程を以下のように提案する。収穫は 9 月下旬に行い、株から根を切り分け、その根を 10 月下旬まで約 30 日間地表面から 30~40 cm 下の土中に貯蔵する。その後、水および砂を用いて周皮を除去して 11 月下旬まで野外の風乾場にて乾燥した後、温室や乾燥機などで最終的な乾燥を行う。

大和芍薬の調製方法に関する助言を頂いた (株) 福田商店 (奈良県桜井市) 福田眞三氏、分光色差計の測定に関するご協力および芍薬の資料をご提供頂いたクラシエ製薬株式会社 土田貴士博士、豊岡寛美氏、達川早苗博士、芍薬市場品のサンプルに関する情報をご提供頂いた (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リーダー 飯田 修氏、圃場における栽培管理作業および収穫・調製作業において多大なご尽力を頂いた同センター北海道研究部主任技術専門員 澤井清道氏、技術専門員中西大樹氏、成瀬ひとみ氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Nihon Yakkyokuho Kaisetsusyo Hensyuiinkai, Explanation of The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition, Hirokawa Publishing, Tokyo, 2006, pp. D-324-D-329.

- 2) Nishimoto K., *Gendai Toyo Igaku*, **6**, 56-61 (1985).
- 3) Fukuda S., *Gendai Toyo Igaku*, **12**, 77-85 (1991).
- 4) Nihon Hyoujyunshikihiyo Hensyuinkai, The Japan Color Standard for Horticultural Plants, Japan Color Research Institute, Tokyo, 1984.
- 5) Anetai M., Aoyagi M., Hayashi T., Hatakeyama Y., *Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health*, **50**, 6-10 (2000).
- 6) Nishizawa M., Yamagishi T., *Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health*, **32**, 60-61 (1982).
- 7) Nishizawa M., Yamagishi T., Nonaka G., Nishioka I., *Yakugaku Zasshi*, **104**, 1244-1250 (1984).
- 8) Murata M., *Kagaku to Seibutu*, **45**, 403-410 (2007).
- 9) Ding C.K., Chachin K., Ueda Y., Mochioka R., *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, **67**, 360-366 (1998).
- 10) Shimizu M., Hashimoto T., Ishikawa S., Kurosaki F., Morita N., *Yakugaku Zasshi*, **99**, 432-435 (1979).
- 11) Nishizawa M., Yamagishi T., Horikoshi T., Honma N., *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 423-426 (1986).
- 12) Anetai M., Sato M., Shibata T., *Pharm. Regul. Sci.*, **40**, 497-504 (2009).

成分含量, 生薬の性状および農業形質からみた薬用シャクヤク
品種の育成 (第1報) —低開花率により摘花および摘蕾作業の
省力が可能になる新品種について—

林 茂樹^{a*}, 菱田 敦之^a, 熊谷 健夫^a, 佐藤 正幸^b, 青柳 光敏^b,
林 隆章^b, 姉帯 正樹^b, 柴田 敏郎^a

^a 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

^b 北海道立衛生研究所

Breeding of Medicinal Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) Based on Active
Ingredient Content, Characteristics of Crude Drugs and Agronomic
Traits (Part 1)

—A New Peony Variety with Low Flowering Rate, Which Can Contribute
to Labor Saving for Bud and Flower Picking—

Shigeki Hayashi^{a*}, Atsuyuki Hishida^a, Takeo Kumagai^a,
Masayuki Sato^b, Mitsutoshi Aoyagi^b, Takaaki Hayashi^b,
Masaki Anetai^b and Toshiro Shibata^a

^a Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation,
108-4 Ohashi, Nayoro, Hokkaido 096-0065, Japan

^b Hokkaido Institute of Public Health,
Kita-19, Nishi-12, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0819, Japan

(Received December 13, 2010)

An increase in the self-sufficiency of peony roots (*Paeonia lactiflora* Pall.), which are frequently used in Kampo formulae, will be welcomed, because the supply of peony roots is heavily dependent on foreign countries. Therefore, we tried to develop a new variety of medicinal peony with possible labor-saving cultivation and stable quality using clonal selection. As a result, active ingredient content and root yields of No. 518 strain ("518") selected from 53 strains were relatively high (paeoniflorin, 4.42% ; albiflorin, 0.53% ; dry root yield, 712 kg/10 a) compared with those of the other strains. In addition, the flowering rate of "518" was extremely lower (5%) than that of the other strains (32-100%) in 3 years' plants, and there was a negative correlation between flowering rate and number of stems for peony ($r = -0.735$, $p < 0.001$, $n = 140$). Furthermore, color in the root cross section of "518" was more whitish (L^* value, 79.5) than that of "Kitasaisyo" (74.7) and crude drugs sold in the market (65-73). We concluded that "518" is a new peony variety which would contribute to labor-saving cultivation and stable production of crude drugs with stable quality. The variety name "Beni-shizuka" was given to selected variety "518" and applied as a new peony variety on the basis of the Seeds and Seedlings Act, Japan.

Keywords : *Paeonia lactiflora* Pall. ; Breeding of medicinal plants ; low flowering rate ; labor-saving cultivation

結 論

シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pall., ボタン科) は根を利用部位とし、鎮痛薬、鎮痙薬、婦人病薬等として、葛根湯や加味逍遙散等多くの漢方処方中使用されている汎用度が高い生薬原料の一つである^{1a)}。第十五改正日本薬局方 (JP15) において paeoniflorin 含量が 2% 以上と規定され^{1a)}、調製した根が白く仕上がった製品が上品とされる^{1~3)}。

近年、国内における薬用シャクヤクの自給率は 5% 前後であり^{4,5)}、主に中国からの輸入に依存している。しかし、中国からの輸入品はトレーサビリティの確保に限界があることや、中国国内における物価上昇に伴う生薬の価格高騰が懸念されることから、今後、国内生産量の増加が望まれる。

国内でシャクヤク生産を推進する上での主要な課題の一つとして、生産コストの削減 (省力化など) があげられるが、生産栽培においては、根の肥大を促すため通常蓄や花を除去する作業が行われる^{6,7)}。この作業には多大な労力を要するため、開花率の低い品種の導入が望ましい。

1969 年以来、当センターではシャクヤクの系統選抜を行っており、paeoniflorin 含量や収量が安定して高い品種「北宰相」⁸⁾ が畠山らにより育成され、1996 年に品種登録された。現在、シャクヤク登録品種の中では「北宰相」が唯一の薬用品種であるが、albiflorin 含量 (加味逍遙散エキスの確認試験項目^{1b)}) が 0.1% 以下と極めて低く⁸⁾、加えて調製した根の断面が赤味を帯びるため、生薬として好まれない傾向がある。

そこで、上記に示す栽培管理上および品質に関する問題点を克服しうる新品種の育成を行ったので結果を報告する。

材料および方法

1. 材 料

独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部において、1969 年から 1993 年 (当時、北海道薬用植物栽培試験場) までの期間に、約 5,000 株の実生集団 (一部栄養繁殖) から、形質や生育を指標として選抜された 53 系統のシャクヤクを用いた⁸⁾。

2. 栽培方法

各系統について、繁殖はすべて栄養繁殖 (株分け法) により行い、第一期から第六期まで、10 m × 1~3 畝、株間 50 cm、畝幅 60 cm (第一期、第五期 B は 80 cm) の条件で栽培した。各期における根茎の定植日、根の収穫日を Table 1 に示す。

肥料条件は、基肥として堆肥 2 t/10 a、炭酸カルシウム 100 kg/10 a、追肥として各年次に化成肥料 (N, P, K : 8.8~22, 10.8~17, 8.4~21 kg/10 a)、貝殻粉 (60~120 kg/10 a)、鶏糞 (105~150 kg/10 a) を施用した。

3. 収穫と調製

第一期~第三期: 各系統の栽培 3 年目または 4 年目株について根および根茎を収穫後、根を洗浄し (第三期は周皮を除去)、11 月下旬まで屋外にて風乾した。その後、温風乾

Table 1. Planting and harvesting date of *Paeonia lactiflora* in first to sixth period.

Period	Planting date	Harvesting date	Cultivation period
First	Oct. 6 1992	Sep. 13-24 1996	4 years
Second	Oct. 3 1996	Sep. 19-21 1999	3 years
Third	Oct. 7 1999	Sep. 10-13 2002	3 years
Fourth	Oct. 1 2002	Sep. 20-22 2005	3 years
		Sep. 18-19 2007	5 years
Fifth A ¹⁾	Oct. 5 2005	Sep. 16-17 2008	3 years
Fifth B ²⁾	Oct. 4 2007	Growing	
Sixth ³⁾	Sep. 25 2008	Growing	

¹⁾ Derived from plants cultivated for 3 years in fourth period.

²⁾ Derived from plants cultivated for 5 years in fourth period.

³⁾ Derived from plants cultivated for 3 years in fifth A period.

燥機 (第二, 三期) または加温した温室内 (第一期) にて乾燥し、直径が 10 mm 以上であった根の重量を測定した (第一期は収量データなし)。

第四期~第五期 A: 各系統の栽培 3 年目株について根および根茎を収穫後、根を 10 月下旬まで約 30 日間地表面から 30~40 cm 下の土中に貯蔵した。その後、水および砂を用いて周皮を除去し、11 月下旬まで屋外の風乾場にて乾燥した。その後、加温した温室内にて 3 月上旬まで乾燥し、直径が 10 mm 以上である根の重量を測定した⁹⁾。

4. 成分含量の測定

1996 年、1999 年および 2002 年 (第一期~第三期) に収穫・調製された各系統の根から、それぞれ無作為に 15 本 (直径 10~15 mm) を選定し、それらを混合・微粉砕したものをサンプルとした。Paeoniflorin, oxypaeoniflorin および albiflorin の定量は西澤および山岸¹⁰⁾、gallotannin の定量は西澤ら¹¹⁾ の方法に準じた。

5. 開花率と茎葉の調査

2008 年 7 月 2 日 (第五期 A の栽培 3 年目株) と 2009 年 6 月 18 日 (第六期の栽培 1 年目株, 第五期 B の栽培 2 年目株) に開花率を調査した。花もしくは蕾を 1 つ以上保有する個体を開花個体とし、各系統について 56~200 個体を調査対象とした。

第五期 B の各系統における栽培 2 年目株を対象として、2009 年 6 月 18 日に茎数と茎の太さ (地際から 3 節目の中央部) を 20 株について測定した。また、各 20 株から無作為に茎葉を各 1 本採取し、50°C で約 10 日間乾燥後、重量を測定した。また、「北宰相」、系統 No. 204, 205, 405, 513 について、花または蕾を保有する株と保有しない株を各 8~10 株選定し、無作為に茎葉を各 1 本採取し、50°C で約 10 日間乾燥後、茎葉重を測定した。なお、茎葉のみの重量を比較するために、花および蕾の重量を除外した。

Table 2. Chemical properties and dry root yields of 8

Strain	Paeoniflorin (%)				Albiflorin (%)				Oxypaeoniflorin (%)				1996
	1996	1999	2002	ave	1996	1999	2002	ave	1996	1999	2002	ave	
204	5.58	4.48	4.66	4.91	0.12	0.16	0.11	0.13	0.65	0.32	0.82	0.60	0.33
205	3.35	3.66	3.56	3.52	1.04	1.42	1.23	1.23	0.38	0.35	0.69	0.47	0.27
405	3.14	3.80	3.17	3.37	1.72	2.48	1.82	2.01	0.24	0.20	0.40	0.28	0.82
505	4.36	5.21	4.61	4.73	0.10	0.08	0.17	0.12	0.49	0.40	0.72	0.54	0.51
513	3.68	4.46	3.76	3.97	0.20	0.28	0.19	0.22	0.13	0.13	0.21	0.16	0.23
"518"	4.23	4.43	4.61	4.42	0.47	0.56	0.56	0.53	0.19	0.16	0.35	0.23	0.50
519	4.30	4.77	4.73	4.60	0.29	0.30	0.26	0.28	0.18	0.15	0.28	0.20	0.58
"Kitasaisyo"	—	5.29	3.92	4.60	—	0.02	0.06	0.04	—	0.32	0.45	0.38	—
Average of 45-53 strains	3.58	4.08	4.05	3.82	0.48	0.64	0.49	0.55	0.24	0.21	0.43	0.28	0.46

strains of *Paeonia lactiflora* cultivated for 3 or 4 years.

Gallotannin (%)			Dry root yields (kg/10 a)			
1999	2002	ave	1999	2002	2005	ave
0.25	0.34	0.31	1017	892	664	858
0.19	0.25	0.24	962	1113	716	930
0.63	0.72	0.72	776	754	457	662
0.30	0.64	0.48	941	742	416	699
0.21	0.39	0.28	930	1520	887	1112
0.36	0.86	0.57	992	825	319	712
0.43	0.74	0.58	914	667	535	705
0.31	0.46	0.39	—	—	671	—
0.36	0.55	0.46	693	625	381	570

Table 3. The flowering rate of 8 strains of *Paeonia lactiflora* in the different period of cultivation.

Strain	Flowering rate (%) of		
	1 year plants	2 years plants	3 years plants
204	16.2 (130)	91.0 (199)	100.0 (58)
205	3.5 (200)	75.5 (200)	100.0 (60)
405	1.7 (181)	38.7 (199)	93.1 (58)
505	29.6 (142)	—	96.4 (56)
513	1.0 (200)	74.0 (200)	100.0 (60)
"518"	0.0 (151)	0.0 (199)	5.0 (60)
519	0.0 (199)	0.0 (200)	32.2 (59)
"Kitasaisyo"	1.5 (196)	65.8 (196)	98.2 (56)

(): number of investigated plants.

各系統間の差の検定はチューキーの多重比較検定、2群比較はt検定を用いた。また、開花率と茎葉の各形質の相関関係をピアソンの相関係数により検定した。

6. 摘花および摘蓄作業の所要時間

2010年7月6日に栽培3年目株(第五期B)の「北宰相」と系統No. 518(以後、「518」と略記する)について、摘花および摘蓄作業の所要時間(166.7 m², 83.3 m²)を計測し、10 a当りの時間・人に換算した。

7. 選 抜

一次選抜: 53系統について、栽培3年目または4年目株の成分含量(第一期~第三期)と収量(第二期~第四期)の調査を実施し、選抜基準として、paeoniflorin含量はJP 15規定値を十分に満たす3%以上、albiflorin含量は検出(検出限界, 0.01%)が十分に可能な0.1%以上¹²⁾、および収量は53系統における60%分位点である650 kg/10 a以上を設定した。次に、この中から、各成分含量または収量について特徴的な形質を持つ系統を選抜するために、paeoniflorin > 4.5%, albiflorin > 0.5%, oxypaeoniflorin > 0.5%, gallotannin > 0.5%のいずれか2つ以上の項目を満たす、もしくは収量 > 900 kg/10 aを満たす系統を選抜した。

二次選抜: 一次選抜された系統の栽培1年目から3年目

株(第五期~第六期)における開花率を調査し、最も低開花率であった系統を選抜した。

8. 根における横断面の色

一次選抜された系統について、調製加工した根を各系統より10本づつ選定し(直径12~15 mm, 第五期A), その横断面の色を分光測色計(ミノルタ, CM2002)によって測定した⁹⁾。色の表示方法はL*a*b*表色系(日本工業規格, JISZ8729)によった。なお、L*値が高いほど明度が高く、a*値が高いほど赤味が強いことを示す。

結果および考察

53系統における成分含量と収量の平均値、標準偏差、最小値および最大値はそれぞれ、paeoniflorin含量3.82 ± 0.94% (0.96~6.60%), albiflorin含量0.55 ± 0.56% (0.00~2.01%), oxypaeoniflorin含量0.28 ± 0.13% (0.01~0.71%), gallotannin含量0.46 ± 0.17% (0.20~1.02%) および収量570 ± 229 kg/10 a (158~1112 kg/10 a)となった。この中から選抜基準に従い、系統No. 204, 205, 405, 505, 513, 518, 519の7系統を一次選抜した(Table 2)。二次選抜では、この7系統の開花率を測定し、最も値が低い系統No. 518を選抜した(Table 3)。

「518」の各成分含量は、53系統の平均値と同等もしくは

それ以上を示した (Table 2). 即ち, paeoniflorin 含量は調査したいずれの年次においても 4% を上回り, JP15 規定値 2%^{1a)} を十分に満たす値であった. また, albiflorin 含量については, 「北宰相」が 0.1% 以下であったのに対し 「518」では 0.5% 前後を, gallotannin 含量については 「北宰相」や 53 系統の平均値を上回る値を示した (Table 2).

また, 「518」の根の収量は 「北宰相」に比べ低いものの収量の年次平均は 712 kg/10 a となり, 53 系統の平均値の 1.25 倍であった (Table 2). なお, 2005 年の収量がいずれの系統においても著しく低かった要因として, 栽培 1 年目, 2 年目の生育最盛期 (6 月~8 月) における降水量がそれぞれ平年値の 81%, 66% と, 干ばつであったことが関連していると考えられた. 以上のことから, 「518」は 「北宰相」の albiflorin 含量が低いという問題点を克服し, 且つ他の成分含量や収量が平均的に高い特性を持つことが判明した.

「518」の栽培 3 年目株における開花率が 5% と極めて低かったのに対し, 他の 7 系統の開花率は 32~100% であった (Table 3, Fig. 1). この要因を解明するために, 茎葉の各形質が開花率へ及ぼす影響について検討した結果, 「518」の茎数は他の系統よりも有意に多く, 一方, 茎の太さや一茎当りの茎葉重は有意に低かった (Table 4). また, 開花率と各形質間の相関関係に着目すると, 開花率と茎数の間には有意な負の相関関係 (Fig. 2A) が, 開花率と茎の太さの間 (Fig. 2B), および開花率と一茎当りの茎葉重の間 (Fig. 2C) には有意な正の相関関係が認められた. さらに, 系統 No. 204, 205 および 「北宰相」における開花茎は未開花茎よりも茎葉重が 0.1% 水準で有意に大きかった (Table 5). なお, 系統 No. 405, 513 について, 平均値においては開花茎の茎葉重が大きかったが統計的な有意差は認められなかった. 以上のことから, 茎が細く茎数が多

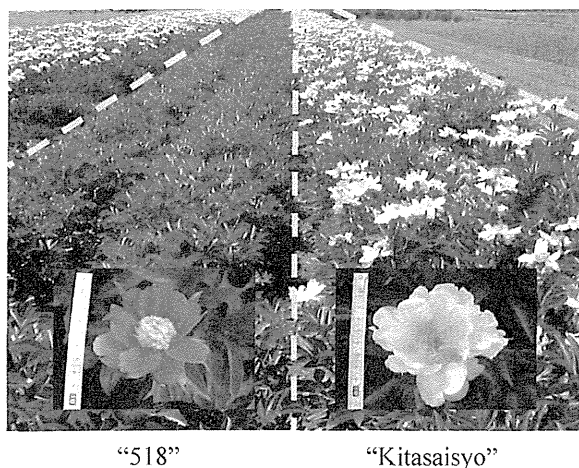


Fig. 1. Flowering and lower flowering strains of *Paeonia lactiflora* cultivated for 3 years. Flowering and white flower strain is “Kitasaisyo” and lower flowering and red purple flower strain is “518”. The photos were taken on June 28, 2010.

い特性を持つ 「518」は, 各茎の成熟度が相対的に低く, 開花期においても花芽分化までに至らず, 結果として開花率が低くなることが明らかとなった.

なお, 実際に摘蕾及び摘花作業に要する時間を測定した結果, 「北宰相」が 10a 当たり 7.8 時間・人であったのに対し 「518」は 0.5 時間・人となり, 「518」では本作業に要する時間が極めて少なく, 省力栽培が可能であることが判明した.

各系統における根の横断面を $L^*a^*b^*$ 表色系により評価した結果, L^* 値 (明度) については, 「518」(79.5) が 「北宰相」(74.7) よりも有意に高く, a^* 値 (赤味) については, 「518」(3.8) が 「北宰相」(7.0) よりも有意に低かった (Table 6, Fig. 3). 著者らは市場品のシャクヤクにおける

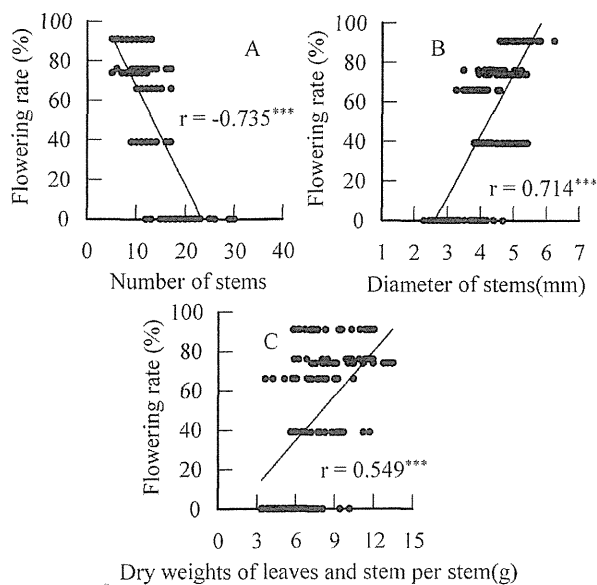


Fig. 2. Relationships between flowering rate and three characteristics of 7 strains of *Paeonia lactiflora* cultivated for 2 years (A, number of stems; B, diameter of stems; C, dry weights of leaves and stem per a stem). The relationships were investigated by Pearson's correlation coefficient test. *** indicates significance at 0.1% level ($n=140$).

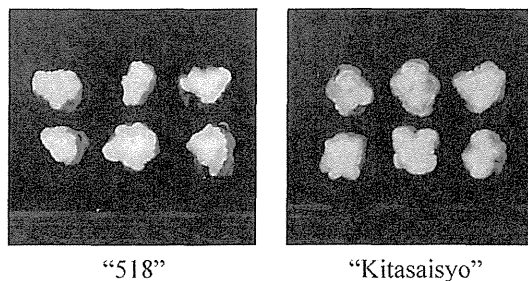


Fig. 3. The cross section of roots taking whitish and slightly red strains of *Paeonia lactiflora* cultivated for 3 years. Whitish strain is “518” and slightly red strain is “Kitasaisyo”. The roots were harvested on September 16-17, 2008, and then were dried using our processing methods⁹⁾ until March 9, 2009.

Table 4. Comparison of number and diameter of stems, dry weights of leaves and stem per a stem of each strain of *Paeonia lactiflora* cultivated for 2 years.

Strain	Stems		Dry weights of leaves and stem per a stem (g)
	number	diameter (mm)	
204	9.1±2.4 ^a	5.2±0.4 ^d	8.4±2.2 ^{bc}
205	11.5±2.5 ^{abc}	4.5±0.4 ^c	10.0±2.0 ^{cd}
405	12.2±2.5 ^{bc}	4.5±0.5 ^c	8.1±1.8 ^b
513	9.7±2.0 ^{ab}	4.7±0.4 ^c	10.4±2.1 ^d
"518"	21.3±4.7 ^e	3.1±0.4 ^a	5.4±1.4 ^a
519	17.4±3.7 ^d	3.6±0.6 ^b	6.2±1.7 ^a
"Kitasaisyo"	13.4±2.6 ^c	3.9±0.3 ^b	7.1±1.7 ^{ab}

Mean (±sd) with different small letters are significantly different from each other at 5% level using the Tukey's multiple comparison test ($n=20$).

Table 5. Comparison of dry weights of leaves and stem per a stem between flowering and non-flowering plants of *Paeonia lactiflora* cultivated for 2 years.

Strain	Flowering state of plants	Dry weights of leaves and stem per a stem (g)	<i>n</i>
204	flowering	9.8±1.7 ^{***}	10
	non-flowering	6.0±1.4	10
205	flowering	12.1±1.4 ^{***}	10
	non-flowering	7.6±1.9	10
405	flowering	9.0±1.9 ns	8
	non-flowering	7.5±1.3	8
513	flowering	11.1±1.8 ns	9
	non-flowering	9.3±2.3	9
"Kitasaisyo"	flowering	8.9±1.9 ^{***}	10
	non-flowering	5.9±1.3	10

The values represent the mean±sd. *** indicates significant difference at 0.1% level using the *t*-test.

Table 6. Comparison of color of cross section of roots between "518" and "Kitasaisyo" of *Paeonia lactiflora* cultivated for 3 years.

Strain	Color of root cross section		
	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
204	80.7±1.3 ^{cd}	3.3±0.5 ^{ab}	16.0±1.4 ^{bcd}
205	79.7±1.7 ^{cd}	3.9±0.5 ^b	14.6±1.4 ^b
405	80.1±1.9 ^{cd}	3.2±0.5 ^{ab}	17.3±1.1 ^d
505	76.8±1.5 ^b	5.0±0.7 ^c	15.0±1.2 ^{bc}
513	79.0±1.1 ^c	3.3±0.4 ^{ab}	17.0±0.9 ^d
"518"	79.5±1.2 ^c	3.8±0.4 ^{ab}	14.6±1.1 ^b
519	81.5±1.5 ^d	3.1±0.5 ^a	16.5±1.1 ^{cd}
"Kitasaisyo"	74.7±1.1 ^a	7.0±0.5 ^d	11.5±1.6 ^a

*L**: lightness; *a**: redness or greenness; *b**: yellowness or blueness. Mean (±sd) with different small letters are significantly different from each other at 5% level using the Tukey's multiple comparison test ($n=10$).

根の横断面の *L** 値が 65~73 であることを報告しているが⁹⁾, 「518」はこれよりも高い値であり, 根の横断面が白く, 性状面においても優れていることが明らかとなった。

結 論

薬用を目的として育成した「518」は, 既存品種と比較して茎が細く茎数が多いことから開花率が極めて低く, 花や蕾の除去作業の省力化が可能となる。また, 収量性は「北宰相」よりも低いが, 各成分含量が平均的に高く, 根の横断面が白いことから, 「北宰相」が抱えていた問題点 (albiflorin が低い, 根の横断面が赤味を帯びる) を克服しうる系統であった。以上, 育種目標を達成した本系統を「べにしずか」と命名し, 現在, 種苗法に基づく新品種登録出願中である (出願番号: 第 24217 号)。

初期におけるシャクヤクの選抜に携わった元国立医薬品食品衛生研究所 筑波薬用植物栽培試験場長 畠山好雄氏, 北見工業大学教授 山岸 喬氏, 東京農業大学教授 西澤 信氏, 圃場における栽培管理, 収穫および調製作業に多大なご尽力を頂いた当センター北海道研究部技術専門員 澤井清道氏, 中西大樹氏に深謝します。

文 献

- 1) a) Nihon Yakkyokuho Kaisetsusyo Hensyuiinkai, "Explanation of The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition," Hirokawa Publishing, Tokyo, 2006, pp. D324-D329; b) *idem*, pp. D130-D137.
- 2) Nishimoto K., *Gendai Toyo Igaku*, **6**, 56-61 (1985).
- 3) Fukuda S., *Gendai Toyo Igaku*, **12**, 77-85 (1991).
- 4) Japan Speciality Agriculture Products Association, "Material for Medicinal Crops," 2010, pp. 13.
- 5) Asama H., Abstract Papers, Forum on Medicinal Plants, Tsukuba, 9-12 (2010).
- 6) Horikoshi T., Honma N., Hatakeyama Y., *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **91**, 103-106 (1973).
- 7) Ministry of Welfare, Pharmaceutical Affairs Bureau, "Yakuyo-syokubutsu Saibai to Hinshitsu-hyoka Part 3," Yakuji Nippo, Ltd., Tokyo, 1994, pp. 45-56.
- 8) Hatakeyama Y., Kumagai T., Katsuki S., Honma N., Ishizaki S., Miura T., Sawai K., Yamagishi T., Nishizawa M., Hayashi T., Anetai M., *Nat. Med.*, **52**, 103-108 (1998).
- 9) Hayashi S., Anetai M., Sato M., Shibata T., *Shoyakugaku Zasshi*, **64**, 68-75 (2010).
- 10) Nishizawa M., Yamagishi T., *Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health*, **32**, 60-61 (1982).
- 11) Nishizawa M., Yamagishi T., Nonaka G., Nishioka I., *Yakugaku Zasshi*, **104**, 1244-1250 (1984).
- 12) Nishizawa M., Hayashi T., Yamagishi T., Horikoshi T., Hatakeyama Y., Honma N., *Shoyakugaku Zasshi*, **40**, 413-422 (1986).

Variation of Glycyrrhizin and Liquiritin Contents within a Population of 5-Year-Old Licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) Plants Cultivated under the Same Conditions

Mareshige KOJOMA,*^a Shigeki HAYASHI,^{b,#} Toshiro SHIBATA,^b Yutaka YAMAMOTO,^c and Haruo SEKIZAKI^a

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido; Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan:

^bHokkaido Division, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation; Nayoro, Hokkaido 096-0065, Japan; and ^cTochimoto Tenkaido Co., Ltd.; Oniya, Kaibara, Tamba, Hyogo 669-3315, Japan.

Received November 23, 2010; accepted March 28, 2011; published online May 24, 2011

Cultivated licorice plants (*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.) contain smaller amounts of the triterpene saponin glycyrrhizin than wild licorice plants. To resolve this problem and to breed strains with high-glycyrrhizin content we determined the glycyrrhizin content of 100 samples of *G. uralensis* that were propagated from seed and grown under the same conditions in the field for 5 years. There was a 10.2-fold variation in glycyrrhizin content among these plants, ranging from 0.46 to 4.67% (average $2.11 \pm 0.90\%$). There was also a wide variation in liquiritin content, ranging from 0.11 to 2.65% (average $1.00 \pm 0.49\%$). The glycyrrhizin content was positively correlated with that of liquiritin in the taproots ($r^2=0.5525$). Our results indicate that there are various genetic strains for glycyrrhizin and liquiritin synthesis within a population of plants propagated from seed. The selected high-glycyrrhizin and liquiritin strains will be useful for licorice production and studies on biosynthetic analysis of glycyrrhizin and liquiritin.

Key words *Glycyrrhiza uralensis*; glycyrrhizin; liquiritin; Glycyrrhizae Radix; Leguminosae; licorice

Glycyrrhizae Radix, the underground material derived from licorice, *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. (Leguminosae) and some other *Glycyrrhiza* species, is extensively used as an herbal medicine in worldwide.¹⁾ Biological activities of licorice have been attributed to glycyrrhizin, liquiritin (Fig. 1), and other compounds. *G. uralensis* is a perennial herb that grows primarily in the semi-arid zones of Asia. Licorice products are derived from wild or cultivated *G. uralensis* from China or other Asian countries. In recent decades, however, over-harvest has gradually exhausted the natural resources in these regions, and several habitats are undergoing desertification. Thus, it is important to optimized cultivation conditions of *G. uralensis* to adequately substitute for the collection of wild resources. In particular, high quality and high glycyrrhizin content are desirable attributes of *G. uralensis* for medicinal use. According to the Japanese Pharmacopoeia, the glycyrrhizin content of Glycyrrhizae Radix for medicinal use must be at least 2.5%.²⁾ World Health Organization guidelines specify that glycyrrhizin content should be at least 4% for Glycyrrhizae Radix.³⁾ However, the glycyrrhizin content is lower (<2.5%) in cultivated plants of *G. uralensis* than that in wild ones.⁴⁾ Therefore, there is a demand for improved cultivars with high glycyrrhizin contents. Generally, there is wide genetic variation among plants propagated from seed, but there is no clear information on the variation in glycyrrhizin and liquiritin contents among seed-generated *G. uralensis*.

In this study, we hypothesized that there are various genetic strains within a population of *G. uralensis* grown from seed, and that some individuals would show higher glycyrrhizin and liquiritin contents. Accordingly, these could be selected to obtain a high-glycyrrhizin and high-liquiritin strain.

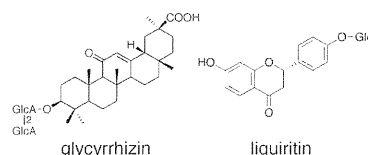


Fig. 1. Chemical Structure of Glycyrrhizin (Glycyrrhizic Acid) and Liquiritin

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Cultivation Conditions *Glycyrrhiza uralensis* FISCH. plants were cultivated in a field for 5 years. A voucher specimen (Accession No. HK 15739-09) has been deposited in the Herbarium of the Division of Hokkaido, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, Japan (Hokkaido Division, NIBIO). Approximately 7000 seeds were sown on 7 June 2004 in the agricultural research field of the Hokkaido Division, NIBIO (Hokkaido, Japan, 44°21'N, 142°27'E). The average annual temperature at the field site is 6.1 °C (range, -28.6 to 33.3 °C; Japan Meteorological Agency) and the rainfall is 891 mm (2004—2008). The plants were grown at a density of 12.5 plants/m² (row spacing, 80 cm; plant spacing, 10 cm). Prior to planting, manure (20000 kg/ha), calcium carbonate (1000 kg/ha), and fertilizer (NPK 56 : 56 : 56 kg/ha) were applied to the field. Additional fertilizers were applied as follows: NPK 12 : 88 : 60 kg/ha in August 2004; calcium carbonate 1000 kg/ha and NPK 84 : 84 : 84 kg/ha in May 2005; NPK 18 : 132 : 90 kg/ha in August 2005; calcium carbonate 1000 kg/ha and NPK 84 : 84 : 84 kg/ha in May 2006; NPK 18 : 132 : 90 kg/ha in August 2006; and calcium carbonate 1000 kg/ha and NPK 126 : 126 : 126 kg/ha in May 2007. The underground parts of 600 plants were unintentionally dug up on 27 August 2008

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: kojoma@hoku-iryo-u.ac.jp

© 2011 Pharmaceutical Society of Japan

Equal contribution with first author.

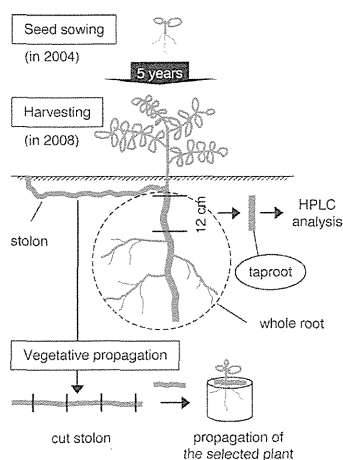


Fig. 2. Cultivation Process, Diagram of Harvested Parts, and Vegetative Propagation from *Glycyrrhiza uralensis* Stolons

Taproots (12-cm segments) were used for glycyrrhizin analyses.

(Fig. 2), taking particular care not to damage the roots (approximately 50–100 cm in length) and stolons (50–150 cm). Then, we visually selected 100 plants that had large root system and no damage by insects or disease from the 600 plants, washed in running tap water and then dried (50 °C, 10 d).

Glycyrrhizin and Liquiritin Analyses We analyzed the glycyrrhizin and liquiritin contents of the taproots cut from the whole root mass of the 100 selected plants (Fig. 2). It is possible that the glycyrrhizin and liquiritin contents are different according to the part of the root; therefore, we selected a 12-cm piece of taproot taken from the basal part of the root system for analysis. The taproot pieces were dried (50 °C) and ground to a fine powder (<150 μm). Quantitative analysis by HPLC of glycyrrhizin was performed according to the procedure in the Japanese Pharmacopoeia²⁾ with minor modifications. Dried samples (250 mg) were extracted in 50% EtOH (12.5 ml) with reciprocal shaking (150 rpm) for 15 min, and then ultrasonicated for 10 min. After centrifugation at 2500 g for 10 min, the supernatant was collected. This was repeated twice and extracts were made up to a final volume of 25 ml. A volume of 20 μl was used for HPLC analysis. The HPLC system consisted of an LC-2000 Plus system (JASCO, Tokyo, Japan), a TSKgel ODS-80T_S QA column (5 μm , 150 \times 4.6 mm, TOSOH, Tokyo, Japan), and a Mightysil guard column RP-18 GP 5-4.6 (Kanto Kagaku, Tokyo, Japan) with column temperature of 30 °C. A solvent system consisting of 2% (v/v) acetic acid:CH₃CN (60:40) was used at a flow rate of 0.6 ml/min. Elution of compounds was monitored by measuring absorbance at 254 nm. A glycyrrhizin standard was purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). Liquiritin analysis was performed as described by Kitagawa *et al.*⁵⁾ with minor modifications. Samples (250 mg) were extracted in 90% MeOH (12.5 ml), and then extraction was carried out in the same way as that used for glycyrrhizin analysis, as described above. The HPLC system was the same as that used for glycyrrhizin analysis, except for the column (Mightysil RP-18 GP 250-4.6 column; 5 μm , 250 \times 4.6 mm, Kanto Kagaku, Tokyo, Japan; column temperature, 40 °C). A solvent system consisting of 2% (v/v) acetic acid:CH₃CN (80:20) was used at a flow rate

of 0.7 ml/min. Elution of compounds was monitored by measuring absorbance at 257 nm. A liquiritin standard was purchased from Kishida Chemical Co. (Osaka, Japan).

RESULTS

Glycyrrhizin Content Glycyrrhizin contents of the 100 samples of *G. uralensis* that were grown under the same conditions for 5 years are shown in Fig. 3A. There was a wide variation in glycyrrhizin content; the highest was 4.67% (plant No. 79), 10.2-fold higher than the lowest (0.46% in No. 21). The average glycyrrhizin content was $2.11 \pm 0.90\%$. Of the 100 samples of *G. uralensis*, five had glycyrrhizin contents of 0–1%, 47 had 1–2%, 32 had 2–3%, 9 had 3–4%, and 7 plants had 4–5%.

Root Weight The fresh root weight (whole root, Fig. 2) of each of the 100 samples of *G. uralensis* was recorded not to dry within 24 h after digging up (data not shown). There were considerable differences in the whole root weights of the plants. The average whole root fresh weight was 163.6 ± 61.0 g, with a 5.9-fold difference between the highest (431.6 g, No. 15) and the lowest (73.0 g, No. 53). There was no clear relationship between glycyrrhizin content and whole root weight ($r^2=0.0082$, Pearson's correlation coefficient). The taproot diameter of each of the 100 samples of *G. uralensis* was also recorded (data not shown). Taproot diameter ranged from 18.1 mm (No. 53) to 36.0 mm (No. 15), with an average of 26.5 ± 3.9 mm. There was a positive correlation between whole root weight and taproot diameter ($r^2=0.6532$). However, there was no clear correlation between glycyrrhizin content and taproot diameter ($r^2=0.0205$).

Liquiritin Content The liquiritin contents of the taproots are shown in Fig. 3B. There was a wide variation in liquiritin content among the 100 samples of *G. uralensis*. The highest liquiritin content was 2.65% (No. 15), 24.1-fold higher than the lowest (0.11% in No. 55). The average liquiritin content was $1.00 \pm 0.49\%$. Of the 100 samples of *G. uralensis*, 56 had liquiritin contents of 0–1%, 41 had 1–2%, and three had 2–3%. Liquiritin content was not correlated with whole root fresh weight ($r^2=0.0042$) or taproot diameter ($r^2=0.0303$).

Relationship between Glycyrrhizin Content and Liquiritin Content The glycyrrhizin content was positively correlated with that of liquiritin in the taproots (Fig. 4, $r^2=0.5525$).

DISCUSSION

In this study, we observed wide variations in glycyrrhizin and liquiritin contents among 100 samples of 5-year-old cultivated *Glycyrrhiza uralensis*. It is thought that the environmental conditions for cultivation, genetic characteristics of each plant influence the difference of plant secondary metabolites production. We think that the difference of the each content of glycyrrhizin and liquiritin in this study is chiefly caused by a difference of the biosynthesis ability at each gene level. Glycyrrhizin is generated with the triterpenoid biosynthetic pathway. In *Glycyrrhiza* plants, the biosynthesis of glycyrrhizin involves the initial cyclization of 2,3-oxidosqualene to a triterpene, β -amyrin, followed by a series of oxidative reactions and glucuronylation. Genes for

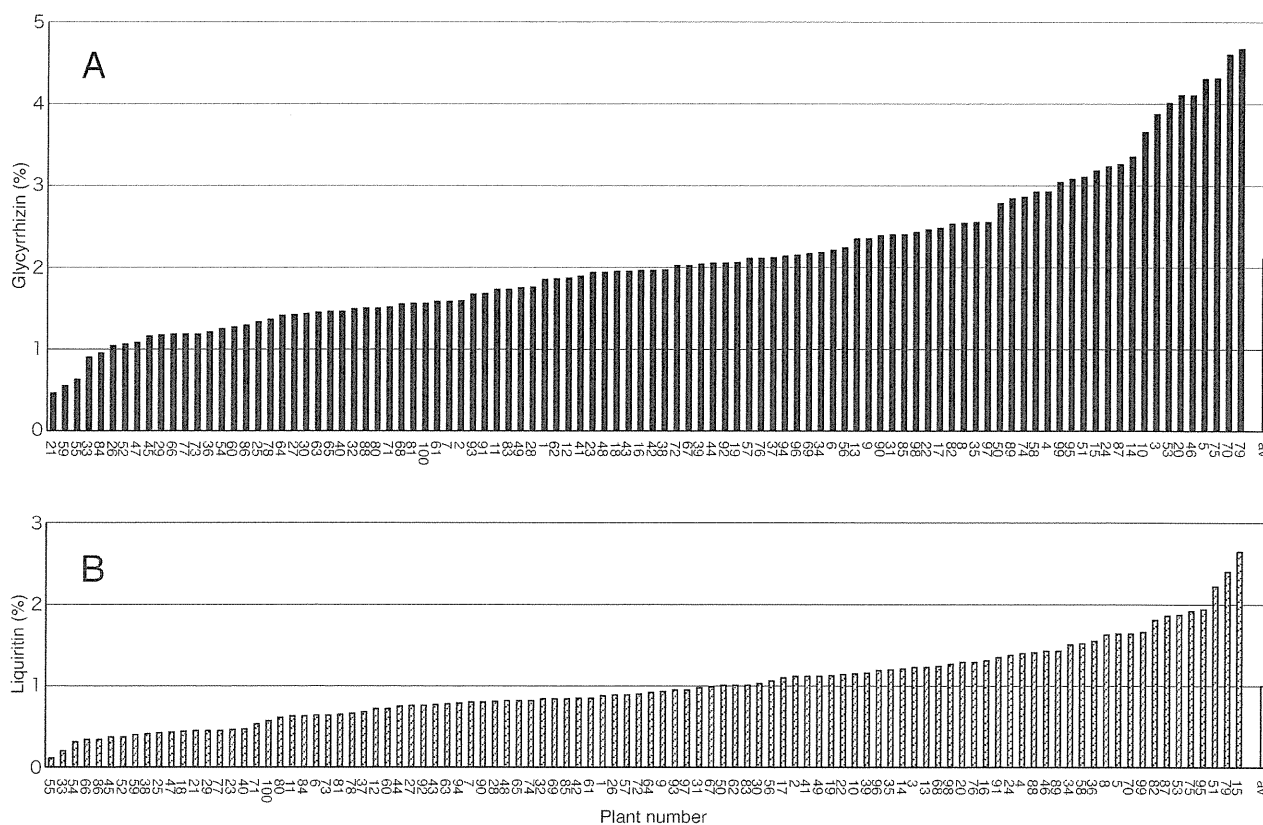


Fig. 3. Glycyrrhizin (A) and Liquiritin (B) Contents of Taproots from 100 Plants of 5-Year-Old *Glycyrrhiza uralensis* (av. Average of 100 Plants)

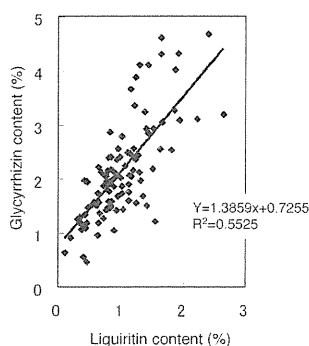


Fig. 4. Correlation between Glycyrrhizin Content and Liquiritin Content of Taproots from 100 Plants of 5-Year-Old *Glycyrrhiza uralensis*

two of the key enzymes in this pathway were discovered in *G. glabra*: *GgSQS1* encodes squalene synthase, which catalyzes the synthesis of 2,3-oxidosqualene from squalene, and *GgbAS1* encodes β -amyrin synthase, which produces β -amyrin from 2,3-oxidosqualene.^{6,7)} The *CYP88D6* gene, which was isolated from *G. uralensis*, encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes the two-step oxidation of β -amyrin at C-11 to produce 11-oxo- β -amyrin.⁸⁾ Recently, Sudo *et al.* analyzed 56857 expressed sequence tags of *G. uralensis*.⁹⁾ On the other hand, liquiritin is generated with the flavonoid synthetic pathway. Studies on the roles of cytochrome P450s in the production of flavonoids (to which class liquiritin belongs) are also progressed in *Glycyrrhiza* plants.¹⁰⁾ The glycyrrhizin content was positively correlated with that of liquiritin in the present study, even though glycyrrhizin and liquiritin are synthesized *via* different biosyn-

thetic pathways. It is assumed that the each biosynthetic pathway of the triterpenoid and flavonoid takes part in parallel or the upstream part in these two biosynthetic pathways takes part in the biosynthesis regulations of glycyrrhizin and liquiritin. However, the detail reason for the positive correlation between glycyrrhizin and liquiritin content is unclear now. These phenomena in this study will be further clarified by genetic analysis of secondary metabolites synthesis including glycyrrhizin and liquiritin. We expect that the present results will contribute to such biosynthetic studies.

We are propagating the selected high contents of glycyrrhizin and liquiritin plants by stolon cuttings (Fig. 2) and *in vitro* micro-propagation using tissue culture.¹¹⁾ Thus, it may be possible to produce high quality strains of *G. uralensis* with high glycyrrhizin and high liquiritin contents. The positive correlation between glycyrrhizin and liquiritin content is important information for selection or breeding of high glycyrrhizin and high liquiritin strains. There has been no report on the cultivation of *Glycyrrhiza* plants with only high content of glycyrrhizin. Yamamoto and Tani⁴⁾ reported glycyrrhizin contents of $1.52 \pm 0.57\%$ in taproots of cultivated 4-year-old *G. uralensis*. This level is lower than that required for medicinal use. The result may be due to the contamination with low glycyrrhizin individuals. By using cloned plants of the selected strains in our study, it will be possible to clarify the effects of environmental factors such as cultivation period, fertilizer, temperature, *etc.* on glycyrrhizin and liquiritin production.

Acknowledgments This work was partially supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry

of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, a Health Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and a Grant for Research for Promoting Technological Seeds from the Japan Science and Technology Agency.

REFERENCES

- 1) Hayashi H., Sudo H., *Plant Biotechnol.*, **26**, 101—104 (2009).
- 2) The Society of Japanese Pharmacopoeia, "Glycyrrhizae Radix," The Japanese Pharmacopoeia (Pharmacopoeia of Japan), 15th ed., Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Tokyo, Japan, 2006, p. 1295.
- 3) World Health Organization, "WHO Monographs on Selected Medicinal Plants," Vol. I, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1999, p. 187.
- 4) Yamamoto Y., Tani T., *J. Trad. Med.*, **19**, 87—92 (2002).
- 5) Kitagawa I., Chen W. Z., Taniyama T., Harada E., Hori K., Kobayashi M., Ren J., *Yakugaku Zasshi*, **118**, 519—528 (1998).
- 6) Hayashi H., Hirota A., Hiraoka N., Ikeshiro Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 947—950 (1999).
- 7) Hayashi H., Huang P., Kirakosyan A., Inoue K., Hiraoka N., Ikeshiro Y., Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 912—916 (2001).
- 8) Seki H., Ohyama K., Sawai S., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Akashi T., Aoki T., Saito K., Muranaka T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 14204—14209 (2008).
- 9) Sudo H., Seki H., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Toyoda A., Totoki Y., Sasaki Y., Iida O., Shibata T., Kojoma M., Muranaka T., Saito K., *Plant Biotechnol.*, **26**, 105—107 (2009).
- 10) Ayabe S., Akashi T., *Phytochem. Rev.*, **5**, 271—282 (2006).
- 11) Kojoma M., Ohyama K., Seki H., Hiraoka Y., Asazu N. S., Sawa S., Sekizaki H., Yoshida S., Muranaka T., *Plant Biotechnol.*, **27**, 59—66 (2010).

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

吉松嘉代（よしまつ かよ）

独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部

日本漢方生薬製剤協会の2008年度調査では、年間約2万トンの生薬が国内で医薬品原料となり、その国内自給率はわずか12%である。従って恒常的な需要を満たすには不安定な状態であり、現に麻黄や甘草の輸入は制限されている。一般に薬用植物は栽培年数が長く、費やす労力が大きい。また、農業労働者の高齢化が進む中では栽培が敬遠される傾向が強い。また、その含有する薬用成分組成および含量は、その生育環境により大きく左右され、収穫時期や乾燥・保管及び加工条件も収穫物の薬用成分含量に影響を与える。このような背景の中、植物種が明確で、品質が安定した薬用植物を大量かつ安定的に供給することは、安全性の高い高品質の医薬資源の供給につながり、医療への大きな貢献になる。そのためには、環境を人為的に制御できる閉鎖系栽培施設における薬用植物の栽培が有効な方法であり、また、このような栽培が可能となれば、野生薬用植物の乱獲を防ぎ、自生地や自然環境の保全にも貢献できる。さらに、適切な出入管理、栽培管理を行うことで、無農薬栽培や多角栽培が可能となり、薬用植物の国内生産の活性化を推進する上でも有効であろう。

薬用植物の養液栽培を用いた生産は、研究室レベルでは水耕法を用いた栽培研究が行われてきたが、地上部を利用目的とした報告が多い。一般に水耕法で栽培した植物の根は、分枝根が多くなり、主根が肥大しないことから、特に肥大した根を使用する例が多い薬用植物においては水耕栽培の実用化は困難であるとされてきた。根を使用目的とする薬用植物の水耕・養液栽培研究は、ミシマサイコ¹⁾やスペインカンゾウ^{2,3)}の例があるが、ミシマサイコでは、土耕に比べて根の生産性が十分ではなく、また、スペインカンゾウでは、日本薬局方規定値を満たす根を得るには至っていない。

我々は、地下部を使用部位とする薬用植物について、1年以内の養液栽培で日本薬局方規定値以上の薬用成分含量を示す生薬の生産に成功した。本シンポジウムでは、ウラルカンゾウを中心に閉鎖型植物生産施設における薬用植物の養液栽培について紹介したい。

文献

- 1) 南ら, 薬学雑誌, 115巻, 832-842 (1995)
- 2) 角谷ら, Natural Medicines 51, 447-451 (1997)
- 3) 角谷, Bull. Pharm. Res. Technol. Inst. 12, 133-138 (2003)

漢薬「麻黄」の資源探索：モンゴル国産 *Ephedra* 属植物の遺伝子多型とアルカロイド成分に関する研究

○宋 妹（ちゅう しゅう）、木谷友紀、小松かつ子
富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野

「麻黄」は、『神農本草経』の中品に収載され、発汗、利水、鎮咳薬として漢方や中国医学で頻用される。『第十六改正日本薬局方』に、「マオウ」は *Ephedra sinica*, *E. intermedia* 及び *E. equisetina* の地上茎で、総アルカロイド (Ephedrine (E) と Pseudoephedrine (PE) の和) 0.7% 以上を含むと規定されている。日本ではこれまで、麻黄の資源を中国に依存してきたが、近年中国では砂漠化防止政策の一環として、麻黄の採取と輸出が制限されるようになった。そこで、中国の北方に位置するモンゴル国で麻黄の資源植物を探索し、それらの有用性を明らかにすることを目的として本研究を行った。

モンゴル国における調査は2002年～2004年と2006年の4回に亘って実施し、モンゴル国全土をほぼカバーした。採集した *Ephedra* 属植物は、分類上重要な形質である球花及び珠被管の形態、種子の数、鱗片葉の形状などにより7種を確認した。南部及び西部に、草質茎が湾曲またはコイル状を呈し、同定困難な *Ephedra* sp. が見られ、また、交雑の可能性が考えられる検体も多数あった。そこで、確実に同定された中国産 *Ephedra* 属植物8種を加えて、モンゴル国採集品112検体について、核18S rRNA 遺伝子及び葉緑体 *trnK* 遺伝子のイントロン領域の塩基配列を解析した。両領域に各々5タイプの配列が認められ、*trnK* 遺伝子では *E. sinica*, *E. lomatolepis*, *E. regeliana*, (*E. intermedia*, *E. minuta* : 中国産) に固有な配列を見出した。さらに種間の交雑を検証するため、核ITS1領域の3'側約400 bp を解析した。遺伝子解析の結果から、日局マオウの基原である *E. sinica* と *E. equisetina* を含め計8種の同属植物のモンゴル国における分布状況を、遺伝子型とともに明らかにした。中南部～南部に分布する *Ephedra* sp. が *E. dahurica* であろうと推定し、南西部で *E. dahurica*, *E. glauca* 及び *E. przewalskii* などの各種間で広く交雑が起こっている可能性が示唆された。次に、モンゴル国産 *Ephedra* 属植物の日局マオウ及び薬用資源としての有用性を評価するため、遺伝子型を明らかにした野生品及び西部のGuulinで栽培された *E. sinica* のエフェドリン系アルカロイド5成分 (EAs) を定量し、日本市場に流通する中国産マオウと比較した。その結果、東部～中央部に分布する *E. sinica* (EAs 平均: 2.74%; E+PE平均: 2.27%), Guulin栽培品 *E. sinica* (1.72%; 1.44%), 中南部～南西部の山地に生育する *E. equisetina* (3.34%; 3.19%) は日局マオウの資源として有用であること、*E. przewalskii* と *E. lomatolepis* 以外の種は、交雑に由来するものを含めて、EAs 含量が2.61-3.67%と高く、医薬品原料として有用であることが示された。

ウラルカンゾウの養液栽培による 高効率的グリチルリチン酸生産

Efficient Glycyrrhizin Production by Hydroponic Cultivation of Chinese Licorice

吉松嘉代*¹ 河野徳昭*² 乾 貴幸*³

国内で使用される漢方製剤の7割以上に配合され、医薬品、化粧品、甘味料原料としても重要な生薬「甘草」は、その供給の100%を輸入に依存し、持続的安定供給が危ぶまれている。そのような現状を打開する一手段として、閉鎖型植物生産施設での養液栽培による「甘草」生産システムの開発と養液栽培に適した優良苗の作出を行った。

1. はじめに

ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) は、中国東北部、中北部、西北部あるいはモンゴルに自生するマメ科カンゾウ属 (*Glycyrrhiza* 属) の多年生草本である。乾燥させたウラルカンゾウの根およびストロンは生薬「甘草」として汎用され、一般用漢方製剤承認基準記載の236処方中168処方(71.2%)に、また、医療用漢方製剤148処方中109処方(73.6%)に配合されている^{1,2)}。甘草の主成分であるグリチルリチン酸は、抗炎症作用、肝臓保護作用、抗アレルギー作用等の薬理活性を有し、また、強い甘み(砂糖の200倍)³⁾を有することから、医薬品、化粧品、甘味料として広く利用されている³⁾。しかし国内での商業栽培は行われていないため、その供給の

100%は外国からの輸入品であり、そのほとんどが野生植物の採取に依存している⁴⁾。そのため、乱獲による環境破壊や資源の枯渇化が顕在化しており、主原産国の中国では、採取制限、輸出規制など、資源保護のための政策が強化されている⁴⁾。さらに、中国国内や日本以外の国でも甘草の需要が増加しており、甘草資源の持続的確保が年々困難になっている。

甘草の安定供給のため、これまでに多くの圃場栽培研究が行われてきた⁴⁻⁸⁾。その1例として、優良系統の選抜と、径10 cm、長さ50 cmの塩化ビニール製のパイプに培養土を充填して植物を栽培する筒栽培法を用いた1年間の野外での栽培により、グリチルリチン酸含量5%以上の甘草の生産が報告されている^{6,8)}。しかし、甘草の栽培品は概して野生品よりもグリチルリチン酸含量が低

*¹Kayo Yoshimatsu (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 育種生理研究室 室長

*²Noriaki Kawano (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 育種生理研究室 研究員

*³Takayuki Inui (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 育種生理研究室 特任研究員

表1 閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産

- ・自然環境の影響を受けず安定的に生産可能
- ・植物種が明確で品質が安定した薬用植物の供給が可能
- ・農薬、土壌汚染を回避できる
- ・計画栽培・多角栽培が可能

く、日本薬局方の規定値 2.5% 以上⁹⁾ を満たすためには、少なくとも 3 年以上の栽培期間を必要とする報告例が多い^{4,7)}。また、野外栽培は異常気象や自然災害および人為的な環境かく乱等の影響を受けやすい。

一方、閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産は、表1のような優れた点を持ち、薬用植物の安心・安全な安定供給に有効であると考えられる。

本稿では、閉鎖型植物生産施設におけるウラルカンゾウの養液栽培、養液栽培に適した優良株の選抜と遺伝子識別および産学官共同研究について紹介する。

2. 閉鎖型植物生産施設でのウラルカンゾウの養液栽培

養液栽培による薬用植物の生産は、研究室レベルでは水耕法を用いた栽培研究が行われてきたが、地上部を使用部位とする報告が多い。一般に水耕法で栽培した植物の根は分枝根が多くなり、主根が肥大しないことから、特に肥大した根を使用する薬用植物においては水耕栽培の実用化は困難であるとされてきた。根を使用する薬用植物の水耕・養液栽培研究は、ミシマサイコ¹⁰⁾ やスペインカンゾウ^{11,12)} の例があるが、根の収量や薬用成分含量の点で満足できる成果は得られていない。

そこで、根が養液中に浸されない養液栽培装置、すなわち通気性・保水性が高い支持体が充填された植木鉢に植物体の地下部を植付け、底面給水により鉢の下部から養液が供給される養液栽培装置¹³⁾ を考案し、閉鎖温室内（温度 20~25℃、相対湿度 50~60%、朝夕の補光照明により明期



写真1 養液栽培4ヵ月後のウラルカンゾウ

14~16時間/日) でウラルカンゾウの養液栽培 [電気伝導度 (EC) : 1.12 mS/cm] を行った (写真1)。

材料植物は、培養植物体として維持・保存してきた2系統 (Gu, GuH) のうち、予備的に実施した閉鎖温室内での鉢栽培 (土耕) で、根の収量およびグリチルリチン酸含量がより高かった Gu 系統を選択し、さらに、Gu 系統の培養シュートより、ストロン様組織¹⁴⁾ を誘導して植物組織培養での増殖効率の高いサブクローン Gu2-3-2 を得、養液栽培装置への植付け材料とした。閉鎖温室内において、Gu の土耕栽培では、根のグリチルリチン酸含量が 2.5% 以上になるまでに 1,009 日を要した。一方、養液栽培した Gu2-3-2 の根のグリチルリチン酸含量は、401 日後に 2.95%、740 日後に 5.22% となり、グリチルリチン酸の生産効率が高いことが判明した。前述の野外で筒栽培されたウラルカンゾウ 2 年生根は、グリチルリチン酸含量 2.5% 以上を満たすものの、フラボノイドであるリキリチン含量は市場品に比べて低いことが報告されている⁸⁾。リキリチンは、ウラルカンゾウの主要成分の一つで、抗うつ作用、抗酸化作用の他、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の神経変性の疾患の治療に効果的と思われる神経栄養作用が報告されており¹⁵⁾、甘草が有する多様な薬理活性の一端を担っていると思われる成分の一つである。740 日間養液栽培した Gu2-3-2 の根は 1.0% 以上のリキリチンを含有していた。従って、養液

栽培法は甘草が含有するフラボノイド類の生産方法としても優れていると思われる。

3. 閉鎖型植物生産施設での養液栽培に適したウラルカンゾウ優良株の選抜

さらに甘草生産効率を高めるため、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部圃場で保存栽培を行っている3系統のウラルカンゾウの種子 (GuTS291-04, GuTS71-08, GuTS321-08) を材料に、優良系統の選抜を行った。3系統のうち、GuTS291-04は、前述のGuと同系統の植物体から得られた種子である。まず、3系統の種子より育成した植物体を前述の養液栽培装置に植付けて閉鎖温室内で半年および1年間栽培し、収量

と二次代謝物含量を調査した。いずれの系統も1年後の根のグリチルリチン酸含量は2.5%に満たなかった。生育および二次代謝物含量は系統間で大きく異なっており、いずれの形質もGuTS71-08系統が最高値 (根の収量: 10.8g, グリチルリチン酸含量: 1.5%) を示した (写真2)。

次に、優良株選抜のため、グロースチャンパー室内 (温度 25℃, 相対湿度 60%, 明期 18時間/日) でGuTS71-08系統種子より育成した植物体を4ヵ月間養液栽培し、収量と二次代謝物含量を調査した。その結果、グリチルリチン酸含量が高く根の収量が良好な優良株2クローンが得られた (写真3中の表)。本株は、前述のGu2-3-2に比べて植物組織培養での増殖効率が低いものの、養

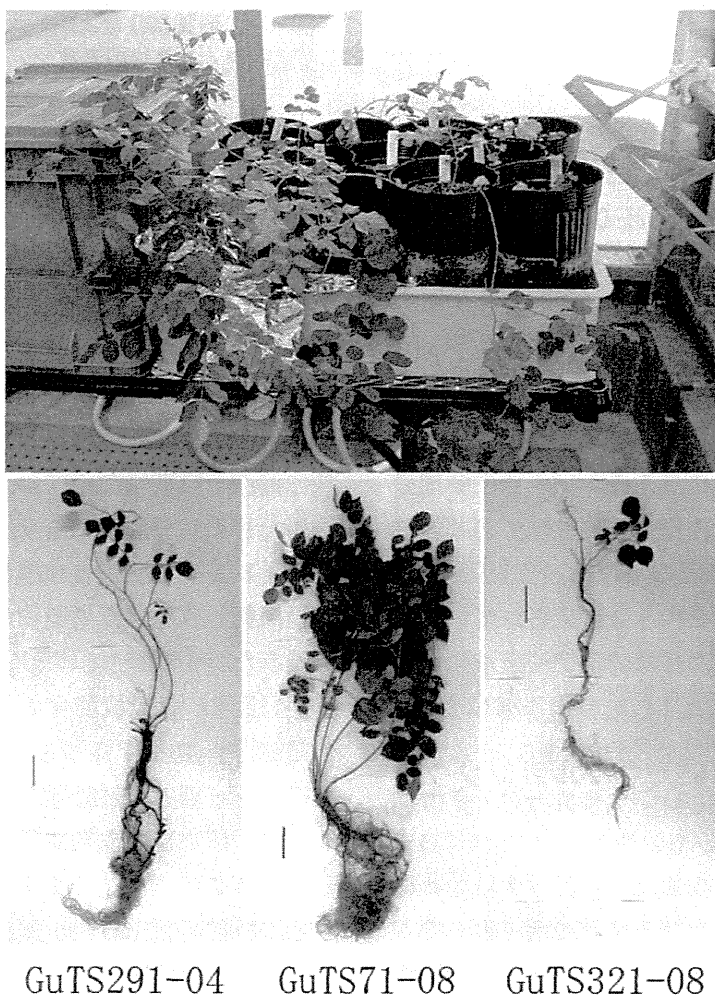


写真2 養液栽培1年後のウラルカンゾウ
(写真中のスケールは5 cm)

クローン	根の収量 (乾燥重 g)	グリチルリチン酸 含量 (%)	グリチルリチン酸 収量 (mg)
GuTS71-08IV1	7.8	2.1	161.7
GuTS71-08IV2	16.1	1.6	258.3

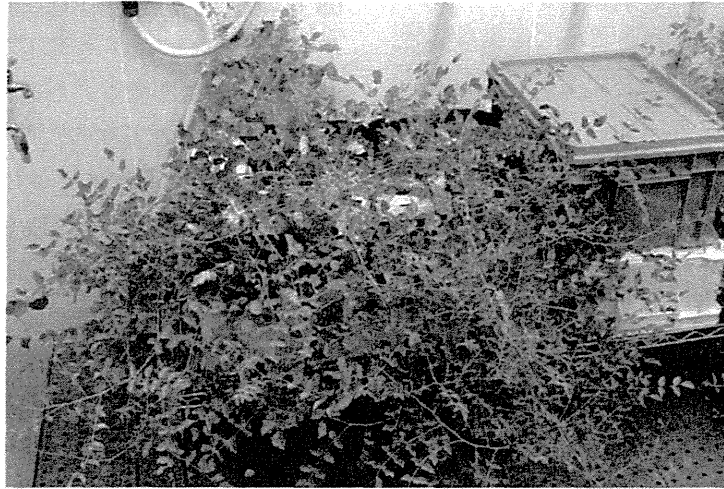


写真3 養液栽培4ヵ月後優良クローンの形質(表)および
GuTS71-08IV2 挿木苗の養液栽培4ヵ月後の写真

液栽培で得たストロンを挿し穂とする増殖が可能であった。得られた GuTS71-08IV2 挿木苗を同様にグロースチャンパー室内で養液栽培したところ、良好に生育し(写真3)、栽培198日後の根のグリチルリチン酸含量は2.5%、リキリチン含量は0.7%、グリシクマリン含量は0.3%であり、二次代謝物高生産性を維持していることを確認した。グリシクマリンもウラルカンゾウの主要成分の一つで、抗けいれん作用が報告されており、こむら返りに対し著効を示す漢方製剤「芍薬甘草湯」の薬理活性の一端を担うと考えられている成分である¹⁶⁾。これらの優良株および増殖法については特許を出願した¹⁷⁾。

4. 遺伝子情報を用いたウラルカンゾウ優良株の識別

優良株を知的財産権の観点から保護するためには、優良株を他系統および他株と識別する必要がある。そこで、客観的かつ迅速な識別を可能とするため、コメの優良品種の識別などに一般的に用いられている遺伝子レベルでの識別法の開発を試

みた。植物種や系統間の遺伝子識別法としては、植物に普遍的に存在する遺伝子(核リボソームDNAのITS領域、葉緑体DNAの *trnK*, *matK* および *rbcl* 遺伝子など)の塩基配列の変異を進化遺伝学的に解析し分類する手法や、制限酵素断片長多型(RFLP)法、増幅断片長多型(AFLP)法が一般的である。しかし、ウラルカンゾウ優良株の遺伝子識別においては、有用物質高生産株選抜のための育種マーカーとしての応用を期待し、グリチルリチン酸生合成酵素遺伝子を用いた迅速かつ簡便なカンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発を試みた。すなわち、グリチルリチン酸の生合成経路(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)および β -amyrin 11位酸化酵素(CYP88D6)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・解析し、優良株の識別が可能か否かを検討した。

スクアレン合成酵素(SQS)はグリチルリチン酸等のトリテルペン配糖体のみならず、植物ステ

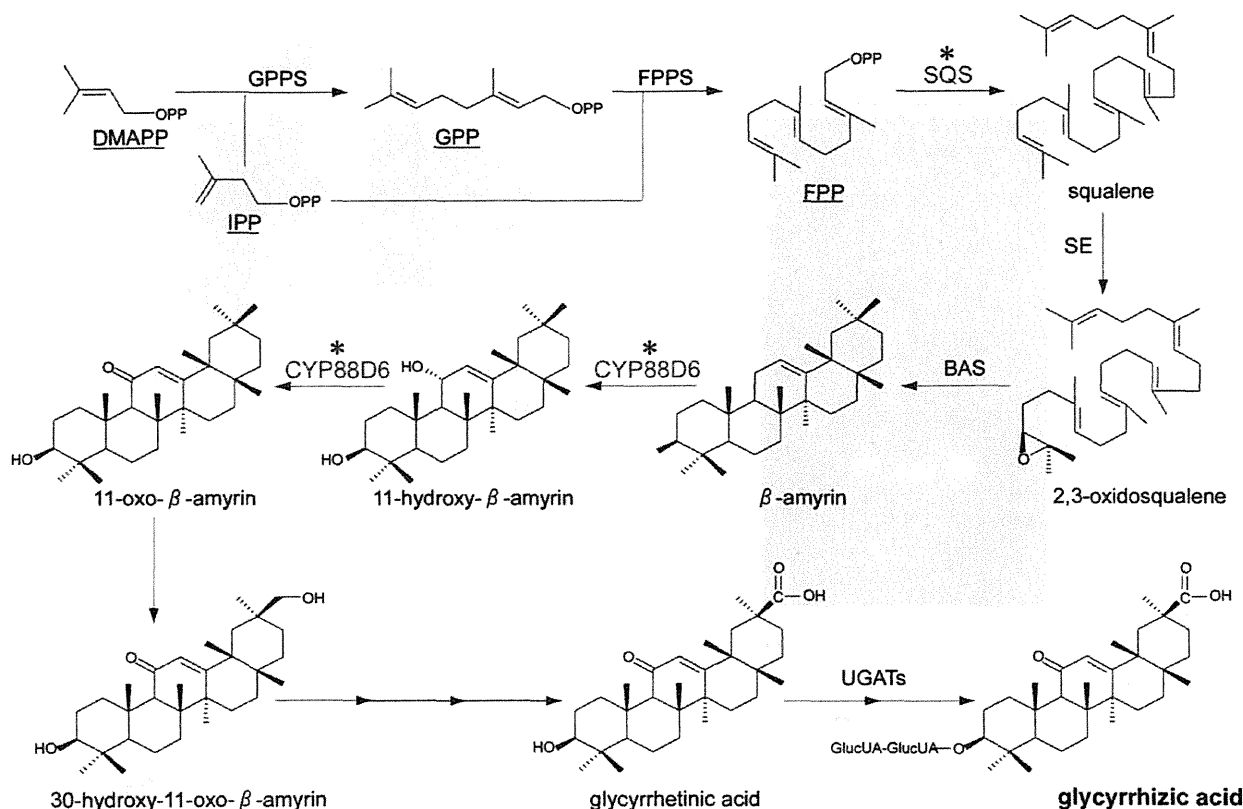


図1 カンゾウ属植物におけるグリチルリチン酸合成経路

(* : 解析対象)

DMAPP : dimethylallyl diphosphate, IPP : isopentenyl diphosphate, GPP : geranyl pyrophosphate, FPP : farnesyl diphosphate, GPPS : GPP synthase, FPPS : FPP synthase, SQS : squalene synthase, SE : squalene epoxidase, BAS : β -amyrin synthase, UGATs : UDP-glucuronosyltransferases

ロールの生合成にも関わる重要な酵素である。シロイヌナズナにおいては AtSQS1 (GenBank accession No. AF004560) および AtSQS2 (AF004396) の2種の相同遺伝子が見出されており、これらのゲノムDNA構造(エクソン・イントロン構造)においてはイントロンの挿入箇所がよく保存されている。カンゾウ属植物のSQS遺伝子においてもその構造は保存されていると推定されたため、エクソン1-3に相当する領域をPCRで増幅し、特にイントロン領域の多型情報を収集し、株間の遺伝子識別が可能か否かを検討した。

ウラルカンゾウ2株(GuTS71-08IV2およびGu2-3-2)より調製したゲノムDNAを鋳型に、SQS遺伝子増幅用プライマーでPCRを行い、増幅産物の塩基配列を解析した結果、各株より、それぞれSQS相同遺伝子(GuSQS1およびGuSQS2)

のエクソン1-3領域の塩基配列が得られた。これらの塩基配列の株間の変異点について設計した識別用プライマーセット2種を使用し、GuTS71-08IV2およびGu2-3-2各植物試料由来ゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。GuSQS2を標的としたプライマーセットでは、GuTS71-08IV2に約250 bpの増幅産物が得られ、一方、Gu2-3-2では増幅産物が検出されず、両者の識別が可能であった(図2右)。また、GuSQS1を標的としたプライマーセットでは、GuTS71-08IV2の方が増幅産物のサイズがGu2-3-2よりも若干大きく、その差異で識別が可能であった(図2左)。

CYP88D6は、グリチルリチン酸合成経路において β -amyrinの11位の酸化を触媒し、グリチルリチン酸非生産性のカンゾウ属植物では、相同遺伝子がコードする酵素の活性がかなり低いこ

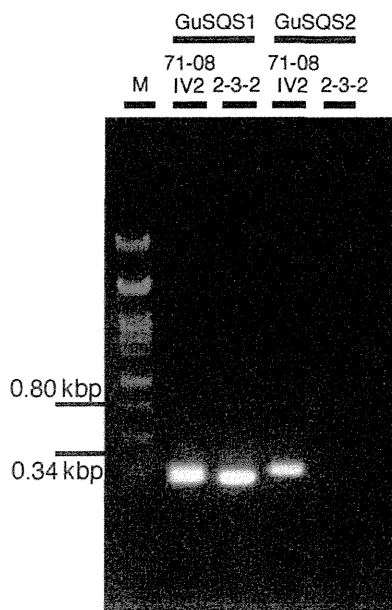


図2 GuS1およびGuS2特異的プライマーによるGuTS71-08IV2とGu2-3-2の識別
71-08IV2: GuTS71-08IV2, 2-3-2: Gu2-3-2, M: DNAサイズマーカー

とが報告されており¹⁸⁾, グリチルリチン酸生合成においてCYP88D6が重要な機能を担っていることが示唆されている。また, CYP88D6が属するCYP88Dサブファミリー遺伝子はマメ科植物に特異的に見出される遺伝子群であり, マメ科で特異的に進化し, トリテルペンサポニンの代謝に関与すると考えられている。このうち, ゲノム情報が公開されているタルウマゴヤシ, ミヤコグサのCYP88D遺伝子では, エキソン・イントロン構造がよく保存されていた。そこで, これらのゲノムDNA情報より, カンゾウ属植物のCYP88D6遺伝子のエキソン・イントロン構造を予測し, データベース上のCYP88D6遺伝子のコーディング配列(AB433179.1)をもとに, イントロン6および7を含む領域を増幅するプライマーを設計し, 株間のCYP88D6イントロン領域の塩基配列変異に着目した識別を試みた。

GuTS71-08IV2およびGu2-3-2について, CYP88D6のイントロン6および7を含む領域をPCR増幅し, 塩基配列解析を行った結果, イントロン6に関しては変異に富む配列が得られたが,

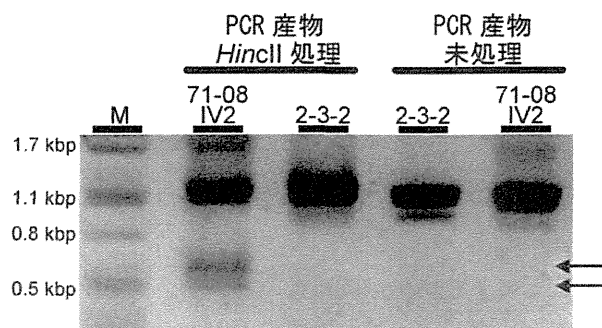


図3 PCR-RFLPによるGuTS71-08IV2とGu2-3-2の識別

71-08IV2: GuTS71-08IV2, 2-3-2: Gu2-3-2, M: DNAサイズマーカー, 矢印: *Hinc* II処理によるPCR産物の断片

株特異的ではなく, 本領域による識別は難しいと考えられた。一方, イントロン7では, 大きく分けて2種の配列が得られた。このうち, 一方は, GuTS71-08IV2に特異的であり, もう一方の共通配列には認められない*Hinc* IIサイトを含んでいたことから, PCR増幅産物の*Hinc* II処理を行った。その結果, GuTS71-08IV2由来のPCR増幅産物特異的に, 約600bpおよび500bpの制限酵素断片が得られ(図3), PCR-RFLP法により, 簡便にGuTS71-08IV2とGu2-3-2を識別できることが示された。

さらに, イントロン7の配列情報を精査した結果, GuTS71-08IV2と他のウラルカンゾウ系統およびスペインカンゾウ等のカンゾウ属植物とを識別可能であることも判明した。これらの変異点は, 少ないものでは数塩基であったが, 他の遺伝子領域の変異情報と組み合わせることにより, より精度の高い識別法が確立できるものと期待される。

5. 甘草の人工水耕栽培システムの開発

ウラルカンゾウの養液栽培に関する研究は, 「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発/植物利用高付加価値植物質製造基盤技術開発」(経済産業省), 「薬用植物資源の安定確保と有効活用のための基盤的技術の研究」(厚生労働省科学研究費補助金)の一環として2006年頃より開始し, 2008年下半期からは, 三者共同研究(医