

ンゾウ優良株の根において発現している遺伝子のリファレンスとするために構築した、ウラルカンゾウ GuIV1 株の EST ライブラリーについて、GL 生合成酵素遺伝子 (文献 1、2、3) が含まれているか確認するため、EST ライブラリーの fasta データ (G. uralensis. deg. fasta, G. uralensis. scf. fasta, G. uralensis. singleton. fasta) について BioEdit (文献 4) の local blast 機能を使用し、相同遺伝子を検索した。

2. 二次代謝関連遺伝子群の探索

EST ライブラリー (エクセルデータ) を二次代謝等に関連するキーワードにより検索した。これらについて EST ライブラリーのアノテーションリスト (annotated_transcripts_wgs_top_hit) 29,624 件中の "hit_title" の項目を検索した結果 (ヒット数) を集計した。さらに、二次代謝関連と考えられる遺伝子群のうち、ステロール代謝、糖転移酵素、メチル基転移酵素、チトクローム P450、そして転写調節因子群のそれぞれについて EST ライブラリーを検索し、関連遺伝子の抽出を行い、出現頻度を解析した。

B2. カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発 分析甘草試料

Glycyrrhiza uralensis Fisch. (Gu)、*G. glabra* L. (Gg)、*G. inflata* Batalin (Gi) を含むカンゾウ属植物の乾燥根、もしくは、乾燥ストロン、22 試料について、それぞれ、独立した 3~4 切片 (この切片が独立した個体由来か、同一個体由来かは不明) より、75% エタノールで洗浄したメス、解剖鋏、ピンセット等を使って、それぞれ 200~400 mg をサンプリングした。一部試料については、同一試料を分割し、一部は遺伝子解析に、残りの一部は、成分分析に用いた。

各甘草試料中の CYP88D6 相同遺伝子ゲノム DNA 配列 (イントロン 7 部分配列) の増幅

各試料より 20 ~ 50 mg を 2.0 mL 容滅菌凍結保存チューブ (ワトソン) に取り、ス

テンレスビーズ (φ 4.8 mm、トミー精工) 2 個とともに、液体窒素で凍結後、ビーズ破碎装置 Micro Smash MS-100 (トミー精工) を用いて、3,000 rpm、60 秒間の条件で 1 回破碎し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、付属のマニュアルに従って、ゲノム DNA を抽出した。次いで、得られたゲノム DNA を鋳型とし、GoTaq Green Master Mix (Promega) を用いて、下記条件にて PCR を行い、増幅産物は 1% アガロースゲル電気泳動により確認した。

(PCR 条件)

- ・ PCR 機器 : 2720 Thermal Cycler (ABI)
- ・ 反応液組成 : GoTaq Green Master Mix : 7 μ L、100 μ M CYP88D6 intron7 Forward (Fw) primer : 0.1 μ L、100 μ M CYP88D6 intron7 Reverse (Rv) primer : 0.1 μ L、genome DNA : 1 μ L、滅菌水 : 5.8 μ L [total : 14 μ L]
- ・ 反応条件 : 94°C 2 min \rightarrow (94°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 30 sec) \times 35 cycle \rightarrow 72°C 5 min \rightarrow 4°C ∞

(プライマー配列)

- ・ CYP88D6 intron7 Fw : 5' -tagtgccctttaagcacatgg-3'
- ・ CYP88D6 intron7 Rv : 5' -tcacgcgtataattgtagcactc-3'

PCRダイレクトシーケンスを用いた各甘草試料中の CYP88D6 相同遺伝子のイントロン 7 配列の遺伝子型の解析

PCR 産物 4.0 μ L に対して、illustra ExoStar (GE healthcare) の Exonuclease I 及び Alkaline phosphatase を、それぞれ、0.5 μ L ずつ加え、37°C で 30 分間、80°C で 15 分間反応し、未反応のプライマー等を除去した。ExoStar 反応液のうち 2 μ L を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いてマニュアルに従い、CYP88D6 intron7 Fw、あるいは、Rv プライマーにより cycle sequence 反応を行った後、Fast gene Dye Terminator 除去キット (日本ジェネティクス) で精製し、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer (ABI) を用い

て塩基配列を解析した。

甘草試料中の二次代謝物の HPLC 分析

甘草試料 (22 サンプル) をビーズ破碎装置、あるいは、乳鉢・乳棒を用いて粉末にまで破碎し、そのうち約 50 mg を精密に秤量後、50% エタノール 7 mL を正確に加え、超音波洗浄機で 30 分間、ボルテックスミキサーで 1 分間抽出した。抽出液を 4,500 rpm で 3 分間、遠心分離した後、上清 300 μ L を ultrafree-MC (Millipore) に取り、15,000 rpm、20°C で 1 分間遠心濾過した。その上清 5~20 μ L を以下の条件で HPLC 分析に供し、GL、リクイリチン、イソリクイリチン、グリシクマリチン、グラブリジンの定量を行った。

(HPLC 条件)

装置 : ALLIANCE HT (Waters)

カラム : TSKgel ODS-100V (TOSOH、径 4.6 mm \times 250 mm、5 μ m)

移動相 : (溶媒 A) アセトニトリル、(溶媒 B) 1% 酢酸、0~21 min : 20~76% B、21~22 min : 76~100% B、22~24 min : 100% B、24~25 min : 100~20% B

流速 : 1.0 mL/min、カラム温度 : 40°C

検出 : 254 nm (定量)、200 - 400 nm (定性)

B3. ウラルカンゾウ挿し木苗の根をモデル解析系とした、根の部位別 GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析

ウラルカンゾウ無菌培養物 (ESTライブラリー構築用試料)

ウラルカンゾウ優良系統 GuTS71-08#11 (枝番 : 1-1、培地略号 : MES (1) IB0. 1、培養期間 : シュート植え継ぎ後約 2 ヶ月) 及び、Gu2-3-2 (培地略号 : WPG、培養期間 : シュート植え継ぎ後約 2 ヶ月) の 2 系統を材料とした。培養条件は、温度 23°C、14 時間明、10 時間暗である。

ウラルカンゾウ ESTライブラリーの解析

ウラルカンゾウ無菌培養物 2 系統より調製した total RNA についてそれぞれ、かずさ DNA 研究所において、*de novo* トランスクリプト

ーム解析を行った。以下にその概要を記す。

試料の total RNA より次世代シーケンサー用試料を調製し、HiSeq1000 (Illumina) を用いペアエンド (2 \times 100 bp) の解析を行った。ここで得られた配列情報を Quality および length (49 base cut) で trimming し、公開 EST データとして整理するとともに、*de novo* アセンブリに供した。ここで、同一植物種・複数系統の場合はリードを混合して contig を作製した。

作製された contig データについて、150 bp 以下のもの及び公開 EST データに含まれないものを除外し、得られたユニークな配列を unigene とし、blastx による機能アノテーションを行った。

さらに、同一植物種・複数系統の試料の場合は contig 配列情報について発現量の目安となる Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads (RPKM) 値*の算出を行った。

*RPKM 値 : 各遺伝子に対するシーケンス配列 (read) 数を遺伝子発現量として換算する際、総 read 数が 100 万 (one million) かつ各遺伝子の配列長を 1,000 塩基 (one kilobase) として正規化した値。

ウラルカンゾウ挿し木苗 (遺伝子発現解析用)

GuIV1、GuIV2、GuTS71-08#11 各系統水耕栽培株の地上茎よりバーミキュライトに挿し木したものを材料とした。栽培条件は下記のとおり。灌水 : アラシステム底面灌水。施肥 : マグアンプ K (ハイポネックスジャパン) 5 g/トレイ、月 1 回。閉鎖 2 温室にて栽培 (温度 25°C、相対湿度 60%、照明明期 16 時間、補光照明使用)。

ウラルカンゾウからの total RNA の調製

ウラルカンゾウ挿し木苗の根は Milli-Q 水で洗浄したのち、上部 (地上部基底直下) と中下部 (中央から下の部分) に分け、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) で total RNA を調製した。

Total RNA の調製には RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用した。根試料約 100 mg

をステンレスボール2個及び、buffer RLT 600 μ L、 β -ME 6 μ Lと共に2mLチューブに入れMX-100で3,000 rpm x 2回粉碎を行った。以後キットのプロトコルに従い調製を行い、最終的に60 μ Lのtotal RNA溶液を得た。このtotal RNA溶液の2 μ Lを使用し、分光光度計ND-1000 (Thermo)を用い、吸光スペクトルの測定を行い品質及び濃度の確認を行った。また、同溶液の3 μ Lをアガロースゲル電気泳動に供した。

得られたtotal RNAはTURBO DNA Free (Ambion)でDNase処理し、total RNAとして350 ngをRT-PCR及び定量real-time PCRに使用した。

GL生合成酵素遺伝子発現解析用プライマーセット(半定量RT-PCR)

半定量的RT-PCRにはSekiらの報告(文献3)に記載のプライマーセットを使用した。*CYP72A154*用のプライマーについてはgenome DNAのコンタミネーションの影響を受けないよう、*CYP72A154*のExon4とExon5のボーダー上でプライマーCYP72A154-1131Sを設計した。

[1] bAS RT-PCR primers

GubAS-sense:5'-ATCAATGTTGCCTCCAGAGAT
TGTGGG-3'

GubAS-antisense:5'-GTGCTCACACAGCTTTT
AAGTTAAAC-3'

[2] CYP88D6 RT-PCR primers

GuCYP88-sense:5'-ACCCGTTGTGGATGAAAGG
CGGTTGAT-3'

GuCYP88-antisense:5'-CTAAGCACATGAAAC
CTTTATCACCT-3'

[3] CYP72A154 RT-PCR primers

GuCYP72-sense:5'-AAGCACCGATGACGACTTA
T-3'

GuCYP72-antisense:5'-TTACAGTTTATGCAG
AATGATGGGTGCC-3'

CYP72A154-1131S primer (Exon4-5
border): 5'-AGGTCGCCTCAAAATTGTAAC-3'

[4] β -tubulin RT-PCR primers

GubTub-sense:5'-CGTGGGTCACAGCAATACAG
GGCT-3'

GubTub-antisense:5'-CCTCCTGAAGTTCTTC

CTCGTCTTC-3'

GL生合成酵素遺伝子発現解析用プライマーセット(定量realtime-PCR)

GuIV1のESTライブラリーのGL生合成酵素遺伝子相同遺伝子について定量real-time PCR用プライマーをPrimer Express Software (Life Technologies)を用い設計した。

半定量的RT-PCR

各系統の根試料より調製したDNase処理済みtotal RNAについて、逆転写酵素にSuperscript III (Invitrogen)、PCRにExTaq (TakaraBio)を使用し、RT-PCRを行った。

PCRサイクル数は*CYP88D6*のみ35 cycleで、他は30 cycleで行った。なお、コントロールには恒常的に発現する β -tubulinを用いた。PCR反応終了後、反応液はアガロース電気泳動に供し、増幅産物のバンドのサイズ及び強度を解析した。

定量realtime-PCR

各試料より調製したtotal RNA 350 ngを鑄型として、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio)を使用し、逆転写反応を行った。この反応液を5倍希釈したものを試料として、SYBR® Premix Ex Taq™II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio)を用い、定量real-time PCR (反復well数:3)を行った。なお、リアルタイムPCRの機器はABI PRISM® 7000(Life technologies)を使用した。各遺伝子の発現量は β -tubulinの発現量を基準とし、 $\Delta\Delta Ct$ 法により求めた。

B4. ウラルカンゾウ挿し木苗を用いたGL生合成酵素遺伝子群のストレス負荷応答解析研究材料

ウラルカンゾウ *Glycyrrhiza uralensis* 優良系統 Gu#11 系統、水耕栽培株地上茎より挿し木により増殖した水耕栽培苗(挿し木苗)を材料とした。

バーミキュライトを充填したアラシステムに挿し木後、約7か月水耕栽培した株、7個体(1個体は予備)を各ストレス処理及び

コントロールに使用した。

栽培条件は下記のとおり。灌水：アラシシステム底面灌水。施肥：マグアンプK（ハイポネックスジャパン）5 g/トレイ、月1回。温度25°C、相対湿度60%、照明明期16時間、補光照明使用。

挿し木苗のストレス処理

ウラルカンゾウ水耕栽培苗に付加するストレス条件として文献 5 を参考として下記条件を設定した。

塩ストレス(S)：200 mM NaCl（RO 水に溶解）
浸透圧（疑似乾燥状態）ストレス(P)：15% PEG6000（RO 水に溶解）
コントロール(C)：RO 水

挿し木苗を水耕栽培のアラシシステムトレイより各ストレス負荷試験トレイに移動し、地表部よりストレス試験水耕液を供給し、支持体（バーミキュライト）中の水耕液を置換することにより、試験を開始した。試験開始(0d)後1日後(1d)、または3日後(3d)に各試験区それぞれ3株をサンプリングした。

GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析

ストレス負荷試験開始後1日後、または3日後に各試験区それぞれ3株をサンプリングした。

ストレス処理した苗及び、対照区の根を基部から5 cmの部分をサンプリングし、4.8mm径ステンレスボール2個とともに2 mL容のサンプリングチューブに入れ、新鮮重測定後、液体窒素で凍結し、以降の処理まで-80°Cフリーザーにて保存した。Total RNAの調製にはRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)をプロトコルに準拠し使用した。試料チューブを液体窒素で5 min凍結し、MX-100(トミー精工)で2,500 rpm x 2回粉砕を行った。これに、buffer RLT 600 mL、 β -ME 6 mLを加えさらにMX-100で3,000 rpm x 1回破碎した。以後キットのプロトコルに従い調製を行い、最終的に65 mLのtotal RNA溶液を得た。このtotal RNA溶液の2 mLを使用し、分光光度計ND-1000(Thermo)を用い、吸光スペクトルの測定を行い品質及び濃度の確認を行っ

た。また、同溶液の3 mLをアガロースゲル電気泳動に供した。

得られたtotal RNAはTURBO DNA Free (Ambion)でDNase処理し、RT-PCR及び定量real-time PCRに使用した。

GL 生合成酵素各遺伝子(*bAS*、*CYP88D6*、*CYP72A154*)の発現量は、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio)を使用し、各検体のtotal RNA 240 ngを鋳型として逆転写反応を行ったものを5倍希釈し、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, Takara Bio)を用いrealtime-PCR法(反復well数:3)により定量した。

発現量の相対定量は、 β -*tublin*遺伝子を対照として使用し、Comparative CT法($\Delta\Delta Ct$ 法)で行った。各遺伝子のrealtime-PCRに使用したプライマーは本分担研究のウラルカンゾウGuIV1系統ESTライブラリーの解析結果よりデザインしたものである。

Realtime-PCRはABI PRISM 7000 Sequence Detection System (ABI)を使用し、増幅データの取得及び解析には、ABI PRISM 7000 SDSソフトウェアを用いた。

統計解析にはR(ver 2.14.1)を使用し、Tukey法による検定を行った。

シロイヌナズナに対するストレス負荷試験

ウラルカンゾウ水耕栽培苗と同様のストレス負荷試験をシロイヌナズナに対して行った。供試したシロイヌナズナは*Arabidopsis thaliana* Col-0系統である。

バーミキュライトを充填したアラシシステムにHyponex(N-P-K=6-10-5、ハイポネックスジャパン)2000倍液を底面灌水で供給したものに種子を播種した。播種後、4°Cで2日間春化(低温)処理したのち、グロースチャンバー(GC)2室(温度25°C、相対湿度60%、明期16時間)に移設し栽培した。播種後18日後に水耕養液をHyponex 2000倍液から200 mM NaCl溶液(RO水)または15%PEG6000溶液(RO水)に置換し、処理開始前(0d)、1日後(1d)、3日後(3d)、5日後(5d)の地上部の状態を観察した。

C. 研究結果

C1. ウラルカンゾウ EST ライブラリーの構築及び解析

ウラルカンゾウ優良株 EST ライブラリーの概要

本研究に供したウラルカンゾウ優良株水耕栽培株由来の EST ライブラリーの概要は下記の通り。総遺伝子数：42,280、クラスター数：40,278、アノテーションのついた遺伝子数：29,624、GO アノテーションのついた遺伝子数：11,540、Interpro アノテーションのついた遺伝子数：14,669、KEGG ID がアノテーションされた遺伝子数：2,214、EC number がアノテーションされた遺伝子数：903。

GL 生合成遺伝子の探索

人工水耕栽培環境下で栽培したウラルカンゾウ GuIV1 株の EST ライブラリーについて、GL 生合成酵素遺伝子の探索を行ったところ、既報（文献 1、2、3）の GL 生合成酵素遺伝子群が含まれていることが示された。

二次代謝関連遺伝子群の解析

二次代謝に関連するキーワードで EST ライブラリーを検索したところ、下記のように、ヒット件数が集計された。

1. Cytochrome P450 関連

EST ライブラリー（アノテーション結果）を“P450”で検索した結果、152 件のヒットがあった。これらのうち、相同性の高い CYP のファミリー番号のアノテーションがついているものが、51%、ついていないものが 44% であり、残りの 4% が、transcinnamate 4-monooxygenase、1% が brassinosteroid 代謝系、そして 1% が P450 reductase と機能推定された。なお、11 位の酸化酵素である CYP88D6 はファミリー番号のアノテーションがついたグループに見いだされたが、30 位の酸化酵素である CYP72A154 は、ファミリー番号のアノテーションが付かないグループに分類されていた。これは、アノテーションの際に使用したデータベースに、CYP72A154

が登録されていなかったためと推定される。

2. ステロール関連

EST ライブラリー（アノテーション結果）を“sterol”で検索すると 24 件、また“squalene”で検索すると 12 件のヒットがあった。これら合計 36 件のうち、sterol または triterpene の骨格形成に至る生合成経路の酵素遺伝子のホモログは、squalene synthase (SQS) が 17%、dehydro squalene desaturase が 8%、そして oxidosqualene の生合成に関わると考えられる squalene monooxygenase のホモログが 6%、presqualene diphosphate phosphatase が 3% の合計 34% を占めた。

また、植物ステロール生合成に関わると推定される sterol 24 位の methyl transferase (C24 SMT) は 14%、3 位の糖転移酵素 3 β -SGT のホモログが 8%、oxidase または reductase が 11%、oxysterol binding protein のホモログが 22%、acyl transferase と機能推定されるものが 5% であった。

3. フラボノイド関連

EST ライブラリー（アノテーション結果）を“flav”で検索した結果を精査したところ、flavonoid の代謝に関連すると考えられるヒットは 108 件であった。

これらのうち、糖転移酵素のホモログは 15%、そのうち、1% は UDP-glucose flavonoid 7-O-glucosyltransferase のホモログであった。また、メチル基転移酵素も isoflavone-4' OMT が 2% アノテートされていた。特にアノテートされた割合が多かったのは isoflavone reductase 26%、dihydroflavonol 4-reductase 16%、dihydroflavonol reductase 8% と reductase が多く、flavonoid 3'-hydroxylase 7%、flavanone hydroxylase 6%、isoflavone 2'-hydroxylase 4%、flavonoid 3',5'-hydroxylase 1%、flavonoid 3'-monooxygenase 5% と、酸化還元に関係する酵素の頻度が高いことが判明した。

4. 糖転移酵素関連

EST ライブラリー (アノテーション結果) を "glycosyl" で検索した結果を精査したところ、糖転移酵素に関連すると考えられるヒットは 79 件であった。そのうち、アントシアニン生合成関連等のフラボノイド代謝に関係すると推定されるものは、anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 18%、anthocyanidin 5,3-O-glucosyltransferase 6%、anthocyanin 3'-O-β-glucosyltransferase 5%、isoflavonoid glucosyltransferase 6%、glycosyltransferase 71D1 (quercetin 3-O-glucosyltransferase) 3%、7-O-glucosyltransferase 1%、の合計 39% を占めた。

一方、ステロール骨格への糖付加を行う、sterol glucosyltransferase は 5% であり、abscisate β-glucosyltransferase のホモログも 4% 存在した。なお、糖転移酵素については、詳細な機能推定ができないものがヒットの 52% にのぼった。

5. 転写調節因子関連

EST ライブラリー (アノテーション結果) について各種転写調節因子名で検索を行い、結果を精査したところ、MYB/MYC、WRKY、bHLH、DREB に対するヒット数はそれぞれ、88、79、76、3 であった。

C2. カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発

基原植物として、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草試料より、ゲノム DNA を抽出し、抽出 DNA を鋳型に *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の増幅を行った。その結果、これら PCR 産物は、増幅の有無やサイズの違いから、(a) 約 300 bp の増幅が認められる Gu 由来の IV2 タイプ、(b) 約 450 bp の増幅が認められる IV1/g タイプ (増幅サイズだけでは、Gu 由来の IV1 タイプと Gg 由来の g タイプ配列の区別は困難)、(c) a、b 両方の増幅が認められる IV1/g + IV2 タイプ、(d) 増幅が認められないタイプの 4 タイプに分類可

能であった。なお、(d) タイプで増幅が認められなかった原因としては、ゲノム DNA の品質等により PCR が機能しなかった可能性、プライマー設計部位に変異がある可能性 (例: Gu2 タイプ) 等が考えられる。また、基原植物情報が Gg の試料において、これまで Gu に特異的に認められていた IV2 タイプの配列と同サイズの増幅が認められたなど、一部試料で基原植物情報と矛盾する結果が得られた。このことから、異なる基原植物の混入の可能性、あるいは、これまで得られていなかった新規配列の存在が示唆された。

次いで、得られた PCR 増幅産物について、PCR 産物の一部を精製し、配列解析を行った。PCR ダイレクトシーケンスの結果、単一配列が増幅された試料も認められたが、複数配列が増幅された試料も多く認められた。このような場合、本来であれば、それぞれの増幅産物をクローニング後、シーケンスする必要があるが、これまでの配列解析結果をもとに含まれる配列を推定可能なため、推定配列を混合した際の予測波形と実際に得られたシーケンスの波形データに矛盾がないか検証することにより、含まれる配列を推定した。

塩基配列の解析の結果、*CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の遺伝子型はほとんどのサンプルで基原植物情報と一致した。しかし、M06-② (基原植物情報: Gi ⇔ 遺伝子型: IV1+IV2)、M10-① (Gi ⇔ IV1+g)、M12-①, ② (Gg ⇔ IV1+g)、M21-① (Gu ⇔ g) など、一部で基原植物情報と異なる遺伝子型が検出された。また、今回の分析試料からは、基原植物情報が Gg の試料の一部より新規配列として、従来得られていた Gg の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列 (g1) と比較し、約 120 bp の欠失が認められた配列 (g2)、及び、3 bp の欠失が認められた配列 (g1-3) が得られた。

成分分析の結果、すべての試料より、GL が検出されたが、その含量は、0.7%~6.0% であり、日本薬局方の規格値 2.5% を満たしているのは、22 試料中 12 試料であった。基原植物が Gu の試料に着目すると、規格値を満たす試料は、8 試料中 3 試料であり、そのう

ち遺伝子型を決定できた 2 試料 (M18-①、M19-①) の遺伝子型は、いずれも、IV1+IV2 タイプであった。

Gu の一部は、特徴的にグリシクマリンを含有することが知られているが (文献 6)、今回分析した Gu 試料中にグリシクマリンを含有する試料は認められなかった。一方で、Gi 試料のうち、2 試料 (M07-①、M10-①) でグリシクマリンが検出された。このうち、M10-①の遺伝子型は、IV1+g であった。

Gg は、特徴的にグラブリジン含有することが知られているが (文献 6)、今回分析した Gg 試料からは、すべてグラブリジンが検出された。さらに、Gi 及び Gu 試料の一部 (M08-①、M09-①、M21-①) からもグラブリジンが検出され、特に基原植物情報が Gu の M21-①の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列の遺伝子型は、Gu タイプ (IV1 or IV2) ではなく、Gg タイプ (g1) であった。

C3. ウラルカンゾウ挿し木苗の根をモデル解析系とした、根の部位別 GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析

ウラルカンゾウESTライブラリーの解析

ウラルカンゾウ無菌培養物2系統のリードを混合して得られた全contigの発現量をプロットした結果、発現量に差のある遺伝子が相当数あることが明らかになった。特に、GL 生合成経路の酵素遺伝子の発現量についてRPKM値をもとに検討すると、11位の酸化に関わる *CYP88D6* がGu2-3-2系統においては発現が検出されなかった。*CYP88D6* はこれらの酵素のなかでも発現量が低いと考えられ、特に幼植物期におけるGL生産量のボトルネックになっていることが示唆された。

ウラルカンゾウ挿し木苗におけるGL生合成酵素遺伝子の発現解析

半定量RT-PCR解析の結果、*CYP88D6* は部位間での発現量の差が *bAS*、*CYP72A154* と比較して大きいことが判明した。

CYP72A154 においては約1 kbpの位置にバンドが認められたが、これはsense primer をExon4-Exon5の境界に設定しても同様に増

幅が認められるため、antisense primerによる非特異的増幅と考えられる。

定量realtime-PCRの結果も半定量RT-PCRと同様の傾向を示し、各遺伝子の発現量は、根上部の方が根中下部と比較して高い傾向が認められた。すわなち、根の成長 (太さ) と関係するものと考えられる。特に、*CYP88D6* は部位間での発現量の差が *bAS*、*CYP72A154* と比較して大きく、GL生産のボトルネックとなっていると考えられる。

C4. ストレス処理に対する GL 生合成遺伝子群の発現応答解析

ストレス処理前及びストレス処理後のウラルカンゾウ挿し木苗の地上部の状態を比較したところ、地上部の生育に関してはストレス処理区とコントロール (R0 水) 区においてストレス処理後 11 日間 (11d) まで両者に顕著な差異は認められなかった。

[ストレス処理 1d における発現量変動]

1 日間ストレス処理を施した場合、塩ストレス (NaCl) 処理においては *CYP88D6* の発現レベル低下が認められた。疑似乾燥ストレス (PEG6000) 処理においては、3 遺伝子とも低下したが、*bAS*、*CYP88D6* においては有意であり、とくに *CYP88D6* の発現レベル低下が顕著であった。

[ストレス処理 3d における発現量変動]

3 日間ストレス処理を施した場合は、非ストレス負荷区であるコントロールの個体間の各遺伝子の発現レベル差異が大きかった。この原因のひとつとしては、コントロールとして使用した R0 水により養分枯渇状態となり、これがストレスとなったためと考えられる。塩ストレス処理においては *CYP88D6* の発現レベル低下が認められた。疑似乾燥ストレス処理においては、3 遺伝子とも発現レベルが低下したが、有意差は認められなかった。ストレス処理区における発現応答の全体的な傾向は 1d と類似していた。

シロイヌナズナに対するストレス負荷試験

シロイヌナズナは 3d 以降、塩、疑似乾燥ストレス両条件下において葉にダメージが生じはじめた。

これに対してウラルカンゾウはいずれの条件下でも 3d 以降、落葉が顕著になり、5d には葉の褐変化が認められた。11d に地上部はほぼ枯れたが、地下部（根）は生存しており、シロイヌナズナと比較してこれらのストレスに耐性を示すことが明らかになった。

なお、ウラルカンゾウにおいては対照区（R0 水）においてもストレス区と同様に地上部が枯れていることから、地上部の枯死は水耕液を R0 水ベースのストレス試験溶液に変更したことによる養分の不足が原因と考えられる。

D. 考察

D1. ウラルカンゾウ EST ライブラリーの構築及び解析

人工水耕栽培ウラルカンゾウ優良株 GuIV1 より構築した EST ライブラリーは、これまでに報告されている GL 生合成関連遺伝子群を含有していることが確認された。これは、本ライブラリーがウラルカンゾウの発現遺伝子解析において、リファレンスとなるライブラリーであることを示すものである。

今回の EST ライブラリーに含まれる二次代謝関連遺伝子群、そして転写調節因子遺伝子群の検索を行ったが、アノテーションのついたものはライブラリー中の遺伝子の一部に過ぎない。また、アノテーションのついたものも、ここで示された機能は推定にすぎず、それぞれの機能の確定には酵母等の異種発現系での解析が必要である。

今後、これまでモデル植物において精力的に解析されてきた、乾燥ストレス等への応答の研究結果をふまえ、本 EST ライブラリーの情報を基盤情報として、乾燥、水浸等（文献 5）の各種ストレス条件下、また、生育ステージにおける、二次代謝関連遺伝子の発現変動の解析を進めることにより、有用物質生能を有する、非モデル植物のそれらの物質生産に関連するマーカー遺伝子群を見出すことができると考えている。

D2. カンゾウ属植物の遺伝子識別法の開発

基原植物として、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草 22 ロット・66 試料よりゲノム DNA を抽出し、その多くより *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 の部分配列を取得した。これら配列中には、Gg 由来の新規イントロン配列が 2 種含まれていた。このうち、一方の配列は、約 300 bp であり、IV2 タイプのイントロン配列と増幅サイズが近いことから、本領域では、PCR の増幅サイズのみで基原植物を判別できないことが判明した。したがって、確実に *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列の遺伝子型を IV2 タイプと判定するには、PCR 産物の制限酵素処理、あるいは、配列解析等が必要であると考えられた。

Gi 試料 (M06~10) では、PCR の増幅が困難なものが多く、試料の状態からゲノム DNA の抽出が困難である可能性、プライマー設計部位に変異がある遺伝子を有している可能性等が考えられ、今後、*CYP88D6* 遺伝子の別部位、あるいは、*CYP72A154* 等、別遺伝子に対するプライマーを用いて検証する必要があると考えられた。また、以前、昭和大学の磯田先生より御供与いただいた Gi の葉のゲノム DNA からは、Gi 特異的な *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 部分配列として、Gg の g1 と 1 塩基異なる配列 (i1) を得ていたが、今回の Gi サンプルからは、i1 を得ることができなかった。以上より、i1 配列は、昭和大学の株に特徴的な変異であった可能性が考えられ、g1 を有し、i1 を持たない個体も Gg であるとは言えない可能性が明らかとなった (Gg と Gi 両方の可能性あり)。ただし、成分分析結果から、Gi サンプルの一部からは、Gu 特徴的成分であるグリシクマリン、あるいは、Gg 特徴的成分であるグラブリジンが検出されており、今後、Gi に特徴的成分であるリコカルコン A (文献 6) の分析を含め、より詳細な成分分析、あるいは、既に Gi の遺伝子識別において報告のある *matK* 領域 (文献 6) 等、他の遺伝子の配列情報と合わせて植物種を同定する必要がある。

ると考えられる。

配列情報を得ることができた 54 試料中 5 試料 (M06-②: Gi ⇔ IV1+IV2, M10-①: Gi ⇔ IV1+g1, MS12-①, ②: Gg ⇔ IV1+g1, M21-①: Gu ⇔ g1) で、基原植物情報と異なる *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列の遺伝子型が検出された。このうち、成分分析の結果から、M10-①では、Gu に特徴的な成分グリシクマリンが、また、M12-①、M21-①では、Gg に特徴的な成分グラブリジンが検出されるなど、特に、M10-①及び M21-①では、遺伝子型のデータを裏付ける結果が得られた。以上より、今後、これら基原植物情報と遺伝子型が一致しなかった試料についてもより詳細な成分分析や他の遺伝子領域の配列情報と合わせて、総合的に基原植物を判断する必要はあるが、本遺伝子領域が、甘草試料中の基原植物の識別 (Gu と Gg) にも有用であることが示された。

D3. ウラルカンゾウ挿し木苗の根をモデル解析系とした、根の部位別 GL 生合成酵素遺伝子群の発現解析

ウラルカンゾウにおける環境因子と GL 生産性の関係については、温度や土壤中の塩濃度等の GL 生産性に与える影響については研究例があるが、GL の生合成に関わる酵素遺伝子レベルでの環境因子との相関を解析した例はない。上記の結果は、ウラルカンゾウの挿し木苗が GL 生合成酵素遺伝子群の発現変動の解析モデルとして使用できることを示すもので、今後、栽培環境因子等と各種遺伝子の発現変動との相関の解析に用いることができると考えられる。

ウラルカンゾウ培養物 GuTs71-08#11 系統及び、Gu2-3-2 系統のトランスクリプトーム解析により Gu2-3-2 系統において、*CYP88D6* 遺伝子の発現が検出されなかった。両者はサンプリング株の写真をみると、GuTs71-08#11 系統においては、根の成長は認められるが細根の成長が芳しくないのに対し、Gu2-3-2 系統においては細根の成長が良い。この形態の差は、細根において *CYP88D6* の発現量が低いという realtime-PCR の解析の結果と矛盾し

ない。なお、両培養物は、使用する培地が異なっており、とくに植物ホルモンの添加が *CYP88D6* の発現レベルに影響した可能性もある。植物ホルモンの GL 生合成遺伝子群の発現調節に与える影響についても興味深い。

D4. ストレス処理に対する GL 生合成遺伝子群の発現応答解析

今回のウラルカンゾウ幼植物におけるストレス応答実験の結果から、GL 生合成酵素遺伝子 3 種のなかでは、*CYP88D6* 遺伝子の発現量のストレス負荷による変動がもっとも顕著であった。これは、昨年度実施した、幼植物根の基部と先端部における GL 生合成遺伝子群の発現解析において、両部位における遺伝子発現の差が *CYP88D6* においてももっとも顕著であったこととよく対応し、本遺伝子が、ウラルカンゾウの GL 生合成経路のボトルネックとなっていることを裏付けるものと考えられる。

今回のウラルカンゾウ水耕栽培苗根におけるストレス応答実験結果から、少なくとも今回供試したような幼植物期においては、高塩濃度や（疑似）乾燥状態は GL の生合成遺伝子の発現量を低下させ、ひいては GL の生産を抑制すると考えられる。

ウラルカンゾウは乾燥地域に自生し、日本のような高温多湿の気候は栽培に不向きと一般に認識され、乾燥した風土や、土壤中の塩分によるストレスが二次代謝産物である GL の生産を誘導する可能性があると考えられていたが、今回の結果はこれを否定するものであり、水耕栽培においては、水分が過剰な状況においても旺盛に生育し、十分量の GL を生産することと矛盾がない。中国東北部で、自然環境下、乾燥または塩分濃度の高い地域に生育しているウラルカンゾウは、長期間を経て GL を生産・蓄積していると考えられる。

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいては、ウラルカンゾウの EST、トランスクリプトーム情報の解析・収集を行っている。今後、ウラルカンゾウ水耕栽培苗を材料とした発現解析モデルシステムとこれら

の情報を活用し、より詳細なウラルカンゾウの栽培及び、GL 生産に適した栽培条件の最適化を進めることができると考えられる。また、これらのモデル実験で蓄積された知見は、幼植物苗のみならず、圃場栽培植物の根における土壌条件や気候条件の差異が GL 生産におよぼす影響の解析の基盤情報となるものと期待される。

E. 結論

人工水耕栽培ウラルカンゾウ優良株 GuIV1 より構築した EST ライブラリーについて、グリチルリチン酸合成関連遺伝子群及び、二次代謝関連遺伝子群の探索を行ったところ、GL 生合成酵素遺伝子群の含有が確認された。また、チトクローム P450、糖転移酵素等の二次代謝関連遺伝子群も多数含まれていることが判明し、本ライブラリーがウラルカンゾウの発現遺伝子解析において、リファレンスライブラリーとして利用できることが確認された。

カンゾウ属植物の優良株等の遺伝子識別法開発を目的とし、*G. uralensis* (Gu)、*G. glabra* (Gg)、*G. inflata* (Gi) を含む甘草 22 ロット・66 試料について、主成分の GL 生合成の鍵酵素の一つと考えられる *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列の解析を行った。その結果、Gg 由来の新規配列 2 種を含むカンゾウ属植物の *CYP88D6* 相同遺伝子のイントロン 7 配列情報を集積し、より精度の高いカンゾウ属植物の遺伝子識別が可能となった。一部試料では、基原植物情報と異なる遺伝子型が検出されたが、成分分析情報から判定遺伝子型が裏付けられ、本遺伝子領域が、甘草試料中の基原植物の識別 (Gu と Gg) にも有用であることが示された。

また、ウラルカンゾウの根における GL の高効率生産条件の探索を目的とし、ウラルカンゾウ優良株 3 種の挿し木苗の根における、 β -アミリン合成酵素遺伝子 (*bAS*)、シトクローム P450 遺伝子 (*CYP88D6* および *CYP72A154*) の 3 種の遺伝子の発現量を、解析、比較した。その結果、根の径が太い根基部の方が、径の細い根端部と比較して、3 遺伝子

ともその発現量が高い傾向があることが明らかになった。これらの GL 生合成酵素の遺伝子の発現量は根の成長 (径) と関係があるものと考えられる。また、上記の結果は、ウラルカンゾウ挿し木苗の根が GL 生合成酵素遺伝子群の環境因子等による発現変動の解析モデルとして使用できる可能性を示すものである。この結果をふまえ、ストレス負荷条件下の GL 生合成酵素遺伝子の発現解析を行ったところ、塩または乾燥ストレスは GL 生合成酵素遺伝子の発現を低下させることが判明した。なお、塩または乾燥ストレス処理により GL 生合成酵素遺伝子の発現量は低下したが、植物自体はこれらのストレスに耐性を示すことが確認された。

F. 文献

- 1) Hayashi, H., Huang, P., Kirakosyan, A., Inoue, K., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Kushiro, T., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (2001). Cloning and Characterization of a cDNA Encoding β -Amyrin Synthase Involved in Glycyrrhizin and Soyasaponin Biosyntheses in Licorice. *Biol. Pharm. Bull.*, 24(8), 912-916.
- 2) Seki, H., Ohyama, K., Sawai, S., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., & Muranaka, T. (2008). Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 105(37), 14204-14209.
- 3) Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Fukushima, E. O., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., & Muranaka, T. (2011). Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *Plant Cell*, 23(11), 4112-4123.

- 4) Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- 5) Li, J., Besseau, S., Törönen, P., Kollist, H., Holm, L., and Palva, T. Defence-related transcriptional factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 200: 457-472 (2013)
- 6) Kondo K., Shiba M., Yamaji H., Morota T. Zhengmin C., Huixia P. and Shoyama Y., *Biol. Pharm. Bull.* 30(8) 1497-1502 (2007)
- ゾウ優良株選抜法. 日本生薬学会第 60 回年会 (2013. 9. 7-8, 札幌)
- 3) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代: ウラルカンゾウ新規優良株の育成. 第31回日本植物細胞分子生物学会大会 (2013. 9. 10-12, 札幌)
- 4) Kawano, N., Inui, T., Kawahara, N., and Yoshimatsu, K., Expression analyses of glycyrrhizin biosynthetic genes in licorice. Concurrent Symposia 1A, International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (2014. 8. 11, Melbourne, Australia)
- 5) Inui, T., Kawano, N., Kawahara, N., and Yoshimatsu, K., Development of discrimination and selection method of *Glycyrrhiza uralensis* clones with high-glycyrrhizin contents using DNA sequence polymorphisms in glycyrrhizin biosynthetic genes. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (2014. 8. 10-15, Melbourne, Australia)
- 6) 河野徳昭、乾貴幸、川原信夫、吉松嘉代. ウラルカンゾウにおけるグリチルリチン酸生合成酵素遺伝子の発現解析. 第32回日本植物細胞分子生物学会大会 (2014. 8. 22-23, 盛岡)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉松嘉代、乾貴幸: 植物工場における薬用植物の栽培・生産. 特産種苗、16 (9), 35-41 (2013).

2. 学会発表

- 1) 吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、湊野裕之、川原信夫、工藤善、高橋豊、新穂大介、田村幸吉、大月典子、穂山浩: 人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた実証的研究. 第6回甘草に関するシンポジウム (2013. 7. 6, 札幌)
- 2) 乾貴幸、河野徳昭、新穂大介、田村幸吉、飯田修、川原信夫、吉松嘉代: 新規カン

- H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成24年度～26年度総合研究報告書

人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）

分担研究報告書

分担研究課題：ハイテク生薬生産システム構築

研究分担者 工藤 善 鹿島建設株式会社 上席研究員

要旨 ウラルカンゾウ：生薬原料としての品質を満たす甘草の商業的な効率生産を想定し、生育速度及び薬用成分含量向上の検討（試験①～⑤）、収穫後の貯蔵温度及び乾燥温度の検討（試験⑥）、水耕液循環量の検討（試験⑦）、実証的な栽培及び収穫後の貯蔵温度の検討（試験⑧）、散気量の検討（試験⑨）を行った。これらの結果、苗の収穫適期は、7～12月までであることを明らかとした。次いで人工環境下で栽培し、生育に適した光環境及び培養液温度を明らかとした。さらに、収穫前の明期及び暗期の UV-B 照射により薬用成分濃度が増加することが示された。また、暗期の UV-B 照射では明期よりも少ないエネルギー量で薬用成分濃度を高められることが示された。低培養液温度（15℃）、収穫後の貯蔵（グリチルリチン酸（GL）とリクイリチン（LQ）は-30～-13℃、リクイリチゲニン（LG）、イソリクイリチゲニン（ISLG）とは4～25℃）、乾燥温度（30～40℃）によって、主要な薬用成分濃度を高められることを明らかとした。今後、これらを組み合わせることで生育速度を速め、主要薬用成分濃度の高い甘草を得られることが示唆された。太陽光利用型植物工場に設置した水耕栽培装置で、夏季から秋季にかけてウラルカンゾウを栽培することができた。冬季に行った補光などを組み合わせることで成長を持続させ、栽培期間の短縮が可能と考えられた。ただし、高濃度系統で根を十分に成長させた場合であっても、栽培条件によっては GL 濃度が 2.5%に満たない場合があることが明らかとなった。GL は他の主要薬用成分よりも多量に含まれ、収穫前のストレス処理や収穫後の貯蔵温度や乾燥方法によらず安定していることが明らかとなった。他方、含有量は少ないものの、フラボノイドである LQ、LG、ISLG では収穫前後の処理によって濃度が大幅に変動することが明らかとなり、概して 50℃乾燥で分解されること、凍結乾燥や低温貯蔵により収穫時の濃度を維持または増加できることが明らかとなった。これらの知見を利用することで、収穫時の薬用成分濃度を高め、収穫後の損失を最小にする技術開発が可能と考えられた。また、水耕液循環量、散気量を変化させた栽培試験を行った。循環水量 16 L min⁻¹で生育量及び GL 濃度が最大となった。散気量 2 L min⁻¹で生育が最大となる傾向となったが、GL 濃度を高められる条件は、明確にはならなかった。

セリバオウレン：水耕栽培液の最適な肥料濃度は、1/8 大塚 A 処方であったが、さらに低濃度の水耕液で最大となる可能性がある。ベルベリン含量は、肥料濃度にかかわらず日本薬局方の基準含量よりも高い値となった。光合成蒸散測定試験を行い、光合成速度が最大となる気温、相対湿度、光強度及び CO₂濃度を明らかにした。最適な光強度環境条件は 150～210 μmol m⁻² s⁻¹であることが明らかとなった。

研究協力者

後藤英司 千葉大学大学院園芸学研究科
教授

彦坂晶子 同 准教授

乾 貴幸 (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 特任研究員

吉松嘉代 同 育種生理研究室長

武田修己 東京生薬協会

A. 研究目的

生薬原料としての品質を満たす甘草の商業的な効率生産を想定し、以下の試験を行った。

・生育速度及び薬用成分含量向上の検討

甘草の生育速度と薬用成分含量を高め、生産効率を向上させることを目的として、甘草 (IV1 及び IV2) 苗の温室環境下での収穫適期 (試験①)、人工環境下での地上部及び地下部の生育・薬用成分濃度を高めるのに適した光環境 (試験②) 及び培養液温度 (試験③) を探索した。また、収穫前の紫外線 (UV) 照射 (試験④) について調査した。

試験④より、明期に甘草地上部に UV-B を照射することで、地下部の薬用成分が増加することが明らかとなったことから、UV の波長域が狭い (UV-C を全く含まないシャープな波形をもつ) UV 光源を用い、暗期に UV-A または UV-B を照射することで、明期より少ない UV 量で明期照射と同様の効果が得られるのかを調査した (試験⑤)。

・収穫後の貯蔵温度及び乾燥温度の検討

収穫後の貯蔵温度及び乾燥温度が根の主要な薬用成分濃度に及ぼす影響について調査した (試験⑥)。

・水耕栽培における水耕液循環量の検討 (試験⑦)

甘草の水耕栽培では、根を肥大成長させるために深い水槽を用い、水耕液をポンプにて循環させて栽培を行っている。水耕液の循環は水耕液中に酸素を供給する役目があり、トマトでは循環水量が多いほど生育が旺盛に

なることが知られている¹⁾。甘草の水耕栽培においても生育の促進が期待できるが、循環水量が大きすぎると流速が早くなり、根にストレスが掛かり、生育が抑制されることも考えられる。一方でグリチルリチン酸 (GL) などの二次代謝産物産生のためには、ストレスを与えることが優位に働く可能性もある。そこで、水耕栽培液の循環水量を変えることにより、生育や二次代謝産物産生に最適な循環水量を検討した。

・実証的な栽培及び収穫後の貯蔵温度の検討 (試験⑧)

太陽光利用型植物工場 (環境制御型の温室) に設置した水耕栽培装置で甘草を栽培した。この栽培装置で栽培した株の根を分割して貯蔵温度処理を行い、凍結乾燥後の薬用成分濃度を測定し、従来法との比較から薬用成分の高濃度化に必要な条件を調査した。

・水耕栽培における散気量の検討 (試験⑨)

試験⑦の栽培実験の結果より循環水量が生育や GL の産生に影響を与えることが確認された。水耕液の循環は水耕液中に酸素を供給する役目が知られているが、甘草の水耕栽培では一般的な水耕栽培槽よりも水深が深く、局所的には酸素不足になっている可能性もある。水耕液に散気を行うことは、より積極的に酸素を供給することと水耕液を上下方向に攪拌する効果が考えられる。また、根にストレスが掛かり、生育が抑制されることも考えられる。一方で GL などの二次代謝産物産生のためには、ストレスを与えることが優位に働く可能性もある。そこで、生育や二次代謝産物産生に最適な水耕栽培液の散気量を検討した。また、試験⑧で行った収穫後の貯蔵温度の検証も合わせて行った。

・セリバオウレンの人工環境下での水耕栽培における肥料濃度の検討 (試験⑩)

セリバオウレンは、樹林下に自生する植物で生育速度は緩慢である。生育速度が遅くないことから要求する肥料量も少ないことが推察される。市販されている水耕液肥料は、

生育の旺盛な野菜向けに調合された製品であるので、セリバオウレンの肥料量としては多すぎることが考えられる。そこで、市販の水耕液濃度を希釈することにより、生育や薬用成分含量の向上に最適な水耕液濃度を検討した。

・人工環境下における様々な環境条件がセリバオウレンの光合成・蒸散速度に与える影響 (試験⑩)

セリバオウレンは、強い光を必要としない人工環境下での栽培に適した植物である。人工環境下では、気温や光強度などの環境条件を精度高く制御できることから、植物の適した環境条件を把握することが必要である。そこで、セリバオウレンの最適な栽培環境条件を見いだすために、光環境、気温、相対湿度、CO₂を変化させて、光合成蒸散測定と評価を行った。

・セリバオウレン栽培における光強度の検討 (試験⑪)

試験⑩の結果より、セリバオウレンの生育が最大となると考えられる栽培環境条件(光環境、気温、相対湿度、CO₂濃度)が確認できた。この環境条件の中で、光強度が最も生育を促進することができる要因である。光合成速度が最大となる光強度はPPF 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であったが、このような光強度で長時間照射すると葉焼け現象を起こすなど生育支障を来す可能性も考えられる。そこで、生育が最大となる光強度の検討を行うこととした。

B. 研究方法

試験① 自然光下での収穫適期の探索

温室でみられる甘草の冬枯れに着目し、12月から翌年7月のウラルカンゾウ (IV1またはIV2) 苗の生育及び薬用成分濃度の季節変動を調査した。挿し木苗を閉鎖型植物生産施設(人工環境下;光源に白色蛍光灯、明期 16 h d⁻¹、植物群落面上の光合成有効光量子束 (PPF) 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温 (明期/暗期) 25/20°C、相対湿度30-70%、CO₂濃度 1000

$\mu\text{mol mol}^{-1}$) で8ヶ月間、湛液水耕で育苗し、ロングポットに移植して温室で栽培し、毎月収穫調査を実施した。

試験② 明期及び光強度の影響

人工環境条下において、試験①と同様の環境条件で9ヶ月間育苗したウラルカンゾウ (IV2) 苗を明期16または明期24 h d⁻¹、及び日積算光量 (DLI; 明期×PPF) を2水準 (DLI 20または26 $\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$) 組み合わせた4区で50日間栽培した。

試験③ 培養液の温度 (液温) の影響

人工環境条下において、試験①と同様の環境条件で4ヶ月間育苗したウラルカンゾウ (IV2) 苗を供試した。試験区は試験期間中の液温をそれぞれ15、20、25及び30°CとしたT15、T20、T25及びT30区とした。液温以外の環境条件は育苗時と同様とした。試験期間は30日間とした。

試験④ 収穫前のUV照射の影響

人工環境下において、試験①と同様の環境条件で3または8ヶ月育苗したウラルカンゾウ (IV2) 苗の地上部に蛍光灯に加え明期中に紫外線 (UV-A及びUV-B) を照射した。対照区は蛍光灯のみ照射した。UV単独照射では、UV-Aを3または6 W m^{-2} で12または6日間照射したAL及びAH区、UV-Bを0.4または0.8 W m^{-2} で12または6日間照射したBLまたはBH区とした。UV-AとBの混合照射では、上記の照射強度の組合せで、ALBL区 (20日間)、ALBH区 (10日間)、AHBL区 (10日間)、AHBH区 (5日間) とした。処理後10日に部位別乾物重、主根基部の直径及び主根中の薬用成分濃度を調査した。

試験⑤ 収穫前の暗期中のUV照射の影響

人工環境下において、ウラルカンゾウの挿し木苗を湛液水耕で4ヶ月間育苗した。育苗から処理期間を通じて、白色蛍光灯を用い、PPF 360 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、CO₂濃度1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ で栽培した。育苗期間の気温は25/20°C (明期/暗期)、明期は16時間とし、処理期間の

気温は22.5℃一定、明期は12時間とした。UV-B光源 (TL20W/01RS; Philips Co., Ltd.) を用い、暗期に12時間連続照射した。UV強度は栽培パネル面上で0.33、0.66、1.32 W m⁻² に設定し、それぞれBL区、BM区、BH区とした。

試験⑥ 収穫後の貯蔵・乾燥温度の影響

ウラルカンゾウ (IV2) 苗の根の収穫後の貯蔵温度 (-80、-30、-13、4、25° C) と貯蔵期間 (1~4週間)、ならびに乾燥温度 (30、40、50、60° C、すべて5日間) を変え、主根中の薬用成分濃度を調査した。

試験⑦ 水耕栽培における水耕液循環量の検討

供試苗 (IV1) はパーミキュライトにて挿し木、発根した個体を水耕栽培に移行後、約2ヶ月養生した苗を用い、1試験区あたり4個体とした。栽培は温室内で、最低気温が15℃以下にならないように制御した。また、短日条件下とならないように10~3月は補光 (植物上部で100-120 μmol m⁻² s⁻¹) を行い、明期時間を12時間以上に維持した。

栽培装置は150mm×720mm×500mmHの栽培槽と270mm×750mm×300mmHの貯水槽からなり、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプにて水を循環した (図1、図2)。

ポンプは60分稼働した後、5分間停止することにより栽培槽の水位を下げ、根が空気に暴露する時間を設けた。

塩ビパイプの栽培槽供給口にディヒューザー (空気混入器) を取り付けることにより、エアレーションを行った。このエアレーションにより、全ての試験区で酸素飽和度が90%以上となった (表1)。

循環ポンプは観賞魚用の水中ポンプ (カミハタ製・リオプラスパワーヘッド1400、1700、2100、2500、3100) を用いた。この水中ポンプの機種 (能力) を変えることにより循環流量を5試験区 (13、14、16、17、20L min⁻¹) 設定した。

水耕液条件は表2の条件で行い、供試苗は2012年8月に定植した。そして2013年7月に収穫し重量を測定し、GL量を測定した。

試験⑧ 甘草の実証的な栽培及び収穫後の貯蔵温度の検討

⑧-1 実証的な栽培検討

ウラルカンゾウの供試苗 (IV1) はパーミキュライトにて挿し木、発根した個体を水耕栽培に移行後、約3ヶ月養生した苗を用いた。IV1を30個体とした。栽培は温室内で、最低気温が15℃以下にならないように制御した。また、短日条件下とならないように10~3月は補光 (植物上部で100-120 μmol m⁻² s⁻¹) を行い、明期時間を12時間以上に維持した。栽培装置は400mm×2000mm×350mmHの栽培槽と400mm×2300mm×350mmHの貯水槽からなり、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプ (リオプラスパワーヘッド2500+、カミハタ製) にて水を16L min⁻¹の流量で循環した (図1、図3)。ポンプは60分稼働した後、5分間停止することにより栽培槽の水位を下げ、根が空気に暴露する時間を設けた。エアレーションは、エアポンプ (XP-60、テクノ高槻製) を用いた。このエアポンプを塩ビパイプにて配管し、散気管 (FAL5000 細目26φ、ユニホース製) 1800mmにて水耕栽培槽に空気を散気した (15L min⁻¹)。水耕液は、表2の条件とした。

この装置を鹿島建設 (株) 技術研究所内に設置し、2013年8月から12ヶ月間栽培した。そして、この栽培装置を千葉大学松戸キャンパス内の2号棟温室に移設して、2014年8月8日から10月14日まで栽培した。水耕液は表3の条件とした。栽培期間中、温室内の昇温抑制のために遮光カーテンと細霧冷房を自動制御した。

⑧-2 収穫後の低温処理と乾燥方法

収穫したウラルカンゾウの根の基部から1cm下を切り、その下5cmの部分进行分析試料とした。分析試料は4片に切り分け (図4)、それぞれをa) 収穫後すぐに凍結乾燥、b) 収穫後すぐに50℃乾燥、c) -30℃保存後に凍結乾燥、d) -80℃保存後に凍結乾燥、とした。それぞれの方法を以下に示した。

a) 凍結乾燥

サンプルを液体窒素で凍結後、凍結乾燥機 (FD-1、東京理科器械製) で5日間 (10月14日から19日) 凍結乾燥させ、以下の抽出・分析を行った。

b) 50°C乾燥

サンプルを定温乾燥器 (DX302、ヤマト科学製) を用いて5日間 (10月14日から19日) 乾燥させ、以下の抽出・分析を行った。

c) -30°C保存後凍結乾燥

サンプルをメディカルフリーザー (MDF-U538、三洋電機 (現パナソニック) 製) を用いて-30°Cで2週間 (10月14日から28日) 保存した。その後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥機 (FD-1、東京理科器械製) で5日間 (10月28日から11月2日) 凍結乾燥させ、抽出・分析を行った。

d) -80°C保存後凍結乾燥

サンプルを超低温フリーザー (MDF-193、三洋電機 (現パナソニック) 製) を用いて-80°Cで2週間 (10月14日から28日) 保存した。その後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥機 (FD-1、東京理科器械製) で5日間 (10月28日から11月2日) 凍結乾燥させ、抽出・分析を行った。

薬用成分の抽出・分析方法

【抽出】上述のa)~d)の凍結乾燥または50°C乾燥した分析試料を、乾物重を測定後、マルチビーズショッカー (安井器械製) 用50 ml チューブにメタルコーン (直径20 mm) と共に入れ、マルチビーズショッカーで2500 rpm、30秒 (15秒×2回) で粉碎した。粉碎後の試料1.0または0.5 gに60% (v/v) に調整したエタノールを10倍量 (mg/ml) 加えた。ポルテックスミキサで攪拌後、超音波洗浄機 (TUS820、井内盛栄堂 (現アズワン) 製) で30分間抽出した。抽出後は遠心機 (マイクロ冷却遠心機1720、久保田製作所製) で19404×g、30分で遠心分離し、試料を上清と残渣に分けた。得られた上清はPTFEフィルター (DISMIC、0.2 μm) を用いて濾過し、その20 μlをサンプルカップに注入して分析に用いた。抽出液に含まれるGL、リクイリチン

(LQ)、リクイリチゲニン (LG) 及びイソリクイリチゲニン (ISLG) の4成分を測定対象とした。試料によって検量先の範囲内に入らないことがあるため、分析試料には各成分に1倍液と、抽出液を60%エタノールで4倍に希釈した4倍希釈液を用いた。

【分析】分析には高速液体クロマトグラフ (HPLC) 質量分析計 (MS/MS) を用いた (HPLC: Nexera、MS: LCMS-8030、島津製作所製)。カラムは逆相クロマトグラフィ用セミマイクロカラム (TSKgel ODS-100S、2.0 mm×15 cm、東ソー製) を用い、カラム温度は40°Cに設定した。流量は0.2 mlとした。移動相はHPLC分析用蒸留水 (和光純薬工業製) で2%に調整した酢酸 (Sigma-Aldrich Inc.) 及びLCMS分析用アセトニトリル (和光純薬工業製) をメンブレンフィルタ (0.2 μm) で濾過後、超音波洗浄機で30分間脱気したものを用いた。LCのグラジエント条件を表4に示した。測定する各成分のイオンの質量電荷比 (プリカーサーイオン (Q1) > プロダクトイオン (Q3)) は、821>821 (GL)、255>135.2 (LG)、417>255.2 (LQ)、255>119.2 (ISLG) とした。

試験⑨ 水耕栽培における散気量の検討

ウラルカンゾウの供試苗 (IV1及びIV2) はバーミキュライトにて挿し木、発根した個体を水耕栽培に移行後、約3ヶ月養生した苗を用いた。1試験区あたりIV1を3個体、IV2を2個体の計5個体とした。栽培は温室内で、最低気温が15°C以下にならないように制御した。また、短日条件下とならないように10~3月は補光 (植物上部で100-120 μmol m⁻² s⁻¹) を行い、明期時間を12時間以上に維持した。

栽培装置は150mm×720mm×500mmHの栽培槽と270mm×750mm×300mmHの貯水槽からなり、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプ (リオプラスパワーヘッド2100+、カミハタ製) にて水を16L min⁻¹の流量で循環した (図1、図5)。ポンプは60分稼働した後、5分間停止することにより栽培槽の水位を下げ、根が空気に暴露する時間を設けた。エア

レーションは、エアポンプ（XP-40、テクノ高槻製）を用いた。このエアポンプを塩ビパイプにて配管し、散気管（いぶきエアストーン#100・23φ×350、キング砥石製）にて栽培槽に空気を散気した。散気量の調整は、配管したボールバルブの開口度により5試験区（0、0.5、1、2、4L min⁻¹）を設定した。散気量の違いにより、試験区の溶存酸素量にも違いが生じた（表5）。

水耕液条件は表1の条件で行い、供試苗は2013年10月に定植した。そして2014年12月に収穫し重量を測定した。

<収穫後の貯蔵温度処理>

12月10日に収穫したカンゾウの根を試験⑧と同様の処理を行い、4片の分析試料とした。それぞれをa) 収穫後すぐに凍結乾燥、b) 収穫後すぐに50℃乾燥、c) -30℃保存後に凍結乾燥、4℃保存後に凍結乾燥、とした。a)～c)の乾燥や貯蔵法は試験⑧と同様の方法で行った。4℃保存後に凍結乾燥方法を以下に示した。

サンプルは、薬用保冷库（MPR-215FS、三洋電機（現パナソニック）製）を用いて4℃で2週間（12月10日から12月24日）保存した。その後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥機（FD-1、東京理科学器械製）で5日間（12月24日から12月29日）凍結乾燥させ、抽出・分析を行った。薬用成分の分析法は、試験⑧と同様の方法で行った。

試験⑩ セリバオウレンの人工環境下での水耕栽培における肥料濃度の検討

供試植物はセリバオウレンの培養苗を水耕栽培で馴化養生した苗を用いた。1試験区6個体とした。栽培は人工気象室内で、東芝製Hf蛍光灯（昼白色）を用い、PPF 180 μmol m⁻² s⁻¹、CO₂濃度1000 μmol mol⁻¹で栽培した（図6）。気温及び明期は育苗期間で22/16℃（明期/暗期）、14時間とした。

栽培装置は350mm×1200mm×110mmHの栽培槽と450mm×550mm×250mmHの貯水槽からなり、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプにて水を連続循環した。

水耕液条件は表6の条件で行い、肥料濃度を1/2、1/4、1/6、1/8と変えて4試験区を設定した。栽培は588日間で栽培終了後、重量を測定しベルベリン量を測定した。

試験⑪ 人工環境下における様々な環境条件がセリバオウレンの光合成・蒸散速度に与える影響

供試植物はセリバオウレンの培養苗を水耕栽培で馴化養生し、馴化後の葉に全て更新された苗を用いた。光合成・蒸散測定には、小糸工業製KMC-2005型改良機を使用した（図7）。チャンバーのサイズは178mm×275mm×400mmHであった。また、光源として東芝製Hf蛍光灯（昼白色）を使用した。セリバオウレンは水耕栽培に馴化後、90～120日間育成後の個体で、葉の枚数は3～4枚の個体であった。測定は基本となる環境条件を設定した（表7）。また、水耕液条件は栽培時と同様である。この各環境要因を変化させた場合の光合成速度と蒸散速度を1回の測定に1個体用いて、4個体計測した。

試験⑫ セリバオウレン栽培における光強度の検討

供試植物はセリバオウレンの培養苗を水耕栽培で馴化養生した苗を用いた。1試験区5個体とした。この内3個体は馴化養生期間が10ヶ月、2個体は1ヶ月である（図8）。苗の馴化養生条件は人工気象室内で、光源は東芝製Hf蛍光灯（電球色）を用い、PPF 180 μmol m⁻² s⁻¹、相対湿度は50%、CO₂濃度1000 μmol mol⁻¹で栽培した。気温及び明期は育苗期間で22/16℃（明期/暗期）、14時間とした。

栽培条件は人工気象室内で、気温21℃、相対湿度50%、CO₂濃度1000 μmol mol⁻¹とした（図9）。光源は東芝製Hf蛍光灯（電球色・32W）を用い、光強度をPPF 150、180、210、240 μmol m⁻² s⁻¹の4試験区を設定した。照射時間は1日の積算光照射量（10.37 mol m⁻² d⁻¹）が同一となるように明期時間をそれぞれ19.2、16、13.7、12時間とした。

栽培装置は350mm×1200mm×110mmHの栽培槽と450mm×550mm×250mmHの貯水槽からな

り、この二つの水槽を塩ビパイプで接続し、ポンプ（リオプラスパワーヘッド1400+、カミハタ製）にて水を連続循環した。

水耕液条件は表8の条件で行った。栽培期間は144日間で栽培終了後、重量を測定した。

C. 研究結果

試験① 自然光下での収穫適期の探索

12-2月に生育及び薬用成分濃度（GL、LQ、LG、ISLG）が低下し、3月から出葉を開始して7月に生育及び薬用成分濃度が大きくなった（図9、図10）。よって、温室栽培で冬季の生育の低下に伴い薬用成分濃度が低下することが明らかとなり、生育が低下する直前の12月または生育が旺盛となる翌年の7月以降に収穫するのがよいと考えられた。

試験② 明期及び光強度の影響

地上部の生育を高めるためには明期16 h d⁻¹（L16-350区、L16-450区）が好適であること（図11）、LG及びISLG濃度を高めるためには明期24 h d⁻¹（L24-230区、L24-300区）が好適であること、GL及びLG濃度を高めるためにはDLIの増加は不適であることが示唆された（図12）。

試験③ 培養液の温度（液温）の影響

液温15-30℃、35日間の試験で、15℃で他の液温条件より生育は小となったが（図13）、薬用成分濃度は大きくなった（図14）。そのため、液温の低温処理は長期の栽培には不適で、収穫前の30日程度の処理として行うことがよいと考えられた。

試験④ 収穫前のUV照射の影響

UV-BまたはUV-A・UV-B混合光を5~10日間照射することで、主根の成長は抑制されないが、薬用成分GL、LQ、LG、ISLGが対照区より約50-350%高まった（図15）。

試験⑤ 収穫前の暗期中のUV照射の影響

UV-Bの照射による乾物重への影響はみられなかった（図16）が、可視障害として、BH及びBM区の地上部で一部葉が黄化した。試験

④よりも黄化葉は少なかった。4種の薬用成分濃度はCont.区よりも全てのUV-B照射区で大となる傾向がみられ、特にISLG濃度はBL区で有意に大となった（図17）。また、本試験の範囲において暗期UV-B照射では強度が低いほど薬用成分濃度が高まる傾向がみられた。

試験⑥ 収穫後の貯蔵・乾燥温度の影響

GLとLQ濃度は-30℃または-13℃で1-2週間貯蔵すると、貯蔵せずに凍結乾燥させた対照区より4%~13%高まった。LG濃度は4℃で2週間貯蔵すると対照区より約60倍近く高まり、ISLG濃度は25℃で1週間貯蔵すると対照区より10倍高まった（図18）。

乾燥温度は30℃または40℃とすることで、凍結乾燥させた対照区よりもGL及びLQ濃度を低下させずにLG及びISLG濃度を高められた。収穫後の貯蔵や乾燥温度を制御することで、目的や用途に合わせて成分濃度を変化させられることが示唆された（図19）。

試験⑦ 水耕栽培における水耕液循環量の検討

2013年7月に栽培を終了して、根部を収穫した。栽培終了時の地下部乾燥重量及び根頭部根径の測定を行った。また、GL濃度の測定を行った。供試苗の開始時の根頭部根径がばらついているために、実測値では生育比較ができないので、試験開始時の測定値との増加割合による成長率にて比較することとした。

根頭部根径、地下部乾燥重量のいずれも16 L min⁻¹が最大となった（図20、図21）。また、GL濃度も16 L min⁻¹が最大となり（図22）、日本薬局方の基準含量である2.5%を越える個体が14 L min⁻¹に1個体、16 L min⁻¹に2個体あった。

試験⑧ 甘草の実証的な栽培及び収穫後の貯蔵温度の検討

⑧-1 実証的な栽培検討

太陽光利用型植物工場（環境制御型の温室）に設置した水耕栽培装置で夏季から秋季に

かけてカンゾウ (IV1) を栽培した。温室に既存の細霧冷房装置と遮光カーテンを利用することにより、夏季の明期平均気温を28℃程度にでき、従来型よりも株あたりの培養液量が少ない水耕栽培装置でも十分生育させることができた。

栽培試験終了3日前、培養液のpH調節の際、2槽ある水耕栽培装置のうちの1槽の培養液に誤って消毒用の次亜塩素酸を1.5L入れるという事故が起きた。これにより栽培試験終了時に株番号1~11までの地上部が枯死した。しかし、地下部の外観に影響はみられなかったため、すべての株の根を以下の分析に供試した。

⑧-2 収穫後の低温処理と乾燥方法

GL：日本薬局方に基づくGL濃度 (2.5%) に達したのは30株中8株だった (図26)。地下部 (根) の生体重 (図23) 及び乾物重 (図25)、あるいは基部根径幅 (図24) と乾物重当たりのGL濃度 (図26) との間に一定の関係はみられなかった。凍結乾燥または-80℃の低温貯蔵 (凍結乾燥) を行うことで、従来法の50℃乾燥よりもGL濃度が増加する株がみられた (30株中17株) が、顕著な濃度差ではなかった。また、地上部が枯死した株番号1~11のGL濃度と株番号12~30のGL濃度では差はみられなかった。

LQ：地下部 (根) の生体重 (図23) 及び乾物重 (図25)、あるいは基部根径幅 (図24) と乾物重当たりのLQ濃度 (図27) との間に一定の関係はみられなかった。処理に関わらず、地上部が枯死した株番号1~11で、株番号12~30よりLQ濃度が高かった (図27)。貯蔵温度や乾燥方法でみると、貯蔵せずに凍結乾燥した場合に従来法よりLQ濃度が高く (30株中24株)、特にその傾向及び濃度差は株番号1~11で顕著だった。-30℃または-80℃で貯蔵した場合も同様に従来法よりLQ濃度が高く (30株中21~24株)、株番号1~11でその傾向が顕著であり、収穫直後の凍結乾燥や低温貯蔵することでLQ濃度が従来法の2倍程度まで増加した。

LG：地下部 (根) の生体重 (図23) 及び乾物重 (図25)、あるいは基部根径幅 (図24) と乾物重当たりのLG濃度 (図28) との間に一定の関係はみられなかった。LGでもLQと同様の傾向がみられ、処理に関わらず、地上部が枯死した株番号1~11のLG濃度は株番号12~30よりも高かった (図28)。30株すべてについてみると、貯蔵せずに凍結乾燥した場合 (30株中23株)、-30℃貯蔵した場合 (30株中18株)、-80℃貯蔵した場合 (30株中26株) のいずれも従来法よりLG濃度が高い傾向がみられた。

ISLG：他の成分と同様に、地下部 (根) の生体重 (図23) 及び乾物重 (図25)、あるいは基部根径幅 (図24) と乾物重当たりのISLG濃度 (図29) との間に一定の関係はみられなかった。処理に関わらず、地上部が枯死した株番号1~11で、株番号12~30よりISLG濃度が高かった (図29)。この傾向はLQやLGと同様だったが、ISLGが最も顕著だった。株番号1~11では従来法より凍結乾燥や低温貯蔵処理でISLG濃度が低く、LQやLGでの傾向とは異なった。他方、株番号12~30ではLQやLGでの傾向と同様に、貯蔵せずに凍結乾燥した場合や低温貯蔵した場合に従来法よりISLG濃度が高く、5倍以上になったものもあった。

試験⑨ 水耕栽培における散気量の検討

⑨-1 生育とGL濃度

1 試験区 5 個体で栽培を開始したが、2014年1~3月に0 L min⁻¹で2個体 (IV1、IV2)、0.5 min⁻¹で1個体 (IV2)、1 L min⁻¹で1個体 (IV2)、2 L min⁻¹で2個体 (IV1、IV2)、4 L min⁻¹で2個体 (IV1、IV2) が枯死した。12月に栽培を終了し根部を収穫した。栽培終了時の地上部、地下部 (根) 乾燥重量及び根頭部根径の測定を行った。供試苗の開始時の根頭部根径がばらついているために、実測値では生育比較ができないので、試験開始時の測定値との増加割合による成長率にて比較することとした。

根頭部根径増加率は2 L min⁻¹で最大とな

ったが、大きな差は生じなかった。地下部(根)の乾燥重量の顕著な差が生じて 2 L min^{-1} が最大となった(図 30、図 31)。GL 濃度(50°C 乾燥)は、いずれの処理区も日本薬局方に基づく GL 濃度(2.5%)に達した株はなかった。散気量が 1 L min^{-1} 以上で GL 濃度が下がる傾向が見られた(図 32)。

また、IV1 と IV2 の系統間で地下部(根)乾燥重と GL 濃度(50°C 乾燥)の比較を行った。IV2 は地下部(根)重量が大きい、GL 含量は約 1.2% と低い値となり、IV1 は地下部(根)重量が小さい、GL 含量は約 1.8% と、IV1 と IV2 は逆の傾向を示した(図 33)。

⑨-2 収穫後の貯蔵温度・乾燥処理

散気量処理区ごとに収穫後の貯蔵温度・乾燥処理の比較を行った。

GL : GL 濃度が 2.5% に達した株はなかった。凍結乾燥または -30°C、4°C の低温貯蔵(凍結乾燥)を行うことで、従来法の 50°C 乾燥よりも GL 濃度が増加する区がみられた。しかしながら、傾向は一樣ではなく散気処理区ごとに最も高い濃度となる処理法は異なっていた(図 34)。

LQ : LQ 濃度は散気量が 2 L min^{-1} が最も高い値となった。貯蔵温度・乾燥処理方の傾向は一樣ではなく、散気処理区ごとに最も高い濃度となる処理法は異なっていた(図 35)。

LG : LG 濃度は散気量が 2 L min^{-1} が最も高い値となった。50°C 乾燥よりも凍結乾燥した場合や 4°C 貯蔵した場合に高い傾向がみられたが、-30°C 貯蔵では低い値となり、 0 L min^{-1} では、検出限界以下となった(図 36)。

ISLG : ISLG 濃度は散気量が 0.5 L min^{-1} が最も高い値となった。50°C 乾燥よりも凍結乾燥した場合や 4°C 貯蔵した場合に高い傾向がみられた(図 37)。

試験⑩ セリバオウレンの人工環境下での水耕栽培における肥料濃度の検討

1 試験区 6 個体で試験を開始したが、肥料

濃度の高い区ほど枯死する個体が頻出し、1/2 では、5 個体、1/4 では 3 個体、1/6 では 1 個体が枯死した。

乾燥根茎重量は、1/2 濃度が著しく劣り、1/4 以上では大きな差はないが水耕液濃度が低いほど大きくなる傾向を示した(図 38)。

ベルベリン含量はいずれの区も 7% 以上となり、日本薬局方基準含量である 4.2% 以上の値となった(図 38)。

試験⑪ 人工環境下における様々な環境条件がセリバオウレンの光合成・蒸散速度に与える影響

⑪-1 気温変化

測定基本条件下で明期の気温を 16~26°C に変化させて光合成・蒸散測定を行った。光合成速度は、測定条件下ではほぼ一定であった(図 39)。蒸散速度は高温になるに従って減少し、22°C 以上ではほぼ一定となった(図 40)。

⑪-2 相対湿度変化

測定基本条件下で、相対湿度を 50~80% に変化させて光合成・蒸散測定を行った。光合成速度は、測定条件下ではほぼ一定であった(図 41)。蒸散速度は相対湿度が上昇するに従って減少した(図 42)。

⑪-3 光強度変化

測定基本条件下で、光強度を $0 \sim 350 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ に変化させて光合成・蒸散測定を行った。光強度が増すに従って光合成速度も増加し $300 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で最大となった(図 43)。蒸散速度は、光強度が増すに従って蒸散速度も増加した(図 44)。

⑪-4 CO₂濃度変化

光強度条件は $240 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、それ以外は測定基本条件下で、CO₂濃度を $400 \sim 1,600 \mu \text{ mol mol}^{-1}$ に変化させて光合成・蒸散測定を行った。CO₂濃度は、他の環境条件よりも光合成速度の値のばらつきが大きくなった。CO₂濃度が増加するに従って、光合成速度も増加し $1,200 \mu \text{ mol mol}^{-1}$ 以上ではほぼ一定と