

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishizaki, S., Sakai, Y., Yano, T., Nakano, S., Yamada, T., Nagashima, Y., Shiomi, K., Nakao, Y, Akiyama, H.	Specific Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) of Potentially Allergenic Salmonid Fish Residues in Processed Food	Biosci. Biotechnol. Biochem	76	980-985	2012
Tsuruda, S., Akaki, K., Hiwaki, H., Akiyama, H.	Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of <i>Omphalotus</i> <i>guepiniformis</i> and <i>Lentinula edodes</i>	Biosci. Biotechnol. Biochem	76	1343- 1349	2012
Katayama, S., Kukita, T., Ishikawa, E., Nakashima, S., Masuda, S., Kanda, T., Akiyama, H., Teshima, R., Nakamura, S.	Apple polyphenols suppress antigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells	Food Chem	138	757-761	2013
Yoshimura, M., Akiyama, H., Kondo, K., Sakata, K., Matsuoka, H., Amakura, Y., Teshima, R., Yoshida, T.	Immunological effects of oenothein B, an ellagitannin dimer, on dendritic cells	Int J Mol Sci.	14	46-56	2012
穂山浩、大月典子	カロテノイド摂取と 食物アレルギー発症 の予防	Functional Food	6	191-197	2013
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	35-41	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉松嘉代、河野徳昭、乾貴幸、淵野裕之、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	甘草研究最前線 2013、第 6 回甘草に関するシンポジウム研究発表記録、第 6 回甘草に関するシンポジウム研究発表記録、甘草に関するシンポジウム実行委員会編		50-61	2013
大月典子、穂山浩、工藤善、杉山圭一、阿部裕、六鹿元雄、伊藤裕才、多田敦子、杉本直樹、淵野裕之、吉松嘉代、川原信夫	人工水耕栽培により生産した甘草の安全性評価に関する研究	甘草研究最前線 2013、第 6 回甘草に関するシンポジウム研究発表記録、第 6 回甘草に関するシンポジウム研究発表記録、甘草に関するシンポジウム実行委員会編		62-66	2013
Sun, R., Hikosaka, S., Goto, E., Sawada, H., Saito, T., Kudo, T., Ohno, T., Yoshimatsu, K., Kawano, N., Inui, T. and Kawahara, N.	Effects of post-harvest storage and drying temperatures on four medicinal compounds in the root of Chinese licorice ( <i>Glycyrrhiza uralensis</i> )	Environmental Control in Biology	54	149-155	2013
杉本直樹、穂山浩	コチニール色素とアレルギー	公衆衛生	77	833-837	2013
Minegishi, Y., Mano, J., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R.	Development and evaluation of a novel DNA extraction method suitable for processed foods	Jpn. J. Food Chem. Safety	20	96-104	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Teshima, R., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K.	Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya	J. AOAC Int.	96	1054- 1058	2013
Ohmori, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Hamaoka, S., Makiyama, H., Sakata, K., Kasahara, M., Kitta, K., Fujimaki, T., Teshima, R.	A DNA Extraction and Purification Method using an Ion-exchange Resin -type Kit for the Detection of Genetically Modified Papaya from Processed foods	Food Control	32	728-735	2013
Takabatake, R., Takashima, K., Kurashima, T., Mano, J., Furui, S., Kitta, K., Koiwa, T., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Minegishi, Y.	Interlaboratory Study of Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Maize Events MON810, Bt11 and GA21, and CaMV P35S	J. AOAC Int.	96	1-7	2013
Takabatake, R., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Kurashima, T., Mano, J., Furui, S., Kitta, K.	Development and Interlaboratory Validation of Quantitative PCR Method for Screening Analysis of Genetically Modified Soybeans	Biological and Pharmaceutica l Bulletin	36	131-134	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉松嘉代	水耕栽培システムによる生薬の生産とその評価	Labcab	Vol. 8	13-14	2014
吉松嘉代、乾貴幸	第2章 植物工場における薬用植物の栽培と生育制御	薬用植物・生薬の最前線～国内栽培技術から品質評価、製品開発まで～、シーエムシー出版		9-19	2014
Koizumi, D., Shirota, K., Akita, R., Oda, H., Akiyama, H.	Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods	Food Chem.	150	348-352	2014
Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R., Nishimaki-Mogami, T.	Identification and detection of genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand	Biol. Pharm. Bull.	37	1-5	2014
Ohtsuki, N., Sugimoto, R., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, T., Toyoda, M., Akiyama, H.	化粧品・医薬部外品中の乳アレルギータンパク質の分析	日本食品化学学会誌	21	155-162	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T.	A novel trait-specific real-time PCR method enable quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize	Eur Food Res Technol		in press	2014
Zhu, S., Yu, X. L., Wu, Y. Q., Shiraishi, F., Kawahara, N., Komatsu, K.	Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived from <i>Paeonia lactiflora</i>	J. Nat. Med.	69	35-45	2015

総合トップ > 新着 > 薬用植物組織培養物コレクションについて【GreenInnovation Vol.219】

## 薬用植物組織培養物コレクションについて【GreenInnovation Vol.219】

2012年5月24日 19:00

Twitter いいね! 0

### ◆◆◆薬用植物研究開発の最前線◆◆◆

薬用植物組織培養物コレクションについて  
医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター育種生理研究室 吉松嘉代室長

医薬基盤研究所薬用植物研究センター育種生理研究室は、前身の国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場（後に国立医薬品食品衛生研究所と改称）の発足（1980年2月1日）に伴って新設された研究室で、84年より薬用植物の組織培養に関する研究を開始しました。現在の当研究室では、植物バイオテクノロジーを応用した新しい薬用植物資源の開発と保存（植物組織培養による薬用植物の効率的増殖、薬用植物組織培養物の超低温保存、閉鎖型植物栽培施設における薬用植物の生産、薬用成分の生産と生合成、組換え薬用植物の開発、薬用植物のゲノム研究など）を行っています。今回は、上記の研究に活用するために我々が保有している薬用植物組織培養物コレクションについて紹介します。

#### 植物組織培養

植物組織培養は、試験管やフラスコなどの容器の中で無菌的に植物を育てる技術です。植物を育てる容器の中には、培地（植物が育つための栄養分や植物の生長を促す化学物質を含む液、またはその液をゼリー状に固化したもの）が入っており、そこに植物組織の一部（芽や根の先端、葉や茎の一部など）をクリーンベンチなどの清浄空間をつくりだす装置の中で無菌的に植え付け、温度、照度、明期/暗期などの生育環境がコントロールできる部屋の中で培養すると、植物体を育てることができます。

この植物体（培養植物体）は畑で育てた植物体よりもかなり小さいですが、雑菌やカビに汚染されていないため、容器から取り出して土で栽培すると、畑で育ててきた植物体よりも健全で大きな植物体を育成することが出来ます。また、容器内一杯に育った培養植物体の一部を、再び新しい培地に植え付けて同じように培養すると、再び植物体に生育します。これを繰り返すことを継代培養と呼び、継代培養を繰り返すことで何年間も同じ植物体を維持管理することができます。また、生育環境をコントロールした室内で育てるため、気象や季節の影響を受けず、亜寒帯から熱帯に至る幅広い原産地の植物を育てることができます。さらに、継代培養に必要な植物組織は植物体の一部であるため、1本の培養植物体から数本の植え付け材料が得られ、1つの植物組織から元の植物体に復元するまでの培養期間は多くの場合、1カ月から2カ月程度であるため、短期間に多くの植物体を増やすことができます。

#### 薬用植物組織培養物コレクション

当研究室が現在薬用植物資源として継代培養し、維持管理している薬用植物の組織培養物は、植物体103種（同じ植物種で系統が異なるものは別にカウントしている。また、遺伝子組み換え薬用植物を含む）、培養根（根だけの培養物）9種、毛状根（土壌細菌アグロバクテリウム・リゾゲネスの遺伝子の一部が組込まれた根の培養物）30種、カルス（不定形の植物細胞）1種、不定胚（植物組織の一部から誘導した胚様体）46種（遺伝子組み換え薬用植物を含む）です（ただし、現在試験中あるいは新たに育成中のものの数量は含まない）。

これらの薬用植物の原産地は、熱帯、温帯、亜寒帯と多様で、それぞれに適した温度および明暗条件で管理しています。また、植物種および系統により、組織培養に適した培地が異なることから、数種類の基本培地成分と固化剤（寒天、ゲルライト）を使い分け、継代培養時に調製する植え付け片の種類も個々の植物により変えています。また、継代培養の間隔も、植物系統により変えています。我々の薬用植物組織培養物コレクションの代表

→ for Investorsについて

→ 購読お申し込み

お知らせ

新刊書籍のお知らせ

『日経バイオテク』最新号 8月4日号目次

夏季休暇に伴う更新停止のお知らせ

アジア細胞治療学会 参加登録開始

《PR》セミナー「薬づくりの新しいR&Dモデルを探る」

認証方式が『日経ID』に変わりました

#### for Investors アクセスランキング

	昨日	週間	月間
1位	日経バイオテク8月4日号「特集」、富士フイルムのバイオ関連事業		
2位	日経バイオテク8月4日号「キーパーソンインタビュー」、富士フイルムの戸田雄三取...		
3位	日経バイオテク8月4日号「点検、バイオ銘柄」、アールテック・ウエノ、近づく新たな...		
4位	アステラスの再生医療ユニット長、ユニット発足の経緯など講演		
5位	インドネシアがソルガムに注目する理由、バイオエタノールを活用しガソリンへの政府...		
6位	日経バイオテク7月21日号「特集」、国内製薬企業の2013年度を総括		
7位	日経バイオテク8月4日号「編集長の目」、抗PCSK9抗体はブロックバスターにな...		
8位	シミックの中村CEO、「現在の制度ではオフアンドラッグで利益出せない」		
9位	日経バイオテク7月21日号「編集長の目」、POCの検証までをアカデミアが担うた...		
10位	協和発酵キリンが英AZ社と提携、抗CCR4抗体を固形がん対象に開発へ		

テーマサイト

日経バイオテクONLINE

的な例として、例えばウルルカンソウ、ショウガ、セリバオウレン、センキュウ、トウキなどがあります。

#### 今後の展開

当センターでは、生物資源に関する業務の一環として、研究・試験のための薬用植物の種子、種いも、苗、苗木、植物体を有償分譲しています。しかし、薬用植物の組織培養物は、維持・管理のための知識、技術および施設が必須であり、また、限られた空間での保存のため、個々の系統の保管数量を制限していることから、通常の有償分譲の対象とはしていません。当研究室との共同研究の目的である場合に限り、無償で分譲しています。

2010年度より、厚生労働科学研究費補助金（創薬総合推進研究事業）「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究」（研究代表者：川原信夫薬用植物資源研究センター・センター長）がスタートしました。著者は分担研究「組織培養物及び効率的増殖法に関する研究」を担当しています。

現在までに維持・管理している薬用植物の組織培養物は、必ずしも漢方薬原料植物ではありません。そこで、漢方薬としての使用頻度が高い植物より順次、新たな材料を入手し、組織培養物の育成と増殖法の検討を行っています。また、増殖・維持法が確立できたものは、植物工場内での生産に関する研究を始めています。本研究にご興味を持っていたら、実験材料を提供して下さる研究者がおられましたら、ご連絡をいただければ幸いです。

#### 関連記事

- 薬用植物資源研究センターの活動について【GreenInnovation Vol.217】（2012-4-26）
- 日本における薬用植物の栽培普及とその課題【GreenInnovation Vol.227】（2012-9-27）
- 薬用植物の国内生産を目指した品種育成【GreenInnovation Vol.229】（2012-10-25）
- 薬用植物資源の高度利用化に向けて—ポストモデル植物時代の「生薬ゲノミクス」【GreenInnovation Vol.221】（2012-6-28）
- ◆組織培養◆理研、薬用植物カンゾウの組織培養法を確立、有用物質生産能を強化した組み換え体に期待（2003-12-1）[IPET](#)
- 薬用植物の栽培研究と種子交換について【GreenInnovation Vol.225】（2012-8-23）
- 日本組織培養学会、非医療分野におけるヒト組織・細胞の取り扱いに関する報告書を発表（1999-2-16）[IPET](#)
- 生薬の品質評価研究と植物の生物活性成分探索について【GreenInnovation Vol.223】（2012-8-9）
- 日本組織培養学会 秋季シンポジウム、11月28日、大阪で開催（1997-10-16）
- 熱帯、亜熱帯性薬用、有用植物の収集、保存、育成および利用【GreenInnovation Vol.231】（2012-11-22）

◀ 特集 ▶

## 植物工場での甘草生産に適した ウラルカンゾウの選抜と育成

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

吉松嘉代・河野徳昭・乾 貴幸

生薬「甘草」は、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、甘味料原料として重要である。しかしその供給の100%は中国からの輸入品であるため、中国内の物価・人件費上昇、需要増加、採取・輸出規制に伴い、供給価格が高騰し、持続的安定供給が危ぶまれている。本稿では産学官共同研究「甘草の人工水耕栽培システムの開発」において、筆者らが担当した「植物工場での甘草生産に適したウラルカンゾウの選抜と育成」について紹介する。

### 1. はじめに

日本の医薬品の規格基準書である日本薬局方(第十六改正)<sup>1)</sup>において、生薬の「甘草」は、「本品は *Glycyrrhiza uralensis* Fischer 又は *Glycyrrhiza glabra* Linné (*Leguminosae*) の根及びストロンで、ときには周皮を除いたもの(皮去りカンゾウ)である。本品は定量するとき、換算した生薬の乾燥物に対し、グリチルリチン酸(C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>: 822.93) 2.5%以上を含む。」と記載され、基原植物としてウラルカンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) 及びスペインカンゾウ(*Glycyrrhiza glabra* Linné) の2種が規定されている。どちらも主成分はグリチルリチン酸(グリチルリチンとも呼ばれている)であるが、主成分以外の成分には違いがあり、実際に漢方製剤等の原料として利用されているのはウラルカンゾウより製造された甘草である。

ウラルカンゾウは、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。生薬「甘草」は、医師の指示に従って処方される医療用漢方製剤148処方中109処方(73.6%)

YOSHIMATSU Kayo, KAWANO Noriaki,

INUI Takayuki

〒305-0843 茨城県つくば市八幡台1-2

に、また、薬局で販売されている一般用漢方製剤236処方中168処方(71.2%)に配合されている<sup>2,3)</sup>。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、砂糖の200倍とされる強い甘み<sup>4)</sup>を有することから、甘草より抽出・精製されたグリチルリチン酸も医薬品、化粧品、甘味料として広く利用されている<sup>4)</sup>。しかし、甘草の供給の100%は中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<sup>5)</sup>。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、中国では資源保護のための政策(採取制限、輸出規制など)が強化されている<sup>5)</sup>。さらに、中国国内や外国でも甘草の需要が増加し、また、最近の中国の著しい経済成長に伴う物価・人件費上昇も相まって供給価格が高騰し、甘草資源の持続的確保が年々困難になっている。

甘草の安定確保あるいは国内商業生産をめざし、これまでに多くの圃場栽培研究が行われてきた<sup>5-9)</sup>。例えば、優良系統の選抜と、筒栽培法(径10cm、長さ50cm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)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<sup>7,9)</sup>。しかし報告例の多くでは、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く、日本薬局方の規定値 2.5%以上<sup>1)</sup>を満たすためには、少なくとも3年以上の栽培期間が必要とされている<sup>5,8)</sup>。また、野外圃場栽培は異常気象や今回の大地震のような自然災害及び人為的な環境かく乱等の影響を受けやすい。

一方、植物工場における薬用植物の生産は、次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。

**表 1 植物工場における薬用植物生産の利点**

**植物工場における薬用植物の生産**

- ・ 自然環境（気温、日照量、降水量、湿度、土質等）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、土壌汚染や人為的環境攪乱を回避できる
- ・ 連作障害がなく、計画栽培・多角栽培が可能
- ・ 人手がかからない（耕うん、土壌改良、除草等が不要で収穫が容易）
- ・ 短期間で収穫可能

## 2. 植物工場におけるウラルカンゾウの養液栽培

植物工場における薬用植物の生産に関する研究は、これまでも水耕法を中心に行われてきたが、地上部（葉、茎、花など）を使用部位とする薬用植物に関する報告が多い。

一般に水耕法で栽培した植物の根は分枝根が多くなり、根部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の生産において、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<sup>10)</sup>やスペインカンゾウ<sup>11, 12)</sup>の例があるが、根の収量や薬用成分含量の点で満足出来る成果は得られていない。筆者らの研究室

でも1990年頃より、循環型湛液水耕法による薬用植物の生産に関する研究を実施し、地上部を使用部位とする薬用植物（ケン、キダチコミカンソウ、ジギタリス、ハッカ、クソニンジンなど）については、生育期間、薬用成分含量と収量において良好な結果が得られた。しかし、地下部（根、根茎など）を使用部位とする薬用植物では、地上部は良好に生育するものの肥大した根が得られず、地下部を使用部位とする生薬の生産には不向きであった。

そこで、植物工場内での甘草の養液栽培のため、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<sup>13)</sup>を考案し、閉鎖温室内（温度 20-25℃、相対湿度 50-60%、明期 14-16 時間/日）でウラルカンゾウの養液栽培を行った（図 1）。材料植物は、当研究室の薬用植物の組織培養物コレクションの中のウラルカンゾウ 2 系統（Gu, GuH）のうち、予備的に実施した閉鎖温室内での土耕栽培で、根の収量及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、本系統の培養シュートより、ストロン様組織<sup>14)</sup>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、前述の 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 1000 日以上を要した。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、約 1 年後に 2.95%、約 2 年後に 5.22%となり、同生育環境の土耕栽培に比べて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、グリチルリチン酸含量 2.5%以上を満たすウラルカンゾウ 2 年生根は、市場品の甘草に比べて、フラボノイドであるリキリチン含量が低いことが報告されている<sup>9)</sup>。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、抗酸化作用や神経栄養作用（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

的とされている)が報告されており<sup>15)</sup>,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。約2年間養液栽培したGu2-3-2の根は1.0%以上のリキリチン含有していたことから,植物工場での養液栽培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。



図1. 養液栽培4ヶ月後のウラルカンゾウ

### 3. 植物工場での養液栽培に適したウラルカンゾウ優良株の選抜と育成

筆者らが所属する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は,北海道,筑波及び種子島の3研究部より構成され,それぞれの環境に適応した国内外の薬用植物が野外圃場で保存栽培されている。ウラルカンゾウは,北海道及び筑波研究部の野外圃場で保存栽培され

ているが,筑波研究部では開花・結実が認められないため,種子の生産は北海道研究部で行っている。

植物工場内での甘草生産効率をより高めるため,北海道研究部圃場で採取した3系統のウラルカンゾウの種子(GuTS291-04, GuTS71-08, GuTS321-08)を材料に,植物工場での生産に適した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及び1年間養液栽培し,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。生育及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(株あたりの根の収量:10.8g,グリチルリチン酸含量:1.5%)を示した(図2)。

次に,優良株選抜のため,グロースチャンバー室内(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ヶ月間養液栽培し,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(図3左表)。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,養液栽培で得たストロンを挿し穂

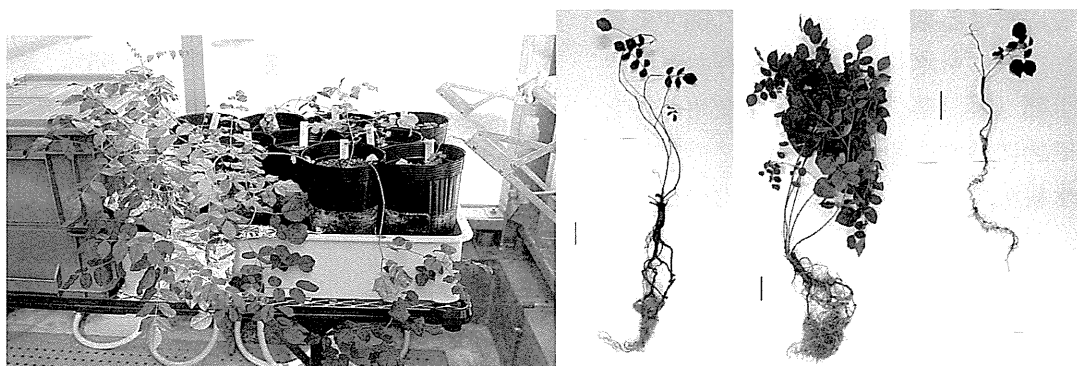


図2. 養液栽培1年後のウラルカンゾウ GuTS291-04 GuTS71-08 GuTS321-08  
写真中のスケールは5cm

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（図 3 右）、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，抗けいれん作用を有することが報告されている<sup>16)</sup>。本成分は，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。これらの優良株及び増殖法については特許を出願した<sup>17)</sup>。

#### 4. 遺伝子情報を用いたウラルカンゾウ優良株の識別

遺伝子情報を利用した植物の優良品種や系統の識別は，コメの品種鑑定に代表されるように，外部形態等で判断が困難な検体間の客観的な識別が，簡便かつ迅速に可能な一般的ツールとして認知されており，キットとして販売されるまでになっている。本手法は有用物質の多産系統や，植物工場での栽培・増殖に適した系統であるといった，外部形態の差異では識別，特定が困難な薬用植物の優良系統の識別にとくに適していると考えられる。

薬用植物資源に関しては，植物そのものの資源保護の問題もさることながら，偽ブランド米の問題のように，今後，品種や系統といったレ

ベルの知的財産権の主張並びに保護が，国内のみならず，国家間においても重要な課題となると考えられ，遺伝子情報を活用した品種識別の手法は，優良系統の選抜・育種と共にその開発が求められている。

これまでにコメなどを対象に実用化されている品種鑑定法の多くは，AFLP 法や PCR-RFLP 法をはじめとする SNPs 等の変異を検知する手法により，識別対象とする遺伝子領域を限定せずに，目的とする植物を他の植物群と識別できれば可とするものであった。また，植物の分子遺伝学または進化生物学的な識別においては，植物に普遍的に存在する葉緑体 DNA やミトコンドリア DNA，またはリボソーム DNA 等の植物種間の多型を利用することが一般的であり，近年では植物種識別のための上記遺伝子領域の網羅的な情報集積，いわゆるバーコード化も国際的なコンソーシアムによって進められている。しかしながら筆者らは，薬用植物の優良系統・優良株の遺伝子識別においては，薬用植物の生産する有用物質の二次代謝経路の酵素遺伝子の多型に着目することとした。

二次代謝経路は，その多くが薬理活性を示すテルペノイド，ポリケタイド，アルカロイド等の天然物の生産に関わる生合成経路であり，本経路の酵素遺伝子の多型は，薬用植物の生理活性の本体である二次代謝物の生産能に直接的に影響すると考えられ，とくに有用物質の生産性等を直接議論できるマーカーとしての利用が期待される。

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)
GuTS71-08I V1	7.8	2.1	161.7
GuTS71-08I V2	16.1	1.6	258.3

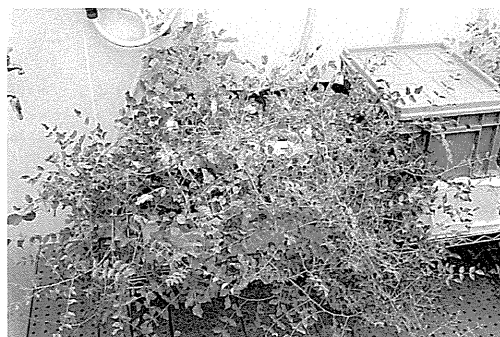


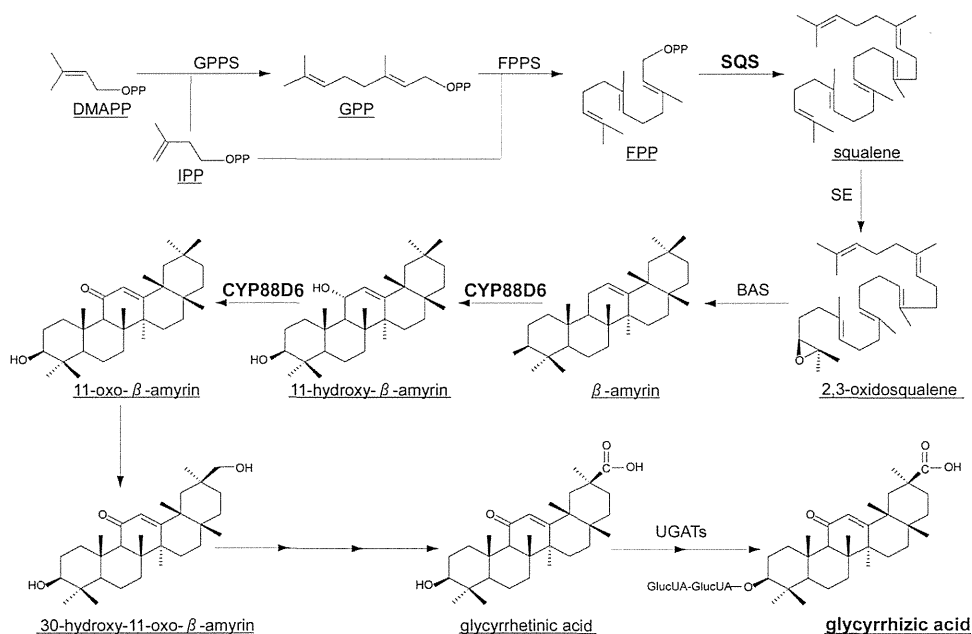
図 3. 養液栽培 4 ヶ月後優良クローンの形質（左表）及び GuTS71-08IV2 挿木苗の養液栽培 4 ヶ月後の写真（右）

筆者らは、ウラルカンゾウの生産するトリテルペン配糖体であるグリチルリチン酸の生合成経路（図 4）上の、骨格形成段階に関わるスクアレン合成酵素(squalene synthase, SQS)及び生合成経路下流の修飾過程の P450 酵素であるβアミリン 11 位酸化酵素(β-amyrin 11-oxidase, CYP88D6)の 2 遺伝子を解析対象とし、とくに、ゲノム DNA 上のコーディング領域のうち、タンパク質に翻訳されないため変異が蓄積しやすいと考えられるイントロン領域の多型情報による優良株の識別について検討した。

## 5. SQS イントロン領域を用いたウラルカンゾウ優良株の遺伝子識別

我々が最初に着目したのは、トリテルペンであるグリチルリチン酸の炭素数 30 のユニット形成の鍵酵素であるスクアレン合成酵素(SQS)である。本酵素は 2 分子のファルネシル 2 リン酸より炭素数 30 の直鎖状のスクアレンを合成

するものであり、植物ステロールの生合成においても重要である。モデル植物であるシロイヌナズナにおいては、AtSQS1 (GenBank accession No. AF004560) 及び AtSQS2 (AF004396) の 2 種のホモログが見出されており、両者のエキソン・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。このエキソン・イントロン構造は他の植物種でも保存されている傾向にあり、カンゾウ属の SQS においてもその構造は保存されていると推定された。そこで、既にデータベースに登録されているカンゾウ属植物由来の SQS の cDNA 配列から、エキソン 1 - 3 領域の増幅用プライマーを設計し、PCR により増幅した同領域の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検討した。ウラルカンゾウ優良株 2 種、GuTS71-08 IV2 及び Gu2-3-2 より調製したゲノム DNA を鋳型に 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、



DMAPP, dimethylallyl diphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; GPP, geranyl pyrophosphate; FPP, farnesyl diphosphate; GPPS, GPP synthase; FPPS, FPP synthase; SQS, squalene synthase; SE, squalene epoxidase;

図 4. カンゾウ属植物におけるグリチルリチン酸生合成経路（太字：解析対象）

GuSQS1 及び GuSQS2 のエキソン 1・3 領域の塩基配列が得られた。

取得した塩基配列について、多重整列解析、両株間の変異点の抽出を行い、両株間の識別が可能と期待されるプライマーを 2 セット設計した。本プライマーセットを使用し、GuTS71-08 IV2 及び 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の場合、GuTS71-08 IV2 では約 250 bp の増幅産物が得られたのに対し、Gu2-3-2 では増幅産物が検出されなかった (図 5 右)。また、GuSQS1 を標的としたプライマーセットの場合、GuTS71-08 IV2 の方が増幅産物のサイズが Gu2-3-2 よりも大きく、そのサイズの差異で識別が可能であった (図 5 左)。以上の結果はこれらのプライマーを用いた PCR により両者の識別が可能であることを示している。

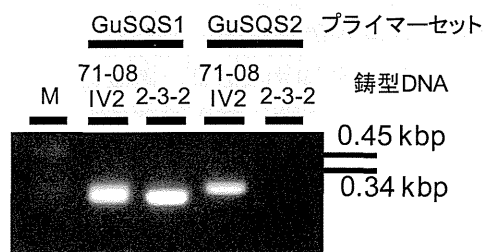


図 5. GuSQS1 及び GuSQS2 特異的プライマーによる GuTS71-08IV2 と Gu2-3-2 の識別

71-08IV2 : GuTS71-08IV2, 2-3-2 :  
Gu2-3-2, M : DNA サイズマーカー

## 6. CYP88D6 イントロン領域を用いたカンゾウ属植物の遺伝子識別

次に筆者らは、グリチルリチン酸生合成経路の修飾段階に関わる  $\beta$  アミリン 11 位酸化酵素 CYP88D6<sup>18)</sup> に着目した。P450 酵素の一種である CYP88D6 はマメ科植物に特異的に見出される遺伝子群である CYP88D サブファミリーに属し、マメ科で特異的に進化し、トリテルペン配糖体の代謝に関与すると考えられている。非

グリチルリチン生産性のカンゾウ属植物では、本酵素のホモログの酵素活性がかなり低いことが報告されており<sup>19)</sup>、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。

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おり、これらのゲノム DNA 情報より、カンゾウの CYP88D6 遺伝子のエキソン・イントロン構造を予測した。

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 及び 7 を含む領域を増幅するプライマーを設計し、ウラルカンゾウ優良株、GuTS71-08 IV2 及び Gu2-3-2 について、CYP88D6 のイントロン 6 及び 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、株特異的ではなく、本領域による識別は困難と考えられた。

一方、イントロン 7 では、大きく分けて 2 タイプの配列情報が得られた。このうち、一方は、GuTS71-08 IV2 に特異的であり、もう一方との共通配列には認められない *HincII* サイトを含んでいた。そこで、PCR 増幅産物の *HincII* 処理を行ったところ、GuTS71-08 IV2 由来の PCR 増幅産物を *HincII* で処理した場合のみに、約 600 bp 及び 500 bp の制限酵素断片が得られ (図 6)、PCR-RFLP 法により、簡便に GuTS71-08 IV2 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、GuTS71-08 IV2 と他のウラルカンゾウ株及びスペインカンゾウ等の他のカンゾウ属植物とも識別可能であることが判明した。以上述べたように、グリチルリチン酸生合成遺伝子の多型情報は、ウラルカンゾウ優良株の遺伝子識別に有用と考えられる。

筆者らは、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究」の一環として、薬用植物資源の安定供給を指向し、生薬情報の多様性の範囲確

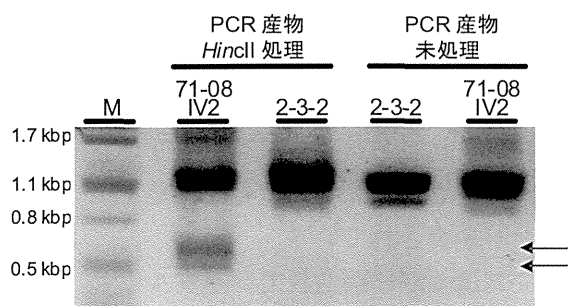


図6. PCR-RFLPによるGuTS71-08IV2とGu2-3-2の識別

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

認を目的として、国内に流通する生薬の遺伝子情報の解析及び収集を進めているが、本研究において収集した市場流通甘草について、CYP88D6 のゲノム DNA イントロン領域の多型を精査した結果、グリチルリチン酸を高蓄積するウラルカンゾウに高頻度で認められる配列タイプが、グリチルリチン酸含有量の高い甘草試料に有意に高い頻度で存在することが明らかになってきている。これは、本領域が、グリチルリチン酸の高含有量を目標とした育種において、植物体が成長し、根が肥大し、グリチルリチン酸含有量が測定可能となるまで待つことなく、葉や種子等から調製したゲノム DNA について高グリチルリチン酸含有量タイプ配列の存否を調べることにより、グリチルリチン酸含有量の「予測」が可能なマーカーとして利用できることを示唆するものであり、さらなるデータの集積を進めているところである。

## 7. 甘草の人工水耕栽培システムの開発

植物工場での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物質製造基盤技術開発」（経済産業省）及び「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、3者共同研究（医薬基盤研究所、鹿島建設、千葉大学）「甘草の人工水耕栽培システムの開発」として実施している（但し、2009年は豊田通商を加えた4者）。

3者共同研究「甘草の人工水耕栽培システムの開発」において、筆者らの医薬基盤研究所は、養液栽培に適した優良株の選抜・育成と増殖法の開発及び人工水耕栽培で生産された甘草の品質評価を担当し、鹿島建設は新規の人工水耕栽培装置の設計と当該装置での栽培を、千葉大学は人工栽培環境制御を担当した。その成果として、短期間の水耕栽培で肥大した根が生産可能な人工水耕栽培装置及び生産システムの開発に成功し、2010年10月28日にプレスリリースを行うとともに特許を出願した<sup>20</sup>。また、本成果は、医薬基盤研究所、鹿島建設、千葉大学が、それぞれの知見、ノウハウ、技術を高次元で連携させ、高品質の甘草を安定的かつ継続的に生産可能とした画期的な成果の好例として高い評価を受け、2011年9月22日、第9回産学官連携功労者表彰において、厚生労働大臣賞を受賞した（図7）。

## 8. おわりに

本稿で紹介した支持体を用いた底面給水式の養液栽培装置は、1株当りの根の収量が低い（1年間の栽培で1株あたり乾燥重量10～20g）ため、現時点では植物工場での養液栽培による甘草の商業生産に適した栽培システムとはいえない。しかし、短期間の栽培で優良株の選抜が可能（ウラルカンゾウの場合は4ヵ月間）、クローン増殖のための植物材料（ウラルカンゾウの場合はストロン挿し穂）の生産が2・3ヵ月で可能、除草等の手間がかからず、植物工場内で多種・多数の植物体を栽培可能、二次代謝物高含有量の地下部（根、根茎など）を生産可能などの優れた面を持つ。筆者らの研究室では、他の薬用植物、生薬「黄連」の基原植物であるセリバオウレン（*Coptis japonica* Makino var.

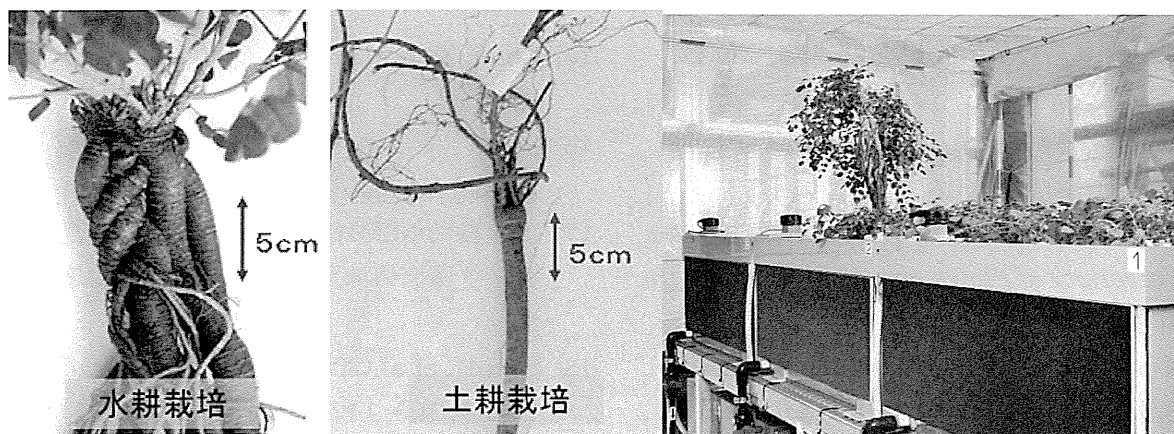


図7. 栽培300日後のウラルカンゾウ根（左：水耕栽培、中：圃場栽培）及び鹿島技術研究所内の新規人工水耕栽培装置（右：写真はウラルカンゾウ植物体を引き上げたところ）

*dissecta* Nakai) や生薬「ベラドンナ根」の基原植物であるベラドンナ (*Atropa belladonna* Linné) に本養液栽培法を適用し、わずか半年間で日本薬局方規格値以上の薬用成分（セリバオウレン根茎：ベルベリン塩化物として4.2%以上、ベラドンナ根：ヒョスチアミン0.4%以上）が得られることを確認している。とくに、養液栽培したセリバオウレン根茎のベルベリン含量は、圃場栽培5年間に匹敵する。

一方、3者共同研究で開発した新規の人工水耕栽培装置は、支持体を使用しておらず、また、図7に示したように短期間で高収量の根が生産可能である。従って、甘草の商業生産を指向した植物工場の施設及びシステム設計により適していると思われる。このような装置や施設の設計・開発やシステム構築は、筆者らが所属する独立行政法人の研究所や大学単独ではなし得なかったことである。

植物工場で生産された生薬が医薬品として製品化された事例は未だなく、また、生薬・漢方製剤業界内では、野生品を栽培品より良品とする傾向が強く、従来の圃場栽培品であってもすぐには野生品と同等であるとは見なされない。しかしながら、生薬の持続的安定供給のための手段として、また、生薬資源及び自然環境の保全のため、さらには天災や人災による生薬資源枯渇防止のためにも、植物工場での生薬の生産

は不可欠な技術である。

植物工場は、生育環境を人工的に制御する特殊な施設であるため、施設の建設は畑の整地よりもはるかに費用がかかり、また、栽培にかかる光熱水費等も畑での栽培よりも割高である。したがって、植物工場における生薬の実生産を具現化していくためには、生産された生薬が従来品と同等あるいはより高品質であることを検証するとともに、生産コストの削減やコストに見合う製品開発など、経済性を考慮した戦略が必須であると思われる。

## 文 献

- 1) 第十六改正日本薬局方(2011), 厚生労働省, 1474-1475
- 2) 厚生労働省医薬食品局, 一般用漢方製剤承認基準, 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知(2010), 1-51
- 3) 日本医薬品集(2007), 医療薬, 2007年版, じほう, 2651-2733
- 4) Hayashi, H. et al. (2009), *Plant Biotechnology*, 26, 101-104
- 5) Yamamoto Y. et al. (2005), *J. Trad. Med.*, 22 (Suppl. 1), 86-97
- 6) 尾崎和男ら(2007), 生薬学雑誌, 61(2), 89-92

- 7) 尾崎和男ら(2010), 生薬学雑誌, 64(2), 76-82
- 8) Kojoma, M. et al. (2011), *Biol. Pharm. Bull.*, 34(8), 1334-1337
- 9) 芝野真喜雄ら(2011), *Bulletin Of Osaka University of Pharmaceutical Sciences*, 5, 59-68
- 10) 南ら (1995), 薬学雑誌, 115, 832-842
- 11) 角谷晃司(1997)ら, *Natural Medicines*, 51, 447-451
- 12) 角谷晃司 (2003), *Bull. Pharm. Res. Technol. Inst.*, 12, 133-138
- 13) 吉松嘉代(2009), 特願 2009-131442 「栽培装置, 及び, 栽培方法」
- 14) 高上馬希重ら (2005), 特開 2005-137291, 「カンゾウ属植物の組織培養方法」
- 15) Chen, Z. et al.(2009), *Cytotechnology*, 60, 125-132
- 16) Sato, Y. et al.(2006), *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 409-414
- 17) 吉松嘉代ら(2010), 特願 2010-250700, 「カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法」
- 18) Seki,H. et al.(2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 14204-14209
- 19) 澤井学ら(2009), 第27回日本植物細胞分子生物学会講演要旨集, p.167
- 20) 澤田裕樹ら(2010), 特願 2010-250701, 「養液栽培システム及び養液栽培方法」



# 甘草の水耕栽培

## 薬用植物資源の保護と確保

吉松嘉代 Kayo 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長



鹿島建設の水耕栽培装置で生産した「甘草」

### 1 はじめに

生薬「甘草」は、医薬品、化粧品および甘味料原料として重要である。しかし、その供給の100%を主として中国に依存しているため、持続的安定供給が危ぶまれている。

我々は、2006年頃より植物工場での「甘草」生産に関する研究を開始し、2008年下半年期からは、当研究所、鹿島建設、千葉大学の3者の共同研究「甘草の人工水耕栽培システムの開発」として実施した(ただし、2009年は豊田通商を加えた4者)。本研究において当研究所は、水耕栽培に適した優良株の選抜・育成と増殖法の開発および水耕「甘草」の品質評価を担当した。2012年度からは、当研究所を中心に、厚生労働科学研究「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」を開始し、上記2者に加え複数の企業・大学の協力のもと、「甘草」をはじめとした漢方薬原料生薬の安心・安全な安定供給を目指し、水耕栽培による生薬生産の実用化を進めるとともに、生産された生薬の安全性・有効性の検証を進めている。以下に、我々の取り組みについて紹介する。

### 2 「甘草」を取り巻く現状

日本薬局方<sup>1)</sup>において「甘草」は、「本品は *Glycyrrhiza uralensis Fischer* 又は *Glycyrrhiza glabra Linné*(*Leguminosae*)の根及びストロンで、ときには周皮を除いたもの(皮取りカンゾウ)である。本品は定量するとき、換算した生薬の乾燥物に対し、グリチルリチン酸( $C_{42}H_{62}O_{16}$ : 822.93)2.5%以上を含む」と規定されており、日本国内で漢方・生薬製剤等の原料となっているのは *G. uralensis Fischer*(ウラルカンゾウ)より製造された「甘草」である。「甘草」は、医療用漢方製剤148処方中109処方(73.6%)に、また、一般用漢方製剤294処方中213処方(72.4%)に配合されており、<sup>2,3)</sup>漢方薬としての使用頻度および使用量が最も多い。その主成分であるグリチルリチン酸は、抗炎症、肝臓保護、抗アレルギー作用等の薬理活性を有し、また、砂糖の200倍とされる強い甘み<sup>4)</sup>を有することから、医薬品、化粧品、甘味料として汎用される。<sup>1)</sup>しかし、「甘草」の供給のほとんどは中国からの輸入品(主に野生植物より製造)である。<sup>5)</sup>近年、「甘草」資源の枯渇化が顕在化し、中国では資源保護のための政策(採取制限、輸出規制等)が強化されている。<sup>5)</sup>さらに、中国国内や欧米でも「甘草」の需要が増加し、また、最近の中国の著しい経済成長に伴う物価・人件費の上昇も相まって供給価格が高騰し、「甘草」資源の持続的確保が年々困難になっており、第2のレアアースとも呼ばれるようになってきている。

「甘草」の安定確保あるいは国内商業生産を目的に、これまでに多くの圃場栽培研究が行われ、最近では幾つかの成功例が報告されている。<sup>5-10)</sup>しかし多くの報告例では、「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く、規定値2.5%以上<sup>1)</sup>を満たすためには、少なくとも3年以上の栽培期間が必要とされている。<sup>5,8)</sup>また野外栽培は、異常気象や2011年の大地震等の自然災害および原発事故のような人為的な環境かく乱等の影響を受けやすい。

その点、植物工場での水耕栽培による薬用植物の生産は、表1に示す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。

表1 植物工場での水耕栽培による薬用植物生産の利点

- ・自然環境(気温, 日照量, 降水量, 湿度, 土質等)の影響を受けずに安定的な生産が可能
- ・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, 土壌汚染や人為的環境かく乱を回避できる
- ・連作障害がなく, 計画栽培・多角栽培が可能
- ・人手がかからない(耕うん, 土壌改良, 除草等が不要で収穫が容易)
- ・短期間で収穫可能
- ・野外・水耕栽培に適した優良苗の選抜・育成が短期間で可能
- ・野外・水耕栽培用の優良クローン苗の効率的増殖が短期間で可能

### 3 植物工場におけるウラルカンゾウの水耕栽培

一般に水耕法で栽培した植物の根は分枝根が多くなり, 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の生産において, 水耕栽培の実用化は困難であるとされている。我々は1990年頃より, 根が水耕液中に浸される循環型湛液水耕法による薬用植物の生産に関する研究を実施し, 地上部を使用部位とする薬用植物(ケシ, キダチコミカンソウ, ジギタリス, ハッカ, クソニンジン等)については, 生育期間, 薬用成分含量と収量において良好な結果が得られた。しかし, 地下部を使用部位とする生薬の生産には不向きであった。

そこで, 植物工場内でのウラルカンゾウの水耕栽培のため, 根が水耕液中に浸されない水耕栽培装置<sup>11)</sup>を考案し, 閉鎖温室内(温度20~25℃, 相対湿度50~60%, 明期14~16時間/日)でウラルカンゾウ培養苗の水耕栽培を行った。植物材料は, 我々の薬用植物の組織培養物コレクションの中のウラルカンゾウ2系統のうち, 予備的に実施した閉鎖温室内での土耕栽培で, 根の収量およびグリチルリチン酸含量がより高かった系統を選択し, さらに本系統の培養シュートより, 植物組織培養での増殖効率の高いサブクローン(Gu2-3-2)を得て, 水耕栽培装置へ植付けた。閉鎖温室内において, 前述の土耕栽培では, 根のグリチルリチン酸含量が2.5%以上になるまでに1,000日以上を要したが, 水耕栽培で得た根のグリチルリチン酸含量は, 約1年後に2.95%, 約2年後に5.22%となり, 同生育環境の土耕栽培に比べてグリチルリチン酸の生産効率が高かった。また水耕「甘草」は, 日本薬局方の他の規格; 確認試験(TLC法), 乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, エキス含量(希エタノールエキス)においても, 規定値を満たすことが確認された。

前述の野外で筒栽培され, グリチルリチン酸含量2.5%以上を満たす「甘草(2年生根)」は, 「甘草」市場品に比べて, フラボノイドであるリキリチン含量が低いと報告されている。<sup>9)</sup> リキリチンは, 「甘草」の主要成分の1つで, 抗うつ, 抗酸化や神経栄養作用(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されている)が報告されており,<sup>12)</sup> 「甘草」が有する多様な薬理活性の一端を担っている成分である。我々が約2年間の水耕栽培で得た根は1.0%以上のリキリチンを含有していたことから, 植物工場での水耕栽培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。

### 4 植物工場での水耕栽培に適したウラルカンゾウ優良株の選抜と育成

栽培環境に適した薬用植物優良系統の選抜は, 生薬生産効率をより高めるために重要であり, 種々(導入元や形質が異なる)系統の種子は選抜材料として好適である。当研究所筑波研究部園場栽培のウラルカンゾウは開花・結実に至らないため, 北海道研究部で採取した3系統のウラルカンゾウ種子を材料に水耕栽培に適した優良系統の選抜および優良株の選抜を行った。

まず系統間の形質の差を確認するため、3系統それぞれの種子より育成した植物体(1系統3個体)を、前述の水耕栽培装置に植付けて閉鎖温室内で半年および1年間水耕栽培して根の収量と二次代謝物含量を調査し、いずれの形質も最高値を示した1系統を選抜した。

次に、優良株選抜のため、グロースチャンバー室内(温度25℃、相対湿度60%、明期18時間/日)で前述の選抜系統の種子より育成した植物体(20個体)を水耕栽培して根の収量と二次代謝物含量を調査し、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クローンを選抜した。本株は、植物組織培養での増殖効率が低いものの、水耕栽培で得たストロンを挿し穂とする挿木増殖が可能であり、本株の苗(GuTS71-08IV2)を同様に200日間水耕栽培した結果、二次代謝物高生産性が維持されていることを確認した(根中の含量;グリチルリチン酸2.5%、リキリチン0.7%、グリシクマリニン0.3%)。グリシクマリニンもウラルカンゾウの主要成分の1つで、抗けいれん作用を有することが報告され<sup>13)</sup>、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。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。<sup>14)</sup>

## 5 遺伝子情報を用いたウラルカンゾウ優良株の識別

「甘草」資源のように、枯渇の危機に瀕している薬用植物資源の確保に当たっては、植物資源の保護そのものが重要である。しかし、各国で生物多様性条約(Convention on Biological Diversity; CBD)の「遺伝子資源へのアクセスと利益配分(Access to Genetic Resources and Benefit Sharing; ABS)」のルール作りが行われ、資源保有国が自国の天然資源に対しての主権的権利を主張するようになっている現在、薬用植物の優良株の開発に当たっては、その植物の主権的権利を主張する資源保有国のルールに触れないように配慮するとともに、開発した優良株の知的財産権の主張およびその保護を行っていくことが、国内外で重要となる。前述の優良株の育成に当たっては、CBDが発行された1993年以前から国内に保有されていた植物を材料として用いたが、その外部形態から優良株の有する優れた形質を判別するのは不可能である。

一方、遺伝子情報を利用した優良株の識別は、植物体の一部で行えるため、優良株の知的財産権保護の上で有用である。我々は、グリチルリチン酸生合成経路(図1)上流のスクアレン合成酵素(squalene synthase; SQS)および同下流の $\beta$ アミリン11位酸化酵素( $\beta$ -amyrin 11-oxidase; CYP88D6)<sup>15)</sup>の2遺伝子を対象に、ゲノムDNA上の遺伝子領域のうち、変異が蓄積しやすいと考えられるイントロン領域の多型情報による優良株の識別を検討した。<sup>16),\*1</sup>

なお1993年以前に国内に保有していた薬用植物であれば、ABS上の問題がないかどうかは今後の資源保有国のABSの動向次第であり、もし可能であれば、古くから国内に植生のある植物を材料とする方が望ましい。

## 6 SQS イントロン領域を用いたウラルカンゾウ優良株の遺伝子識別

SQSは、グリチルリチン酸生合成だけでなく、植物ステロールの生合成においても重要である。既にデータベース(GenBank)<sup>\*2</sup>に登録されているカンゾウ属植物由来のSQSのcDNA配列から、エキソン1~3領域の増幅用プライマーを設計し、ウラルカンゾウ優良株2種(GuTS71-08IV2およびGu2-3-2)より調製したゲノムDNAを鋳型にPCRを行い、増幅産物の塩基配列を解析した。その結果、各株よりそれぞれSQS相同遺伝子(*GuSQS1*および*GuSQS2*)のエキソン1~3領域の塩基

※1 本成果は育種生理研究室の河野徳昭主任研究員、乾貴幸特任研究員との共同研究によるものである。

※2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

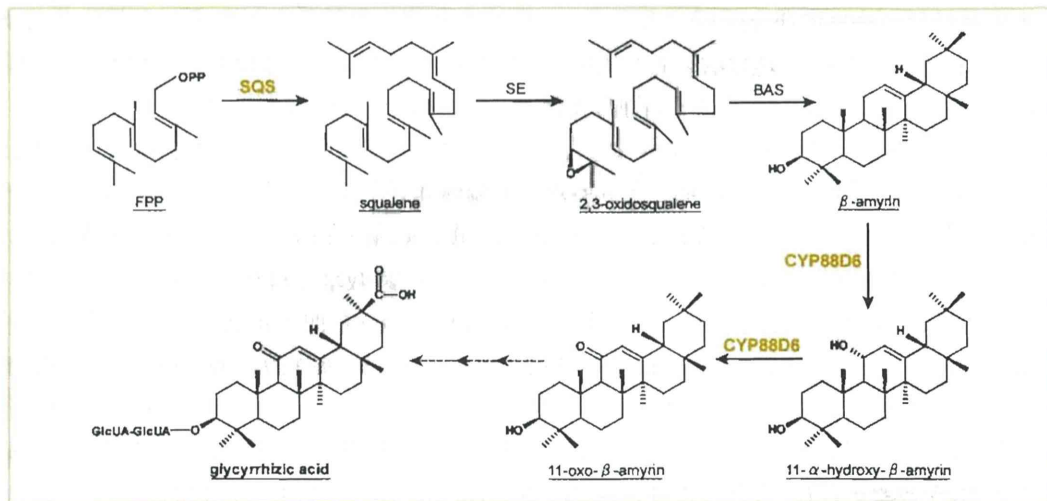


図1 カンゾウ属植物におけるグリチルリチン酸合成経路(色字; 解析対象)

FPP: Farnesyl diphosphate, SQS: squalene synthase, SE: squalene epoxidase, BAS:  $\beta$ -amyrin synthase.

配列が得られた。

取得した塩基配列について、多重整列解析により両株間の変異点の抽出を行い、両株間の識別が可能と期待されるプライマーを2セット設計した。本プライマーセットを使用し、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を行った結果、GuSQS2を標的としたプライマーセットの場合、GuTS71-08IV2では約250 bpの増幅産物が得られたが、Gu2-3-2では増幅産物が検出されなかった(図2右)。また、GuSQS1を標的としたプライマーセットの場合、GuTS71-08IV2の方が増幅産物のサイズがGu2-3-2よりも大きく、そのサイズの差異で識別が可能であった(図2左)。<sup>16), 18)</sup>

## 7 CYP88D6 イントロン領域を用いたカンゾウ属植物の遺伝子識別

CYP88D6<sup>15)</sup>は、P 450 酵素の一種で、グリチルリチン酸合成において重要な機能を担っていることが示唆されている(グリチルリチン酸を生産しないカンゾウ属植物では、本酵素のホモログの酵素活性がかなり低い)。<sup>17)</sup>

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遺伝子のゲノムDNA情報を基に、ウラルカンゾウのCYP88D6遺伝子のエキソン・イントロン構造を予測した。

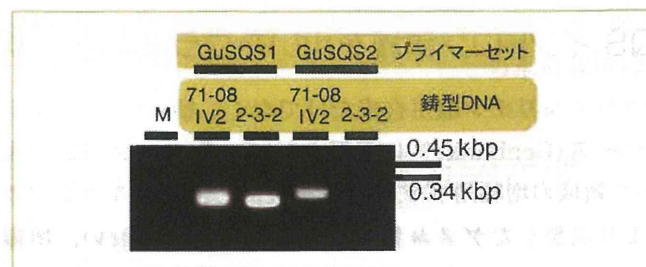


図2 GuSQS1 および GuSQS2 特異的プライマーによる GuTS71-08IV2 と Gu2-3-2 の識別

71-08IV2: GuTS71-08IV2, 2-3-2: Gu2-3-2, M: DNA サイズマーカー。