

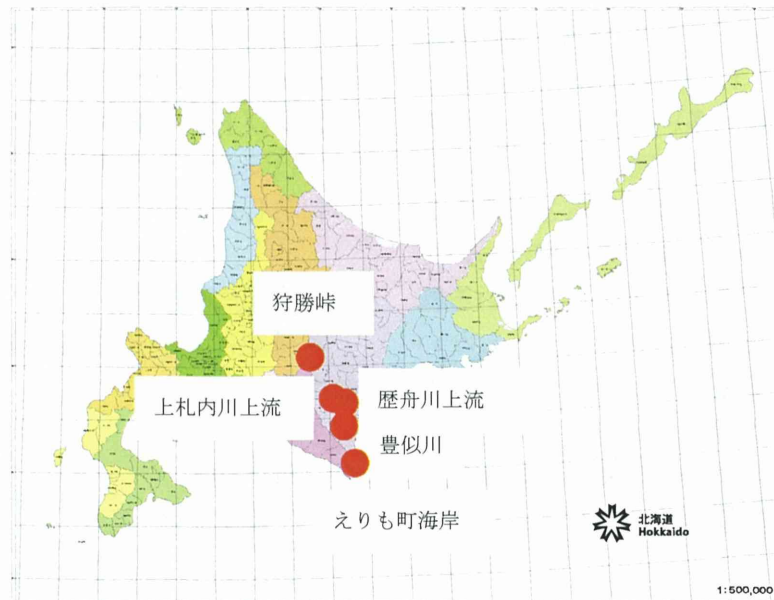


図1 北海道におけるトウキ類植物の資源量の調査地点について



図2 個体密度の調査について. 1m×1mの区画で自生するトウキ類植物の個体数をカウント. 試験区は3反復.



図3 狩勝峠で観察された開花最盛期のトウキ類植物。2014年7月21日に撮影。



図4 上札内川上流で観察された開花最盛期のトウキ類植物。2014年7月21日に撮影。

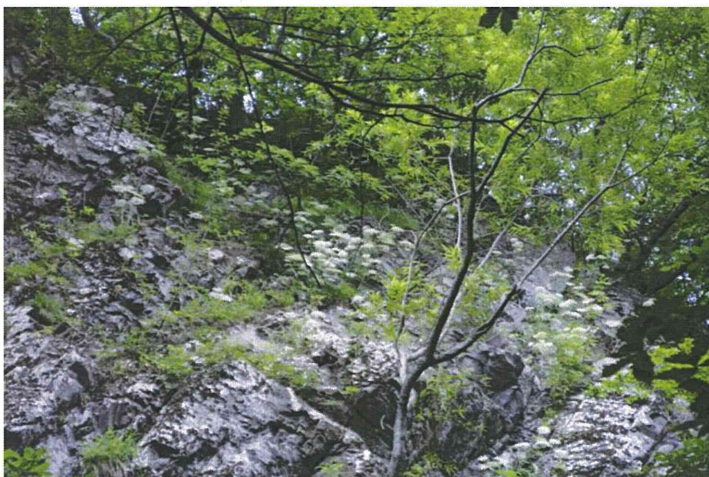


図5 歴舟川上流で観察された開花最盛期のトウキ類植物。2014年7月21日に撮影。



図6 豊似川で観察された開花最盛期のトウキ類植物。2014年7月21日に撮影。

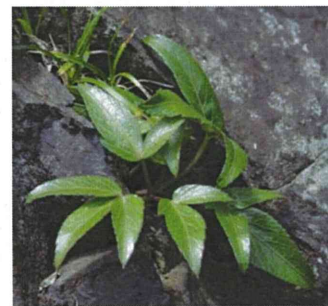


図7 えりも町海岸で観察された結実期のトウキ類植物。2014年7月21日に撮影。

表1 各調査地点で自生するトウキ類の個体密度、草丈、分布面積および個体数について

調査地点	個体密度 (個体数/m ²)	草丈 (cm)	分布面積 (m ²)	個体数
狩勝峠	25.7 ± 10.6 ^a	120.7 ± 8.4 ^a	77	1,967
上札内川上流	7.3 ± 3.8 ^b	71.0 ± 31.2 ^{ab}	600	4,400
歴舟川上流	4.7 ± 1.5 ^b	116.0 ± 33.5 ^a	305	1,423
豊似川	3.0	-	150	450
えりも町海岸	2.0 ± 1.0 ^b	32.0 ± 10.4 ^b	140	280

調査は2014年7月21日、22日に実施、個体密度と草丈の数値は平均値±標準偏差を示し、異なるアルファベット間に有意差があることを示す (n=3, Tukey-Kramer のHSD検定)。なお、上豊似橋のみn=1。

個体数：個体密度 × 分布面積

表2 北海道産トウキ類植物の形態調査 2 0 1 4

個体番号	No.4 上礼内1	No.7 歴舟川1	No.9 歴舟川3	No.5 上礼内2	No.10 えりも1	No.11 えりも2	No.12 えりも3	No.1 狩勝峠1	No.2 狩勝峠2	No.3 狩勝峠3	No.6 上礼内3	No.8 歴舟川2
植物タイプ	トカチトウキ (小型)				ミヤマトウキ			トウキ類(シシウド属)の一種 (特大)				
1. 立地条件												
生育環境	川沿い	川沿い	川沿い	川沿い	海岸	海岸	海岸	林縁	林縁	林縁	川沿い	川沿い
標高(m)	381.2	175.8	179.7	381.2	12.3	12.3	12.3	647.8	647.8	647.8	381.2	173.9
2. 全形に関する形質												
※草丈(cm)	91	115	83	35	37	20	39	125	126	111	87	150
分枝数	1	1	1	1	1	1	1	2	5	3	1	4
3. 茎に関する形質												
茎色	緑色	ほとんど 緑色 (紫色 わずか)	緑色 (一部 紫色)	緑色 (一部 紫色)	ほとんど 緑色 (紫色 わずか)	緑色 (一部 紫色)	緑色 (一部 紫色)	緑色 (一部 紫色)	緑色 (一部 紫色)	緑色 (一部 紫色)	緑色 (一部 紫色)	緑色
※最大茎径(mm)	6.0	6.5	6.7	5.0	8.0	8.0	7.5	11.0	13.8	10.0	9.0	13.0
茎の毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛
4. 葉に関する形質												
※葉質	稍薄い	稍薄い	稍薄い	稍薄い	やや厚い	やや厚い	やや厚い	稍薄い	稍薄い	稍薄い	稍薄い	稍薄い
※葉終裂片幅(cm)	2.0	2.2	1.5	1.3	2.7	2.0	2.5	2.5	3.0	3.0	4.0	3.5
※葉終裂片形	狭披針形	狭披針形	狭披針形	狭披針形	長卵形	長卵形	長卵形	広披針形	広披針形	広披針形	広披針形	広披針形
※葉表の光沢	無	無	無	弱い光沢	光沢明瞭	光沢明瞭	光沢明瞭	弱い光沢	弱い光沢	弱い光沢	弱い光沢	弱い光沢
※葉鞘のふくらみ	ほとんど 無	ほとんど 無	ほとんど 無	ほとんど 無	明瞭	明瞭	明瞭	わずか	わずか	わずか	わずか	わずか
※鋸歯の形状	細かい 不揃い	細かい 不揃い	細かい 不揃い	細かい 不揃い	細かい 不揃い	細かい 不揃い	細かい 不揃い	粗い 不揃い	粗い 不揃い	粗い 不揃い	粗い 不揃い	粗い 不揃い
茎葉数	3	5	4	3	4	3	3	4	6	4	4	6
小葉先の形	徐々に狭く とても長く 尖る	徐々に狭く 長く尖る	徐々に狭く 長く尖る	徐々に狭く とても長く 尖る	徐々に狭く 短く尖る	徐々に狭く 短く尖る	徐々に狭く 短く尖る	徐々に狭く 長く尖る	徐々に狭く 長く尖る	徐々に狭く 長く尖る	徐々に狭く 長く尖る	徐々に狭く 長く尖る
中位の葉長(cm)	36	43	35	22	18	14	15	50	45	51	45	55
葉の出方	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉	2回3出 複葉
最大小葉長(cm)	12.0	17.5	10.0	8.5	5.5	4.5	5.0	7.5	7.7	8.0	11.0	14.0
葉表の色	薄い緑色	緑色	薄い緑色	薄い緑色 (一部紫 色)	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色
葉裏の色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色	やや白色 帯びた 緑色
葉表の毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛
葉裏の毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛	無毛
葉柄の色	薄い緑色	緑色	薄い緑色	薄い緑色 (一部紫 色)	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色
5. 根に関する形質												
根の太さ	やや細い	やや細い	細い	やや細い	太い	太い	太い	太い	太い	太い	やや太い	太い
6. 花に関する形質												
花弁色	白色	白色	白色	白色	白色	白色	白色	白色	白色	白色	白色	白色
やくの色	白色	白色	白色	紫色	紫色	白色	白色	白色	白色	白色	紫色	白色
花径(mm)	3.5	3.5	2.0	3.0	2.5	-	-	2.0	2.0	2.0	2.5	2.0
周辺部花弁形	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い	ほぼ揃い
花序数	2	3	2	2	3	3	3	4	7	4	3	6
花序の高さ	ほぼ揃う	ほぼ揃う	ほぼ揃う	ほぼ揃う	上下 バラツキ 小	ほぼ揃う	上下 バラツキ 小	上下 バラツキ 中	上下 バラツキ 大	上下 バラツキ 中	上下 バラツキ 小	上下 バラツキ 大
花序茎の色	薄い緑色	緑色	薄い緑色	薄い緑色 (一部紫 色)	緑色 (一部紫 色)	緑色 (一部紫 色)	緑色	緑色 (一部紫 色)	緑色 (一部紫 色)	緑色 (一部紫 色)	緑色	緑色
花序の毛	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生	短毛密生
大散形花序の包	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)
小散形花序の包	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)	有(線形)
7. 若い果実に関する形質												
果実の形	-	卵形	卵形	-	長楕円	長楕円	長楕円	-	長楕円	長楕円	-	長楕円
果実の厚さ	-	やや丸い	やや丸い	-	やや丸い	やや丸い	やや丸い	-	平ら	平ら	-	平ら
果実長(mm)	-	2.0	2.0	-	3.0	3.0	3.0	-	3.0	2.5	-	3.0
果実幅(mm)	-	1.5	1.5	-	1.5	1.5	1.5	-	1.0	1.0	-	1.5
果実翼の割合	-	少ない	少ない	-	少ない	少ない	少ない	-	少ない	少ない	-	少ない
果実の色	-	緑色	緑色	-	緑色	緑色	緑色	-	緑色	緑色	-	緑色

※、太文字下線：植物タイプの区分の重要形質。二重線の囲み：各種の特徴形質。

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物、生薬の持続的生産を目指した新品種育成および新規栽培技術の開発
並びにこれらの技術移転の基盤構築に関する研究（H25-創薬-一般-003）
分担研究報告書

分担研究課題：薬用植物品種の遺伝子識別に関する研究

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

要旨 薬用植物優良品種の開発において、育成した植物の知的財産権保護の重要性は今後高まると予想される。本分担研究課題では、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて育成された優良品種を主な鑑別対象とする、シャクヤクの遺伝子鑑別法の開発を試みた。解析対象領域として花色に関わるアントシアニン類の生合成酵素遺伝子群に着目し、これらの品種間の遺伝子多型を解析した。その結果、DFR遺伝子ゲノムDNAのExon2-Exon4領域に品種間の識別に利用可能な遺伝子多型が見いだされた。これらの情報を基にPCR-RFLP法の適用を検討したところ、今回供試したシャクヤク4種のそれぞれの識別が可能であった。本領域はシャクヤク優良品種の遺伝子鑑別に有用な領域であると考えられる。

A. 研究目的

近年、イネをはじめとする有用作物においては、相次ぐ優等品種の偽装問題や、優等品種の種苗の流出の問題に対応するため、品種等の鑑別に遺伝子鑑別技術を利用することが主流となってきており、鑑別用キットなども販売されている。

厚生労働科学研究費「薬用植物、生薬の持続的生産を目指した新品種育成および新規栽培技術の開発並びにこれらの技術移転の基盤構築に関する研究」においては、有用物質高含量系統や、有用な形質並びに栽培特性を持った優良系統の作出を遂行課題のひとつとしているが、本研究で作出した優良品種等の知的財産権の保護の重要性は、穀類等の作物と同様に今後一層高まると考えられる。

そこで、本研究分担課題においては、薬用植物分野における優良品種の知的財産権保護の一助とするため、育成する優良品種と、在来の品種等を遺伝子レベルで識別する方法を確立することを目的とする。

薬用植物の栽培から成分・遺伝子研究、そして資源保存までを一貫して実施する国内随一の薬用植物の総合研究機関であるセンターにおいて、優良品種の品種育成並びに、優良資源の保存とそれらの知財保護に関わ

る遺伝子鑑別法の開発を、歩調を合わせ進めることの意義は大きい。

また、生薬や薬用植物の基原植物の鑑別において、遺伝子鑑別技術はその重要性を増しており、日本薬局方の参考情報の項にもその手法が収載されるようになっている。しかしながら、それらの手法を薬用植物の系統や品種、そして個体のレベルでの識別に応用した例は未だ少ない。本研究では、薬用植物の分野において、保存資源並びに、我々の手で育成した優良系統並びに品種等について、迅速かつ客観的に鑑別可能な手法について検討し開発する点を特色とする。

B. 研究方法

遺伝子鑑別の解析対象領域は対象とする植物によりさまざまであるが、薬用植物の遺伝子鑑別においては、二次代謝物質の生合成酵素遺伝子の多型情報が、薬用植物の品質を左右するそれらの化合物の生産性等に直接リンクする情報として有用と考えられる。医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターではこれまで、二次代謝酵素遺伝子の多型に着目し、オウレン、ウラルカンゾウ、ケシ属植物等の植物種や優良系統等の鑑別法の確立に成功している。

今回、鑑別対象とするシャクヤクにおいては、主要薬用成分であるペオニフロリン等の生合成機構が未解明であるため、花色（文献1）を決定するアントシアニン類の生合成経路に着目し、本経路の酵素遺伝子群の多型について優良品種の鑑別への利用が可能か否か検討した。

遺伝子解析に供したシャクヤク試料

本研究に供試したシャクヤク *Paeonia lactiflora* 試料は下記のとおりである。

#1:「北宰相」（花色：白）北海道研究部 乾燥葉

#2:「べにしずか」（花色：紅）北海道研究部 乾燥葉

#3:1570-10 大和シャクヤク（花色：白）根

#4:1500-10 新潟県産（花色：淡赤）根

解析対象遺伝子領域の検討

アントシアニン生合成経路の酵素遺伝子の多型情報を遺伝子鑑別に適用するにあたり、生合成経路の酵素遺伝子群のうち、図1に示す、phenylalanine ammonia lyase (PAL)、chalcone synthase (CHS)、dihydroflavonol 4-reductase (DFR)の3酵素遺伝子に着目した。これらの遺伝子を利用した植物の品種等識別の例としては、Kaundunらや、氏原らのポリフェノールを含有するチャ（茶）の、市販緑茶の品種識別に利用した例（文献2～4）が挙げられる。氏原らは、チャの品種識別のため、ポリフェノール生合成経路のチャPAL、CHS2、DFRの3遺伝子の多型を利用し、日本国内に流通する市販の緑茶のブレンドされた品種を同定可能なDNAマーカーを開発している。今回、シャクヤクにおいて上記の3遺伝子について解析を行い、優良品種の鑑別に利用可能か否か検討した。

植物試料からのゲノムDNA調製

シャクヤク乾燥葉（試料#1, #2）及び、根（試料#3, #4）よりゲノムDNAを調製した。各試料（#1: 25.3 mg、#2: 24.5 mg、#3: 36.2 mg、#4: 22.0 mg、#1, 2は乾燥重、#3, 4は新鮮重）をサンプリングし、個別に直径4.8 mmのス

テンレスボールと共に2 mLスクリーキャップチューブに入れ、液体窒素に5分間浸漬したのち、MS-100(TOMY)にセットし2,500 rpmで1分間破碎した。破碎粉末に1 mLのDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1バッファー及び2 μ LのRNase（キット添付のもの）を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノムDNA調製を行った。最終的にゲノムDNAは50 μ LのAEバッファーで溶出し、その1 μ LをPCRに使用した。

シャクヤクのアントシアニン生合成酵素遺伝子のPCR増幅

シャクヤクのアントシアニン生合成経路のCHS、PAL、DFRの各酵素遺伝子のゲノムDNA情報の解析の詳細は下記のとおりである。

CHS (chalcone synthase)

CHSについては、シャクヤクのCHSのcDNA配列(JN132108)、シロイヌナズナのCHS cDNA配列(BT000596)及びCHSが座するゲノムDNAの配列(At5g13930)について多重配列解析を行い、シャクヤクゲノムDNA上のCHS遺伝子のexon1-exon2の領域を増幅するプライマーを設計した。プライマー配列は表1のとおり。これらのプライマーを用い、各試料のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。

PAL (phenylalanine ammonia-lyase)

PALについてはシロイヌナズナのPALゲノムDNA配列(L33677)とシャクヤクのPAL cDNA配列(JQ070801)より、シャクヤクPAL cDNAのExon1とExon2の境界を推定し、intron1を挟むこれらの領域間で、nested PCRを行うため、表1に示す特異的プライマーを2セット設計した。なお、PCR増幅産物の予想サイズはシロイヌナズナのPALゲノム配列情報より推定したものである。これらを用い各試料より調製したゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。

DFR(dihydroflavonol 4-reductase)

国際遺伝子データベース(EMBL/GenBank/DBJ)に登録されている *P. lactiflora* 由来のDFR 遺 伝 子 cDNA 配 列 (accession no.

JQ070804)と *A. thaliana* の DFR のゲノム DNA 配列 (AB033294, AJ251982, AM887616) を多重整列解析により比較し、植物種を越えて保存されていると考えられるエキソン、イントロン構造を推定した。その結果、シャクヤクの DFR 遺伝子についてそのゲノム構造を推定することができたため、intron 領域を含む Exon1-Exon2 及び Exon2-Exon4 に特異的なプライマーをそれぞれ設計した。プライマー配列は表1のとおり。これらを用い各試料より調製したゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。

塩基配列情報取得のための PCR は、いずれの領域についても下記の反応条件で行った。

PCR reaction mixture: KOD-plus (TOYOBO) 1 µl, KOD-plus buffer 5 µl, dNTP mixture 5 µl, MgSO₄ 2 µl, sense & antisense primers (100 µM) 0.5 µl each, genome DNA 1 µl, water 35 µl (reaction volume: 50 µl)

PCR condition: 94°C 2 min. - (94°C 15 sec. - 56°C 30 sec. - 68°C 90 sec.) x 35 - 4°C ∞、iCycler (BioRad)

得られた増幅産物はアガロース電気泳動で解析した。

PCR増幅産物の塩基配列解析

PCRにより特異的と考えられるバンドの増幅産物が得られた場合は、SV PCR Gel purrification kit (Promega)により標的の増幅産物に対応するバンドをゲル精製ののち、ダイレクトシーケンシングに供した。

DNAシーケンシング反応には各領域の増幅に用いたプライマーを用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)で行った。塩基配列解析には ABI PRISM 3130-Avant DNA sequencer、80 cm キャピラリー、POP-7ポリマー(Life)を用い、データ解析にはDNASIS-Mac v3.7 (Hitachi Software)、Finch TV (Geospiza Inc.)を使用した。

PCR-RFLP法によるシャクヤクの品種間識別

シャクヤク DFR 遺伝子ゲノム Exon2-Exon4 領域の、高品質な塩基配列遺伝子情報が得られた部分の多型情報より、これらを識別可能な変異点に着目し、PCR-RFLP法に適用可能

な制限酵素を検討した。その結果、*AfaI* または *Sau96I* で DFR 遺伝子ゲノム DNA の Exon2-Exon4 領域の PCR 増幅産物を消化すると、4試料を識別できると考えられた。

具体的には、*AfaI* は #1 の同領域において2か所を認識し切断するため、消化産物は3本のバンドになり、#2 及び #3 では1か所もしくは2か所が切断されたものが混在するため、消化産物は4本、そして #4 では、切断サイトが1か所のため、2本のバンドとなると予想された。同様に *Sau96I* で消化すると、#3 以外は1か所で切断される2本のバンドになるが、#3 は1か所で切断される遺伝子型と、*Sau96I* サイトがない遺伝子型が混在するため、3本のバンドとなると推定された。

そこで、KAPA3G (日本ジェネティクス) を PCR 酵素として用い、下記の PCR 条件で DFR 遺伝子 Exon2-Exon4 領域の増幅を行い、得られた PCR 産物を *AfaI* または *Sau96I* を用い 37°C で1時間消化した。消化産物は反応液全量をアガロースゲル電気泳動 (ME-agarose, 1.0%ゲル) に供し、解析を行った。PCR 及び制限酵素消化の各反応条件は下記のとおり。
[KAPA3G の PCR 反応]

PCR reaction mixture: water 23.3 µl, KAPA3G Plant PCR Buffer 25.0 µl, primer sense & antisense (100 µM) 0.15 µl each, KAPA3G polymerase 0.4 µl, genome DNA 1 µl (reaction volume: 50 µl)
PCR condition: 95°C 3 min. - (95°C 20 sec. - 58°C 15 sec. - 72°C 30 sec.) x 40 cycle - 72°C 60 sec. - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

[PCR産物の制限酵素消化]

AfaI digestion

PCR product 5 µl, 10xT buffer 0.65 µl, 10xBSA 0.65 µl, *AfaI* (TakaraBio) 0.2 µl (reaction volume 6.5 µl), 37°C, 1 hr

Sau96I digestion

PCR product 5.65 µl, 10x Cut Smart buffer 0.65 µl, *Sau96I* (NEB) 0.2 µl (reaction volume 6.5 µl), 37°C, 1 hr

C. 研究結果

シャクヤクのアントシアニン生合成酵素遺伝子群のゲノム DNA の多型解析

CHS

データベース登録のシャクヤク CHS 遺伝子の塩基配列をもとに設計したプライマーを用い、各試料のゲノム DNA を鋳型として PCR を行ったところ、図 2(a)のように単一バンドの CHS ゲノム DNA(CHSg)の増幅産物が得られた。これらの遺伝子配列を解析したところ、混合塩基が認められたが、いずれも同一の配列型であり、本領域における試料間の変異等の多型は認められなかった。

PAL

シャクヤクの PAL 遺伝子について設計したプライマーを用い、各試料より調製したゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。2nd PCR 用のプライマーセットを用いた PCR では特異的と考えられる増幅産物が得られなかったため、nested PCR を適用した。その結果、1st PCR では、予想よりも小さい約 0.4 kbp のサイズの PCR 産物が得られたが、試料#1, #2, #8 においてバンドがブロードであった。これらの PCR 産物よりプライマーを Illustra ExoStar (GE ヘルスサイエンス) で処理し除いたのち、これを鋳型として 2nd PCR を行ったところ、増幅産物が得られず、特異的な増幅が進行していないものと考えられた。

DFR

シャクヤクの DFR 遺伝子について設計したプライマーを用い、Exon1-Exon2 について PCR 増幅を行ったところ、図 2(b)のように約 0.2kbp の single band の増幅産物が得られたため、これを direct sequencing に供した。その結果、各試料の DFR ゲノム DNA の塩基配列は混合塩基を含め、いずれも同一であり、試料特異的な変異等の多型は認められなかった。

続いて、Exon2-Exon4 について PCR 増幅を行ったところ、図 2(c)のように約 0.8 kbp の single band の増幅産物が得られたため、これを direct sequencing に供した。その結果、多数の遺伝子変異点が認められたが、試料#2, #3, #4 については、intron3 と推定される領域

の波形が乱れ、下流領域の解析が不可能であった。

ダイレクトシーケンシングによる解析結果であるため、一部試料の塩基配列解析結果については、とくに両末端領域の品質が低い情報となっているが、各試料の DFR 遺伝子は 2 種以上の遺伝子型により構成されることが推定された。ダイレクトシーケンシングの結果をまとめたものが表 2 である。

表 2 に示すように、今回供試した 4 試料は exon2-exon4 領域の遺伝子型によって、それぞれを区別できる可能性が示された。

PCR-RFLP 法によるシャクヤクの品種間識別

DFR 遺伝子ゲノム配列 (DRFg) の Exon2-Exon4 領域における試料#1~#4 の変異点情報から、同領域の PCR 産物を *AfaI* または *Sau96I* で消化すると、図のように消化された DNA 断片によりそれぞれを識別できると期待された。

各試料の PCR 産物をこれらの制限酵素で消化した結果、ほぼ予想したバンドパターンと同様の消化産物が得られた (図 3)。このように、PCR-RFLP 法により、#1~#4 の各シャクヤク (品種) を識別できることが示された。

D. 考察

今回得られた各試料の DFR 遺伝子ゲノム配列情報を用い、それぞれの試料に特異的な変異点をターゲットとして PCR-RFLP 法により各植物の識別ができる可能性を示した。今後、同領域のクローニングにより高品質な塩基配列情報を取得することにより、各試料特異的な変異点について設計したプライマーや、制限酵素を組み合わせ適用することにより、各試料の迅速かつ客観的なより精度の高い識別が可能になり、シャクヤク優良品種の知的財産権保護のための有力なツールとなるものと考えられる。

現在のところ、シャクヤクについては、主要薬用成分であるペオニフロリンやペオノールの生合成機構が明らかになっていない

ため、これらの生合成遺伝子の情報を利用することができないが、我々はシャクヤクの EST ライブラリーを構築し、解析中であり、シャクヤクの EST 情報を活用することにより、ペオニフロリン生合成機構の解明につながる情報が得られるものと期待され、これらの二次代謝酵素遺伝子群の多型情報を活用することにより、より有用成分の生産性等の品質に関わる情報にリンクした遺伝子鑑別手法が開発できるものと期待される。

E. 結論

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいて育成された優良品種を主な鑑別対象とする、シャクヤクの遺伝子鑑別法の開発を試みた。解析対象領域として花色に関わるアントシアニン類の生合成酵素遺伝子群に着目し、これらの品種間の遺伝子多型を解析した。その結果、DFR 遺伝子ゲノム DNA の Exon2-Exon4 領域に品種間の識別に利用可能な遺伝子多型が見いだされ、これらの情報を基に PCR-RFLP 法の適用を検討したところ、今回供試したシャクヤク 4 種のそれぞれの識別に成功した。本領域はシャクヤク優良品種の遺伝子鑑別に有用な領域であると考えられる。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

G. 研究発表

1. 学会発表
なし
2. 論文発表
なし

H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

I. 文献

- (1) 細木高志、瀬尾光広：シャクヤクの花のアントシアニン. 島根大農研報(*Bull. Fac. Agr. Shimane Univ.*) **25**: 11-14 (1991)
- (2) Kaundun, S.S. and Matsumoto, S. Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in Tea, *Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze, and differentiation between assamica and sinensis varieties. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 375-383 (2003)
- (3) 氏原ともみ：DNA マーカーによる市販緑茶の品種識別. https://www.naro.affrc.go.jp/training/files/2004_7-07.pdf
- (4) (独) 農業・生物系特定産業技術研究機構 野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点、緑茶の品種識別マニュアル. http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/naro-se/cha-shikibetsu.pdf (平成 17 年 2 月)

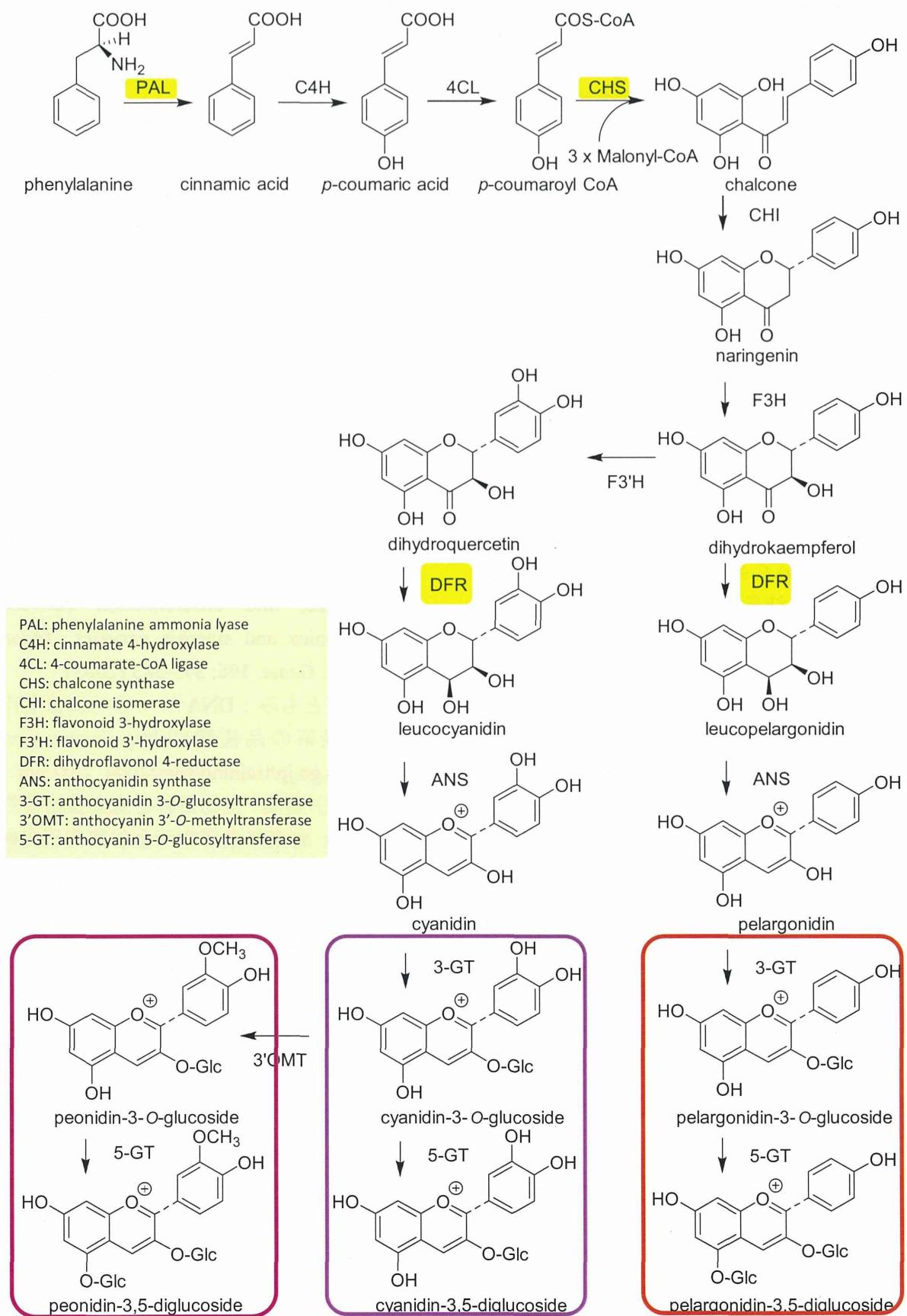


図1. シャクヤクに含まれるアントシアニン類とその生合成経路の概要

表1. 本研究で用いたプライマーの配列情報

Target gene	Region (expected length)	Primer name	Sequence of oligo DNA	Remarks
PAL	Exon1-Exon2 (ca. 0.64 kbp)	PIPALg-Ex1S1	5'-ata gtt acg gtg tca caa ctg-3'	1st PCR
		PIPALg-Ex2A1	5'-gag agt gtt gat tct cac tag-3'	
	Exon1-Exon2 (ca. 0.60 kbp)	PIPALg-EX1S2	5'-gtt tgg cgc aac ttc gca cag-3'	2nd PCR
		PIPALg-Ex2A2	5'-tag cat ggc tgc tct agt tgc-3'	
CHS	Exon1-Exon2 ca. 0.33 kbp	PICHSG-Ex1S	5'-gta tca acc agg ctg agt atc-3'	
		PICHSG-Ex2A	5'-cac cat gtc ttg acg tgc atc-3'	
DFR	Exon1-Exon2 ca. 0.19 kbp	PIDFRg-Ex1S	5'-tcg gtt cat ggc ttg tca tgc-3'	
		PIDFRg-EX2A	5'-cac agg gtc aaa tgg gta tcc-3'	
	Exon2-Exon4 ca. 0.78 kbp	PIDFRg-Ex2S	5'-tga agc att tgt tgg att tgc-3'	
		PIDFRg-Ex4A	5'-acc aga gtt ggt atg ata ctg-3'	

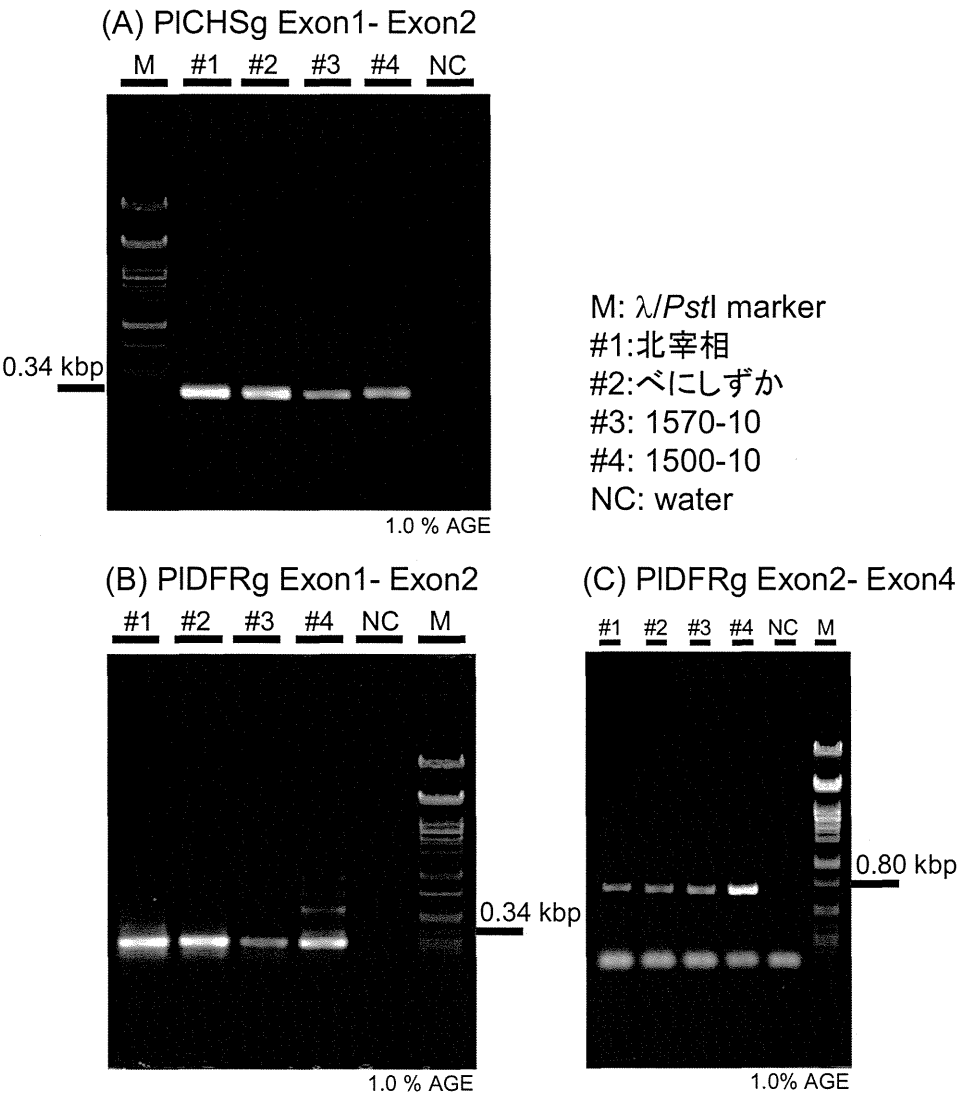


図2. シャクヤクのアントシアニン合成酵素遺伝子群各領域の増幅結果

表2. シャクヤクDFRg遺伝子Exon2-Exon4領域の優良品種間の多型情報

Sample	Nucleotide positions*														
	147	163	176	213	225	244	276	336	369	393	453	535	543	627	704
#1 北宰相	G	R	R	G	T	Y	K	G	R	A	C	A	A	W	S
#2 べにしずか	G	R	R	K	T	Y	G	R	A	R	S	W	NA	NA	C
#3 1570-10(大和)	G(A)	R	R	K	T(C)	Y	G	R	A	G(A)	S	W	NA	NA	C
#4 1500-10(新潟)	G	R	R	K	T	Y	G	R	A	G	G	T	NA	NA	C
RE sites	Sau96I										AfaI				
R:A/G, K:T/G, Y: C/T, S: C/G, W: A/T, (): weak signal												ambiguous region			
*: Nucleotide positions corresponds to the sequence data of sample #1															

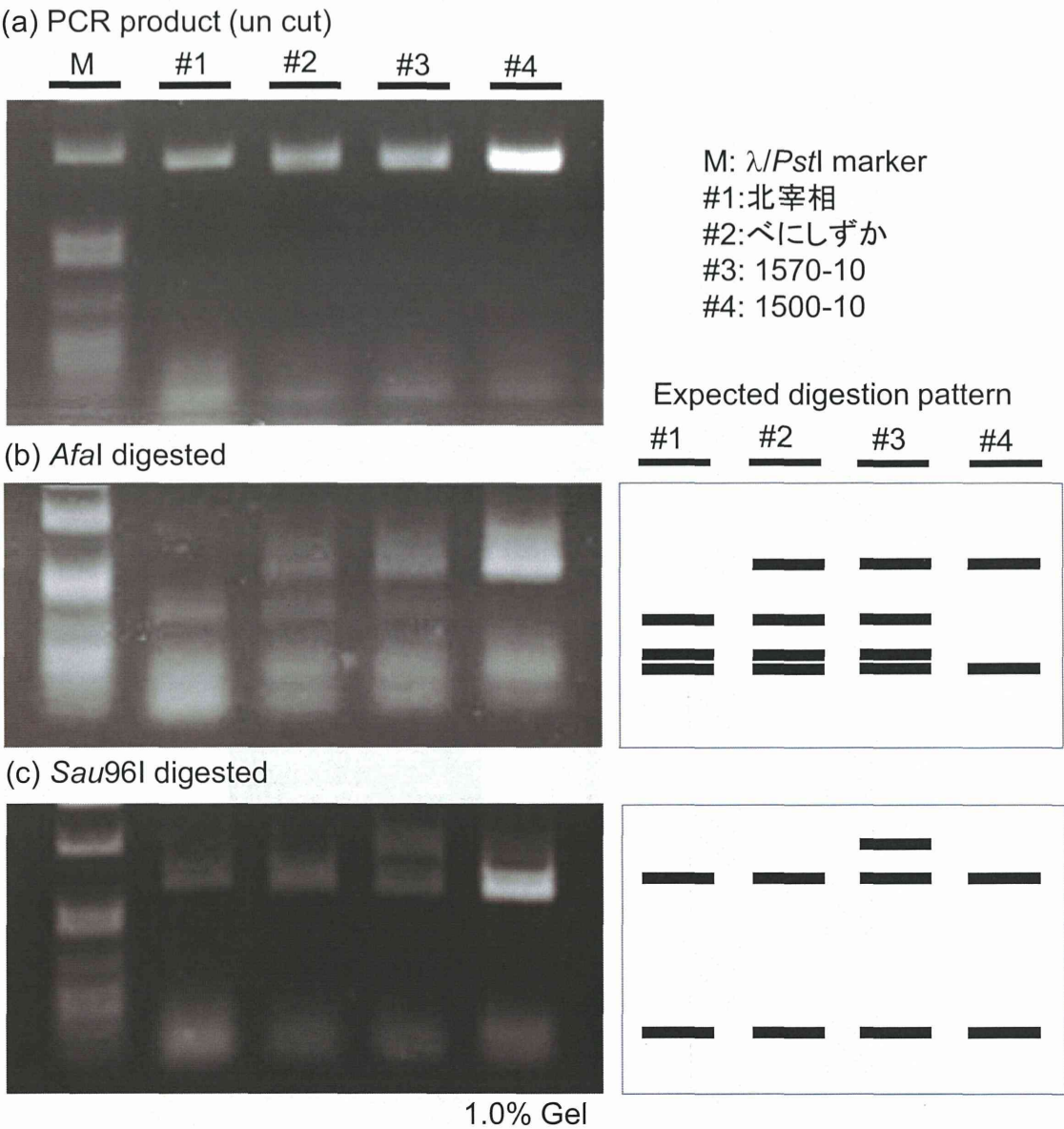


図3. PCR-RFLP法によるシャクヤク優良品種の識別

右が制限酵素AfaIまたはSau96IIによるDFRg Exon2-Exon4領域PCR産物の消化パターン。左が消化産物のアガロースゲル電気泳動解析結果。

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物、生薬の持続的生産を目指した新品種育成および新規栽培技術の開発
並びにこれらの技術移転の基盤構築に関する研究（H25-創薬一般-003）
分担研究報告書

分担研究課題：薬用植物の省力化、機械化栽培技術の確立と
栽培に適した環境条件の調査に関する研究
-栽培に適した環境条件の調査に関する研究-

研究分担者 井上 聡 農研機構北海道農業研究センター 主任研究員
研究協力者 村上 則幸 農研機構北海道農業研究センター 上席研究員
研究協力者 林 茂樹 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 研究員
研究協力者 菱田 敦之 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 研究サブリーダー

要旨 北海道内8地点および道外2地点において、2013年6月に移植した甘草のその後の生育調査結果と有効積算気温との関係を解析した。道内日本海側3地点とその他地点とを分ける事により、それぞれの区分で、有効積算気温と根重など各部位の甘草乾物重との関係式を得、各部位は均等に生育することが分かった。その他地域での生育が本来の生育ポテンシャルであり、道内日本海側の気候環境（多雨）によって生育遅延が生じていることが示唆された。

A. 研究目的

北海道のような寒地の大規模土地利用型農地において、農業を取り巻く情勢の変化に伴い、新規作物の導入可能性が検討されている。これは経済効果のみならず、近年の夏季高温や多雨、干ばつのような極端気象が多発する気候変動条件下の生産リスク分散としても期待されるところである。薬用植物は、国内と異なる気象条件の諸外国で栽培されているものが多く、新規作物としての可能性を十分に秘めているが、気象学的検討がきわめて不十分であり、導入に向けての障害になっている。

そこで、栽培に適した環境条件の調査を実施し、薬用植物の国内栽培の基盤を整備することが目的である。研究の目的を達成することにより、薬用植物の栽培における生産者の負担を軽減して国内栽培を促進し、医薬品原料の安定供給を図ることができる。さらに、新規作物として地域の産業振興に貢献することが期待できる。

B. 研究方法

本年は、2013年に移植した甘草を対象として、生育結果と気象との関係を解析した。

B-1 使用したデータ

2013年6月上旬に移植した甘草を、2013年10月下旬および2014年10月下旬に収穫し、各部位の長さや乾物重等の生育結果を得た。また、同期間気象観測を行っていた近隣の気象観測地点の気象観測データを入手し、解析した。各地点と気象データは以下の表の通りである。

2013年は、甘草の移植を6月1日、収穫を10月31日とし、その間を生育期間とした。2014年は4月1日から10月31日までを生育期間とした。

B-2 解析方法

北海道内の牧草（イネ科、マメ科）は、日平均気温5℃を閾値として5℃を超えると生育し、5℃を下回ると生育停止し、生育量が5℃以上の有効積算気温で表現できることが知られている。甘草にもこの関係を適用し、2013年の生育期間の有効積算気温と2013年生育結果、2013年と2014年の有効積算気温の和と2014年の生育結果を比較した。

C. 研究結果

2013 年の北海道内栽培地点の有効積算気温と各部乾物重の関係を図 1 に示す。特段の関係は得られなかった。また、2014 年の北海道内栽培地点の有効積算気温と各部乾物重の関係を図 2 に示す。特段の関係は得られなかった。

しかし、図 1、図 2 の赤丸の 3 地点を確認すると、遠別、鷹栖、札幌であり、いずれも日本海側に位置することが分かった。そこで、これら日本海側の地点とその他の地点とを別々に検討した。その結果を図 3、図 4 に示す。根乾物重、全地下部乾物重、全乾物重のいずれについても、有効積算気温との線形関係が得られた。

さらに北海道外の栽培地点である秋田、愛媛をその他地点に加えたところ、ほとんど同じ線形関係が得られた。

D. 考察

本解析は、マメ科牧草（赤クローバ、アルファルファ）の生育気象反応の知見を、同じマメ科である甘草に適用したが、マメ科牧草と同様に良好な関係を得た。その他地点は日本海側地点より同じ有効積算気温であっても生育が良好であった。これは、元来乾燥地で自生する甘草にとって、昨年検討した、日本海側の多雨・高水分ストレスによって、生育が停滞したためと考えられる。

しかし、秋に多雨傾向のある日本海側とその他地域とを別々に検討することにより、それぞれの地域で有効積算気温と乾物重の線形回帰式を得ることができた。特に甘草生産に重要な

根重が得られた。また、各部位で同様の 1 次式が得られたことから、甘草の温度生育反応は、特定の部位に働くのではなく、全体が同時に生育することが分かった。

さらに秋田、愛媛の生育結果が、道内その他の回帰直線上に載る結果となった。以上から、その他地域での回帰直線が甘草本来の温度生育反応（ポテンシャル）であり、日本海側の気候が生育停滞をもたらし、別の回帰式の要因となっていることが示唆された。2015 年は同年の栽培結果を追加するとともに、日本海側の生育停滞要因および土壌タイプの影響も検討する。

E. 結論

2013 年、2014 年の 2 ヶ年の気象データ、生育データから、北海道内日本海側、その他地域の 2 区分で、甘草の根重など各部位の乾物重推定式を得た。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 栽培地点と気象データの詳細

栽培地点	観測地点	観測者
遠別・褐低	遠別	アメダス
名寄	名寄	アメダス
鷹栖	江丹別	アメダス
美幌・報徳	報徳	気象協会
美幌・美富	美幌	気象協会
美幌・日並	日並	気象協会
札幌	札幌	独自
芽室	芽室	独自
秋田	大正寺	アメダス
愛媛	愛媛	独自

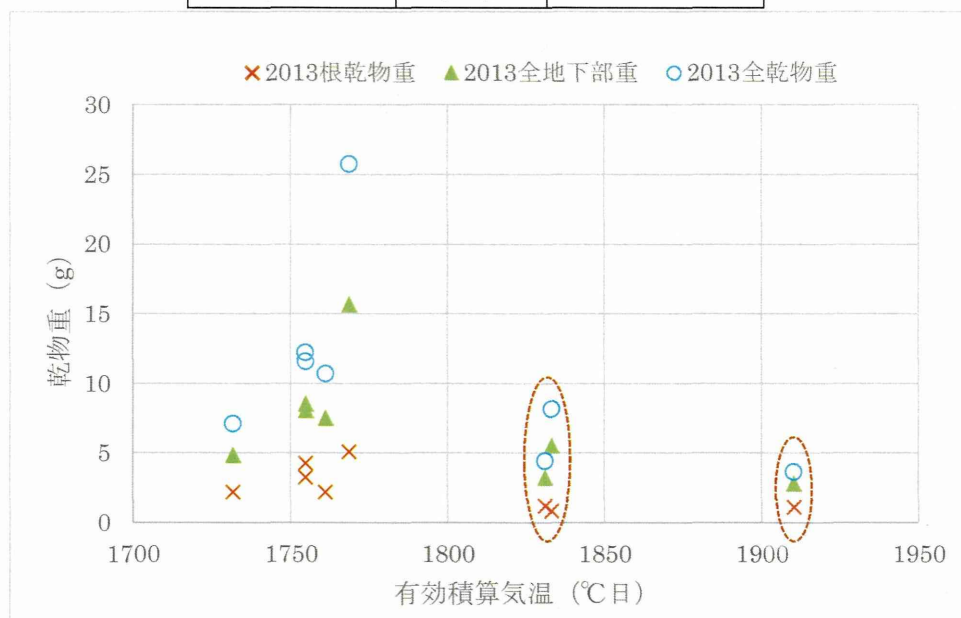


図1 2013年の有効積算気温と乾物重の関係
(○内は日本海側地点)

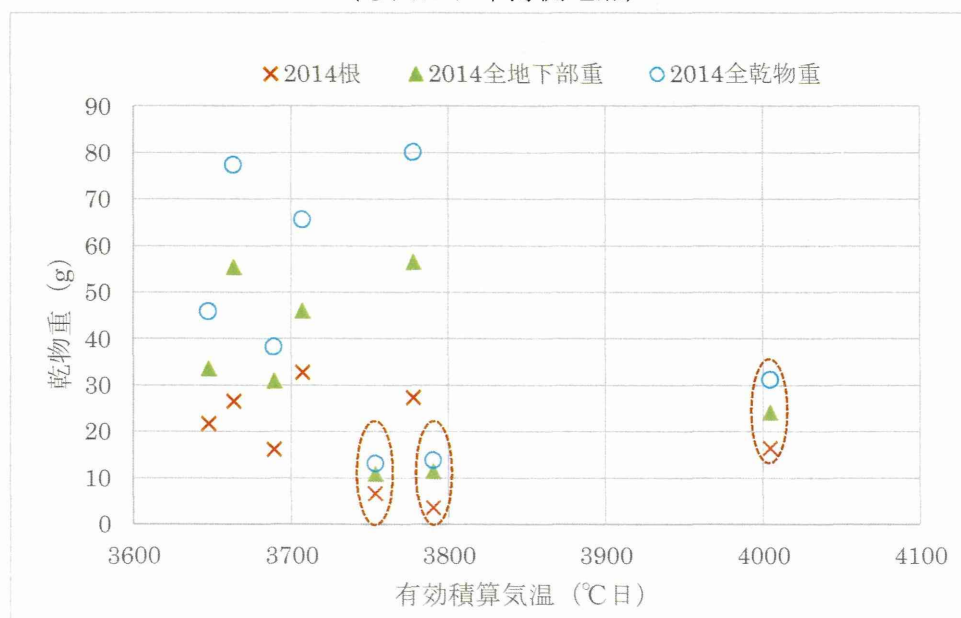


図2 2014年の有効積算気温と乾物重の関係

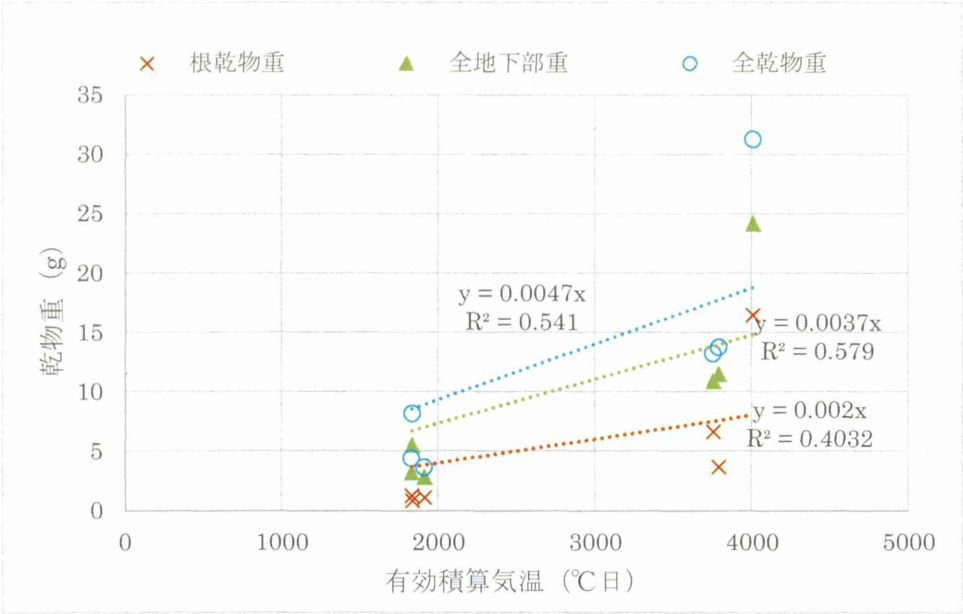


図3 日本海側地点の有効積算気温と乾物重の関係

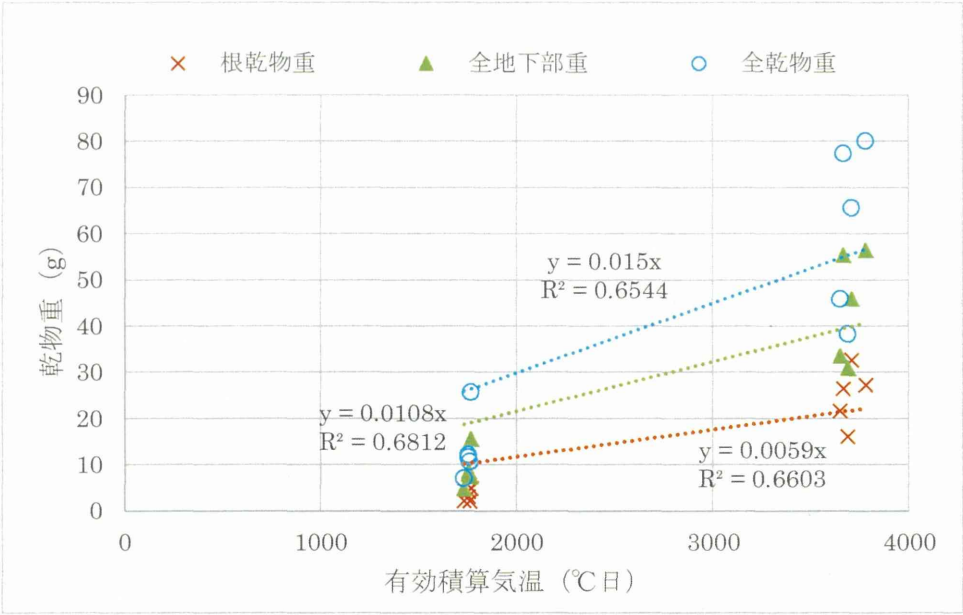


図4 その他地点の有効積算気温と乾物重の関係

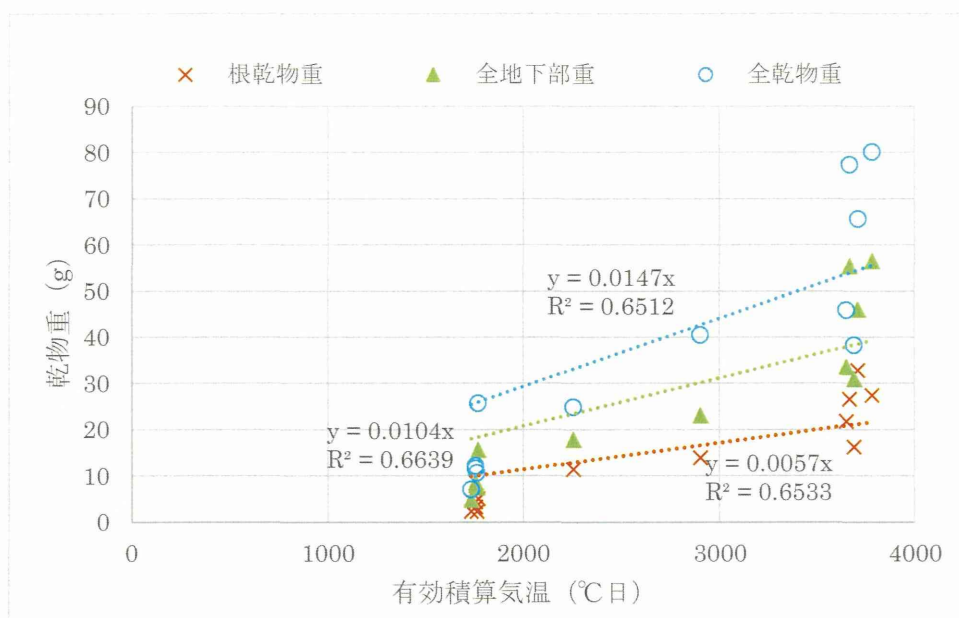


図5 その他地点および秋田、愛媛での有効積算気温と乾物重の関係

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物、生薬の持続的生産を目指した新品種育成および新規栽培技術の開発
並びにこれらの技術移転の基盤構築に関する研究（H25-創薬-一般-003）

分担研究報告書

分担研究課題：薬用植物の省力化、機械化栽培技術の確立と
栽培に適した環境条件の調査に関する研究
-根茎を利用する薬用植物の機械収穫方法の開発-

分担研究者 井上 聡 農研機構北海道農業研究センター 主任研究員
協力研究者 村上 則幸 農研機構北海道農業研究センター 上席研究員
協力研究者 林 茂樹 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 研究員
協力研究者 菱田 敦之 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 研究サブリダー

要旨 昨年度考案した薬用植物地下茎収穫のための振動サブソイラ型とコールタ型の2種類の機械収穫方法の実用化に向けてコールタ方式については昨年の試験結果に基づき、2連のディスクにより1工程でカンゾウ列両端のストロンの切断が可能な作業機を設計・試作して性能を調査した。調査の結果、ウェイトの追加は必要であるものの1m/秒までの作業速度で収穫に必要なストロンの切断深さ30cm以上で作業できることを確認した。

この結果を基に、大型トラクタ作業を想定したトラクタ前装型の切断装置を設計した。さらに本州での小規模栽培での利用を想定した中・小型トラクタを想定した収穫機については、2連の振動型サブソイラをベースとした収穫機を検討した。

A. 研究目的

多年生植物であるカンゾウ属植物の一部の根やストロン（地下茎）を乾燥させたものは甘草と呼ばれ、漢方処方の70%以上に処方される最も汎用性の高い生薬原料として知られており、医薬品原料として極めて有用であるばかりでなく、ショ糖の約150倍という独特な甘味を有しているため、甘味料としても大量に消費されている。現在、殆ど全てが中国などから輸入している野生品で賄われていることから、国内での栽培の各種方法が検討されている。国内生産の問題として作業の省力化があげられる。

栽培期間が複数年にまたがるカンゾウ属植物は、根やストロンを土壌に深くかつ広域に張り廻らす性質があるため、通常の根菜類の収穫に用いられる各種掘取り機では、地中に強固に張り付いたカンゾウ属植物の根やストロンが掘取り機に絡まってトラクタが前進することができなくなるため、これらを

利用することができなかった。そこで昨年、従来のバックホー等の重機を利用した収穫に代わる省力的な機械収穫方法を考案した。

提案方法では、従来のワサビなどの掘取り上げ機では困難であった連続収穫作業が、ストロン切断の前処理を行うことで可能となり、収穫作業を大幅に省力化できる可能性があることを確認した。

そこで本年は、昨年得た基礎データを基に、ストロンの切断機を試作し、その性能を確認するとともに、実用的なカンゾウ収穫機を構想・設計した。

B. 研究方法

B-1 コールタ型切断装置の試作

昨年度の調査結果より、75馬力以上の大型トラクタ作業を想定した省力作業を目的としてディスク（コールタ）によりストロンを切断する前処理機を試作する。

前年度の結果より、掘取り機による収穫作

業を省力的に行うために必要なストロン切断深さ30cm以上を確保するためには、2連のディスクにより1工程で作業を行うためには約500kgの作業機質量が必要であることが明らかになった。そこで、本年度、昨年利用した振動サブソイラ（K社製、SVシリーズ）のフレームをベースに図1に示す2連ディスク型のストロン切断モデル作業機（材質 一般構造用鋼材、ディスク直径90cm、厚さ3.2mm、トラクタ用の45kgウェイトを6枚搭載）を試作した（図1）。作業機とウェイトの質量を合わせて、総質量は約500kgである。

B-2 実用機の開発に向けた検討

上述の試作機による試験結果などを参考に、実用機の検討・設計を行った。

C. 研究結果

C-1 試作機による性能試験

試作ストロン切断機の試運転を5月22日に実施、7月11日には7月12日の収穫機実演に向けてストロンの切断作業を行った。5月22日の試験では、作業速度を0.15~0.20m/sの低速で実施し、その切断深さを調査した。圃場の土壌硬度は（山中式土壌硬度計）試し掘り圃場（採種圃）が1970~3700 kPa、試験圃場が396~532 kPa（測定深度は20~30cm）であった。試運転の結果、図1に示すように特に土壌硬度が高い圃場では切断深は20~30cmで、目標の30cmの切断深には到達しなかった。

7月11日には、追加の荷重により目的とする30cm以上の深さを確保でき、翌日の根菜堀取り機によるカンゾウの連続収穫作業を実施できた。

C-2 前装コールタ型作業機の設計

2連のディスクでの1工程作業を安定的に実施するためには追加の荷重が必要であること、また堀取り同時作業を考えると、トラクタの前装着が望ましいことから、図2に示すトラクタ前装着型ストロン切断機を設計した。装置の圃場への差し込みは油圧シリンダにより行う。油圧はトラクタから供給し、差し込み深さは、油圧バルブの開閉により自由に調節可能である。設計図を図3に示す、シリンダの取り付けにより、ディスクの上下

ストロークを50cm以上確保できると考えられる。

C-3 大型コールタの材料の検討

試作機による作業試験では、トラクタ姿勢の変化などにより横からのディスクへの荷重によりディスクがたわむことがあった。短期的な作業は可能であるが、長期・長時間の作業での耐久性等、部材の材質及び表面の加工方法については検討が必要である。

これまでの調査結果で本作業に適する部品は国内農業機械関係では見当たらないことから、金属材料加工メーカーと協力して新たに試作の準備を進める。

C-4 小型トラクタ向け収穫機の検討

小規模、中・小型トラクタ向けの収穫機の構成を検討した。昨年の試験結果から、振動サブソイラ（N社製）の2連タイプをベースに後方にバレイショのディガーをベースにした堀取り部を接続する。最大作業切断深さは45cmである。作業速度は、0.15~0.20m/s程度である（図省略）。

D. 考察

昨年の試験結果を基に、前処理の2方式について実用に向けた試作・検討を行った。

1) コールタ式については、切断深さは土壌の影響を受け、2連のディスクで安定的に30cm以上の切断深さを確保するために、500kg以上の作業機質量が必要であった。

2) 上述のコールタ方式で荷重を確保し、さらに収穫までを1工程で行うためには、トラクタ前装とすることが適当である。設計の結果、油圧シリンダによるディスクの上下委機構により、ディスクの深さ調節が可能である。

3) ディスクは剛性や耐摩耗性に優れた材料及び表面加工が必要であり、引き続き検討を進める。

4) 中・小型トラクタ向けでは振動サブソイラをベースに堀上げ機構を装着した機構が有望である。

E. 結論

昨年考案した、ストロン切断のための収穫前処理手法について、北海道向けコールタ型

試作機の性能調査を中心に実用に向けた検討を行った。

土壌硬度などにより、切断深さは影響をうけることから、必要切断深さを確保するためには荷重は 500kg 以上必要でありそのためには、トラクタ後方の装着では、3 点リンクに係る作業機の上下動の負荷を考慮すると限界があり、トラクタの前装とすることが、作業機の上下調整や後方への堀取り機の装着を考えると合理的である。

今後は、実用性の高いコールタの試作を進め、北海道向け実用機を完成させる。さらに、本州向け作業機についても検討を進め、次年度は実用機を完成させる。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 出願番号：特願2014-246362号、発明の名称：薬用植物の地下部の収穫方法並びにそれに用いる切断装置及びトラクタ、発明者：村上 則幸、菱田 敦之、林 茂樹、中西 大樹、出願日：平成26年12月4日



図1 試作コールタ型ストロン切断機
(作業機上にウェイト 290kg (45kg×6 枚) を搭載)