

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18894

研究課題名(和文) マオウ属植物の新品種育成を基盤とした育種戦略

研究課題名(英文) Investigation of plant breeding for Ephedra species

研究代表者

安藤 広和 (ANDO, Hirokazu)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00768731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、麻黄の原植物であるマオウ属植物の新品種の育成及び品質評価法の開発を目的としている。新品種の育成では、*E. sinica*と*E. likiangensis*の交配によって総アルカロイド含量の高い個体を、*E. sinica*と*E. chilensis*の交配によってエフェドリン系アルカロイドを含有しない個体を作製した。これらの成果はマオウ属植物の初めての育種であり、含有成分をコントロールするための手段として交雑法が有効であることを示唆した。また、品質評価法の開発では、総アルカロイド含量と総タンニン含量の相関関係を見出し、アルカロイドを含まないマオウにも適応可能な新たな品質評価法を開発した。

研究成果の概要(英文)：This research aims to grow a new breed and to develop a quality evaluation method of Ephedra species which is required to cultivate domestic. In plant breeding, we successfully produce two types through breed *E. sinica* and *E. likiangensis*; one contains high total alkaloids, the other does not contain them. This is a first attempt to breed Ephedra species and it suggests a possible way to control the amount of components. In addition we revealed a correlation between total alkaloids and total tannin contents which is useful to evaluate a quality of Ephedra species not including alkaloids.

研究分野：薬用植物学

キーワード：マオウ 育種 エフェドリン 栽培

## 1. 研究開始当初の背景

漢方生薬「麻黄」は葛根湯、麻黄湯などの漢方処方に配合される重要生薬である。日本では年間 500 トン以上の需要があるが、マオウ属植物は日本に自生しないため、その全てを中国から輸入している。しかし、中国は資源保護、砂漠化防止を理由に麻黄の輸出を規制しているため、供給は常に不安定な状態にある。その為、マオウの国内栽培は必要性が高いとされている。

マオウ属植物は種によって含有成分に特徴がある。*E. sinica* ではエフェドリン (E) が多く、*E. intermedia* ではプソイドエフェドリン (PE) が多くと報告されている (Hong H *et al.*, *J Nat Med* **65**(3-4), 623-628 2011)。また、総アルカロイド含量は *E. equisetina* > *E. intermedia* > *E. sinica* の順に多いとされている (御影雅幸, 特産種苗 No.16, p55, 2013)。しかし、野生株では産地によってアルカロイドの組成や総アルカロイド含量にバラツキがある。先行研究では、アルカロイドの組成は遺伝的要因によってコントロールされており、総アルカロイド含量は環境要因によって影響を受けると報告されており (Matsumoto M. *et al.*, *J Nat Med* **69**(1), 63-67 2015)、野生株では安定した品質の麻黄の生産が困難である。

第十七改正日本薬局方 (JP17) では総アルカロイド含量 (E+PE) が規定されているが、組成の記載はない。しかし、E 及び PE は立体異性体の関係にあり、生理作用が異なっている。すなわち、同じ総アルカロイド含量を示す麻黄であっても、アルカロイド組成によって生理作用が異なっている。その為、麻黄湯や麻杏甘石湯などの処方には、組成が E > PE である麻黄を、防風通聖散などの処方には PE > E である麻黄を使用することが推奨されている。また、漢方医療の現場では、麻黄含有製剤は狭心症、心筋梗塞患者、重症高血圧患者に対して投与を制限しており、アルカロイドが副作用になる場合もある。しかし、現在市場に流通している麻黄は野生株を使用している為、アルカロイドの組成をコントロールする事は困難であり、尚且つ JP17 収載種は全てアルカロイドを含有する種であるため、使用目的に応じて使い分ける事は困難である。

## 2. 研究の目的

麻黄含有製剤の治療効果向上の為にはアルカロイド組成及び総アルカロイド含量がコントロールされたマオウ栽培品種の育成が必要不可欠である。その為、本研究課題ではマオウの栽培化を志向した新品种の育成及びその品質評価法を確立する事を目的とし、漢方処方や患者に応じて使用可能なマオウの育種を行う。我々は金沢大学保有株の中から優良品種の選抜を行い、利用価値の高いマオウ株を育種する。また、同属間の交配による新品種育成を試みる。

## 3. 研究の方法

我々は石川県の能登半島及び金沢大学医薬保健学域薬学類・創薬科学類附属薬用植物園にてマオウ属植物を 20,000 株以上栽培している。それらの植物を用いて 優良品種の育種、品質評価法の検討を行う。

### 優良品種の育種

#### 淘汰法による育種

金沢大学が保有している約 1,000 株の *E. sinica* を対象に栽培特性の調査として形態、収穫量、増殖性を検討する。優良な性質であると判断した個体について、挿し木法によるクローン株の作製を行う。また、含有成分についても精査する。

#### 総アルカロイド含量の定量

十分乾燥したマオウを粉碎し、得られた粉末をオープンで 105 °C、15 時間乾燥させた。粉末を正確に 30 mg 量り取り、移動相を 1.5 mL 加え、室温で 20 min 放置後、25 min 超音波抽出した。12,000 rpm、15 min 遠心分離し、上清を 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過したものを試料溶液とし、HPLC 法にて定量分析を行った。HPLC 条件は以下の通りである。

Column : COSMOSIL Packed Column 5C<sub>18</sub>-MS- (4.6 mm I.D. × 150 mm), Column temperature 35 °C, Flow rate : 1.0 mL / min, Detection wavelength : 210 nm, Injection volume : 10 μL, Mobile phase : CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / SDS = 195 mL / 305 mL / 0.8 mL / 2.4 g

#### 交雑法による育種

交配に使用する雌株は JP17 収載種である *E. sinica* に固定して人工交配を行った。雄株は収穫量及びアルカロイド含量の増加を目標に *E. likiangensis*、アルカロイドを含まないマオウを作製するため *E. chilensis* を用いた。交配には組み合わせごとに専用のビニルハウスを使用し、雌株の穂果が形成される前に隔離し実施した。

#### 種間雑種の DNA 解析

得られた植物体から草質茎を採取し、粉碎後 DNeasy Plant Mini Kit を用いて DNA を抽出した。PCR は KOD FX Neo を用いて核 ITS1 領域、葉緑体 trn L/F 領域を増幅した。Cycle Sequencing 反応は Big dye Terminator Sequencing Kit を用いた。

#### 品質評価法の検討

JP17 収載種である *E. sinica* 以外に、エフェドリン系アルカロイドを含有しない *E. przewalskii* を用いて検討を行った。*E. przewalskii* はユナニ-医学、ウイグル医学、モンゴル医学などで熱性喘息、咳嗽、肺炎などに使用されているマオウ属植物である。評

価指標として、HPLC 法によるエフェドリン系アルカロイドであるエフェドリン (E)、プソイドエフェドリン (PE) の定量、タンニン含量の指標として Folin・Ciocalteu 法による総量の測定を行った。

#### 4. 研究成果

##### 優良品種の育種

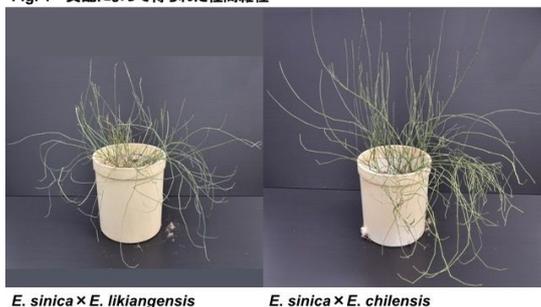
##### 淘汰法による育種

栽培株から形態、収穫量の多い個体を中心に増殖性の検討を行った。その結果、植物形態は収穫の際の省力化を考慮すると倒伏した草質茎よりも密度の高い直立した形態が優良であると考えられる。含有成分では、総アルカロイド含量が 1.0% 以上の個体が確認できたが、これらの個体は総じて挿し木による増殖が困難であった。また、アルカロイドの組成では、エフェドリンが高い個体、プソイドエフェドリンが高い個体それぞれを確認できたが、これらも同様に挿し木による増殖が困難であった。挿し木法は 1 個体から多数のクローン株の作製に有効な手段であるが、その発根率は個体差が大きい。そのため、優良品種の増殖には、1 個体からの分割数が少ないものの、活着率の高い株分け法が有効な手段であると考えられる。

##### 交雑法による育種

交雑法では *E. sinica* と *E. likiangensis* の組み合わせで人工交配を行った結果、28 個の種子が得られた。得られた種子全てを播種したところ、8 個が発芽し *E. sinica* × *E. likiangensis* の植物体を得られた (ESL1~8)。また、*E. sinica* と *E. chilensis* の組み合わせで人工交配を行った結果、23 個の種子が得られた。得られた種子全てを播種したところ、7 個が発芽し *E. sinica* × *E. chilensis* の植物体を得られた (ESC1~7)。その後全ての実生苗は 1/2000 a ワグネルポットにて栽培した (Fig.1)。これらの苗は *E. sinica* と比べ成長が早く、発芽後数ヶ月で明確な違いが現れた。また、両種間雑種に共通して、木質化の傾向が強く大型であった。しかし、*E. sinica* で多く見られる根茎を伸ばして増殖する性質も見られる事から植物形態的に交配の影響が観察できる。

Fig. 1 交配によって得られた種間雑種

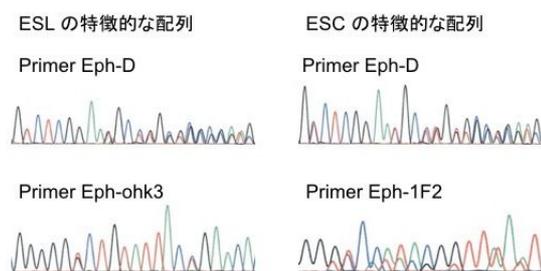


##### 種間雑種の DNA 解析

得られた種間雑種の交配の有無を分子生

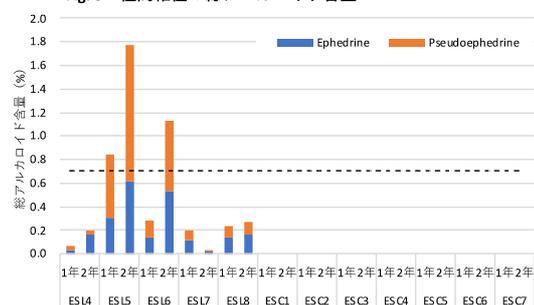
物学的方法によって証明するため、DNA 配列の解析を行った。*E. sinica* × *E. likiangensis* の trn L/F 領域の DNA 配列は *E. sinica* の DNA 配列と一致し、ITS1 領域は親株 (*E. sinica* と *E. likiangensis*) の DNA に由来するヘテロ接合型であった (Fig.2)。以上より、ITS1 領域の DNA 解析によって交配の有無を証明した。*E. sinica* × *E. chilensis* においても同様の解析を行い交配の有無を証明した。また、種間雑種の trn L/F 領域を解析した結果、種子親である *E. sinica* の DNA 配列と一致したことについて、葉緑体 DNA は多くの植物の場合、母性遺伝があるが、マツ科など一部の裸子植物では父性遺伝を行う。しかし、同じ裸子植物であるマオウ科マオウ属植物の場合は母性遺伝である事が明らかになった。

Fig.2 ITS 1 領域の DNA 配列



次に、これらの株のエフェドリン系アルカロイド含量の分析結果を Fig. 3 に示す。発芽後 1 年の *E. sinica* × *E. likiangensis* では 6 個体の平均総アルカロイド含量が 0.31%、2 年では 0.68% であった。最も高含量の個体は 1.8% であり、発芽後 2 年であることを考慮する本課題の目的の一つである高い総アルカロイド含量の育種に成功したと考えられる。一方で、*E. sinica* × *E. chilensis* では発芽後 1 年、2 年ともに 7 個体全てでエフェドリン系アルカロイドは検出されなかった。すなわち、交雑法によってアルカロイドを含まないマオウの作製に成功したと考えられる。

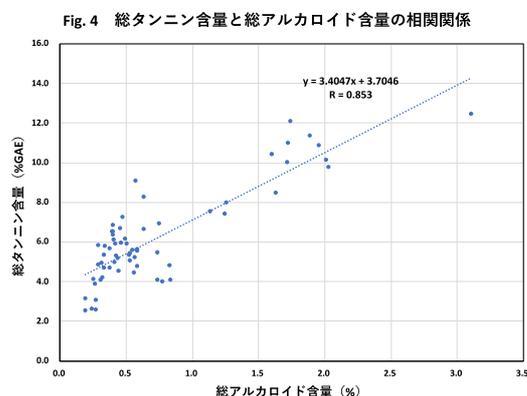
Fig. 3 種間雑種の総アルカロイド含量



##### 品質評価法の検討

ウイグル医学などで使用されるエフェドリン系アルカロイドを含有しない *E. przewalskii* に着目し、Folin・Ciocalteu 法による総タンニン含量を測定した結果、約 14.7%

であった。同様の方法で市場品麻黄 (*E. sinica*) の総タンニン含量を測定すると 8.3% であったことから、*E. przewalskii* には多量のタンニンを含有している事が明らかになった。マオウに含まれるタンニンはカテキンやエピカテキン、ガロカテキン及びこれらの二量体や三量体など多様である。また、これらの多くは抗インフルエンザ作用が報告されている。しかし、タンニンの定量は二量体、三量体などを考慮すると、それぞれの成分を HPLC 法によって定量するよりも、Folin・Ciocalteu 法のような比色法が最適であると考えられる。また、63 個体の市場品麻黄及び栽培した *E. sinica* を用いて総アルカロイド含量と総タンニン含量の相関関係を調査した結果、相関係数  $r=0.85$  の正の相関関係が認められた (Fig. 4)。以上の結果より、総タンニン含量の測定はアルカロイドの有無に影響しない麻黄の新たな品質評価法として有用であると考えられる。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Si-ran Ni, Mutalifu Nilufaer, Hirokazu Ando, Yohei Sasaki, Masayuki Mikage. The Botanical Origin of Ephedra Herb used in Xinjiang Uyghur Autonomous Region of China. *The Japanese Journal of Medicinal Resources*, 査読有り, 39(2), 37-43, 2017.

安藤広和, 草場大作, 御影雅幸, 佐々木陽平, マオウ属植物の栽培研究(第 9 報) マオウ属植物 Ep-13 草質茎のアルカロイド含量の局在性について、薬用植物栽培研究、査読有り, 38(2), 10-16, 2016

安藤広和, 北村雅史, 佐々木陽平, 北岡文美代, 御影雅幸, マオウ属植物の栽培研究(第 8 報) 旧国立衛生試験所が導入し保存されてきたマオウ属植物 Ep-13 の遺伝的背景について、薬用植物栽培研究、査読有り, 38(2), 1-9, 2016

安藤広和, 倪斯然, 佐々木陽平, 御影雅幸, マオウ属植物の栽培研究(第 7 報) 圃場栽培株の総アルカロイド含量の経年変化と日局麻黄の生産、薬用植物栽培

研究、査読有り, 38(1), 20-27, 2016

〔学会発表〕(計 6 件)

織田枝里子, 安藤広和, 佐々木陽平, 麻黄に含まれるエフェドリンの簡易測定法の開発、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 27 日、もてなしドーム 金沢  
伊藤ほか, 安藤広和, 佐々木陽平, 漢方生薬麻黄の煎法による煎液中の成分変化、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 27 日、もてなしドーム 金沢  
草場大作, 北村雅史, 安藤広和, 佐々木陽平, 漢方生薬「麻黄」原植物の研究 DNA 配列に基づく簡易鑑別法とアルカロイドの局在性について、日本薬学会北陸支部、2017 年 11 月 26 日、金沢大学 金沢

安藤広和, 佐々木陽平, 倪斯然, 御影雅幸, *Ephedra* 属植物の育種研究日本生薬学会第 64 回年会、2017 年 9 月 9-10 日、東邦大学 千葉

草場大作, 安藤広和, 佐々木陽平, 御影雅幸, *Ephedra* 属植物 Ep-13 系統株の性質に関する研究、日本生薬学会第 63 回年会、2016 年 9 月 24 日-25 日、富山国際会議場 富山

安藤広和, 倪斯然, 佐々木陽平, 安井廣迪, 御影雅幸, 漢方生薬「麻黄」の国産化研究、第 33 回和漢医薬学会学術大会、2016 年 8 月 27 日-28 日、星薬科大学 東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunshishoyaku/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

安藤 広和 (ANDO, Hirokazu)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00768731