

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14932

研究課題名(和文)マオウ属植物の分子育種を志向した指標遺伝子の開発

研究課題名(英文)Development of target genes based on molecular breeding of the genus Ephedra

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：漢方生薬麻黄は葛根湯や麻黄湯などの漢方処方に配合される重要生薬である。本研究課題では、マオウ属植物の分子育種に応用可能なDNAマーカーの開発を行った。その結果、中国に自生するマオウ属植物及びそれらの雑種と*E. sinica*を鑑別するためのプライマーを開発した。また、次世代シーケンサーを用いる事によって得られた配列情報を解析する事により、含有成分と関連があるDNAマーカーの候補を明らかにした。このDNAマーカーは育種目標に応じて候補の数が減少し、最適なマーカーを選択することが可能である。今回得られた知見はデータを蓄積することにより、優良品種の選抜に貢献するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マオウ属植物は日本に自生がなく、中国からの輸入に依存している。しかし、供給は不安定な状態にあり、マオウ資源の確保が急務とされている。そのような状況下で、麻黄を国内生産するためには優良品種を早期に見出す必要がある。しかし、マオウの総アルカロイド含量が医薬品として利用可能になるまで少なくとも3年は必要であることから、DNAを用いた育種法が不可欠である。本研究では、原植物を簡易的に鑑別するプライマーの開発、含有成分と関連があるDNAマーカーの候補を明らかにした。今回得られた知見はデータを蓄積することにより、早期に優良品種の選抜を可能にし、日本独自のマオウ資源の創出に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mao is an important crude drug used in Kampo formula such as Kakkon-to and Mao-to. In this research, we developed DNA markers that can be applied to the molecular breeding of the genus Ephedra. As a result, we have developed a Primer for distinguishing *E. sinica* from other plants of the genus Ephedra and their hybrids that grow naturally in China. In addition, by analyzing the sequence information obtained by using a next-generation sequencer, we have clarified candidates for DNA markers related to the contained components. The number of candidates for these DNA markers decreases according to the breeding goals, and it is possible to select the most suitable marker. By accumulating data, the findings obtained this research will contribute selection methods of excellent varieties.

研究分野：薬用植物学

キーワード：マオウ 育種 栽培 エフェドリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。日本では年間約 500 トン以上の需要があるが、マオウ属植物は日本に自生がなく、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、我が国はマオウ資源の確保が急務とされている。そこで、我々は石川県の能登半島において麻黄の国産化研究を開始し、さらに、日本独自のマオウ資源を創出するため、マオウ属植物の育種研究を開始した。麻黄は第十七改正日本薬局方 (JP17) で *Ephedra sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* の地上茎で、総アルカロイド含量 (エフェドリンとブソイドエフェドリンの和) が 0.7% 以上であると規定されている。このように原植物を 3 種に限定しており、エフェドリン系アルカロイドは麻黄の品質において重要な指標成分となっている。麻黄の薬理作用は鎮咳、気管支拡張、発汗、抗炎症などが報告されており、主にエフェドリン系アルカロイドが関与していると考えられている。エフェドリン系アルカロイドはエフェドリン、エフェドリンの立体異性体であるブソイドエフェドリン、ノルエフェドリン、ノルブソイドエフェドリン、メチルエフェドリンなどが知られており、それぞれ同じ作用を示すが強さには差異がある。

エフェドリン系アルカロイドは、L-phenylalanine から Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) によって生成された *trans*-Cinnamic acid を前駆体として生合成されると提案されている。(S)-Cathinone は還元された後、N-メチル化を経てエフェドリン系アルカロイドが生合成される。一方、マオウ属植物の中には、エフェドリン系アルカロイドを含有しない種も存在している。それらは主に新大陸に分布するマオウ属植物で、*E. chilensis* などが知られている。また、合成されるエフェドリン系アルカロイドの組成には種によって偏りがあり、*E. sinica* ではエフェドリンの比率が高く、*E. intermedia* ではブソイドエフェドリンの比率が高い事が報告されている。すなわち、マオウ属植物はアルカロイド合成に関連する遺伝子の発現パターンが種によって異なる事が予想される。そこで我々は種間雑種を作製することにより、アルカロイド含量をコントロールできるのではないかと考え *E. sinica* との人工交配を行った。その結果、エフェドリン系アルカロイドを産生しない *E. sinica* × *chilensis*、アルカロイド含量の高い *E. sinica* × *likiangensis* を作製することに成功した。

2. 研究の目的

本研究課題は、マオウ属植物の分子育種に応用可能な指標遺伝子の開発を目的としている。育種目標として JP17 を満たし、現在使用されているマオウよりも優れた性質をもつマオウを育成するため、原植物の簡易鑑別法の検討を行った。現在、日本および中国市場で流通している麻黄の原植物は主に *E. sinica* であることから、中国に自生するマオウ属植物及びそれらの雑種と *E. sinica* を鑑別するためのプライマーを開発した。次に、エフェドリン系アルカロイド含量と関連のある DNA マーカーの探索を行った。エフェドリン系アルカロイドは JP17 においても指標とされているが、その生合成に関与する遺伝子の多くは未だ明らかになっていない。そのため、これまでに育種、維持してきた株の中から総アルカロイドに対するエフェドリンの比率が 100% の株やブソイドエフェドリンの比率が 99% の株などの特徴的な株を実験材料とし、次世代シーケンサーを用いる事によって得られた配列情報を解析した。

3. 研究の方法

(1) *E. sinica* 簡易鑑別法の検討

実験材料

実験材料はこれまでに系統維持してきた以下のマオウ属植物の草質茎を用いた。雑種は人工交配により作製したものを使用した。

E. sinica, *E. intermedia*, *E. przewalskii*, *E. equisetina*, *E. likiangensis*, *E. gerardiana*, *E. monosperma*, *E. sinica* () × *E. likiangensis* (), *E. sinica* () × *E. intermedia* (), *E. sinica* () × *E. intermedia* ()

DNA の調製

植物体から草質茎を採取し、粉碎後 Mag Extractor および Nucleo Spin plant を用いて DNA を抽出した。抽出後の DNA は Nano Drop 2000 を使用し濃度を測定したのち、20 ng/μL となるように調整した。雑種モデル DNA として、*E. sinica* と *E. likiangensis* の DNA、*E. sinica* と *E. intermedia* の DNA をそれぞれ混合し濃度が 20 ng/μL となるように調整した。

マルチプレックス PCR

DDBJ に登録されているマオウ属植物の塩基配列を参考にして多型のみられる部位を探索し、ITS 領域に 2 組、*trnL/F* 領域に 1 組のプライマーを設計した。PCR 酵素は KOD-Multi & Epi- を使用し、プライマー及び DNA 添加量の検討を行った。増幅産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅断片の確認を行った。

リアルタイム PCR

E. sinica, *E. intermedia*, *E. likiangensis* の DNA を用いてリアルタイム PCR による融解曲線解析の検討を行った。PCR には KOD SYBR qPCR Mix を用いてプロトコールに従い増幅した。プ

ライマーはマルチプレックス PCR で用いたものを用いた。

(2) GRAS-Di による DNA マーカーの探索

実験材料

実験材料はこれまでに系統維持してきた以下のマオウ属植物の草質茎を用いた。雑種は人工交配により作製したものを使用した。

E. sinica (1: エフェドリンの比率が 50% の個体, 2: エフェドリンの比率が 100% の個体, 3: ブソイドエフェドリンの比率が 99% の個体), *E. likiangensis* (総アルカロイド含量の高い個体), *E. sinica* × *E. likiangensis* (総アルカロイド含量の高い種間雑種), *E. chilensis* (エフェドリン系アルカロイドを含有しない個体), *E. sinica* × *E. chilensis* (エフェドリン系アルカロイドを含有しない種間雑種), *E. przewalskii* (エフェドリン系アルカロイドを含有しない *E. chilensis* とは異なる種)

実験方法

植物体から草質茎を採取し、粉碎後 Nucleo Spin plant および CTAB 法を用いて DNA を抽出した。GRAS-Di ライブラリーの調製は 12 組のプライマーを用いて、プロトコルに従って行った。シーケンスライブラリーはバイオアナライザを用いて品質測定を実施した。作製したライブラリーを用いて MiSeq によるシーケンシングを行った (株式会社ジーンベイ)。

4. 研究成果

(1) *E. sinica* 簡易鑑別法の検討

設計した 3 組のプライマーを用いてシングルプレックス PCR を行い、増幅産物を確認したところ、147 bp, 254 bp, 412 bp の増幅産物が確認され、純系統の *E. sinica*, *E. sinica* × *E. intermedia* である場合は 147 bp の増幅産物のみが確認された。これらのプライマーを用いてマルチプレックス PCR を行うため、PCR 条件を検討したところ、DNA の添加量は Total 25 µL の反応あたり 30~200 ng, Hot start 94 2 min, Denaturation 98 10 sec, Extension 68 30 sec, Final extension 68 5 min Cycle number 35 cycle の反応条件において非特異的増幅の出現もなく正しく鑑別可能であった (図 1)。さらに、これらのプライマーを用いて、より迅速に多検体を検出できるようリアルタイム PCR で検出を行った結果、 T_m 値の異なる 3 つのピークが認められ、鑑別可能であった (図 2)。以上の結果から、今回開発した 3 組のプライマーは中国に分布する 11 種のマオウ属植物と *E. sinica* を鑑別することが可能であった。種間雑種の場合においても鑑別可能であるが、*E. intermedia*, *E. przewalskii* を花粉親にもつ雑種の場合は鑑別することができないと考えられる。しかし、我々はこれまで *E. sinica* と *E. przewalskii* の人工交配を繰り返し行ってきたが、これまでに雑種は得られなかった。その理由として、*E. przewalskii* は稔果の形態が大きく異なっている点や、花期が他種と異なる点が挙げられることから、自然界においても雑種を形成しにくいものと考えられる。そのため、実際に鑑別できないと考えられる組み合わせは *E. intermedia* が種子親の場合のみであり、簡易法としての鑑別能は十分であると考えられる。

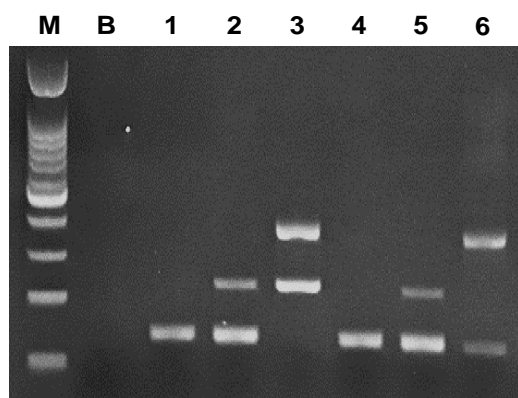


図 1: マルチプレックス PCR の結果

M: DNA ladder, B: Blank, 1: *E. sinica*
2: *E. intermedia*, 3: *E. equisetina*,
4: *E. sinica* × *E. intermedia*,
5: *E. sinica* × *E. intermedia*,
6: *E. sinica* × *E. likiangensis*,

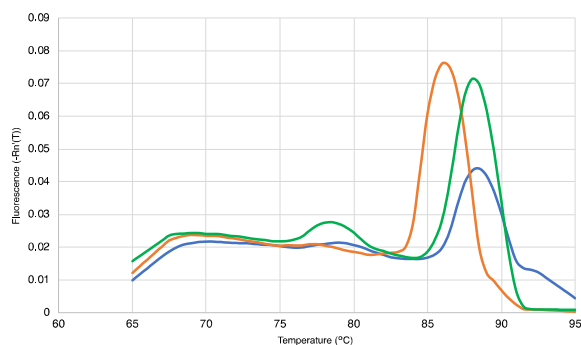


図 2: リアルタイム PCR の結果

(2) GRAS-Di による DNA マーカーの探索

作製したライブラリーを用いて MiSeq によるシーケンシングを行った結果、得られたシーケンスデータの産出量は平均で 151,069 リード, 22,962,488 bp であった。各リード配列について、GRAS-Di 解析ソフトウェアを用いてリファレンスゲノムを使用せず、各リードをまとめること

によってマーカー候補を抽出した。その結果、クオリティ A が 4,083 個、B が 129 個、C が 160 個、D が 306 個、E が 14 個抽出された。さらに、クオリティ A であった 4,083 個の中から判定不能の個体を含むマーカーを除去した 4,019 個について SPSS を用いた主成分分析を行い、Scores plot を作製した。その結果、エフェドリン系アルカロイドを含有しない *E. chilensis*、*E. sinica* × *E. chilensis*、*E. przewalskii* は PC 2 が負の値であり、さらに *E. przewalskii* は PC 1 も負の値であった。また、*E. sinica* の中では、プソイドエフェドリンの比率が 99% である個体の PC 1 が最も大きく、エフェドリンの比率が 100% である個体は負の値であった。以上の結果から、GRAS-Di によって得られたマーカー候補は含有成分と関連がある有力な候補であると考えられ、目的に応じてさらに絞り込むことが可能である。また、*E. sinica* 3 個体に共通するマーカーが 19 個抽出されており、これらは *E. chilensis* や *E. likiangensis* との区別も可能であることから、*E. sinica* の雑種を鑑別できる可能性があると考えられる。

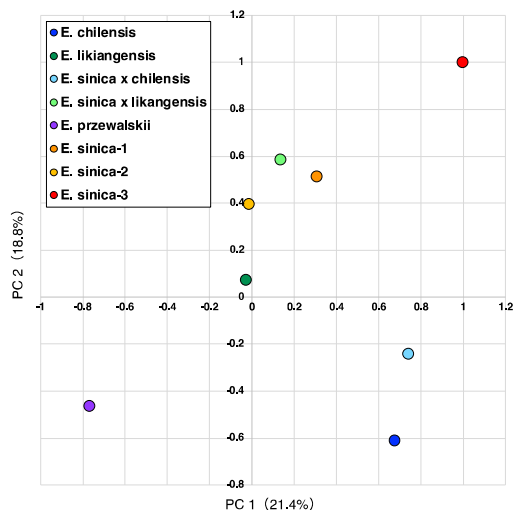


図 3 : GRAS-Di によって得られマーカーから作製した Scores plot
E. sinica - 1 : エフェドリンの比率が 50% の個体、
E. sinica - 2 : エフェドリンの比率が 100% の個体、
E. sinica - 3 : プソイドエフェドリンの比率が 99% の個体

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 倪斯然, 工藤喜福, 安藤広和, 佐々木陽平, 御影雅幸	4. 巻 40(1)
2. 論文標題 マオウ属植物の栽培研究(第11報)草質茎の挿し木法の検討(4)挿し木の適期に関する研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 薬用植物研究	6. 最初と最後の頁 22-28
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Si-ran Ni, Ai Kaneda, Yoshitomi Kudo, Hirokazu Ando, Marie Ochiai, Shaoqing Cai, Masayuki Mikage	4. 巻 40(2)
2. 論文標題 Analysis of Ephedra sinica Plant Community in Natural Habitat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of Medicinal Resources	6. 最初と最後の頁 37-50
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤ほのか, 安藤広和, 御影雅幸, 佐々木陽平	4. 巻 41(2)
2. 論文標題 マルチプレックスPCR法によるEphedra属種間雑種および Ephedra sinica の簡易鑑別法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 薬用植物研究	6. 最初と最後の頁 36-44
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤ほのか, 安藤広和, 倪斯然, 御影雅幸, 佐々木陽平
2. 発表標題 マオウの品質評価に関する研究: 乾燥方法の検討
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金田あい, 安藤広和, 佐々木陽平, 御影雅幸
2. 発表標題 マオウ栽培における定植作業の機械化 タバコ苗の移植機を利用して
3. 学会等名 第1回薬用植物栽培研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤喜福, 安藤広和, 佐々木陽平, 倪斯然, 御影雅幸
2. 発表標題 マオウ属植物の遮光栽培と収穫時期の検討
3. 学会等名 第1回薬用植物栽培研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤ほのか, 安藤広和, 御影雅幸, 佐々木陽平
2. 発表標題 マルチプレックスPCR法によるEphedra属種間雑種の簡易鑑別法の開発
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤広和, 伊藤ほのか, 金田あい, 佐々木陽平, 倪斯然, 落合真梨絵, 野村行宏, 御影雅幸
2. 発表標題 マオウ属植物の栽培研究ー施肥及び刈り込み処理が与える影響ー
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金田あい, 安藤広和, 佐々木陽平, 御影雅幸
2. 発表標題 マオウ収穫時における茶葉刈り取り機の利用
3. 学会等名 第2回薬用植物栽培研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ホームページ等 http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakusou/index.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考