

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07112

研究課題名(和文) 加賀黄連を受け継ぐオウレン新品種の開発

研究課題名(英文) Development of new breed inherited Kaga Ouren

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は漢方生薬『黄連』について、自然界で発生した雑種を見出し、キクバオウレンやセリバオウレンのような純系統と比較することにより、交配による影響を明らかにし生薬の国内自給率の向上に向けたオウレンの新品種開発を目的とする。本研究の成果として、キクバオウレン及びセリバオウレンにおける含有成分や色彩などの種に依存的な特徴を明らかにし、交配による影響として、両者の特徴を受け継ぐことを明らかにした。また、栽培において雑種は生育が旺盛であり、収穫重量やひげ根重量が純系統に比べ大きいことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方薬の原料となる生薬のほとんどは中国からの輸入によって供給されている。安定的な漢方医療の持続には輸入に依存した体制から脱却しなければならないが、優良種苗の確保など多くの課題を抱えている。本研究で開発したオウレンの新品種は生産性が高く、医薬品としての品質も確保されたものであり、生薬の国内自給率の向上に寄与するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to develop a new variety of the herbal medicine "Coptis Rhizome" by finding naturally occurring hybrids and comparing them with pure strains such as *Coptis japonica* var. *anemonifolia* and *C. japonica* var. *major* to clarify the effects of hybridization and to improve the domestic self-sufficiency rate of the herbal medicine. The results of this research revealed that the species-dependent characteristics, such as content and coloring in *C. japonica* var. *anemonifolia* and *C. japonica* var. *major* were clarified and that the characteristics of both were inherited as the influence of hybridization. In addition, it was found that the hybrids grew vigorously in cultivation and that the harvested weight and beard root weight were larger than those of the pure strains.

研究分野：生薬学，薬用植物学

キーワード：黄連 育種 アルカロイド

### 1. 研究開始当初の背景

近年漢方薬による治療は、多くのエビデンスが報告されたこともあり、約 **90%**の医師が漢方薬を処方している。現在では西洋薬とともに医療の一端を担っている。しかし、漢方薬の原料となる生薬のほとんどは中国からの輸入によって供給されている。安定的な漢方医療の持続には輸入に依存した体制から脱却しなければならない。2010年に行われた黒岩祐治氏による5点の提言には、生薬資源の安定的確保には優良種苗の維持・確保、栽培指導体制の整備など生薬の国内栽培の基盤整備と記されており、以後産官学に渡って生薬の国産化の動きが活発になり、生薬栽培に関する研究が盛んに行われはじめた。提言から10年が経過しようとしている現在、生薬の国内自給率は**10%**程である。生薬の国産化が進まない理由はいくつか考えられるが、やはり黒岩氏の提言通り、薬用作物は一般的な農作物に比べ優良種苗、栽培指導体制が不足しているものと考えられる。現在、生薬の原料となる植物として品種登録されているものはシャクヤク、ハトムギ、シソなど極めて少ない。そこで、申請者は黄連に着目した。

黄連はオウレン属植物の根茎に由来する生薬で苦味健胃、抗菌、止瀉作用などを有し、黄連解毒湯、三黄瀉心湯、半夏瀉心湯などの漢方処方に配合されている。現在、日本における黄連の使用量は約**40**トンであり、この大部分は中国産で、日本産はわずか**4%**である。JP17では原植物として日本に自生する *C. japonica* と中国に自生する *C. chinensis*, *C. deltoidea*, *C. teeta* の4種が規定されており、含有成分としてベルベリンを**4.2%**以上含むと規定されている。原植物には雑種の記載はないが、*Coptis japonica* は広義のオウレンを指しており、キクバオウレン、セリバオウレン、コセリバオウレン、ミドリオウレン及びそれらの雑種が含まれる。そのため、黄連は一般的な農作物の品種改良で使用される『交配育種法』を用いることができると考えられる希少な生薬である。また、石川県はかつて黄連の産地であった。加賀藩で産出されるキクバオウレンは『加賀黄連』と称され江戸時代の本草書である「和語本草綱目」、「和漢三才図会」、「物類品隲」などに最も良品であると記載されている。そのため、自給率が**100%**であり、中国や韓国に輸出されていた。しかし、現在ではキクバオウレンの生産栽培は行われておらず、生薬市場からも姿を消した。現在、市場に流通している国産黄連は福井県産で、後継者不足による生産規模の縮小が問題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究課題は生薬の国内自給率の向上に向けて、『交配育種法』を応用したオウレンの育種を目的とする。オウレン属植物は生育が遅く育種に時間を要するため、自然界で発生した雑種を見出し、キクバオウレンやセリバオウレンのような純系統と比較することによって交配による影響を明らかにする。また、石川県の優良品種であるキクバオウレンを永続的に維持する目的として遺伝的汚染の調査を行うことを目的とする。古来の最良品であったキクバオウレンの保全に関して、セリバオウレンとの分布域の境界線を明らかにし、雑種に由来する遺伝的汚染の程度を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では石川県を中心とした7県で自生するオウレン属植物の調査を行った。キクバオウレン(以下 **CJA**)とセリバオウレン(以下 **CJM**)の雑種(**CJAM**)は両系統が同一箇所に混在している場所に自生していると考え、形態学的に同定可能な **CJA** 及び **CJM** が混在していた場所の個体を採取し実験に供した。

#### リアルタイムPCRを用いたオウレン3系統の鑑別法

デシケーターで十分に乾燥したオウレン根茎を粉砕し、CTAB法によりDNAを抽出した。また、**CJA** 及び **CJM** を検出するプローブをそれぞれ設計し、リアルタイムPCRで検出した。

#### ベルベリン系アルカロイドの定量

デシケーターで十分に乾燥したオウレン根茎を粉砕し、粉末約**50 mg**を量り取り **Methanol・Formic acid (100:1)** 混液 **20 mL** で **20**分間超音波処理を行った。その後、**3,000 rpm** で **1**分間遠心した後、上清を回収した。得られた上清を **Methanol・Formic acid (100:1)** 混液で**5**倍に希釈し、**0.45 μm** のメンブレンフィルターでろ過したものを試料溶液とした。分析は **HPLC** を用いて実施し、**Berberine, Palmatine, Jaterorrhizine, Coptisine** の検量線を作成し定量を行った。

#### 根茎粉末の色彩測定

デシケーターで十分に乾燥したオウレン根茎を粉砕し、粉末を径**8 mm**の専用シャーレに充填し、分光測色計を用いて色彩を測定した。測定条件は標準光(**D65**光)、測定径**3 mm**で反射光を測定し、**L\*a\*b\***表色系で数値化した。

#### 圃場栽培における成長評価

2021年4月にDNA配列により鑑別を行ったCJA, CJM, CJAMを金沢大学医薬保健学域薬学類附属薬用植物園の栽培圃場に定植した。苗は事前に全てのひげ根を除去し、根茎を刃物で切断して株分けし(平均2.3 cm)、発根させたものを用いた。栽培圃場には白色防草シートでマルチングし、20 cm 間隔で定植し、遮光ネット(遮光率50%)を被せて栽培した。その後、2023年1月に収穫し、根茎の長さ及び重量、細根の重量を測定した。根茎の長さ及び重量は株分け時からの増加比として評価した。

#### 4. 研究成果

##### リアルタイムPCRを用いたオウレン3系統の鑑別法

まずプローブを作成するため、CJAとCJMに特異的な塩基配列を調査した。我々はこれまでにTHBO遺伝子のSNPにより両系統を区別可能と報告しており、このSNPを利用することとした。CJAに特異的なプローブにはSYBRを、CJMに特異的なプローブにはHEXを付加し、典型的なCJA及びCJMを用いて正しく鑑別できることを確認した(図1)。本方法は安価で迅速に多検体の鑑別が可能であることから、以後本方法を用いて原植物の鑑別を行った。CJA及びCJMが混在する場所は複数箇所確認できたため、本報告では特に顕著だった石川県南部に自生する83個体の鑑別結果を報告する。

採取した全ての個体のDNAを抽出し、リアルタイムPCRによる鑑別を行ったところ、CJAは29個体、CJMは27個体、両系統の雑種であるCJAMは27個体であった(図2)。すなわち、両系統が混在する場所では容易に雑種を形成することが明らかとなった。また、これらの場所は石川県南部で見られ、かつて行われていたオウレン栽培で福井県の越前オウレンが導入されたことにより、石川県に自生していたCJAと交雑したものと考えられる。

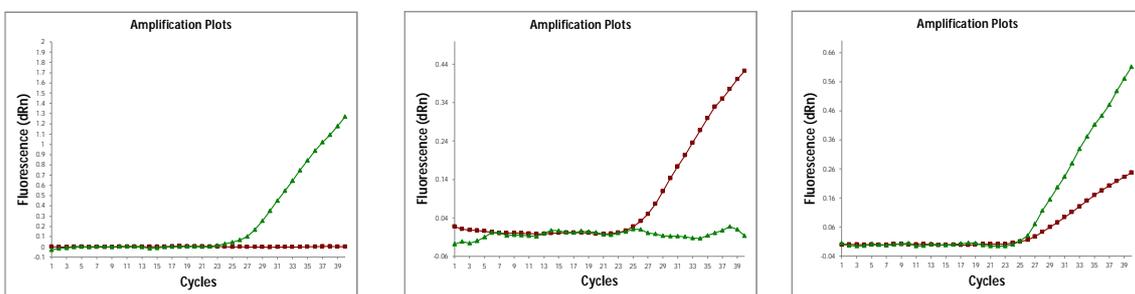


図1: リアルタイムPCRによるオウレン3系統の鑑別  
(左: CJA, 中: CJM, 右: CJAM)

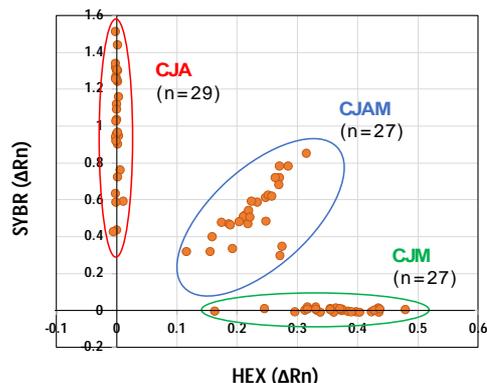


図2: 同一地点で採取したオウレン属植物の鑑別 (n=83)

##### ベルベリン系アルカロイドの定量

リアルタイムPCRにより鑑別を行ったCJA, CJM, CJAMを用いてベルベリン系アルカロイドの定量を行った結果、全ての系統でJP17に規定されているBerberine含量4.2%以上の規定を満たした。また、Berberine, Palmatine, Jaterorrhizine含量については各系統間に有意な差は認められなかった。一方、Coptisine含量は全ての系統間に有意な差が見られ、CJAが高く、CJMは低く、CJAMはその中間の含量であった(図3)。すなわち、CJAはCJMに比してCoptisine含量が高い特徴を有しており、これらが交配したことによりCJAMはCJMよりも高いCoptisine含量になったものと考えられる。

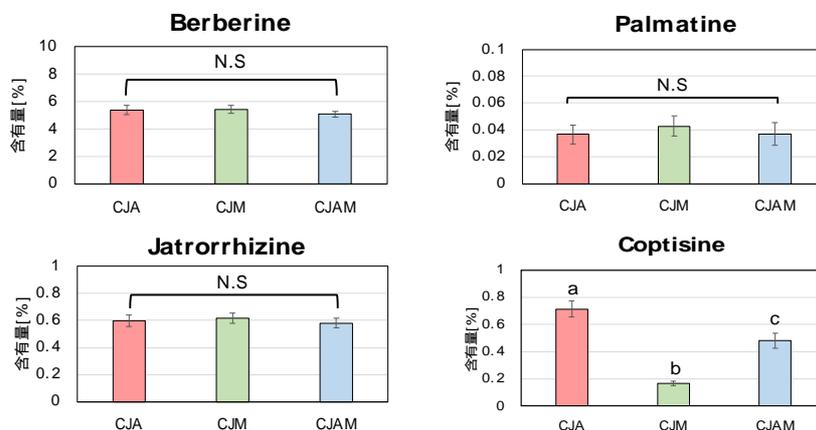


図3：各系統のベルベリン系アルカロイド含量  
(異なるアルファベット間に有意差あり, Tukey HSD,  $P < 0.05$ , Means  $\pm$  S.E., CJA : n=29, CJM : n=27, CJAM : n=27)

### 根茎粉末の色彩測定

リアルタイム PCR により鑑別を行った CJA, CJM, CJAM を用いて根茎粉末の色彩を測定した結果, 明度を示す  $L^*$  値は CJA が低く, CJM は高く, 赤色を示す  $a^*$  値は CJA が高く, CJM は低く, CJAM は  $L^*$  値,  $a^*$  値の何れにおいてもその中間の値であった。一方, 黄色を示す  $b^*$  値は全ての系統において差異は認められなかった(図4)。すなわち, CJA は CJM に比して暗く赤みが強い事が明らかとなり, その雑種である CJAM は中間的な色彩を示すことが明らかになった。ベルベリン系アルカロイドの定量結果を考慮すると, Coptisine 塩酸塩は橙色を呈する化合物であり, この含量が根茎粉末の色彩に影響しているものと考えられる。実際, Coptisine 含量と  $a^*$  値の相関係数は 0.918 と高値を示している。以上, CJAM は CJA と CJM が交配することにより Coptisine 含量が変化し, それに伴って粉末の色彩も変化することが明らかになった。

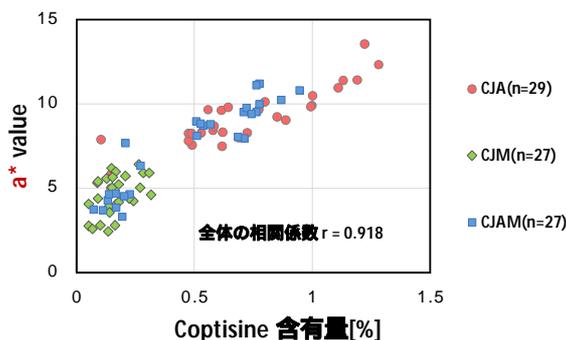


図4：Coptisine 含量と  $a^*$  値の相関関係  
(Pearson の相関係数,  $r = 0.918$ ,  $P < 0.01$ )

### 圃場栽培における成長評価

リアルタイム PCR により鑑別を行った CJA, CJM, CJAM を栽培圃場で 21 ヶ月栽培した結果, 根茎の長さの増加比は CJA が 2.74, CJM は 2.89, CJAM は 2.67 であり, CJM が最も長く成長した。また, 重量の増加比は CJA が 3.79, CJM は 2.95, CJAM は 4.26 であり, CJAM が最も重たく成長した。一方, 1 個体のひげ根重量は CJA が 12.48 g, CJM は 17.31 g, CJAM は 29.97 g であった(図5)。オウレン属植物は成長が遅いことが知られており, 山間部の栽培では 10 年, 畑での栽培でも 5~6 年を要する。本研究では 21 ヶ月と栽培期間が短いにも関わらず根茎重量やひげ根重量において差異が生じた。すなわち, CJAM は最も収穫量が期待できる系統であることが明らかになった。また, ひげ根重量においては大きな差異が生じ, CJAM の重量は CJA の 2.40 倍, CJM の 1.73 倍であった。ひげ根は土壌から水分や栄養を吸収する重要な器官であり, CJAM の成長は他の系統に比して旺盛であると考えられる。実際, CJAM の地上部は他の系統と比して旺盛であり, 継続的に栽培することによって収穫重量にもより大きな差異が生じるものと考えられる。以上, 本研究課題では自然界で発生した雑種を見出し, 含有成分や色彩など, 交配による影響を明らかにした。また, 自生地の調査を行うことによって雑種に由来する遺伝的汚染の程度を明らかにした。

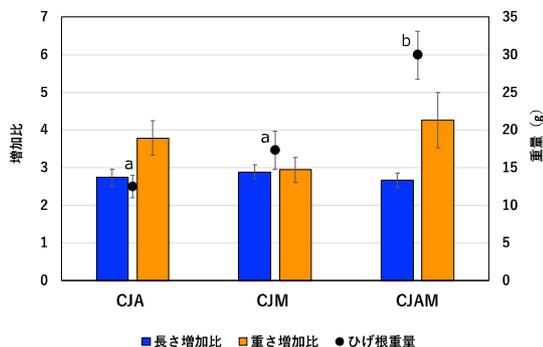


図5：オウレン3系統の成長評価  
(異なるアルファベット間に有意差あり, Tukey HSD,  $P < 0.05$ , Means  $\pm$  S.E., CJA : n=40, CJM : n=31, CJAM : n=36)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依田幸子, 安藤広和, 北村雅史, 佐々木陽平
2. 発表標題 同一環境下に自生するオウレン属植物3系統の品質評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	北村 雅史  (Masashi Kitamura)  (10825392)	城西大学・薬学部・准教授    (32403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------