

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460124

研究課題名(和文) 機能性多糖高含有カラスビシャクの選抜と高効率生産を目指した基礎研究

研究課題名(英文) Study on breeding and an advanced cultivation method of Pinellia ternata containing functional polysaccharides

研究代表者

田中 宏幸 (TANAKA, HIROYUKI)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30253470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、重要生薬半夏の原料植物カラスビシャクの育種と植物工場での大量育苗を目的とした基礎研究を実施した。特に、本研究課題の成果としては、品質評価が困難なカラスビシャクについて多糖を対象とした免疫化学的分析手法を構築した。カラスビシャク含有多糖を極めて特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、本抗体を用いて迅速簡便なELISAを構築した。続いて、本ELISAをスクリーニング法として活用し、全国40か所以上から採取したカラスビシャクを精査し、収量が高く、かつ多糖を豊富に含んだ優良品種の選抜に成功した。また、植物工場でのカラスビシャクの育苗における最適条件も設定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：A breeding study of Pinellia ternata, which is a material of Pinellia Tuber, was performed this time. It is reported that P. ternata polysaccharide shows anti-emetic activity. So, we tried preparation of a monoclonal antibody (mAb) for the polysaccharide of P. ternata and establishment of immunochemical analysis for P. ternata using the mAb for the first time. As a result, the prepared mAb recognizes P. ternata polysaccharide specifically. And ELISA using this mAb was satisfactory as an evaluation method of Pinellia Tuber. The advantage of the developed immunochemical system is quick, simple and easy. In addition, we analyzed about 40 samples which were collected in various parts of Japan. Finally, we obtained a good strain having a lot of polysaccharides. Moreover, we studied a cultivation of P. ternate in the plant factory. As a result, we obtained optimum conditions in terms of watering and temperature. We succeeded cultivation of P. ternata twice a year in the plant factory.

研究分野：生薬学、薬用植物学

キーワード：半夏 多糖 モノクローナル抗体 カラスビシャク 植物工場

1. 研究開始当初の背景

半夏は約 23%の漢方薬に配合されている主要生薬の一つである。半夏は上焦の水滯によっておこる悪心、嘔吐を緩解する利水薬であり、唾液分泌促進作用、拘束水浸ストレス潰瘍の抑制作用、腸管蠕動運動の促進作用などの消化器系に対する作用が報告されている。様々な薬効解析結果の中でも、臨床的に確認されている鎮吐作用は半夏の主要薬理作用といえるもので、その有用成分としてアラバンを主体とする水溶性多糖が知られており、半夏の品質を左右する最も重要な指標といえる。^{1),2)}

2. 研究の目的

本研究では代表者の田中がこれまで培ってきた生薬成分に対するモノクローナル抗体(mAb)作製技術を駆使し、カラスビシャク由来水溶性多糖を特異的に認識するmAbを作製し、さらに、作製したmAbを活用したイムノアッセイによる半夏の品質評価法を確立した。続いて、新規品質評価系をスクリーニング法として、国内各地に自生しているカラスビシャクを調査し、水溶性多糖を高生産する個体を選抜した。さらに、上記研究と並行して、カラスビシャクの塊根形成のための人工制御下での栽培条件の至適化について検討を進めた。

3. 研究の方法

1. 鎮吐作用を有するカラスビシャク由来水溶性多糖(PT-PS)に対するモノクローナル抗体(mAb)の作製

半夏粉末を精製水で抽出した後、透析膜を用いて分子量100,000~1,000,000の多糖画分(PT-PS)を調製した。その後、非加熱処理したPT-PSと加熱処理(120、20分)したPT-PSを調製した。これらを免疫原としてマウスに免疫感作を行った。数度の免疫感作の

後、十分な抗体価が得られた段階で、脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。続いて、PEG法により細胞融合を行い、PT-PSに対して特異的な反応性を有するmAbを産生する複数のハイブリドーマの中で候補を見出し、クローニングを実施した。クローニングの完了したハイブリドーマは大量培養し、続いて培養上清中に分泌されたmAbの精製を行った。

2. 抗PT-PS mAbの反応性並びに特異性の検討

各種濃度に希釈したPT-PS溶液をイムノプレートに分注し、抗原をイムノプレートに固相化した。5%スキムミルク-PBS溶液でブロッキングを行った後、一次抗体溶液、二次抗体溶液を加え、抗原抗体反応を行った。最後に基質溶液(ABTS溶液)を加えて発色させ、吸光度を測定した。

交差反応性試料の調製については、各種生薬粉末(50mg)を精製水(1mL)で抽出した溶液のち、95で10分間熱処理し、その後、50mM carbonate bufferで適切な濃度に希釈した(1000倍希釈)後、抗原溶液として用いた。

3. ELISAによるカラスビシャク品質評価法

上記実験方法2.の方法に従い、各種カラスビシャク試料(50mg)について、精製水(1mL)による抽出、熱処理(95、15分)を行った。適切な濃度になるように試料溶液を希釈した(1000~4000倍希釈後、PT-PSを標品として上記ELISAにより定量的な解析を行った。

4. 栽培試験:

4-1. 培養液面の検討

植物材料には市販のカラスビシャク球茎(日光種苗株式会社)を用いた。培地にはパミス特小粒(大江化学工業株式会社)を用いた。2つの塩ビ栽培箱(幅30cm,奥行15cm,高さ21cm)にパミスを高さ18cmまで充填し、

球茎底部が培地表面下 3 cm になるよう 1 列 5 cm 間隔で各箱 5 個を移植した。培養液には大塚 1, 2 号 (標準処方, pH4.0 に調整) を用いた。固形培地の培養液面が球茎底部の下 4 cm の区 (GWL-4) と 8 cm の区 (GWL-8) の 2 種を設定した。いずれにおいても培地表面は濡れた状態が維持されていた。栽培箱を、気温 25、相対湿度 70%、自然光のファイトトロンに設置し、2013 年 6 月 5 日から 9 月 18 日まで 15 週間 (105 日間) 生育させた。栽培期間中は、1 週間ごとに葉の数を測定した。また、変色して萎れた葉を葉柄基部から随時採取して、この葉の基部あるいは葉柄下部にあるむかご (珠芽) を採取し、生重を測定した。

4 - 2 . 栽培温度の検討

植物材料には、京都府および長崎県から収集したカラスビシャクの珠芽を用いた。培地にはパミス特小粒 (大江化学工業株式会社) を用いた。3 つの塩ビ栽培箱 (幅 30 cm, 奥行 15 cm, 高さ 21 cm) に培地を高さ 15 cm まで充填した。1 地区のむかごを一つの列に並べ、一つの栽培箱に 2 列 (列間 5 cm) 移植した。この時、むかご底部が培地表面下 3 cm になるよう 1 列 5 cm 間隔で 1 地区 5 個を移植した。培養液には大塚 1, 2 号 (標準処方, pH4.0 に調整) を用いた。固形培地の培養液面をむかご底部の下 4 cm に設定した。各々の栽培箱を、気温 20, 25, 30 (いずれも相対湿度 70%, 自然光条件) のファイトトロンに設置し、夏期 (2014 年 5 月 14 日 ~ 8 月 27 日) および冬期 (2014 年 11 月 19 日 ~ 2015 年 3 月 4 日) にそれぞれ 15 週間 (105 日間) 生育させた。栽培期間中は、1 週間ごとに葉の数を測定した。また、変色して萎れた葉を葉柄基部から随時採取して、この葉の葉柄に形成されたむかごを採取し、生重を測定した。105 日間の栽培終了後は、すべてのむかごおよび塊茎の生重を測定した。塊茎を剥皮したものを 1% 酢酸

水溶液中に 4 時間浸漬後、流水でよく洗浄して、2 週間室内で乾燥させた。

4 - 3 . カラスビシャクの選抜

北海道から沖縄にかけての広い地域 (約 40 地点) から収集したカラスビシャクのむかごを同一期間栽培し、各系統の生育と塊茎の有用成分含量を比較調査した。

4 . 研究成果

半夏の有効成分と考えられている水溶性多糖 (PT-PS) に対する mAb の作製を試みたところ、PT-PS を熱処理しない場合と熱処理した場合では、生じる抗体の特異性に違いが認められた。即ち、熱処理しない抗原溶液を用いた場合には、得られた抗体は熱処理しない抗原にのみ反応性を示した。漢方薬を調製する際には、熱時生薬を抽出することから、このような特性を有する抗体はイムノアッセイには用いることができないと判断し、熱処理した PT-PS に反応性を示す mAb の作製を目指した。常法により、免疫感作、細胞融合を行ったところ、PT-PS に極めて高い反応性を示す mAb を得ることができた。次に、今回得られた mAb の各種生薬エキスに対する交差反応性を精査した結果、半夏に極めて高い特異性を示すことを確認した。次に、本 mAb を用いた ELISA の確立を目指し、各種条件の検討を行ったところ、PT-PS 0.5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で良好は直線性が得られ、定量的な解析が可能であることが示された。

半夏の原料植物であるカラスビシャクの栽培試験については、105 日間の栽培終了後は、すべての珠芽および球茎の生重を測定した。さらに、固形培地内で球茎の位置する表面下 2 ~ 3 cm の層、およびその直下の 3 ~ 4 cm の層の培地の体積含水率も評価した。いずれの区でも栽培期間中に緑葉の萎れなどのような水分不足と思われる症状は認められなかった。塊茎周囲の体積含水率は GWL-4 で約 26%、GWL-8

より約1%高かった(孔隙率約58%)より下層の含水率はGWL-4で約27%、GWL-8で約26%であった。

葉の展開はGWL-4でより順調であり、栽培期間中常にGWL-8の葉数を上回っていた。珠芽収量も同様で、特に葉基部に着生した珠芽収量の差が顕著である。これは、GWL-4では葉基部に珠芽が着生していた割合がほぼ100%であるのに対しGWL-8では約40%と低かったため、および葉基部着生珠芽1個の重さがGWL-4でGWL-8の約3倍あったためと考えられる。栽培終了後の収量を表1に示す。1株あたりの珠芽収量、球茎収量ともGWL-4で高く、球茎生重はGWL-8で移植時の約2倍になったのに対してGWL-4では約4倍になった。栽培期間中に得られた珠芽もあわせると、GWL-4では移植時の約8倍の収量が、GWL-8では約4倍の収量が、夏期105日間の栽培で得られた。以上のように、球茎底部から地下水位までの距離を4cmにすると、8cmの場合よりも生育、収量ともに優れていた。培地含水率に顕著な差は認められなかったが、その差が収量には大きく影響すると考えられる。また、葉基部に珠芽が生じる割合が地下水位によって顕著に異なったことから、形態形成にも培地の水分状態が影響していると考えられる。

周年栽培についての実験において、栽培期間中の積算日射量は夏期で $1,571 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ 、冬期で $829 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ であり、冬期は夏期の52.7%の日射量であった。日照時間は、夏期4.7時間 $\cdot \text{日}^{-1}$ 、冬期3.8時間 $\cdot \text{日}^{-1}$ で、冬期は夏期の81%であった。地上部の生育については、いずれの系統も、夏期に比べ、冬期の葉数およびむかご形成数が少なかった。また、開花は夏冬とも認められたものの、夏期では栽培開始から9週目に最初の開花が認められたが、冬期では13週目と遅れが生じていた。休眠と思われる状態は認められなかったため、夏期と冬期の生育の違いは日射量に起

因すると考えられる。

夏期の気温30条件を除いて、京都府産カラスビシャクの肥大率が優れており、その系統間差は特に冬期において顕著であった。夏期・冬期とも、いずれの気温条件においても京都府産が優れていた。有用成分含量に関わらず、重さでの評価がなされているが、京都府産のものは夏期においては特級～甲級、冬期においても甲級と評価できる塊茎が得られている。塊茎の有用成分含量について精査結果、事前に調査した市販品の含量は $21.4 \mu\text{g}/\text{mg dw}$ であり、これを下回ったのは気温20下で生育させた長崎産カラスビシャク(夏期・冬期とも)のみである。夏期・冬期とも、京都府産の含量が高く、夏期においてその系統間差がより顕著であった。以上のように、カラスビシャクの生育温度は、その生育と塊茎の有用成分含量に影響するが、日射量の違い、および系統の違いが、塊茎の収量・品質により大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。今回の調査では、京都府産カラスビシャクが市販品に大きく優る品質を持ち、高い収量をもたらすことが明らかとなり、この系統が園芸施設での周年生産に利用可能であることが示唆された。

最後に、約40か所から採取したカラスビシャクを同一の条件で栽培した後、塊茎に含まれるPT-PS含量をELISAにより測定した。その結果、京都産のカラスビシャクが最もPT-PS含量が高く、また、最も高い塊茎収量であることを確認した。

今回の研究期間を通して、目的としたカラスビシャク由来生理活性多糖を特異的に認識するmAbの作製に成功し、本mAbを用いた簡便な免疫化学的分析手法を確立した。また、植物工場でのカラスビシャクの栽培を目的として、様々な栽培条件を精査した結果、カラスビシャクの周年栽培を実現した。さらに、高品質カラスビシャクの選抜育種にも取り組み、高収量でPT-PS高含有の個体を選抜すること

に成功した。今後は、本個体の品種としての登録を念頭において、更に、安定した生産システムの構築に取り組んでいく計画である。

<引用文献>

1. T. Maki et al., *J. Agr. Food Chem.*, **33**, 1024 (1985)
2. T. Maki et al., *Planta Medica*, **53**, 410 (1987)

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

1. T. Eguchi, H. Tanaka, S. Yoshida, K. Matsuoka, Influence of Ground Water Level on the Growth of the Medicinal Plant *Pinellia ternata* Breit. in a Solid Substrate Culture System, The International Conference on Plant Factory 2014, Kyoto, p.2 (2014)
2. 江口壽彦・田中宏幸・吉田 敏・松岡 健, 薬用植物カラスビシャクの制御環境下での栽培と優良系統の選抜、日本生物環境工学会2015年宮崎大会, 2015

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 宏幸 (TANAKA, Hiroyuki)
九州大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：30253470

(2)研究分担者

江口 壽彦 (EGUCHI, Toshihiko)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：40213540