

# 植物バイオテクノロジーによる薬用植物の育種研究

正山 征洋

(長崎国際大学 薬学部 薬学科)

## 要 旨

薬用植物の均質化を遂行するためにトリカブトのクローン増殖を行い、それらクローン苗を栽培してアコニチン系アルカロイドの均質性を確認すると共に、季節変動により含量に大きな差が出ることを明らかにした。また、バイオトロンにより温度による変動を検討し、温度が高いほどアコニチン系アルカロイド含量が高いことを明らかにした。ニンジンの花芽をカルス化し、不定胚から幼植物を得る手法を確立した。本手法により得られた植物の遺伝子分析によりその均質性を確認した。

除草剤耐性遺伝子をパーティクルガンにより直接カラスビシャク細胞へ導入し、トランスジェニック植物に除草剤耐性が付与されることを明らかにした。抗ソラソジン配糖体モノクローナル抗体の小型化抗体(scFV)遺伝子を宿主植物へ、アグロバクテリウムを介して形質導入し、トランスジェニック植物を得て、scFV タンパク発現の確認とソラソジン配糖体含量を分析した。その結果 scFV 遺伝子を導入することによりコントロールに比べて約3倍の含量になった。本手法は新しい育種法として展開可能と考えられ、ミサイルタイプ分子育種と命名した。

## キーワード

クローン増殖、パーティクルガン、トランスジェニック植物、scFV 遺伝子導入、ミサイルタイプ分子育種

## はじめに

バイオテクノロジーの定義はバイオ(Bio; 生物)とテクノロジー(technology; 工学)の2つの単語を結び付けた造語であることは周知のことである。1950年代後半からスタートした植物バイオテクノロジーは50年間多様な技術革新を展開してきた。その経緯の概略を示す。

### 植物バイオテクノロジーの変遷

第一世代(～1965年)

植物組織培養の基礎概念と技術の確立

- ・各種植物ホルモンの単離・構造決定
- ・培養単細胞から個体再分化(全能性)の確立
- ・プロトプラスト(細胞壁を除き細胞膜のみとした裸の細胞)の単離
- ・細胞・組織培養用基本培地組成の開発

植物組織・細胞培養技術の応用(細胞工学)

- ・プロトプラストからの個体再分化
- ・プロトプラスト融合による体細胞雑種の作出
- ・細胞選抜による二次代謝産物の生産、大量スケール培養
- ・培養細胞による物質変換
- ・マイクロプロパゲーションによるクローン植物の大量増殖の実用化

第二世代(1982 - 1992年)

植物への遺伝子導入技術の確立(トランスジェニック植物)

- ・アグロバクテリウムによる遺伝子導入系の確立
- ・モデル遺伝子の導入、発現、遺伝形質の確認
- ・異種生物由来の単一遺伝子の導入による農業的形質の改変

- ・毛状根の誘導と培養による物質生産
- 遺伝子および細胞工学的技術の新展開
- ・有用植物種への遺伝子導入と個体再生系の確立
  - ・トランスジェニック植物の実用化
  - ・重要遺伝子の単離、同定とエンジニアリング
- 第三世代 (2001 ~ )
- 大規模ゲノムプロジェクトの推進  
(薬用資源学、斉藤和季ら、p.67、丸善、2002年を改変)

第一世代は植物バイオテクノロジーの基礎を樹立する時代であり、植物ホルモン類すなわちオーキシン類、サイトカイニン類、ジベレリン類、アブシジン酸等の植物ホルモンが次々と単離・構造解析され、人工培養培地を開発し、植物細胞・組織培養を可能とした時代である。また、植物細胞からセルロース、ペクチン質等で形成されている強固な細胞壁を消化する酵素(セルラーゼやペクチナーゼ等)の発見と実用生産により、細胞膜のみとしたいわゆる裸の細胞、プロトプラストを創製し、動物細胞と同様な扱いが可能とした技術は植物バイオテクノロジーを大きく進展させた技術革新と言える。体細胞雑種と呼ばれる育種法が考案されたのもこの世代である。例えばミカン科のオレンジとカラタチの細胞を融合して作り出したハイブリッド細胞から再分化したオレタチは良く知られた体細胞雑種の例である。この時代に何れの植物組織の単細胞も分化全能性を持つことが確かめられた。動物細胞の幹細胞が全能性をもつことが明らかとなり、再生医療への実用化が大きな技術革新のうねりとなっているが、植物の全能性は1980年代に実用化に至っている。この技術が第二世代の幕開けを誘導したと言っても過言でない。

第二世代は前述のプロトプラストに異種遺伝子を導入する努力が払われた。導入方法の一方としてパーティクルガンと呼ばれる鉄砲により金粒子へ遺伝子をまぶして、培養細胞目掛け

て発射し、遺伝子を直接導入する装置が開発されたが繁用されるには至っていない。一方ではアグロバクテリウムと呼ばれる樹木に腫瘍を形成させるバクテリアが注目され、そのプラスミッドが外来遺伝子導入に適していることが確認され、以後ほとんどの遺伝子導入研究で用いられるようになった。この技術によりトランスジェニック植物の創製が可能となり農業分野では実用化したものが少なくない。例えば除草剤耐性遺伝子を導入した大豆や昆虫に対する毒性のあるタンパクを導入して食害を防御しているワタ、また植物色素であるアントシアニンの遺伝子を導入して作り出された青いバラやトマトが運搬中に傷つかないように細胞壁を強固にしたトランスジェニックトマト等である。

第三世代はマーカー植物としてのシロイヌナズナ等の全ゲノム解析が行われた時代でもある。有用作物のイネ等もゲノム解析が行われた。また、有用化合物の生合成酵素遺伝子のクローニングが行われ、それらの生合成酵素遺伝子を宿主植物へ導入して有用化合物、特に薬理活性天然物の含有量を高めようとする努力が続けられている。

以上バイオテクノロジーの時代背景を垣間見たが、我々は薬用植物に的をしぼりバイオテクノロジー研究を行ってきたので、2、3紹介する。最初に生薬の均質化を目指した薬用植物のマイクロプロパゲーション、すなわちクローン増殖法の開発に触れる。また、外来遺伝子導入によるターゲット成分の含量増加を狙った育種方法についても概説する。

### 1. クローン増殖による均質な生薬の確保

我が国では薬用植物の90%以上を輸入に依存しており、それらの約70%は自生種の採取により供給される。このため産地や採取時期、修治(個々の生薬に対する特殊な加工により有効性を上げる方法)による成分の変動が大きく、従ってコンスタントな薬効が得難い。また薬用植物は付加価値が高いため乱獲が進み資源の払底や

環境への悪影響が危惧されている。例えば甘草と麻黄は準砂漠地帯に生息するため、乱獲により砂漠の拡大が惹起されているとの見解から、数年前に中国産の甘草と麻黄の輸出が禁止となったことは記憶に新しい。このような情勢を背景に、植物バイオテクノロジーの内、特に細胞・組織培養を応用した薬用植物の育種研究を行って来た。トリカブト(附子)<sup>1-4)</sup>、アカヤジオウ(地黄)<sup>5-7)</sup>、オケラ類(朮)<sup>8,9)</sup>、カラスビシャク(半夏)<sup>10-14)</sup>、ニンジン属(人参)<sup>15-18)</sup>、リンドウ(竜胆)<sup>19)</sup>など主要な薬用植物のクローン増殖法を開発してきた。本稿ではハナトリカブトとニンジン(薬用人参)のクローン増殖法について概説する。

### 1 1 ハナトリカブトのクローン増殖

*Aconitum* 属植物の塊根は附子と称し、鎮痛、強心、利尿、新陳代謝機能の促進などを目標として、八味地黄丸、真武湯など多くの漢方薬処方に配合される重要な生薬で、特に虚証の患者さんに与えて、冷えを解消し新陳代謝を上げる働きが強い生薬である。成分としては強心作用を有する hygenamine、coryneine 等、鎮痛作用を有する猛毒成分として aconitine 系アルカロイドに属する mesaconitine、aconitine、hypaconitine 等、さらにこれらのリポ体等が知られている。漢方においては aconitine 系アルカロイドの毒性が強いため種々の修治を加え減毒した炮(加熱処理)附子や塩(食塩処理)附子などの加工附子が用いられる。*Aconitum* 属植物には2、3、4、5 倍体が存在するため種間で成分変異が多いことが容易に推察される。また、同一種内における含有アルカロイドの変異もきわめて大きいと言われており、均質な原料確保が不可欠である。この点から、附子の原料植物の1つであるハナトリカブト(*Aconitum chammichaeli*)のマイクロプロパゲーションについて触れてみたい。

茎頂部を各種のホルモン添加区で培養して multiple shoot (多芽体) 形成について検討した

結果、BA (ベンジルアデニン; 5 mg/l) 添加培地で培養することにより良好な増殖が認められた。培養を繰り返しても増殖率の低下は見られなかった。

次に得られた multiple shoot を分割し、IAA (0.5 mg/l) 添加培地で培養することにより発根し幼植物が得られた。この幼植物を継代することなく、20℃、暗黒下でさらに4週間培養することにより、平均2個の microtuber (子根) を形成した(図1)。この子根は栽培期まで4℃で保存し、播種することにより、斉一な発芽が認められることから、栽培に当たってきわめて有用な方法であることが確認された。<sup>2)</sup>

次に葯(花粉の袋)培養から不定胚を経由して再分化個体を得る方法について触れる。開花直前の蕾から無菌的に葯を採取し、2, 4-D (2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸; 5 mg/l) カイネチン (1 mg/l) 添加区で培養してカルス(細胞の不定塊)を形成し、同一の組成培地でカルスを増殖した。2, 4-D (1 mg/l) 添加区でカルスから不定胚(人工種子)を誘導した(図2)。同一培地で継代培養することにより、不定胚の増殖(図3)と幼芽の形成も認められた。成熟胚は GA (1 mg/l)- BA (5 mg/l) 添加区で培養することにより発芽し、幼芽を形成した<sup>4)</sup>(図4)。発根は前述の通りである。中には花をつける個体も見られた(図5)。

茎頂由来のクローン苗を栽培し、その含有アルカロイドを分析した結果クローン増殖により育成した個体は親植物に比べ均質化が進んでいることが明らかとなった<sup>4)</sup>(表1)。本法により、1茎頂から年間12,000本のクローン苗を得ることが可能であり、通常の方法では年間6倍前後の増殖率なので、2,000倍のスピードで均質化が進むことになる。

これら均質となったハナトリカブトを用いて aconitine 系アルカロイドの時期的な変動を見たのが図6である。この結果、9月頃からアルカロイド含量は上昇し、発芽期に最高値を示した。このことから採取時期に配慮が必要なこと

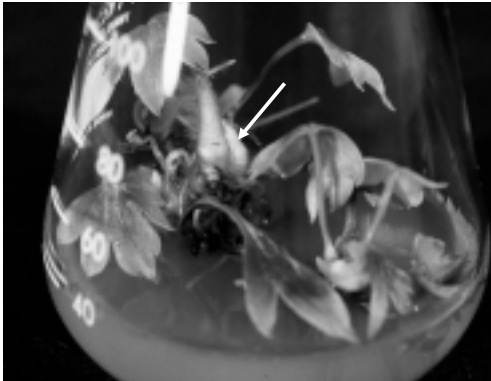


図1 幼植物の暗黒下培養により子根の発生(矢印)

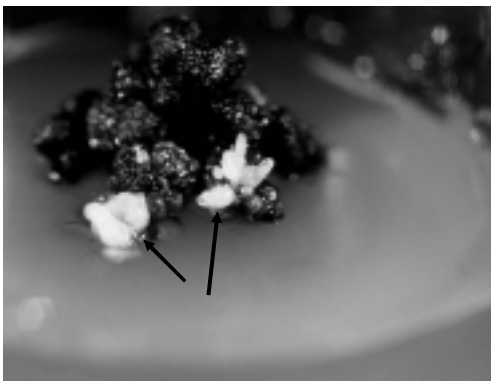


図2 薬から生じたカルス上に不定胚が発生(矢印)

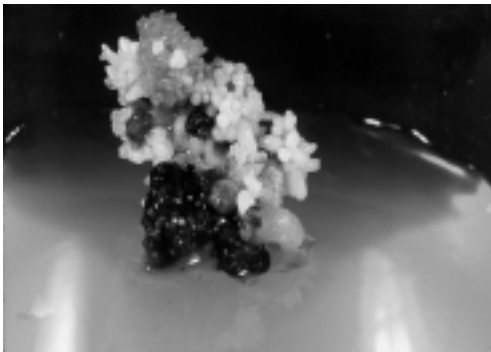


図3 増殖中の不定胚



図4 不定胚からの発芽



図5 フラスコ内で開花したハナトリカブトの幼植物

サンプル	サンプル数	乾燥重量% (変動係数%)		
		mesaconitine	hypoconitine	aconitine
1	10	0.151±0.032 (21.2)	0.052±0.018 <sup>a</sup> (32.4)	0.020±0.004 (22.0)
2	70	0.127±0.032 (26.3)	0.041±0.017 (41.7)	0.020±0.009 (43.1)

1:クローン植物を15°C室のバイオトロンで5ヶ月栽培、2:親植物、  
a:親植物に比較して変異差がP<0.05

表1 クローン植物(1)と親植物(2)のアコニチン系アルカロイド含量の比較

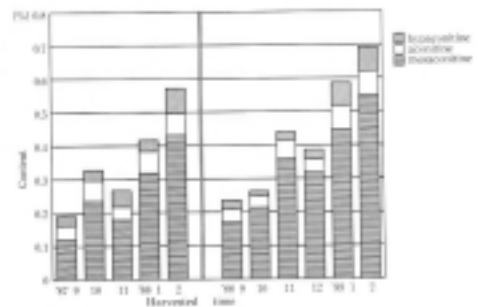


図6 クローン植物を用いたアコニチン系アルカロイドの季節変動

が示唆された<sup>20)</sup>。

また、人工気象器を用いて温度による aconitine 系アルカロイド含量を調査したのが表 2 である。この結果温度が高いほど aconitine 系アルカロイド含量が高い結果を得ている。なお、附子の重量は温度が低いほど高いことが示された<sup>20)</sup>。

以上の通り、附子の均質性は遺伝形質以外にも外的要因が絡んでいることが明らかとなり、古くから附子は医者「さじ加減」で調合すると言われてきた一端を理解することが出来るであろう。

## 1 2 ニンジンのクローン増殖

植物細胞が再分化する場合、植物種によって異なる再分化の過程を辿る。また、植物ホルモンの種類により再分化誘導が異なることもある。アカヤジオウ（地黄）の例をあげると、カルスから不定胚（人口種子）を生じる場合（図 7）や葉から茎が直接出ることもある（図 8）。また、カルスから直接再分化する場合もある<sup>7)</sup>（図 9）。

ニンジンに付いては不定胚を経由して以下の通り再分化植物を得た。ニンジンの花芽を暗黒下 2, 4-D 添加培地で培養してカルスを得る（図 10）。同一培地で培養を続けると不定胚を生じて、不定胚の数が増加すると共に生長して再分化するものも出てくる（図 11）。不定胚を増殖後、ホルモン無添加培地へ継体することにより再分化が起こり次第に生長して（図 12）、培養を続けることにより発根し幼植物となる<sup>17)</sup>（図 13）。中にはフラスコ内で開花する個体もある（図 14）。茎葉をクローン増殖培地へ継体することにより多芽体を形成する（図 15）。

以上の方法で得られた幼植物の遺伝子レベルでその均質性を調査したのが（図 16）であり、何ら変異は認められない<sup>18)</sup>。

## 2 . 外来遺伝子導入

外来遺伝子導入の例として除草剤耐性を導入

し実用化に至った成功例は少なくないが、我々は生薬として重要な半夏の原植物であるカラスビシャクへの導入をパーティクルガンによる方法を行ったのでこれにつき概説する。また、ユニークな手法として小型化抗体遺伝子を導入し、抗原分子を上昇させようとする戦略を行っているのでこれについても紹介する。

### 2 1 パーティクルガンを用いた除草剤耐性遺伝子の導入

遺伝子を細胞へ直接導入するツールとして用いられてきた上述のパーティクルガンを用いて除草剤耐性遺伝子を導入した例について述べる。外来遺伝子を金粒子にコーティングして弾丸（プロジェクタイトル）の先端に載せ、窒素圧により弾丸をマッハ以上の初速で発射する（図 17）。金粒子と DNA は植物の細胞壁を貫通して核にまで到達し、DNA が核に組み込まれ発現する。図 18 はカラスビシャク（半夏；漢方薬に頻りに配合される重要生薬の一つ）の培養細胞にグルクロニダーゼ遺伝子を発射・導入し、基質を加えて発色したもので、図 18 左がコントロールとして遺伝子無しで発射したもので、何ら発色は認められない。一方、図 18 右は発色が見られ、グルクロニダーゼタンパクが発現し、酵素活性を示しており、外来遺伝子が導入可能なことを示している<sup>21)</sup>。

除草剤耐性遺伝子についても同様に形質導入が可能である。なお、除草剤耐性の作用メカニズムは以下である。除草剤ピアラフォスは *Streptomyces hygroscopicus* および *S. viridochromogenes* によって産生されるトリペプチドで、グルタミン酸（図 19 右）と類似の構造を持つフォスフィノスリシン（図 19 左）にアラニン 2 分子が結合している。何れの植物も保有するペプチダーゼにより、容易にペプチド結合が分解され、ピアラフォスからフォスフィノスリシンが遊離し、このものは、ATP の存在下でグルタミン合成酵素を不可逆的に阻害し、植物毒性を示すレベルのアンモニアが植物中に蓄積され、

Cultivation condition (°C)	N <sup>a</sup>	Average % of dry weight (w/w <sup>b</sup> )		
		Mesaconitine	Aconitine	Hypaconitine
15	10	0.108 ± 0.019 <sup>***</sup> (0.18)	0.810 ± 0.006 (0.17)	0.889 ± 0.011 (0.11)
20	10	0.141 ± 0.008 (0.15)	0.827 ± 0.006 (0.16)	0.889 ± 0.010 (0.16)
25	10	0.208 ± 0.006 (0.18)	0.865 ± 0.010 (0.18)	0.925 ± 0.006 (0.17)
Field	10	0.122 ± 0.002 (0.16)	0.820 ± 0.007 (0.11)	0.889 ± 0.010 (0.17)

<sup>a</sup> Sample number analyzed  
<sup>b</sup> Coefficient variation  
<sup>\*\*\*</sup> Standard error

表2 クローン増殖ハナトリカブトのアコニチン系アルカロイド含量に対する栽培温度の影響

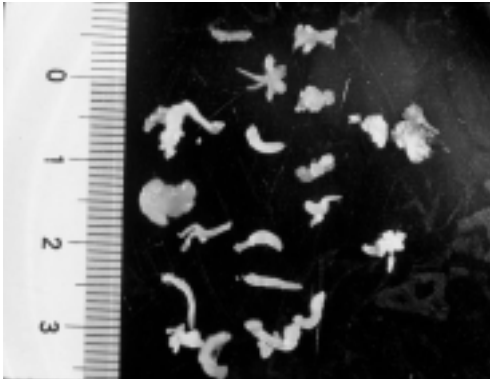


図7 アカヤジオウのカルスから発生した不定胚



図8 アカヤジオウの葉から茎葉が再分化

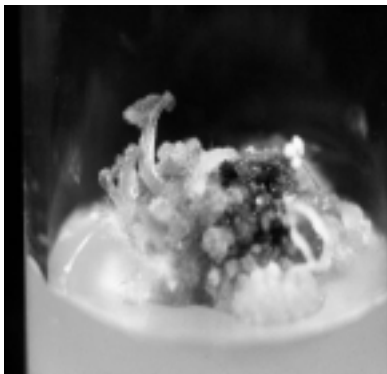


図9 アカヤジオウのカルスから茎葉の分化



図10 ニンジンの花芽由来カルス

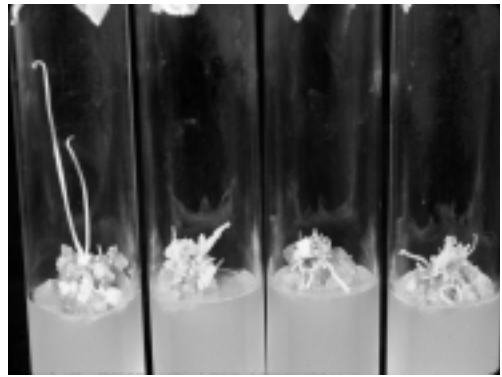


図11 カルスから不定胚と再分化植物の発生

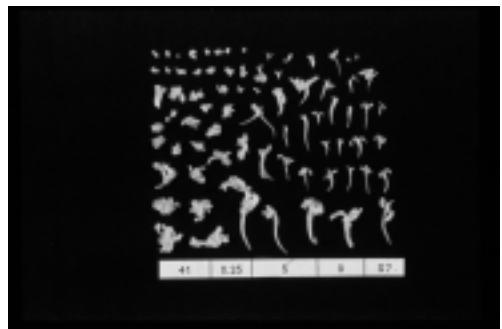


図12 不定胚の生長と再分化

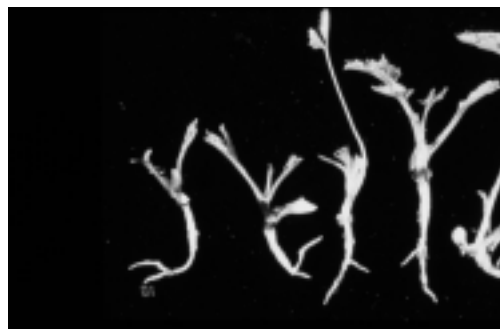


図13 ニンジンの不定胚経由の幼植物

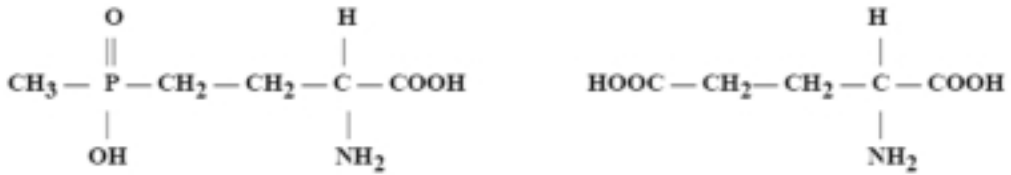


図19 フォスフィノスリシン（左）とグルタミン酸（右）の構造

植物を死に至らしめる。一方、phosphinothricin acetyl transferase はフォスフィノスリシンを分解するため除草剤活性が不活化される。

図20に示すようにパー遺伝子 (phosphinothricin acetyl transferase をコード) を組み替えた後、前述のカラスビシャク培養細胞 (図17) へパーテイクルガンで導入し、再分化植物を得た (図21) 得られた植物は phosphinothricin acetyl transferase を発現しており、除草剤のピアラフォスを不活化する。

図22はトランスジェニック植物をピアラフォス溶液を用いて除草剤耐性アッセイを行った結果である。一番左が phosphinothricin acetyl transferase を導入していないカラスビシャクであり、茎葉がしなだれている。右の7個体はトランスジェニック植物で、枯死することなく生存しており、除草剤耐性を獲得したことを示している<sup>21)</sup>。

## 2.2 遺伝子組み換えによる高含量品種の育成

我々は生薬の品質評価や漢方薬の薬効評価を目的に多くのモノクローナル抗体 (MAb) を作成し、簡易かつ迅速、高感度の分析法として ELISA を開発してきた。この延長線上の研究として MAb の小型化抗体 (single chain fragment-variable ; scFV) の作成とその応用研究を行っている。幅広い交差性を持つ MAb として抗 solamargine MAb を得ている。このものの scFV が先行しているので解説する<sup>22)</sup>。

定法通り、抗 solamargine MAb 産生ハイブリドーマから RNA を抽出、cDNA とし、長鎖 (vH) と短鎖 (vL) 遺伝子を PCR で増幅しリンカーにより結合し、大腸菌へ組み替え scFV

をクローニングする (図23)。scFV 遺伝子の配列を確かめ、発現ベクターへ組み込み (図24) タンパクの発現を行う。インクルージョンボディとして発現されるので、可溶化後 His タグアフィニティーカラムで精製しながら巻き戻し、活性のある scFV タンパクとする。精製タンパクはウエスタンブロットイング、MALDI-TOF Mass 等で純度を確かめた。

次にホスト植物である *Solanum khasianum* へ scFV 遺伝子を *Agrobacterium rhizogenes* を介して形質転換を行った。毛状根 (ヘアリールート) を生じたクローンを選抜し、scFV 産生クローンを得る。それぞれのクローンを培養し、再分化植物を得た (図25)。生産した scFV タンパクを精製し、ウエスタンブロットイング (図26) と MALDI-TOF Mass (図27) により生成度を確かめると同時にその分子量からアミノ酸シークエンスが正しいことを確認した<sup>23)</sup>。

一方 solasodine 配糖体を ELISA により分析した結果、ワイルドタイプの *A. rhizogenes* で感染して生じたヘアリールートおよび再分化植物を比べたところ、scFV 遺伝子を導入したヘアリールートおよび再分化植物は2.5~3倍の solasodine 配糖体を含有することが明らかとなった (図28)。当然ながら図29に示すとおり scFV タンパク量と比例している。このことから植物体内で scFV タンパクはハプテン分子と抗原抗体反応を行い、コンプレックスが不活化し系外へ排除され、この結果 solasodine 配糖体の生合成経路が正の方向へ進むものと考えている<sup>23)</sup> (図30)。本法は抗体を用いたミサイル療法に類似するため「ミサイル型分子育種法」と命名した。



図14 フラスコ内におけるニンジンの開花



図15 ニンジンの多芽体 (multiple shoot) 形成

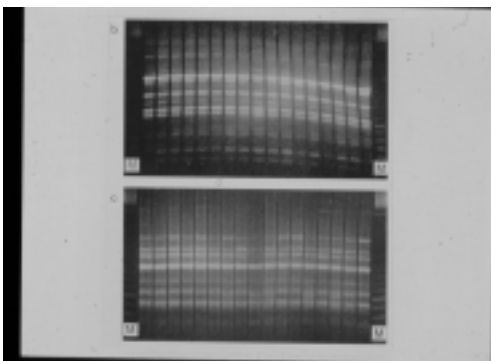


図16 再分化ニンジンの遺伝子分析(RAPDによる)

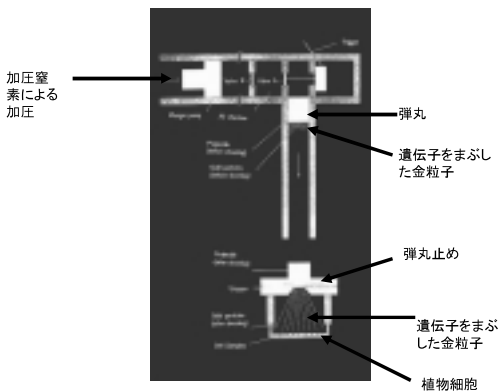


図17 パーティクルガンの構造

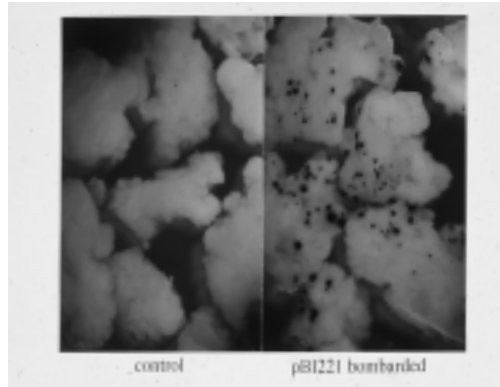


図18 パーティクルガンによるカラスビシャク細胞へのグルクロニダーゼ遺伝子の導入とその発現(右)

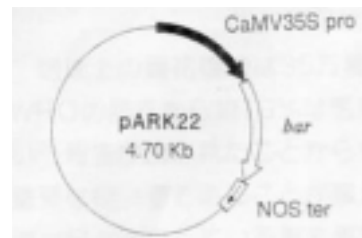


図20 パー遺伝子の挿入



図21 カラスビシャクのトランスジェニック植物



図22 トランスジェニック植物のピアラフォス溶液を用いた除草剤耐性アッセイ  
一番左がコントロール、右7本がトランスジェニック植物



## おわりに

薬用植物の育種研究は、農学領域と異なり含有する薬効成分等が重要視されるので、形質のみをターゲットとするストラテジーとはより複雑となってくる。前述の通りゲノム分析が進み、また、生合成酵素遺伝子のクローニングが進んできたので、外来遺伝子導入により高含有量の品種作成が容易なような錯覚を起しがちであるが、実情は厳しく成功例は未だなく、本稿で述べた我々の成功例が最初の例となった。

前述の通り甘草は70%以上の漢方薬に配合される最重要生薬である。甘草の大量採取が資源の枯渇を招き、ひいては中国の砂漠化を惹起したとの見解から、自生種の採取禁止令が出され一時パニック状態になったことは記憶に新しい。我々は甘草の有効成分であるグリチルリチンに対するMAbを作成し、その高感度分析法を開発し、これに基づきELISAキットの上市が行われた。現在は高感度のELISAキットを用いて、多数の株を分析し優良株の特定を行っている。育種方法としてはオーソドックスな手法であるが、新しい分析方法の開発により従来は考えられなかった高感度、かつ多数のサンプルをスピーディーに分析し優良株の選抜を行っている。このことから如何に分析方法が重要かご理解頂けよう。

## 謝辞

本総説は日本学術振興会によるアジアコアプログラム活動の一環として著されたものである。ここに深謝します。

## 引用文献

- 1) Hatano K, Shoyama Y, Nishioka I (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the anther of *Aconitum carmichaeli* Debx. *Plant Cell Reports* 6, pp.446-448.
- 2) Hatano K, Shoyama Y, Nishioka I (1988) Clonal multi-

plication of *Aconitum carmichaeli* by tip tissue culture and alkaloid contents of clonally propagated plant. *Planta Medica* 54, pp.152-155.

- 3) Yamada Y, Shoyama Y, Nishioka I (1991) Characteristics of clonally propagated *Aconitum carmichaeli*. *Shoyakugaku Zasshi* 45, pp.289-292.
- 4) Shoyama Y, Nishioka I, Hatano K, (1991) In *Aconitum* spp. (Monkshood): Somatic Embryogenesis, Plant Regeneration, and the Production of Aconitine and Other Alkaloids. *Plant Regeneration, and the Production of Aconitine and Other Alkaloids. Biotechnology in Agriculture and Forestry* 15, 58-72.
- 5) Shoyama Y, Nagano M, Nishioka I (1983) Clonal multiplication of *Rehmannia glutinosa*. *Planta Medica*, 48, pp.124-128.
- 6) Matsumoto M, Shoyama Y, Nishioka I, Iwai H, Wakimoto S (1989) Identification of viruses infected in *Rehmannia glutinosa* L. var. *purpurea* Makino and effect of virus infection on root yield and iridoid glycoside contents. *Plant Cell Reports* 7, pp.636-638.
- 7) Matsumoto M, Shoyama Y, Nishioka I (1989) Constituents of regenerated shoot and cultured root tissue of *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry* 28, pp.2331-2332.
- 8) Shoyama Y, Tareno R, Nishioka I (1987) Clonal multiplication of *Atractylodes lancea* by tip tissue culture. *Shoyakugaku Zasshi* 41, pp.313-317.
- 9) Hatano K, Shoyama Y, Nishioka I (1990) Clonal propagation of *Atractylodes japonica* and *A. ovata* by tip tissue culture and the atractylon content of clonally propagated plants. *Planta Medica* 56, pp.131-132.
- 10) Shoyama Y, Hatano K, Nishioka I (1983) Rapid and simple multiplication of *Pinellia ternata* by tissue culture. *Planta Medica* 48, pp.14-16.
- 11) Shoyama Y, Hatano K, Nishioka I (1983) Clonal multiplication of *Pinellia ternata* by tissue culture. *Planta Medica* 47, pp.103-105.
- 12) Hatano K, Shoyama Y, Nishioka I (1986) Multiplication of *Pinellia ternata* by callus culture of leaf segment. *Shoyakugaku Zasshi* 40, pp.188-192.
- 13) Hatano K, Shoyama Y, Nishioka I (1991) Cultivation studies on clonally propagated *Pinellia ternate*. *Shoyakugaku Zasshi* 45, 203-205.
- 14) Shoyama Y, Nishioka I, Hatano K (1992) Micropropagation of *Pinellia ternata*. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 19, pp.464-480.

- 15) Shoyama Y, Nishioka I, Fujioka N, Kohda H, Yamasaki K (1987) Clonal multiplication of *Panax Japonicus* by tissue culture. *Shoyakugaku Zasshi* 41, pp.333-337.
- 16) Shoyama Y, Kamura K, Nishioka I (1988) Somatic embryogenesis and clonal multiplication of *Panax ginseng*. *Planta Medica* 54, pp.155-156.
- 17) Shoyama Y, Matsushita H, Zhu X. X, Kishira H (1995) Somatic embryogenesis in ginseng (*Panax* species) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 31, 333-356.
- 18) Shoyama Y, Zhu X. X, Nakai R, Shiraishi S (1997) Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. *Plant Cell Rep* 16, 450-453 (1997).
- 19) Yamada Y, Shoyama Y, Nishioka I (1991) Clonal micropropagation of *Gentiana scabra* Bunge var. *buergeri* Maxim. and examination of the homogeneity concerning gentiopicoside content *Chem. Pharm. Bull.* 39, 204-206.
- 20) Shoyama Y, Yamada Y, Nishioka I (1993) Relationship between the content of aconitine-type alkaloids and growth environments in clonally propagated *Aconitum carmichaelii* Debx. *Biotronics* 22, pp.87-93.
- 21) 正山征洋、未発表データ
- 22) Ishiyama M, Shoyama Y, Murakami H, Shinohara H (1996) Production of monoclonal antibodies and development of an ELISA for solamargine. *Cytotechnology* 18, pp.153-158.
- 23) Putalun W, Taura F, Qing W, Matsushita H, Tanaka H, Shoyama Y (2003) Anti-solasodine glycoside single-chain Fv antibody stimulates biosynthesis of solasodine glycoside in plants. *Plant Cell Rep* 22, pp.344-349.

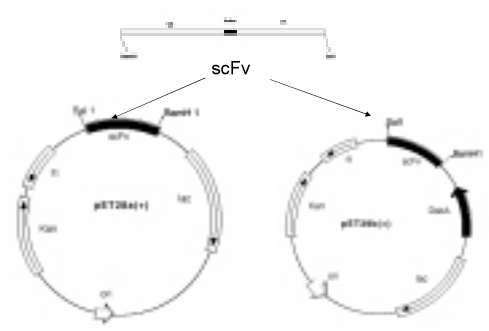


図24 プラスミッドへの scFV 遺伝子の挿入

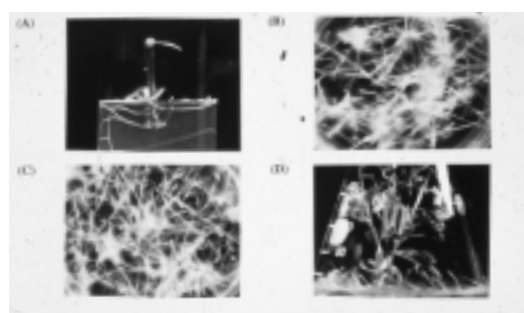


図25 アグロバクテリウムを用いた感染による scFV 遺伝子の導入  
 A : 感染によりヘアリールートが発生、B : ヘアリールートの増殖、C : グリンスポットの発生、D : トランスジェニック植物の発生

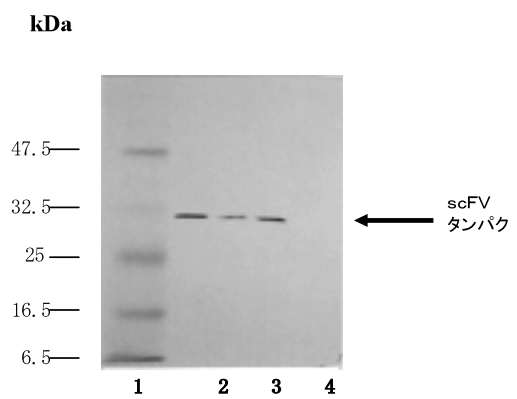


図26 scFV タンパクのウエスタンブロットティング

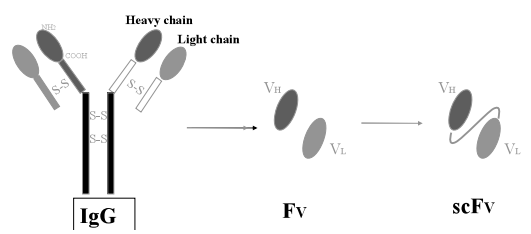


図23 小型化抗体遺伝子のクローニング

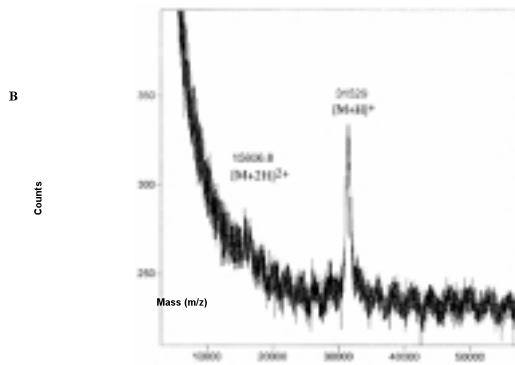


図27 MALDI マスによる scFV タンパクの分子重量測定とアミノ酸シーケンスの確認

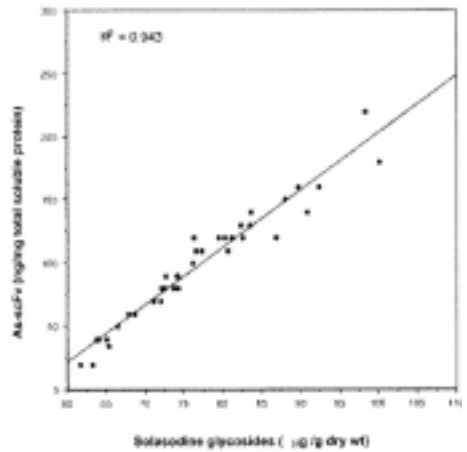
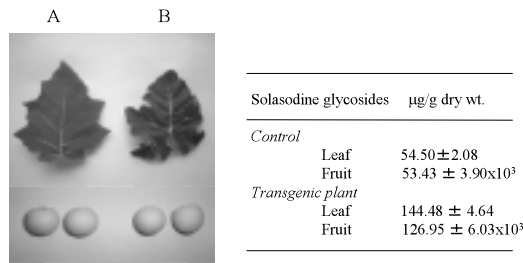


図29 scFV タンパク発現とソラソジン配糖体含量の相関



Leaf and fruit of control (A) and transgenic plant (B)

図28 scFV 導入トランスジェニック植物(B)とコントロール(A)のソラソジン配糖体含量の比較

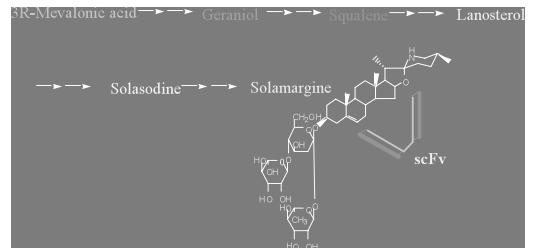


図30 小型化抗体タンパクによるソラソジン配糖体のトラップと生合成経路の促進