

京都大学	博士（薬学）	氏名	伊藤 ほのか
------	--------	----	--------

論文題目	薬用人参のギンセノシド詳細分析と遺伝的多様性に関する研究
------	------------------------------

(論文内容の要旨)

オタネニンジン (*Panax ginseng* C. A. Meyer) の乾燥した根を基原とする生薬の薬用人参は、古来東アジア諸国で珍重されてきたが、日本では様々な漢方処方に配合される他、食品等にも使用される。薬用人参の特徴的な成分はギンセノシド類であり、日本薬局方では定量指標成分として ginsenoside Rb1 および Rg1 が規定されている。

オタネニンジン は韓国や中国、ロシアに自生するが、今では絶滅危惧種となっており、生薬には主に栽培したものが使用される。日本に自生は無いが江戸時代に栽培が始まり、現在も長野県、島根県、福島県等で栽培されているものの、栽培の難しさや栽培期間の長さがマイナス要因となり、生産量は減少している。一方、近年日本では薬用人参の使用量が増加傾向にあり、その多くは中国からの輸入品であるため、安定的な資源確保のための危険分散や国産化推進の観点から、薬用人参栽培の振興を目標に、その問題点の克服が求められている。そこで、薬用人参研究の歴史的変遷と近年の動向を調査し、調査結果をもとに、栽培振興の基盤整備のひとつとして日本で栽培されている薬用人参のギンセノシド類含有量の詳細分析と遺伝的多様性の調査、および両者の関係についても調べた。

### 第一章 薬用人参研究の歴史的変遷と近年の動向

第一章では、薬用人参研究の現状について整理し、問題解決のためのヒントや新たな展開への糸口を見出す目的で文献調査研究を行った。Web of Science, scifinder<sup>n</sup>, PubMed, Google Scholar で、*Panax ginseng* C.A.Meyer, ginsenosides, genetic diversity, biosynthesis, cultivation, pharmacology 等のキーワードを用いて検索した結果、1208件の文献が確認された。これらを分類すると、薬理学研究が549件と最も多く、次いで成分研究が262件だったが、栽培研究や分子生物学的研究は少なかった。近年では特徴的な成分であるギンセノシド類を中心に、薬理作用のメカニズムの解明、成分パターンと栽培条件の関係の調査、遺伝子発現の調査、組織培養の条件検討等に関する研究が多かった。また、文献の大半は中国や韓国の研究グループによるもので、日本の研究グループの報告は少なかった。比較対照として、薬用人参同様に古くから栽培されているヤマトトウキの研究状況を調査した結果、日本での栽培や遺伝子解析に関する研究が多数実施されていた。このことから薬用人参は、日本での栽培と成分パターンの関係や遺伝的多様性に関する知見が不十分であり、これらの知見を得てより効率的な栽培方法や天然物医薬品特有の品質のばらつきを制御する方法等を検討することで薬用人参栽培の問題解決や新たな展開に繋がるものと考えた。この結論に基づき第二章、第三章の検討を行った。

### 第二章 日本産薬用人参のギンセノシド類の局在と経年変化

薬用人参は栽培年数に応じてギンセノシド含量が高くなると言われ、一般に栽培年数が長いほど市場価格が高い。一方、複数の先行研究で薬用人参の栽培年数とギンセノシド含量の関係が報告されているが結果に共通性がない。そこで、栽培期間中のギンセノシド含

量の変動を明らかにする目的で、日本産薬用人参の主根のギンセノシド類の局在と含量を個体別に調査した。検討に際し、生育年数が短い根は根重量が少なく、HPLCを用いた従来法では分析が困難だったため、少量の試料でギンセノシド類の詳細分析を行う方法を検討した。その結果、モノリスキャピラリーカラムを使用して27種類のギンセノシドを分析できることを確認した。次に、長野県で1-6年栽培した薬用人参計30個体を分析した結果、全ての生育年数で周皮のギンセノシド含量(mg/g)は根の内部の含量の5倍程度だった。また、栽培年数とともに主根の太さは増加するが、主根の単位重量当たりギンセノシド含量(mg/g)は大きく変化しなかった。よって、栽培年数の短い薬用人参はギンセノシド類が少なく利用価値が低いという従来の通念は科学的には必ずしも正しくないという結果が得られた。

### 第三章 栽培されるオタネニンジンの遺伝的多様性とギンセノシド含量等について

韓国や中国ではオタネニンジンの新品種開発が盛況で、ギンセノシド含量が高い品種もある。また、遺伝的多様性が調査され、遺伝子型と主根ギンセノシド含量が関連することも報告されており、ギンセノシド含量は遺伝的な制御を受けると考えられた。そこで、日本のオタネニンジンの遺伝的多様性の一端を明らかにする目的で、マイクロサテライトマーカーによる解析を行った。韓国のオタネニンジンの遺伝的多様性を調査した先行研究で報告されている8組のマーカーを用いて解析した結果、長野県と島根県で収集した91個体のオタネニンジンの遺伝子型は大きく2群に分けられたが、それは栽培地による群分けとは一致しなかった。3つのマーカー領域で多くの個体が同じ遺伝子型かつヘテロ接合型であり、日本のオタネニンジンは受粉が不要な無融合種子形成で増殖していると考えられた。また、ヘテロ接合度など遺伝的多様性の指標となる数値を先行研究と比較した結果、日本のオタネニンジンは韓国や中国のものと比較し遺伝的多様性が低かった。さらに、遺伝子型に基づく群分け同士でギンセノシド含量や根の太さを比較すると、2群間で根の太さや成分パターンが異なるという結果を得た。

以上、申請者はまず、日本では薬用人参栽培が長い歴史を持つものの栽培に関連する研究が少ないことを文献調査で明らかにした。次に、モノリスキャピラリーカラムを使用して従来分析が困難であった少量の試料のギンセノシド含量を測定し、これまで検討が不十分だった日本産薬用人参のギンセノシド含量の変動について、栽培年数によって主根のギンセノシド類の局在や含量は大きく変化しないことを示した。また、これまで不明であった日本のオタネニンジンの遺伝的多様性を調査し、韓国や中国と比べて日本の栽培品は遺伝的多様性が非常に低いことを明らかにした。さらに、遺伝子型による群分けとギンセノシド含量等が関係することを示した。本研究の成果は、現状では収穫に6年ほどの長期間を要する薬用人参栽培の、栽培期間の短い薬用人参の利用の検討や遺伝子マーカーを用いた育種等への活用が考えられ、生薬資源の安定的な確保を念頭に置いた栽培振興の基盤整備に役立つ知見であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、栽培振興の基盤整備に資することを目的として、薬用人参研究の歴史的変遷と近年の動向を調査し、その調査結果をもとに日本で栽培されている薬用人参のギンセノシド類の詳細分析を行い、それらの含量と遺伝的多様性との関係について研究を行ったものである。

第一章では、薬用人参研究の現状について整理することにより課題解決のためのヒントや新たな展開への糸口を見出す目的で文献調査研究が行われている。検索した結果から見出された1208件の文献を分類することにより、薬理学研究が多いが、次いで成分研究が中程度だったこと、栽培研究や分子生物学的研究が少いこと、近年ではギンセノシド類を中心に、薬理作用のメカニズムの解明、成分パターンと栽培条件の関係の調査、遺伝子発現の調査、組織培養の条件検討等に関する研究が多かったことが判明した。また、文献の大半は中国や韓国の研究グループによるもので、日本の研究グループの報告は少なかった。このことから薬用人参は、日本での栽培と成分パターンの関係や遺伝的多様性に関する知見が不十分であり、これらの知見を得てより効率的な栽培方法や天然物医薬品特有の品質のばらつきを制御する方法等を検討する必要性が明らかにされた。

第二章では、日本産薬用人参のギンセノシド類の局在と経年変化について検討している。薬用人参は栽培年数に応じてギンセノシド含量が高くなると言われ、栽培年数が長いほど市場価格が高い。一方、これまでの薬用人参の栽培年数とギンセノシド含量の関係の報告には共通性がない。そこで、栽培期間中のギンセノシド含量の変動を明らかにする目的で、日本産薬用人参の主根のギンセノシド類の局在と含量が個体別に調査された。生育年数が短い根は根重量が少なく、HPLCを用いた従来法では分析が困難だったため、少量の試料でギンセノシド類の詳細分析を行う方法が検討されている。その結果、モノリスキャピラリーカラムを使用して27種類のギンセノシドを分析できることが確認された。次に、長野県で1-6年栽培した薬用人参計30個体を分析した結果、全ての生育年数で周皮のギンセノシド含量(mg/g)は根の内部の含量の5倍程度だった。また、栽培年数とともに主根の太さは増加するが、主根の単位重量当たりギンセノシド含量(mg/g)は大きく変化しなかった。よって、栽培年数の短い薬用人参はギンセノシド類が少なく利用価値が低いという従来の通念は科学的には必ずしも正しくないという結果が得られている。

第三章では、栽培されるオタネニンジン(オタネニンジン)の遺伝的多様性とギンセノシド含量等について検討している。これまでに遺伝子型と主根ギンセノシド含量が関連することが報告されており、ギンセノシド含量は遺伝的な制御を受けると考えられた。そこで、日本のオタネニンジン(オタネニンジン)の遺伝的多様性を明らかにする目的で、マイクロサテライトマーカーによる解析が行われた。韓国のオタネニンジン(オタネニンジン)の遺伝的多様性を調査した先行研究で報告されている8組のマーカーを用いて解析した結果、長野県と島根県で収集した91個体のオタネニンジン(オタネニンジン)の遺伝子型は大きく2群に分けられたが、栽培地による群分けとは一致しなかった。また、3つのマーカー領域で多くの個体と同じ遺伝子型かつヘテロ接合型であり、日本のオタネニンジン(オタネニンジン)は受粉が不要な無融合種子形成で増殖していると考察している。また、ヘテロ接合度など遺伝的多様性の指標となる数値を先行研究と比較した結果、日本のオタネニンジン(オタネニンジン)は韓国や中国のものと比較し遺伝的多様性が低かったこと。さらに、遺伝子型に基づく群分け同士でギンセノシド含量や根の太さを比較すると、2群間で根の太さや成分パターンが異なるという結果を得ている。

本研究の成果は、現状では収穫に6年ほどの長期間を要する薬用人参栽培の栽培期間を短縮するために、栽培期間の短い薬用人参の利用価値の検討や遺伝子マーカーを用いた育種等への活用が期待されるものであり、生薬資源の安定的な確保を念頭に置いた栽培振興の基盤整備に役立つ知見であると考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年2月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降