

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2012

課題番号：20255005

研究課題名（和文） マオウ属植物の多様性の解析と種分類に関する調査研究

研究課題名（英文） Studies on the diversity and taxonomy of Ephedra plants.

研究代表者

御影 雅幸（MIKAGE MASAYUKI）

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：50115193

研究成果の概要（和文）：アジア，ヨーロッパ，アフリカなど計 12 カ国において海外学術調査を行ない，本研究で主目的とした *Ephedra distachya*, *E. sinica* などを始めとする 28 分類群を入手した。これらの資料をもとに内部形態，含有アルカロイドなどに関する多様性を調査した結果，生育地の水分環境に大きな影響を受けている一方，栽培研究により，ある程度は遺伝的要因に依存していることも明らかになった。分類学的には学際的研究により，*E. distachya* と *E. sinica* は別分類群であることを解明した。

研究成果の概要（英文）：We have carried out field investigations in 12 countries in Asia, Africa, Europe, and USA and collected 28 taxa of *Ephedra* including *E. distachya* and *E. sinica*. Interdisciplinary study of these samples clarified that the anatomical and chemical diversities in *E. sinica* were largely controlled by the precipitation or wetness of the habitat, but cultivation experiments also indicated minor control by genetic factors. Based on these analyses, we showed that *E. distachya* and *E. sinica* were different taxa although some researchers regarded them as synonymous.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2009 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2012 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
総計	33,900,000	10,170,000	44,070,000

研究分野：生薬学・薬用植物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：Ephedra, 麻黄, 多様性, 分類学, 塩基配列, 栽培, エフェドリン, 薬物資源

1. 研究開始当初の背景

マオウ科植物はマオウ属 *Ephedra* 1 属からなり，裸子植物の中でもっとも進化した一群に位置づけられている。乾燥地帯を中心に世界に 35～40 種が分布すると考えられているが，植物体の構造が単純で分類形質が少ないため種分類が困難かつ混乱している一群である。分類が混乱している要因と

して，本属植物が広範囲かつ普遍的に分布し，かつ多くが辺境の砂漠地帯や高山帯などに生育するため研究資料が不十分であることが挙げられ，よってマオウ科全体の生態的特徴のみならず植物地理学的にも未知な部分が多い。一方，本属植物は薬用資源としても重要で，中国医学で地上部草質茎が「麻黄」として発汗剤とされる他，含有成

分のアルカロイドのエフェドリンは喘息治療薬として現代医学でも不可欠であるが、アルカロイドを含有しない一群もあり、本属植物の系統分類を考える上で、アルカロイドの有無やその組成も指標として重要である。

申請者らは 1983 年以後のアジア産マオウ科植物の学際的研究の結果、(1) 本属植物はとくに中国四川省の山岳地帯や新疆省の乾燥地帯で多様化しており、未だ種分類が不明確な分類群があること、(2) 地上部の形態は、同一種であっても、生育地の環境の相違により極めて多様に変化すること、(3) 土壌 pH により種がすみ分けていること、(4) アルカロイドを含有する種においては、含量は種に関係なく、生育土壌の pH が高いほど含量が高いこと、(5) 本属植物は他の植物との競合を避けるため、早春に芽生え開花し、夏には種子が成熟し、冬期に至る迄に発芽しある程度生育する戦略をとっていること、(6) DNA 塩基配列解析の結果、*E. intermedia*, *E. equisetina*, *E. przewalskii* の種内に多型があり、一方 *E. sinica* の塩基配列は安定しており、ロシアで報告された *E. dahurica* と区別し得ないことから、本種はモンゴルからロシアのブリアチア地方にまで広く分布していること、(7) 中国における資源の減少は乱獲以上に農地開発の影響が大きく、機械で耕耘されるとその群落が枯死し、また過放牧によるヤギの食害も甚大であること、(8) マオウの栽培においては雑草と灌水の管理が重要であること、栽培種としては *E. sinica* が適しており、*E. equisetina* は不適切であり、また栽培植物のエフェドリン含有量が低く、価格低下のために栽培を放棄する農家があること、などを明らかにした。本調査研究では、これまでの調査解析結果をもとに、本科の種分類に関連し懸案となっている以下に列挙する問題点や、新たに生じた問題点を解決することを目的としてアジアを初め世界各地で資料を収集し、調査研究する。

2. 研究の目的

マオウ属植物の種分類学的再検討ならびに薬用資源としての学際的な研究を集大成するために以下の問題点を解決する。(1) 四川省と新疆省における多様性の解明と、2007 年に採集した不明分類群の種同定、(2) *Ephedra sinica* と *E. distachya* の分類学的位置、(3) *E. sinica* の分布域と中国における西限、(4) パキスタン、モンゴル、中国など広い地域から報告されている *E. intermedia* の実態と、ネパール産本属植物で *E. pachyclada* Boiss. と同定されてきた植物群の分類学的位置、(5) *E. likiangensis* と *E. glauca* の分類学的位置、(6) 全分類群の

DNA 塩基配列の特徴、エフェドリン含有種と不含有種の DNA 塩基配列の相違、(7) 栽培麻黄のエフェドリン含有量が低い原因の解明、(8) マオウの栽培と、高品質麻黄生産のための栽培方法の確立。

3. 研究の方法

(1) マオウ属植物の外部形態、組織形態、DNA 塩基配列、アルカロイド含有量についての種内の多様性を明らかにするため、広範囲で採集した全分類群を検討し、これら各要素間の相関や、変異と生育地の環境、緯度経度との相関などを検討する、(2) *E. sinica* および *E. likiangensis* の分類学的位置ならびに分布域を確定する、(3) アルカロイドおよびタンニン含量を指標として化学成分を検討し、種間の特性、あるいは種間や種内に多様性を生じさせる生育地の環境要因を明らかにし、さらにアルカロイドを含有する種としない種を分子生物学的に検討することにより、アルカロイド生合成に関与する遺伝子を明らかにし、高品質麻黄栽培のためのデータとする、(4) とくに分布範囲が広く外部・内部形態の変異が大きい *E. sinica*, *E. intermedia* および *E. gerardiana* について、形態ならびに成分化学的なクラインまたはジェノタイプの実態を明らかにする、(5) 以上の学際的調査研究により、マオウ属植物の属・種・個体レベルの多様性を把握し、本属の種分類を系統的に再検討し明確にする。

上記の研究を遂行するために次の未調査地域において海外学術調査を行う。(1) 研究資料が不足しているアルタイ山脈とその周辺部、(2) *E. sinica* の地理分類学的研究を完結させるために必要な中国の内蒙古自治区中央部並びに西部地域、(3) アジアで本属植物が最も分化していることが明らかになった中国の四川省と新疆省の未調査地域、(4) *E. intermedia* と *E. gerardiana* の種分類を確立するために必要な中国の西藏自治区、ヒマラヤ地区、(4) *E. distachya* の地理分類学的研究に必要な資料収集のためにフランス、エジプト北部、トルコ、(5) エフェドリンを含有しない種を採取するためにパキスタン及び、アメリカ、ペルーを始めとする新大陸の西海岸、などを調査する。

4. 研究成果

(1) 現地調査

① 研究期間中に海外学術調査を行なった地域と国 (☆は大学あるいは博物館などにおける標本調査のみ)

アジア：中国 (内蒙古自治区、甘粛省、新疆省)。モンゴル国。ネパール。トルコ共和国。

ヨーロッパ：スイス。イタリア。スペイン。
フランス。☆ドイツ。☆イギリス。

アフリカ：エジプト。

アメリカ合衆国（西南部）。

②入手した分類群：*Ephedra aphylla*, *E. aspera*, *E. californica*, *E. campylopoda*, *E. chilensis*, *E. ciliata*, *E. cutleri*, *E. dahurica*, *E. distachya*, *E. equisetina*, *E. fragilis*, *E. funerea*, *E. gerardiana*, *E. glauca*, *E. helvetica*, *E. intermedia*, *E. major*, *E. monosperma*, *E. nebrodensis*, *E. nevadensis*, *E. pachyclada*, *E. przewalskii*, *E. regeriana*, *E. scoparia*, *E. sinica*, *E. torreyana*, *E. trifurca*, *E. viridis*.

(2) 多様性に関する研究成果

①これまでに中国、モンゴル、ロシアで蒐集した *E. sinica* の資料を用い、産地による内部形態とアルカロイド含量の相違を検討した結果、両者とも生育地の水分環境の違いによって変化することが明らかになった。

②中国各地で採集した多数の *E. sinica* と *E. intermedia* の外部及び内部形態の多様性を詳細に観察し、種分類した結果、*E. sinica* の分布の西限は甘粛省東部であると判断した。青海省などさらに西側の地域から報告されていた *E. sinica* は *E. intermedia* の生長不良株（毬花のない小型株）であることが明らかになった。

③従来 *E. sinica* と *E. intermedia* の化学的相違とされてきたエフェドリンとプソイドエフェドリン含有量の比率に関しては種内で多様に変化し、両者を区別する指標とはならないことを明らかにした。両種とも乾燥地に生える株ほどプソイドエフェドリンの比率が高くなる傾向が認められた。

④広い分布を示す *E. equisetina* の含有アルカロイドの多様性を検討した結果、含量とともに、エフェドリンとプソイドエフェドリンの含有比率にも大きな変異が認められた。ITS1領域のDNA塩基配列や生育地の気候などとの関連を調査した結果、これらの要素との相関は認められず、日照や土壤環境など、個々の株が生育する土地の細かな環境が影響しているのではないかと考えられた。

⑤以上のことから、従来、遺伝的要因に左右されると考えられてきた内部形態や含有アルカロイド成分が、生育地の環境にも大きく影響を受けていることが明らかになり、本属植物の形態的分類や化学的分類を再考する必要があることを示唆した。

⑥入手した北米産の8分類群に関しては、すべてアルカロイドを全く含まないことを確認した。

(3) 種分類に関する研究成果

①同一種であるとする説がある中国やモンゴルに分布する *Ephedra sinica* Stapf とヨーロッパに分布する *E. distachya* L. について

学際的に検討した結果、ITS1領域のDNA塩基配列が11塩基異なり、また内部形態における表皮下繊維群の形状、含有アルカロイドの量や個々のアルカロイドの含有比が大幅に異なることなどから、別種にすべきであると判断した。

②新疆省産で *E. distachya* と同定されてきた詳細が不明な分類群のITS1領域のDNA塩基配列を検討した結果、より西側に分布する *E. pseudodistachya* のデータバンクに登録されている配列に一致した。また、これらの植物はアルカロイドをほとんど含有していないことが明らかになった。

③西部ネパールの主としてカリガンダキ川上流域に分布し、これまで *E. pachyclada* Boiss. と同定されてきた資料のITS1領域のDNA塩基配列をエジプトで入手した *E. pachyclada* をも含めて比較検討した結果、ネパールには本種が分布せず、本種と同定されてきたものはすべて *E. intermedia* と *E. gerardiana* の交雑種由来であることを明らかにし、ヒマラヤ地域の植物研究者から大きな反響を得た。

④同一種であるとする説がある *E. major* と *E. equisetina* を学際的に検討した結果、*E. equisetina* のITS1領域のDNA塩基配列に1塩基の挿入があること、アルカロイド組成は類似していることを明らかにし、両者は同種内の亜種関係にあるものと判断した。

(4) 栽培研究による成果

①従来 *E. sinica* の栽培品では低いとされてきたエフェドリン系アルカロイド含量が、ワグネルポットに川砂で植え付け、16分の1に薄めた人工海水を灌水することにより、日本薬局方で規定する0.7%を超えるアルカロイド含量を示すことを明らかにした。本成果は、今後日本で日局品麻黄を栽培生産する際に応用できる技術であると高い評価を得た。

②アルカロイド含量や組成比が異なる雌株から採取した種子を播種して生長させた子株は、アルカロイド含量、組成比とも、親株の性質を受け継いでいた。このことは両形質は遺伝的要因にも影響を受けていることを示唆している。

③挿し木法により得たクローン株を用いた研究で、クローン株においても株間のアルカロイド含量に大きな変異があることが明らかになった。栽培土壌を変えるなどして研究した結果、これらの変異は株の生長度の違いに依るものと考えられた。

⑤栽培用土は市販のプランター用土における生長が最も良く、次いで、赤玉土、川砂などであった。これらの用土では根の生長が優れていた。一方、桐生砂、山砂などでは根の生長が悪く、その結果、地上部の生長も悪かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Ni.S-R, Matsumoto.M, Shimoyama.Y, Allain.N, Maksut Coskun.M, Yilmaz.T and Mikage.M : Anatomical, Chemical, and Molecular Genetic Studies of *Ephedra distachya* L., 査読有, *The Journal of Japanese Botany*, **88**(3), 164-175(2013).
<http://www.tsumura.co.jp/english/kampo/plant/top/index.html>
- ② Mikage.M, Nomura.Y, Mouri.C, Fushimi.N, Ide.T and Cai.S-Q : Salt Tolerance of *Ephedra sinica* Stapf in the Germination Period, 査読有, *The Japanese Journal of Medicinal Resources*, **34**(2), 1-6 (2012).
- ③ Mouri.C and Mikage.M : Field Study of *Ephedra* plants in southwestern USA : 査読無, *Newsletter of Himalayan Botany*, No.45, 7-15 (2012)
- ④ Kakiuchi.N, Mikage.M, Freitag.H (他 2 名, 2 番目) : A molecular phylogenetic study of the *Ephedra distachya* / *E. sinica* complex in Eurasia, 査読有, *Willdenowia*, **41**, 203-215 (2011). DOI: <http://dx.doi.org/10.3372/wi.41.41201>.
- ⑤ Hong.H, Chen.H-B, Yang.D-H, Shang.M-Y, Wang.X, Cai.S-Q & Mikage.M : Comparison of contents of five ephedrine alkaloids in three official origins of Ephedra Herb in China by high-performance liquid chromatography, 査読有, *Journal of Natural Medicine*, **65** (3-4), 623-628 (2011).DOI :10.1007/s11418-011-0528-8
- ⑥ Hamanaka.E, Ohkubo.K, Mikage.M and Kakiuchi.N : Molecular genetic characteristics of Nepalese *Ephedra* plants, 査読有, *The Journal of Japanese Botany*, **86**, 303-313 (2011). http://www.tsumura.co.jp/english/kampo/plant/086/086_05.html#p303
- ⑦ Wang.L-L, Kakiuchi.N, Mikage.M : Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 6. Geographical changes of anatomical features and alkaloids content of *Ephedra sinica*, 査読有, *Journal of Natural Medicine*, **64** (1), 63-69 (2010). DOI: 10.1007/s11418-009-0374-0
- ⑧ 御影雅幸 : 中国におけるマオウ属植物資源と栽培問題 : 査読有, 植物地理・分類研究, **58** 卷 1 号, 11-14 (2010),
- ⑨ Inoko.A, Kakiuchi.N, and Mikage.M (他

2 名, 5 番目) : *Ephedra* Resource in Sichuan and Yunnan Provinces 2007, 査読有, *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **32**(9), 1621-1623 (2009) .
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/32/9/32_9_1621/_pdf

- ⑩ Mikage.M, Hong.H and Cai.X-Q : Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 5. The herbivory damage to *Ephedra* plants by livestock, 査読有, *Journal of Traditional Medicine*, **25** (4), 108-111 (2008).
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110006991271>
- ⑪ Fushimi.N, Wang.L-L, Ebisui.S, Cai.S-Q and Mikage.M : Studies of *Ephedra* Plants in Asia. Part 4. Morphological differences between *Ephedra sinica* Stapf and *E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer, and the botanical origin of Ma-huang produced in the Province of Qinghai, 査読有, *Journal of Traditional Medicine*, **25** (3), 61-66 (2008).
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110006839033>

[学会発表] (計 26 件)

- ① 安藤広和, 松本昌士, 御影雅幸, Allain Nathalie, Coskun Maksut, Yilmaz Turgut : *Ephedra equisetina* 並びにその関連種の DNA 配列及びアルカロイド解析 : 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② Ni.S-R, Allain.N, Coskun.M, Yilmaz.T, Mikage.M : Studies of *Ephedra sinica* Stapf and it's allied plants : International Symposium of Medicinal Plant and Natural Product Research, Traditional and Modern Aspects, 2012 年 9 月 21 日, 国立モンゴル大学, (ウランバートル, モンゴル)
- ③ 垣内信子, 渥美聡孝, 大塚功, 御影雅幸, Freitag.H, Maria.M-S : アジア及び地中海沿岸地域に分布する *Ephedra gerardiana* および関連 *Ephedra* 属植物の系統解析 : 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月 18 日, かずさアカデミアホール (千葉市)
- ④ Mikage.M & Kakiuchi.N : Interdisciplinary study of *Ephedra* plants : 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2012 年 6 月 29 日, アンカラ大学 (アンカラ, トルコ)
- ⑤ 松本昌士, 下山祐依, 土田貴志, 御影雅幸 : 中国の野生及び市場品の麻黄中の ephedrine 系アルカロイド含量の評価 : 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 30

- 日, 北海道大学 (札幌市)
- ⑥ 御影雅幸, 下山祐依, 北岡文美代, 松本昌士, Allain.N: 地中海地方産の *Ephedra* 属植物の DNA 及び成分解析: 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日, 北海道大学 (札幌市)
- ⑦ 樋口真理, 田中沙織, 西川佳奈美, 上川翔平, 大塚功, 垣内信子, 御影雅幸, H.Freitag: ユーラシア大陸に自生する *Ephedra sinica* 関連マオウ属植物の DNA 解析と系統解析: 日本生薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月 25 日, 昭和大学 (東京都)
- ⑧ 御影雅幸, 野村行宏, 平山学, 佐々木陽平, 三宅克典: マオウ属植物の栽培研究: 日本植物園協会第 46 回大会, 2011 年 6 月 26 日, ブルーボネット (名古屋市)
- ⑨ 野村行宏, 平山学, 三宅克典, 佐々木陽平, 御影雅幸: *Ephedra* 属植物の草質茎による挿し木に関する研究: 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 31 日, 静岡県立大学 (静岡)
- ⑩ 下山祐依, 北岡文美代, 堂井美里, 御影雅幸: エジプト産 *Ephedra* 属植物の DNA 及び成分解析: 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 31 日, 静岡県立大学 (静岡)
- ⑪ 三宅克典, 河崎亮一, 御影雅幸: ネパール産 *Ephedra gerardiana* の標高に対するアルカロイド含量の変化: 2010 年 9 月 25 日, 徳島文理大学 (徳島市)
- ⑫ Mikage.M: Interdisciplinary study of *Ephedra* plants, Ma-hwang: 40th Annual Convention of Korean Society of Pharmacognosy: 2009 年 12 月 2 日, 文化会館 (ソウル)
- ⑬ 大富規弘, 大野剛史, 御影雅幸: 栽培条件が麻黄のアルカロイド含量に及ぼす影響: 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 28 日, 京都会館 (京都市)
- ⑭ 濱中絵美, 垣内信子, 御影雅幸, 大久保圭佑: ネパール産マオウ属植物の DNA 解析: 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 28 日, 京都会館 (京都市)
- ⑮ Kakiuchi.N, Mikage.M, Freitag.H, Search for resources of *E. sinica* and the related *Ephedra* plants: Asian Symposium for Pharmaceutical Sciences in JSPS Core Program, 2008 年 8 月 4 日, 上海中医薬大学 (上海)

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakusou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

御影 雅幸 (MIKAGE MASAYUKI)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号: 50115193

(2) 研究分担者

佐々木 陽平 (SASAKI YOUHEI)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号: 10366833

三宅 克典 (MIYAKE KATSUNORI)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号: 20597687

(3) 連携研究者

垣内 信子 (KAKIUCHI NOBUKO)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号: 30204324

(H20→H21): 研究分担者

大場 秀章 (OHBA HIDEAKI)

東京大学・総合研究博物館・名誉教授

研究者番号: 20004450

能城 修一 (NOSHIRO SHUICHI)

独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・チーム長

研究者番号: 30343792

高橋 晃 (TAKAHASHI AKIRA)

兵庫県立大学・自然環境科学研究所・教授

研究者番号: 30244693

池田 博 (IKEDA HIROSHI)

東京大学・総合研究博物館・准教授

研究者番号: 30299177

毛利 千香 (MOURI CHIKA)

スミソニアン協会・フリア美術館・研究員

研究者番号: 20345599