

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

DNA塩基配列とSNPsによる生薬基原植物の鑑別

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
筑波薬用植物栽培試験場
研究者 菱田 敦之

要旨

塩基配列情報に基づく生薬基原植物の鑑別方法を開発するために、形態的な識別が難しい 4 属 20 種 32 系統の植物を導入し、3 種の遺伝子領域について塩基配列を決定した。その結果、これらの遺伝子領域を用いることにより各属の種間識別ができることを明らかにした。

1. 研究の目的

日本で消費される生薬原料植物の 95%以上が輸入に依存している。生薬基原植物の鑑別は、現在おもに生薬の外部および内部形態の観察と含有成分の測定により行われている。しかし、これらの方法は、高度な技能と経験を要し、簡便・迅速・高精度に薬用植物を鑑別することは難しい。

その理由として、①栄養生長期の植物の形態的特徴からの鑑別が困難である場合、②同名の生薬にもかかわらず中国、韓国および日本の各国間でその基原植物が異なる場合が挙げられる。

一方、含有成分の面からみると、原料植物の大部分が野生品であることから、植物種の変異・生産地・生薬の調製方法等により成分含量に大きな変動があることが知られている。

これらの問題を解決するには、植物の生育環境や生育ステージ等に影響されない DNA 解析技術、特に、塩基配列情報に基づく生薬基原植物の鑑別方法が非常に有効であると考えられる。現在、薬用植物分野では、RAPD 法を用いた基原植物の識別方法が主に研究されているが、DNA の塩基配列情報に基づく鑑別方法に関する研究は少ない。そこで、本研究では先ず、塩基配列情報を生薬基原植物の鑑別方法に用いる。第二に、得られた塩基配列情報から一塩基多型 (SNPs) の検出による鑑別方法を開発する。この結果、簡便・迅速・高精度な鑑別方法の確立と遺伝子解析情報の収集に伴うデータベースの構築により、生薬原料となる植物の安全な供給が可能となる。

本年度の報告で取り扱った生薬基原植物は、次の通りである。

(1) 6 種のケシ属 *Papaver* sp. 植物 (9 系統)

ケシ *P. somniferum* は、その全草及び未熟果の乳液に、アヘンアルカロイドであるモルヒネ、コデイン及びパパベリンなどが含まれる。これらのアヘンアルカロイドは、麻薬や覚醒剤の原料となるため、日本国内においてケシは、「あへん法」及び「麻薬及び向精神薬取締法」に定める麻薬原料植物として、一般に輸入や栽培が禁止されている。同様の理由で、他のケシ属植物である *P. setigerum* 及びハカマオニゲシ *P. bracteatum* は、規制の対象となっている。一方、麻薬成分を含まないケシ属植物の園芸品オニゲシ *P. orientale*、*P. pseudo-orientale* 及びヒナゲシ *P. rhoeas* は、花色や形状が美しいことから、市場に多く流通している。先の法律で規制されているケシ属植物は、園芸品と誤って栽培される場合や、犯罪的に麻薬原料として輸入・栽培される場合があり、大きな社会問題となっている。ケシ属植物の鑑別は、特に栄養成長期において極めて難しく、確実かつ簡便な鑑別法の開発が望まれている。そこで、DNA 塩基配列に基づくケシ属植物の鑑別法を検討した。

(2) 6 種のタツナミソウ属 *Scutellaria* sp. 植物 (11 系統)

コガネバナ *S. baicalensis* は、第 14 改訂日本薬局方 (以下、局方) で定める生薬「黄ゴン」の基原植物として、その根を解熱、利尿、消炎及び止瀉に利用する。中国の雲南省及び四川省では、同属植物であ

る *S. amoena* が、薬用として栽培されている。国内では、園芸品種として同属植物と見られる Skullcap が市場に流通している。そこで、DNA 塩基配列に基づくタツナミソウ属植物の鑑別号を検討した。

(3) 3種のオモダカ属 *Alisma* sp. 植物 (7系統)

サジオモダカ *A. plantago-aquatica* var. *orientale* (= *A. orientale*) は、局方で定める生薬「沢瀉」の基原植物として、その根茎を利尿及び止瀉に利用する。ヨーロッパに分布する *A. plantago-aquatica* は、サジオモダカに形状が酷似していることから、日本産サジオモダカとの違いを DNA 塩基配列に基づく鑑別法で検討した。

(4) 5種のイノコズチ属 *Achyranthes* sp. 植物 (5系統)

日本産のヒナタイノコズチ *A. fauriei* 及び中国産の *A. bidenntata* は、局方で定める生薬「牛膝」の基原植物として、その根を浄血、利尿及び通経に利用する。野生品として市場に流通しているものには、希にヤナギイノコズチ *A. longifolia* が含まれることや、日本国内では、地上部の形状がよく似たヒカゲイノコズチ *A. japonica* が存在する。これらは、外見上非常に酷似していることから、DNA 塩基配列に基づくイノコズチ属植物の鑑別法を検討した。

2. 研究方法

2.1 材料

本報告で用いた植物とその導入先は、6種のケシ属植物が表1、6種のタツナミソウ属植物が表3、3種のオモダカ属植物が表5、5種のイノコズチ植物が表7にそれぞれ示した。各植物の生葉もしくは乾燥葉をDNAの抽出材料とした。

2.2 実験方法

DNAの抽出は、Edwardsら(1991)の方法を一部改変して実施した。塩基配列の決定は、以下の3領域を特異的に増幅するプライマーをそれぞれ用い、PCRにてこれらの領域を増幅した。増幅したDNA断片は、DNAシーケンサーで塩基配列を決定した。

- ① 葉緑体遺伝子 *rpl16* とそれに続く *rpl16-rpl14* 介在配列 (PSID-1) : 約 550bp
- ② 葉緑体遺伝子 *atpF* と *atpA* の間の介在配列 (PSID-2) : 約 350bp
- ③ 核のリボゾーム遺伝子 ITS1 と ITS2 (ITS1 : 約 250bp、ITS2 : 約 220bp)

3. 研究成果と考察

3.1 ケシ属植物 (表2)

rpl16 領域は、いずれの種でも 403bp、PS-ID1 領域は、*P. bracteatum*、*P. orientale* 及び *P. pseudo-orientale* では 127bp、*P. rhoeas* 及び *P. setigerum* 及び *P. somniferum* では 126bp であった。

各種間の塩基配列の違いは、*rpl16* 領域で 7ヶ所、PS-ID1 領域で 4ヶ所の合計 11ヶ所であった。従って、検討した 6種類のケシ属植物は、塩基配列の違いから鑑別できることを見いだした。

特に麻薬原料植物である *P. bracteatum* は、栄養生長期において *P. orientale* 及び *P. pseudo-orientale* との識別が難しいが、この方法を用いることでより容易で確実に鑑別できることが明らかになった。

Table 1. List of the species of *Papaver* used in this study.

| Species Accession number | Source | Country and Year of introduction |
|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>P. bracteatum</i> 14-95 | Hortus Centralis Cultura Herbarum Medicarum, Facultas Medica-Universitas Masarykiana | Czech Republic, 1995 |
| <i>P. orientale</i> 13-95 | Hortus Centralis Cultura Herbarum Medicarum, Facultas Medica-Universitas Masarykiana | Czech Republic, 1995 |
| <i>P. pseudo-orientale</i> 96-95 | Hortus Botanicus-Balchik | Bulgaria, 1995 |
| <i>P. rhoeas</i> Gifu | Gifu Pharmaceutical University | Japan |
| Kyoto | Kyoto Pharmaceutical University | Japan |
| <i>P. setigerum</i> 27 (pink) | NIHS, Tsukuba | Japan |
| 28 (vermillion) | NIHS, Tsukuba | Japan |
| <i>P. somniferum</i> Ikkansyu | NIHS, Tsukuba | Japan |
| Nanko 1 gou | NIHS, Tsukuba | Japan |

Table 2. Polymorphic nucleotide sites used in the phylogenetic analysis in *rpl 16*—PS-ID1 aligned sequences from 6 *Papaver* species. Numbers at the top of the column refer to the number of the base in the aligned sequences starting from the 5' end of the *rpl 16* region. Horizontal rows are nucleotides states from individual sequences.

| Species | <i>rpl 16</i> | | | | | | | PS-ID1 | | | |
|----------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|--------|---|---|---|
| | . | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | 5 | |
| | 4 | 5 | 9 | 3 | 4 | 5 | 8 | 2 | 5 | 8 | 2 |
| | 5 | 0 | 5 | 1 | 6 | 8 | 5 | 6 | 7 | 6 | 5 |
| <i>P. bracteatum</i> | A | T | - | T | G | T | T | T | - | T | A |
| <i>P. orientale</i> | A | T | - | G | G | C | A | G | G | T | - |
| <i>P. pseudo-orientale</i> | A | T | - | G | G | C | A | G | - | T | A |
| <i>P. rhoeas</i> | A | T | - | G | G | C | A | G | - | C | - |
| <i>P. setigerum</i> | - | C | T | G | A | C | A | G | - | C | - |
| <i>P. somniferum</i> | A | C | - | G | A | C | A | G | - | C | - |

3.2 タツナミソウ属植物 (表 4)

rpl16 領域は 403bp、PS-ID1 は 118bp と塩基配列を決定した。その結果、*rpl16* 領域で 5ヶ所、PS-ID1 領域で 5ヶ所の合計 10ヶ所で塩基が異なっていた。従って、検討した 6種のタツナミソウ属植物を塩基配列の違いから識別できることを見いだした。また、Skullcap という名で市販されていたハーブの一種は、塩基配列の結果から *S. lateriflora* であると鑑別した。

Table 3. List of the species of *Scutellaria* used in this study.

| Species | Source | Country and Year of introduction |
|-------------------------------|--|----------------------------------|
| Accession number | | |
| <i>S. altissima</i> | | |
| 110-97 | Botanischer Garten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (native) | Germany, 1997 |
| 263-97 | Botanischer Versuchs-und Lehrgarten der Universität Regensburg (cultivated) | Germany, 1997 |
| <i>S. baicalensis</i> | | |
| 480-79 | Tsukuba Medicinal Plant Research Station, National Institute of Health Sciences (cultivated) | Japan, 1979 |
| 408-96 | Chonlla, Nan-Do, Yoch' On (cultivated) | Korea, 1996 |
| <i>S. galericulata</i> | | |
| 262-97 | Botanischer Versuchs-und Lehrgarten der Universität Regensburg (cultivated) | Germany, 1997 |
| 266-96 | Botanical Garden, University of Turku (native) | Finland, 1996 |
| <i>S. incana</i> | | |
| 109-97 | Botanischer Garten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (native) | Germany, 1997 |
| <i>S. indica</i> | | |
| 86-97 | Botanischer Garten der Universität Potsdam (cultivated) | Germany, 1996 |
| <i>S. lateriflora</i> | | |
| 22-97 | Jardin Botanique de La Ville Dijon (cultivated) | France, 1997 |
| 252-97 | W.J. Beal Garden, Michigan State University (native) | U.S.A., 1997 |
| Skullcap | Good on the marker | Japan |

Table 4. Polymorphic nucleotide sites used in the phylogenetic analysis in *rpl 16*—PS-ID1 aligned sequences from 6 *Scutellaria* species and skullcap. Numbers at the top of the column refer to the number of the base in the aligned sequences starting from the 5' end of the *rpl 16* region. Horizontal rows are nucleotide states from individual sequences.

| Species | <i>rpl 16</i> | | | | | PS-ID1 | | | | | |
|-------------------------------|---------------|---|---|---|---|--------|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | | |
| | 2 | 0 | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 4 | 4 | 6 | 8 |
| | 8 | 3 | 1 | 4 | 9 | 0 | 0 | 3 | 9 | 4 | 8 |
| <i>S. altissima</i> | C | A | T | A | T | G | G | A | A | C | T |
| <i>S. baicalensis</i> | C | A | C | A | T | C | G | A | C | C | C |
| <i>S. galericulata</i> | C | A | T | A | T | G | A | G | C | A | C |
| <i>S. incana</i> | T | A | T | T | T | G | G | A | A | C | T |
| <i>S. indica</i> | C | A | T | A | T | G | A | G | - | A | C |
| <i>S. lateriflora</i> | C | G | T | A | G | G | A | G | C | A | C |
| Skullcap | C | G | T | A | G | G | A | G | C | A | C |

3.3 オモダカ属植物 (表 6)

rpl16 領域、PS-ID1 と PS-ID2 では塩基配列の違いを見出さなかったが、ITS1 と ITS2 領域で塩基の違いが見出された。その ITS1 領域は 258bp、ITS2 領域は 311bp であった。その結果、ITS1 領域では 1 ヶ所、ITS2 領域では 2 ヶ所塩基が異なっていた。従って、検討した 3 種のオモダカ属植物は、塩基配列の違いから鑑別できることを見いだした。

Table 5. List of the species of *Alisma* used in this study.

| Species | Source of introduction |
|--|-------------------------------|
| Accession number | |
| <i>A. plantago-aquatica</i> | |
| 228-99 | Soller, Spain* |
| 229-99 | Linden, the Netherlands* |
| 230-99 | Brandenburg, Germany* |
| <i>A. plantago-aquatica</i> var. <i>orientale</i> | |
| 231-99 | Akita, Japan* |
| 232-99 | Miyagi, Japan* |
| <i>A. canaliculatum</i> | |
| 233-99 | Tochigi, Japan* |
| 234-99 | Akita, Japan* |

*: These plants were presented by the Tokyo Medicinal Plant Garden in 1999.

Table 6. Polymorphic nucleotide sites used in the phylogenetic analysis in ITS1 and ITS2 aligned sequences from 3 *Alisma* species. Numbers at the top of the column refer to the number of the base in the aligned sequences starting from the 5' end of the ITS1 and ITS2 region. Horizontal rows are nucleotides states from individual sequences.

| Species | ITS1 | ITS2 |
|--|-------------|-------------|
| | | 1 |
| | 1 | 3 |
| | 4 | 4 |
| <i>A. plantago-aquatica</i> | T | C |
| <i>A. plantago-aquatica</i> var. <i>orientale</i> | C | C |
| <i>A. canaliculatum</i> | C | T |

3.4 イノコズチ植物 (表 8)

rpl16 領域は 359bp、PS-ID1 領域は 142bp と塩基配列を決定した。その結果、*rpl16* では、塩基配列の違いが観察されなかったが、PS-ID1 領域では、2ヶ所塩基が異なっていた。

PS-ID2 領域では、*A. fauriei* f. *rotundifolia* と *A. japonica* は、69bp、*A. fauriei* と *A. longifolia* は 70bp、*A. bidentata* は 71bp と塩基配列を決定した。この結果、PS-ID2 領域では、3ヶ所塩基が異なっていた。

これらの結果から、PS-ID2 領域を用いることにより 5 種のイノコズチ植物を塩基配列の違いから鑑別できることを見いだした。

Table 7. List of the species of *Achyranthes* used in this study.

| Species Accession number | Source | Country and Year of Introduction |
|---|-------------------|-------------------------------------|
| <i>A. bidentata</i> | | |
| 0607-79 | NIHS, Tsukuba | Japan |
| <i>A. fauriei</i> | | |
| 1247-80 | NIHS, Tsukuba | Japan |
| <i>A. fauriei</i> f. <i>rotundifolia</i> | | |
| 1537-84 | NIHS, Tsukuba | Japan |
| <i>A. japonica</i> | | |
| 593-00 | NIHS, Tanegashima | Japan, 2000 |
| <i>A. longifolia</i> | | |
| 594-00 | NIHS, Tsukuba | Japan, 2000 |

Table 8. Polymorphic nucleotide sites used in the phylogenetic analysis in *rpl 16*—PS-ID and PS-ID2 aligned sequences from 6 *Achyranthes* species. Numbers at the top of the column refer to the number of the base in the aligned sequences starting from the 5' end of the *rpl 16* region. Horizontal rows are nucleotides states from individual sequences.

| Species | PS-ID1 | | PS-ID2 | | |
|---|--------|---|--------|---|---|
| | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 |
| <i>A. bidentata</i> | T | A | A | A | A |
| <i>A. fauriei</i> | T | A | A | A | - |
| <i>A. fauriei</i> f. <i>rotundifolia</i> | A | A | C | - | - |
| <i>A. japonica</i> | T | C | A | - | - |
| <i>A. longifolia</i> | T | A | C | A | - |

4. まとめ

本報告では、塩基配列情報に基づく生薬基原植物の鑑別方法を開発するために 4 属 20 種の植物を導入し、3 種の遺伝子領域について塩基配列を決定した。その結果、これらの遺伝子領域を用いることにより外部形態からの同定が難しい各属の種間識別ができることを見いだした。

- ①6 種のケシ属植物は、PS-ID1 領域
- ②6 種のタツナミソウ属植物は、PS-ID1 領域
- ③3 種のオモダカ属植物（生薬名：タクシャ）は、ITS1 領域と ITS2 領域
- ④5 種のイノコズチ属植物（生薬名：ゴシツ）は、PS-ID2 領域

5. 研究発表

該当なし

6. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

該当なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社