

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3属16種17系統の植物を導入し、2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、主に生薬の外部及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、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や、植物種の変異、生育ステージ及び生育環境により成分含量に変動が見られ、さらに収穫した植物の調製加工法によっても成分含量は変動す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2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。

平成13年度の報告では、形態的な識別が難しいケシ属、タツナミソウ属、オモダカ属及びイノコズチ属の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。

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) 4種のウスバサイシン属 *Asiasarum* 植物 (5系統)

ウスバサイシン *A. sieboldii* は、根を主とし、根茎や葉を付けた全草を生薬「細辛」として用いる。漢方では、鎮咳、去痰、利尿、解熱、鎮痛薬とし、感冒や気管支炎などの処方に加えられる。中国産の細辛は、東北部に産するケイリンサイシン *A. heteropoides* var. *mandshurichicum* であり、朝鮮半島産では、ウスゲサイシン *A. heteropoides* var. *seoulense* がほとんどでウスバサイシンを起源とするのものは少ない。

また、日本には、ウスバサイシンによく似たオクエゾサイシン *A. heteropoides* が、本州北部、北海道に分布することから、これらのウスバサイシン属植物の葉緑体遺伝子に基づく鑑別法を検討した。

(2) 3種のシシウド属 *Angellica* 植物 (3系統)

トウキ *A. actiloba* は、根を湯通して乾燥させたものを生薬「当帰」と呼び、強壯、鎮静、鎮痛薬として、貧血症、腹痛薬、身体疼痛、月経不順、月経困難、月経痛その他婦人の更年期障害などに処方される。国内では、奈良県を中心にトウキが栽培されているが、トウキの品種改良種と言われているホッカイトウキ *A. actiloba* var. *sugiyamae* が北海道を中心に栽培されている。日本には、トウキの近縁種であるミヤマトウキ *A. actiloba* var. *iwatensis* が野生種として本州から北海道に分布している。これらの3種は、形態的に区別が難しいことから、葉緑体遺伝子に基づく鑑別法を検討した。

(3) 9種のマオウ属 *Ephedra* 植物 (9系統)

マオウには、形態上よく似たシナマオウ *E. sinica*、フタマタマオウ *E. distachya* 及びキダチマオウ *E. equisetina* があり、いずれも中国が原産である。マオウは生薬「麻黄」と呼び、漢方では、草質茎を鎮咳、発汗、解熱、消炎薬として葛根湯、麻黄湯、小青竜湯、麻杏甘石湯など多くの処方に加えられる。麻黄はその大半を輸入品に依存し、形態上の識別が非常に困難であることから、生薬基原植物以外のマオウ属植物が輸入品に混入する可能性が考えられる。そこで、これら3種に近縁種である *E. altissima*、*E. fragilis*、*E. gerardiana*、*E. procera*、*E. procera* var. *erythrocarpa* 及び *E. regerianan* を加えた9種のマオウ属植物について葉緑体遺伝子に基づく鑑別法を検討した。

2. 研究方法

2.1 材料

本報告で用いた植物は、4種5系統のウスバサイシン属植物、3種のシシウド属植物、9種のマオウ属植物を導入し供試材料とした。各植物の生薬もしくは乾燥薬を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2領域を特異的に増幅するプライマーをそれぞれ用い、PCR法で増幅した。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 緑体遺伝子 *rpl16* とそれに続く *rpl16-rpl14* 介在配列：約 550bp
- ② 葉緑体遺伝子 *atpF* と *atpA* の介在配列：約 50~60bp

3. 研究成果と考察

3.1 ウスバサイシン属植物

rpl16 領域は、検討した4種共に 359bp、*rpl16-rpl14* 介在配列領域は、*A. sieboldii* が 129bp、*A. heterotropoides*、*A. heterotropoides* var. *seoulense* 及び *A. heterotropoides* var. *mandshuricum* が 128bp であった。

各種間の塩基配列の違いは、*rpl16* 領域が3ヶ所、*rpl16-rpl14* 介在配列領域が1ヶ所の合計4ヶ所であった。従って、検討した4種類のウスバサイシン属植物は、*rpl16* 及び *rpl16-rpl14* 介在配列領域の塩基配列の違いから鑑別できることを明らかにした。

3.2 シシウド属植物

*rpl16*及び*rpl16-rpl14*介在配列領域の塩基配列を検討した結果、いずれの種において*rpl16*領域は359bp、*rpl16-rpl14*介在配列領域は104bpであり、塩基配列は共通であった。*atpF-atpA*介在配列は、*A. actiloba*が56bp、*A. actiloba* var. *sugiyama*は54bp及び*A. actiloba* var. *iwatensis*は55bpであり、3ヶ所で塩基の配列が異なっていた。従って、検討した3種のシシウド属植物は、塩基配列の違いから鑑別できることを明らかにした。

3.3 マオウ属植物

*rpl16*及び*rpl16-rpl14*介在配列領域の塩基配列を検討した結果、各種共に*rpl16*領域が356bp、*rpl16-rpl14*介在配列領域が75bpであった。決定したこの塩基領域では、*rpl16*領域が3ヶ所、*rpl16-rpl14*介在配列領域が1ヶ所の合計4ヶ所で塩基が異なり、*E. sinica*、*E. distachya*及び*E. equsetina*は区別できることが示された。さらに、検討した9種を同時に比較した場合、次の4グループに分けることができた。

- (1) *E. sinica*、*E. procera*及び*E. procera* var. *erythrocarpa*
- (2) *E. distachya*、*E. gerardiana*及び*E. regeriana*
- (3) *E. equsetina*及び*E. gerardiana*及び*E. fragilis*
- (4) *E. altissima*

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3属16種17系統の植物を導入し、2種の遺伝子領域について塩基配列を決定した。その結果、以下に示す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ウスバサイシン属及びシシウド属植物は種間識別ができることを明らかにした。マオウ属植物では*E. sinica*、*E. distachya*及び*E. equsetina*は区別できることが示され、検討した9種のマオウ属植物は4グループに分類できることを見出した。

- ① 4種のウスバサイシン属植物は、*rpl16*領域と*rpl16-rpl16*介在配列領域
- ② 3種のシシウド属植物は、*atpF-atpA*介在配列領域
- ③ 9種のマオウ属植物は、*rpl16*領域と*rpl16-rpl14*介在配列領域

5. 研究発表

誌上発表

K. HOSOLAWA, T. SHIBATA, I. NAKAMURA and A. HISHIDA: Discrimination of *Papaver* species based on plastid gene *rpl16* and *rpl16-rpl14* spacer Sequence, *Forensic Science International* (In communication).

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

遺伝子登録

本研究で決定した以下に示すケシ属植物の *rpl16* 及び *rpl16-rpl14* 介在配列領域は、DDBJ、EMBL 及び GenBank の遺伝子データベースに登録した (平成 14 年 11 月 26 日受理)。

(1) *Papaver bracteatum* (AB096920)

(2) *P. orientale* (AB096921)

(3) *P. pseudo-orientale* (AB096922)

(4) *P. rhoeas* (AB096923)

(5) *P. setigerum* (AB096924)

(6) *P. somniferum* (AB096925)

※ 植物名に続く () 内の番号は登録番号