

作成した分子系統樹を図 4 に示した。 *L. williamsii* から 4 つの遺伝子型、 *L. williamsii* var. *decipiens* からは 3 つ、 *L. diffusa* からは 4 つ、 *L. diffusa* var. *koehresii* からは 2 つの遺伝子型が見いだされた。また、系統樹解析では、今回の研究で見いだされた 13 個の遺伝子型は、5 つのクラスターに分類された。

#### D. 考察

今回、サブクローニングを行った 11 個体のうち、T-43 及び T-49 は、全クローンが同一の塩基配列を示したことから、これらの試料は、戻し交配の繰り返しなどにより、GBSSI 遺伝子に関して純系であると考えられた。T-43 は、昨年度の本研究において、*trnL* intron 領域の塩基配列から、*L. williamsii* と鑑別されながら、1 の含有が認められなかった個体である。すなわち、この個体は、1 の生合成酵素遺伝子のいずれかが欠落、欠損あるいは、未発現であることを示している。*L. williamsii* と鑑別された 9 個体のうち、T-43 のみが、GBSSI 遺伝子において他と異なる遺伝子型を示していることは興味深い。*L. williamsii* で見いだされた GBSSI 遺伝子型のうち、T-43 の遺伝子型 (*L. williamsii* type 4) 以外の 3 つの遺伝子型のいずれかが 1 の含有を示すマーカーとして機能する可能性があると考えられる。この点については、*trnL* intron 領域において、*L. williamsii* 型の塩基配列を示しながら 1 を含有しない個体の例数を増やし、慎重に確認する必要がある。

分子系統解析の結果、各遺伝子型は、基原植物に無相関に 5 つのクラスターに分かれた。従って、今回、解析を行った GBSSI 領域の塩基配列から基原植物を鑑別する事は困難であ

ると思われた。しかしながら、GBSSI 領域の各遺伝子型は、*Lophophora* 属植物の多くで、単一個体内に複数存在し、その組み合わせは、同一基原種であっても、品種により異なっていた。従って、昨年度の本研究で検討を行った *trnL* intron 領域の microsatellite 領域の塩基配列と組み合わせる事で、GBSSI 領域の塩基配列は、*Lophophora* 属植物の個体分類に有用であると思われた。

このことは、*Lophophora* 属植物を用いた薬物事犯が生じた際に、事故品のトレーサビリティ（追跡可能性）を高めることにより、裁判化学に貢献しうる知見である。

#### E. 結論

*Lophophora* 属植物の核 DNA 上の GBSSI 領域の塩基配列解析を行った結果、動植物の基原種鑑別には、昨年度、検討を行った葉緑体 DNA の *trnL-F* 領域の塩基配列がより適していると考えられた。しかし、GBSSI 領域の塩基配列は、今回調査を行った試料の多くで、単一個体内に複数の遺伝子型を有し、その遺伝子型の組み合わせが多岐に渡っていた。このため、GBSSI 領域の塩基配列は、*Lophophora* 属植物を用いた薬物事犯が発生した場合、事故品のトレーサビリティ（追跡可能性）を高める目的に効力を発揮すると考えられる。また、GBSSI 領域の塩基配列は、1 の含有と相関する可能性を示唆する結果を得た。

#### F. 研究発表

1. 学会発表  
無し
2. 論文発表  
無し

G. 知的財産権の出願・登録状況  
無し

参考文献

- 1) Sasaki Y., Fujimoto T., Aragane M., Yasuda I., Nagumo S., Rapid and sensitive detection of *Lophophora williamsii* by loop-mediated isothermal amplification, *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 887-891 (2009).
- 2) 合田幸広, 丸山卓郎, 幻覚性サボテンの基原種と mescaline の有無について, 厚生労働科学研究費補助金, 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「乱用薬物の分析・同定に関する研究」, 平成 20 年度研究報告書, pp. 75-82 (2009).

- 3) Mason-Gamer R. J., Weil C. F., Kellogg E. A., Granule-bound starch synthase: Structure, function, and phylogenetic utility, *Mol. Biol. Evol.*, **15**, 1658-1673 (1998).
- 4) Peralta I. E., Spooner D. M., Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [MILL.] WETTST. Subsection *Lycopersicon*), *Am. J. Bot.*, **88**, 1888-1902 (2001).

表1 本研究で使用された *Lophophora* 属植物

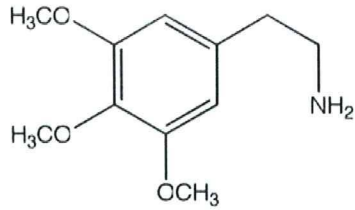
種子島導入番号	カタログ植物番号	学名	品種名	trnL-F genotype	microsatellite region
T41	26	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> new type	(AT)11
T42	28	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	テキサーナ	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10
T43	29	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	ペンタゴナ	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10
T44	30	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	子吹鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10
T45	31	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	中型鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10
T46	32	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	刺鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10
<b>T47</b>	<b>33</b>	<b><i>Lophophora fricii</i> Haberm.</b>	<b>銀冠玉</b>	<b><i>L. diffusa</i></b>	<b>(AT)8</b>
T48	35	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	銀冠錦(上斑)	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	(AT)5+9
T49	36	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	疣銀冠玉	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	(AT)5+9
T50	37	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	翠冠玉	<i>L. diffusa</i>	(AT)8
T51	39	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	翠冠錦(並斑)	<i>L. diffusa</i>	(AT)8
T52	40	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo var. <i>koehresii</i> Riha	コエルシー	<i>L. diffusa</i> var. <i>koehresii</i>	(AT)6
T53	41	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	翠冠玉翁	<i>L. diffusa</i>	(AT)8
T54	42	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	翠冠玉吹上	<i>L. diffusa</i>	(AT)8
T55	43	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	子吹鳥ウバ錦(並斑)	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10
T56	44	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	仔吹銀冠	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	(AT)5+9
T57	45	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	銀冠モンスター	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i> new type	(AT)5+8
T58	47	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	グリーン翠冠玉	<i>L. diffusa</i>	(AT)8
T59	48	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	銀冠仔吹モンスター	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i> new type	(AT)5+8
T60	49	<i>Lophophora williamsii</i> J.M.Coult.	赤花鳥羽玉	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10
T61	50	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	富岡翠冠玉	<i>L. diffusa</i> new type	(AT)9
T62	51	<i>Lophophora fricii</i> Haberm.	仔吹銀冠モンスター	<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	(AT)5+9
T63	52	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	グリーンスイカン	<i>L. diffusa</i>	(AT)8
T64	53	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	小池デフーサ	<i>L. diffusa</i>	(AT)8
T65	54	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	ウルトラデフーサ	<i>L. diffusa</i>	(AT)8
T66	55	<i>Lophophora diffusa</i> (Croizat) Bravo	大毛デフーサ	<i>L. diffusa</i> new type	(AT)9
T67	56	<i>Lophophora jourdaniana</i>	ヨーベルニアナドイツタイプ	<i>L. williamsii</i> -1	(AT)10

表2 ダイレクトシーケンスによる GBSI 塩基配列の大別

Species*1	sequence type	classified sample*2
<i>L. williamsii</i>	a	<u>T-41</u> , -42, -44, -45, -46, -55, -60, -67
	b	<u>T-43</u>
<i>L. williamsii</i> var. <i>decipiens</i>	a	T-48, <u>-49</u>
	b	<u>T-56</u> , -59
	c	<u>T-57</u>
	d	<u>T-62</u>
<i>L. diffusa</i>	a	<u>T-47</u> , -50, -61, -65
	b	<u>T-51</u>
	c	<u>T-53</u> , -54, -58, -63
	d	<u>T-64</u>
<i>L. diffusa</i> var. <i>koehresii</i>		<u>T-52</u>

\*1: speculated from their trnL-F sequence

\*2: the samples applied to subcloning were underlined



mescaline (1)

図1 メスカリンの構造

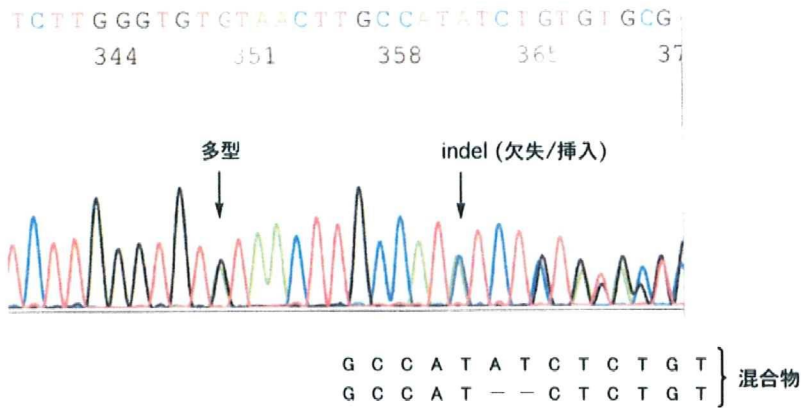


図2 ダイレクトシーケンスの生データ

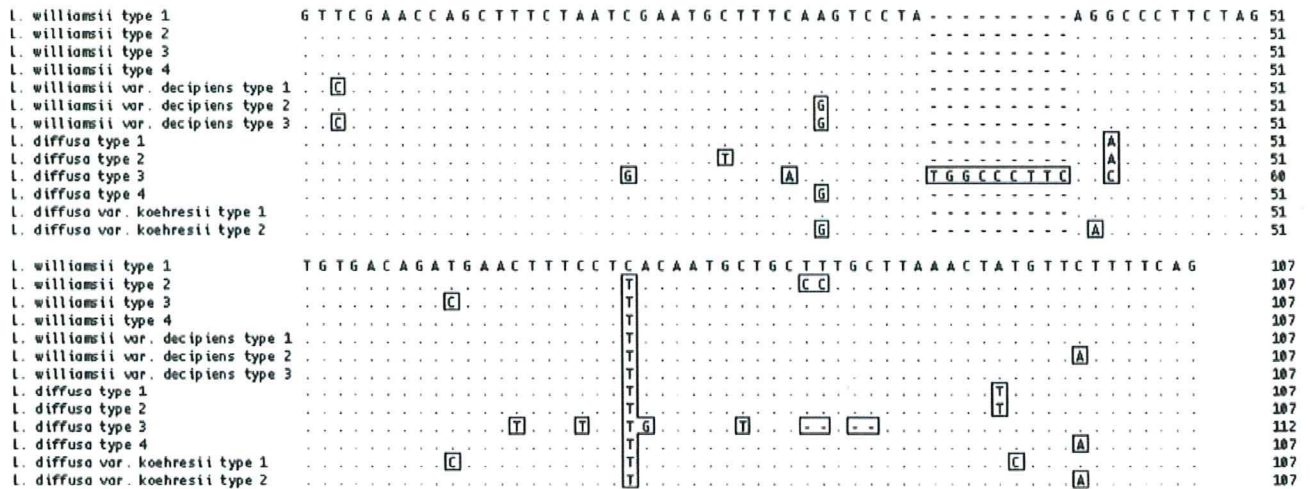


図3 *Lophophora* 属植物で認められた GBSSI, intron 4 領域の各遺伝子型

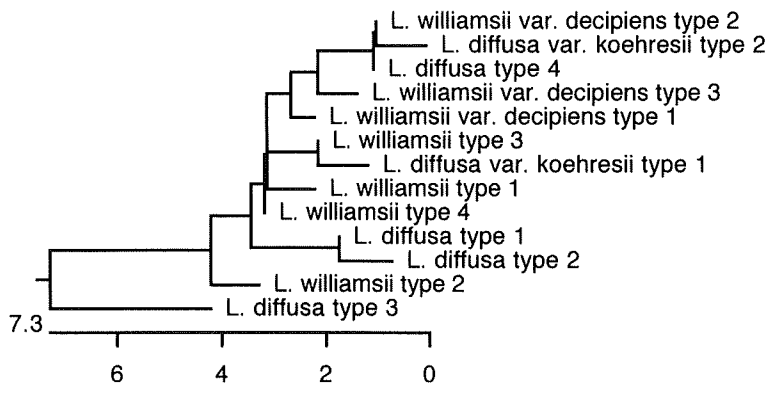


図4 *Lophophora* 属植物の GBSSI, intron 4 領域の各遺伝子型の分子系統樹

## 分担研究課題 薬物の分析と同定に関する研究

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

協力研究者 河野徳昭（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部研究員

### 遺伝子情報を利用したケシ属植物の識別法に関する研究

**研究要旨** ケシ属植物は、類似した形態を有し、栄養繁殖期における識別には経験を要する。本研究においては、ケシ属植物のアルカロイド生産に関わる二次代謝酵素遺伝子の鍵酵素のひとつと推定される (*S*)-3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine-4'-*O*-methyltransferase (4'OMT)のゲノムDNA部分配列(4'OMTg)の情報を集積し、種間、系統間における塩基配列の相違点を見出し、それらの多型情報による植物種、系統の同定が可能か否かを検討するとともに、迅速かつ簡便な判別法の確立について検討した。ケシ、アツミゲシ、ヒナゲシの3植物種について4'OMTgの塩基配列情報を集積し、ヒナゲシとアツミゲシ、また、ケシとアツミゲシのPCR法による識別についてそれぞれ検討したところ、いずれの場合も、両植物の識別に成功した。以上のように、二次代謝酵素遺伝子4'OMTgの多型情報は、ケシ属植物の遺伝子識別に有用であることが示された。

#### A. 研究目的

ケシ属植物は種間で類似した形態を有し、とくに、栄養繁殖期における識別には経験を要する。本研究においては、遺伝子レベルでのケシ属植物各種の判別に利用可能なゲノムDNA配列の相違点を見出し、迅速かつ簡便な判別法の確立を目的とする。本研究の成果として、ケシ属植物の簡便な判別法が確立されれば麻薬植物の監視行政への多大な貢献が期待される。また、本研究においては、植物種の判別法として、植物をはじめとする生物全般に普遍的に存在する遺伝子、たとえば、核リボソームDNAのITS領域、葉緑体DNAの*trnK*遺伝子、*matK*遺伝子、*rbcL*遺伝子の塩基配列の変異（多型）を進化遺伝学的に解析し、分類するという手法を用いるのではなく、有用物質生産に関わる二次代謝酵素遺伝子群のうち、

とくに鍵酵素と予想される反応段階に関わる酵素遺伝子について、塩基配列の種間、系統間変異のデータを集積し、それらの多型情報による植物種、系統の同定が可能か否かを検討する。本手法により、遺伝子レベルの情報と、薬用植物の品質の主体である有用物質の組成、含有量との相関について直接的な議論が可能になると考えられ、他の薬用植物等への応用や有用物質高生産株の育種マーカーとしての利用も期待され、その意義は大きい。本報告では、二次代謝酵素遺伝子4'OMTgの多型情報が、ケシ属植物の遺伝子識別に有用であることを示すため、ヒナゲシとアツミゲシの簡便な識別法開発について、また、これまで葉緑体DNA等の多型情報を用いた手法では困難であった、ケシとアツミゲシの識別について報告する。

## B. 研究方法

### 4'OMT遺伝子ゲノムDNA配列によるケシ属植物種判別

4'OMTは、モルヒネ、パパベリン、サンギナリンといった、レチクリンを生合成中間体とする経路によって生合成される、ベンジルイソキノリンアルカロイドを生産するオウレン属やケシ属植物に特徴的な二次代謝鍵酵素のひとつである(図1)。本研究において植物種判別のために解析の対象として考えられるケシ属植物は、その生産する化合物から、4'OMTを共通に発現していると考えられ、その遺伝子構造の多型による植物種の判別が可能と予想された。

また、これまでの知見から、ケシ *Papaver somniferum* L. のゲノムDNA上の4'OMTのORFにはイントロンが1ヶ所のみ存在することが明らかになっているが、高等植物の二次代謝に関わる酵素遺伝子においては、そのゲノム構造(エキソンに挿入されるイントロンの位置)は植物種を越えてよく保存されている傾向があることが知られており、4'OMTのゲノム構造もケシ属植物間で保存されていると考えられる(図2)。そこで、本研究においては、タンパク質をコードしないため、とくに種間変異に富むと期待されるイントロン配列を含む4'OMTゲノムDNA部分配列(以下、4'OMTg)をPCRにより増幅・クローニングし、塩基配列解析及び、多型データの集積を行い、植物種判別に利用可能か否かを検討することとした。

#### 本研究で解析対象としたケシ属植物

本研究で遺伝子解析等に供したケシ属植物は下記のとおり。[学名、和名、「系統名」、(実験コード)の順。]

*P. somniferum* L. ケシ「一貫種」(PsIK1, PsIK2, PsIK)

*P. somniferum* L. ケシ「作東町」(Ps作東)

*P. somniferum* L. ケシ「インド6」(PsIndia6)

*P. somniferum* L. ケシ「フランス」(PsFrance)

*P. somniferum* L. ケシ「オーストラリア産」(PsMY)

*P. setigerum* DC. アツミゲシ「27 セチゲルムピンク」(27ピンク)

*P. setigerum* DC. アツミゲシ「28 セチゲルム朱」(28朱)

*P. setigerum* DC. アツミゲシ「190-00」(190-00)

*P. rhoeas* L. ヒナゲシ「岐阜」(PrGifu)

*P. rhoeas* L. ヒナゲシ「京都」(PrKyoto)

*P. rhoeas* L. ヒナゲシ「サカタシャーレーポピー」(PrSaka)

新鮮葉からのゲノムDNA調製には、(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部圃場で栽培(2008年春蒔きまたは2009年春蒔き)したもの、及び試験管培養物または温室内で栽培したものを材料とした。また、FTAカードを用いた試料採取には、同圃場栽培(2009年春蒔き)のアツミゲシ(28朱)及びヒナゲシ(PrGifu)を用いた。

#### ゲノムDNAの調製

ゲノムDNAの調製にはDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を使用した。新鮮葉約100 mgを、2 ml 容アシストチューブに径4.8 mmステンレスボール2個及びキットのAP1バッファー500 µlを入れ、破砕機MS-100 (TOMY)で4,500 rpm、1分間、2回粉砕を行い、以後キットのプロトコルに従い調製した。

#### ケシ属植物4'OMTgのクローニング

塩基配列が未知のケシ属植物から4'OMTgをクローニングするため、縮重入りプライマーを用いたdegenerate PCRを適用した。ケシ及び、同じくベンジルイソキノリンアルカロイドを生産するセリバオウレン *Coptis japonica*、キバナカラマツソウ *Thalictrum flavum* 由来の4'OMTおよび6OMT (norcoclaurine 6-O-methyl-

transferase)の各アミノ酸配列のアラインメントから、高度保存領域について縮重入りプライマーをセンス、アンチセンス方向各2組(1st PCR: 4'OMTdeg-S1 + 4'OMTdeg-A1, 2nd PCR: 4'OMTdeg-S2 + 4'OMTdeg-A2)設計し、ゲノムDNAを鋳型としてnested PCRに用いた(図2)。PCR条件は下記のとおりである。

(1st PCR) PCR reaction mixture: ddH<sub>2</sub>O 78.5 µl, 10 x ExTaq Buffer 10 µl, dNTP mix 8 µl, primer sense & antisense (100 µM) 1 µl each, genome DNA 1 µl (reaction volume: 100 µl)

PCR condition: 94°C 5 min. → (94°C 1 min. → 42°C 2 min. → 72°C 3 min.) x 30 → 72°C 10 min. → 4°C ∞, GeneAmp 2400 (PE)

(2nd PCR) PCR reaction mixture: ddH<sub>2</sub>O 78.5 µl, 10 x ExTaq Buffer 10 µl, dNTP mix 8 µl, primer sense & antisense (100 µM) 1 µl each, first PCR product without primers 1 µl (reaction volume: 100 µl)

PCR condition: 94°C 5 min. → (94°C 1 min. → 48°C 2 min. → 72°C 3 min.) x 30 → 72°C 10 min. → 4°C ∞, GeneAmp 2400 (PE)

### イントロン領域を含むゲノムDNAの塩基配列解析

上述の縮重入りプライマーを用い、各植物から抽出したゲノムDNAを鋳型にnested PCRを行い、イントロンを含むゲノムDNAの約0.2-0.4 kbpの増幅産物を得た。得られた増幅産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、シーケンシングベクターpT7Blue T-vector (Novagen)にクローニングし、コロニーとして単離したのち各植物個体につき8-16クローンについて塩基配列解析を行った。なお、PCR増幅で複数のバンドの増幅産物が得られたものについては各バンドを個別に精製、クローニング、塩基配列解析を行った。

### 塩基配列の系統樹解析

各試料より得られた塩基配列のアラインメント作成及び系統樹解析は、DNASIS Ver.3.7 (Hitachi Software)を使用しHiggins methodにより行った。

### ヒナゲシとアツミゲシの遺伝子識別

ヒナゲシとアツミゲシ各植物由来4'OMTg各1クローンの塩基配列の相違点から設計した両植物の識別用プライマーセット(アツミゲシ特異的プライマーセット: Pseti-21S+ Pseti-21A、ヒナゲシ特異的プライマーセット: Pr4OMT-21S+ Pr4OMT-21A)を設計し、これらのプライマーを用い、下記のPCR条件で両植物のPCR識別が可能かを検討した。

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix (2 x) 3 µl, primer sense & antisense (10 µM) 1 µl each, genome DNA from fresh leaf 1 µl (reaction volume: 6 µl)

PCR condition: 94°C 5 min. → (94°C 30 sec. → 58°C 30 sec. → 72°C 1 min.) x 30 → 72°C 10 min. → 4°C ∞, GeneAmp 2400 (PE)

### FTAカード、Ampdirect Plusを使用したヒナゲシ、アツミゲシの簡易識別

Whatman社製FTA® Plant Card (FTAプラントセーバーカード、以下FTAカード)と、PCR反応を阻害する挟雑物の影響に耐性が高いとされるPCR用バッファーAmpdirect Plus (島津製作所)及びPCRポリメラーゼNova Taq Hot Start DNA Polymerase (EMD Biosciences)を合わせて使用し、ヒナゲシとアツミゲシの迅速かつ簡便な識別が可能かを検討した。

FTAカードはWhatman社の取扱説明書に示された使用方法に準拠し使用した。まず、FTAカードの表紙(カード1枚4サンプル区画)にサンプルIDを記録し、FTAカードを付属のカッティングマットに乗せた。各植物より収穫した植物試料(新鮮葉)を葉の表面(上面)を上にしてカ



ードに配置し、その上にサランラップを2枚重ねにしてサンプルにかぶせ、丸底のコーニングチューブの底を使いFTAカードの試料位置の中心に押しつけるようにしてすり潰した(サランラップは1サンプルごとに廃棄、交換。)最後にカードを自然に乾燥させた。以上の操作で、抽出された核酸がFTAカードに吸着し、安定に保存される。

上述のヒナゲシ、アツミゲシ識別用プライマーセットで両植物のPCR識別が可能であることを確認したのち、FTAカード吸着DNAを鋳型としたPCRを行った。

植物のホモジネートがよく乾燥したFTAカードを、清拭したメスを用い、ホモジネートの緑色の部分を1 mm角に切り出した。この切片をPCR反応チューブに入れ、下記のPCR反応液を加えピペッターでよく混和したのちPCRを開始した。

PCR反応液組成 (10サンプル用マスターミックス) : ddH<sub>2</sub>O 79 µl, 2x Ampdirect Plus 100 µl, NovaTaq Hot Start DNA Polymerase 1 µl, primer sense & antisense (10 µM) 10 µl each, Total 200 µl to 20 µl x 10 aliquots (reaction volume: 20 µl)

PCR conditions: 95°C 10 min. → (94°C 30 sec. → 58°C 1 min. → 72°C 1 min.) x 40 → 72°C 7 min. → 4°C ∞, GeneAmp2400 (PE)

PCR primers: 上記のヒナゲシ、アツミゲシ識別用プライマーセットを使用。

PCR反応液20 µlのうち5 µlをアガロースゲル電気泳動 (1.0% アガロースゲル) による解析に供した。

#### ケシとアツミゲシの遺伝子識別

アツミゲシは *Papaver somniferum* L. subsp. *setigerum* (DC.) Arcang. とする分類法もあり、ケシとは非常に近縁な植物であると考えられる。また、両植物の葉緑体DNA、*rpl16*及び*rpl16-rpl14*スペーサー領域の遺伝子配列は同一であり、これらの領域での識別は不可能であった<sup>1)</sup>。

本研究では、アツミゲシに認められ、ケシの4'OMTg標準クローン分類に当てはまらない塩基配列を有するクローン (遺伝子コード#2-5, 134-10r) と、ケシ及びその他アツミゲシ由来の4'OMTg群の塩基配列とをアラインメント解析により比較し、#2-5または134-10rにそれぞれ特異的なプライマーセット(2-5-S + 2-5-A, 134-10r-S1 + 134-10r-A, 134-10r-S2 + 134-10r-A)を設計した。これらの、プライマーセットを用い、ケシ、アツミゲシのゲノムDNAを鋳型にPCRを行い、アツミゲシのみで増幅産物が得られるか、すなわち、両植物の識別が可能か検討した。PCR条件等は下記のとおり。

Primer set: *P. setigerum* specific primer 2-5-S + 2-5-A, 134-10r-S1 or S2 + 134-10r-A

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix (2 x) 3 µl, primer sense & antisense (10 µM) 1 µl each, genome DNA 1 µl (reaction volume: 6 µl)

PCR condition: 94°C 5 min. → (94°C 30 sec. → 58°C 30 sec. → 72°C 1 min.) x 30 → 72°C 10 min. → 4°C ∞, GeneAmp 2400 (PE)

#### C. 研究結果

##### ケシ属植物由来4'OMTgの多型解析

ベンジルイソキノリンアルカロイド生産植物由来4'OMTアミノ酸配列の高度保存領域から設計した縮重入りプライマーを用い、各ケシ属植物試料について4'OMTgの増幅を行った。増幅の例として、アツミゲシ(27ピンク)を材料としたnested PCRの1段階目(1st PCR)、そして2段階目(2nd PCR)の結果を図3に示す。PCR増幅産物を精製し、クローニングしたのち塩基配列を解析したところ、イントロンの位置は各植物種においてよく保存されていることが明らかになった。

4'OMTgの塩基配列について分子系統樹解析を行うと、ひとつの植物種由来の

4'OMTgが異なる複数のクレードに細かく分かれ、かつ、異なる植物種由来の4'OMTgのクレードが系統樹上で近接した位置にあるという、複雑な分子系統樹を形成することが明らかになった。

#### ヒナゲシとアツミゲシの遺伝子識別

得られた、ヒナゲシとアツミゲシ由来の4'OMTgクローンの塩基配列情報を詳細に解析すると、両植物種の識別に利用可能と考えられる塩基配列の相違点が見出された。そこで、各植物種由来のクローンに特異的にアニールするプライマーを設計し、両植物のPCR識別を試みた。その結果、図4のようにアツミゲシ特異的なプライマーではアツミゲシ(27ピンク)より抽出したゲノムDNAを鋳型としたときのみ、また、ヒナゲシ特異的なプライマーではヒナゲシ(PrSaka、PrKyoto)より抽出したゲノムDNAを鋳型としたときのみ、増幅産物を与え、すなわち、PCR法による識別が可能であった。

#### FTAカード、Ampdirect Plusを使用したヒナゲシ、アツミゲシの簡易識別

ヒナゲシ、アツミゲシ各植物より採集した新鮮葉をFTAカード上ですり潰し、抽出物をカードに吸収させ、乾燥させた(図5)。このカード切片に吸着したゲノムDNAを鋳型とし、ヒナゲシ、アツミゲシそれぞれの4'OMTg遺伝子配列に特異的なプライマーを用いPCRを行ったところ、ヒナゲシ特異的なプライマーセットではヒナゲシの特異的な識別はできなかったが、アツミゲシ特異的なプライマーセットでは、アツミゲシを鋳型とした場合のみに特異的な増幅産物を与え(図6)、両植物の識別が可能であることが示された。

なお、ここで用いたアツミゲシ特異的なプライマーの塩基配列は、その後の遺伝子情報の集積によりケシにも存在することが明らかになった。すなわち、本手法により、栽培規制対象であるアツミゲシ

及びケシを、一般栽培可能なヒナゲシと識別することが可能となった。

#### ケシとアツミゲシの遺伝子判別

ケシ、アツミゲシの4'OMTg遺伝子は、クローニングされた分子種の塩基配列のタイプから、ケシゲノムDNAには少なくとも8種以上の4'OMTg分子種が存在すると考えられる。これらの分子種がすべて機能を有する4'OMTとして発現しているかは不明であるが、ゲノムDNA上の相同遺伝子種の多さが、両植物に特異的(特徴的)な塩基配列の抽出、遺伝子識別を困難にしている。

ケシ、アツミゲシについて4'OMTgの配列情報を集積し、ケシ(一貫種)由来の4'OMTgのクローンをその塩基配列により詳細に分類したところ、type Iからtype VIIIの8種にタイプ別に分類された(表1)。作東(Ps作東)系統やインド6(PsIndia6)系統由来のクローンをこの分類に当てはめると、いずれも、いずれかのtypeに分類され、これらの「標準分子種」はケシに存在する4'OMTgをほぼ網羅しているものと考えられた。アツミゲシ由来のクローンをこのタイプ分けに従い分類したところ、28朱、27ピンク、そしてドイツより導入した190-00の2系統より得られた4'OMTgのクローンの一部が、ケシの4'OMTg標準クローン分類にあてはまらない塩基配列を有することが明らかになった(表2、図7)。そこで、これらのクローンの一部(遺伝子コード#2-5, 134-10r)とケシ及びその他アツミゲシ由来の4'OMTg群の塩基配列とをアラインメント解析により比較し、クローン#2-5, 134-10rそれぞれに特異的なプライマーセットを設計した。これらのプライマーセットを用い、ケシ、アツミゲシのゲノムDNAを鋳型にPCRを行い、アツミゲシのみで増幅産物が得られるか、すなわち、両植物の識別が可能か検討した。その結果、#2-5特異的なプライマーセッ

トではケシ及びアツミゲシ両者を鋳型とした場合とも、増幅産物は得られず、クローン#2-5自体が偽増幅産物であった可能性が高いことが判明した。

一方、134-10r特異的なプライマーセットでは、ケシ(PsIK, PsIndia6, PsFrance, PsMY)の4種を鋳型とした場合は増幅産物が認められず、アツミゲシ(27, 28, 190-00)の3種を鋳型とした場合のみ、特異的増幅産物が得られた(図8)。すなわち、本プライマーセットにより、ケシとアツミゲシの遺伝子識別に成功した。

なお、134-18rはのちにケシPsMYにも存在するクローンであることが判明した。

#### D. 考察

ケシ属植物の遺伝子識別法の確立を目的とし、ケシ属植物が共通に生産するアルカロイド合成鍵酵素のゲノムDNA配列の集積と解析を行い、それらを用いたヒナゲシとケシ、また、ケシとアツミゲシの識別が可能であることを示した。

ケシとアツミゲシの遺伝子識別については、現在、両プライマーセットでの識別試験に供したケシ、アツミゲシの系統はケシ4系統、アツミゲシ3系統であり、本識別法が普遍的な方法であることを確認するためには、できるかぎり多くの系統について、識別結果が矛盾しないことを検証する必要がある。

ところで、ケシ*P. somniferum*由来の4'OMTは、現在、遺伝子データベースGenBankには2種が登録されているが、これまでの研究結果より、ゲノム上には4'OMT遺伝子の保存領域を有する遺伝子座が少なくとも8つ存在すると考えられる。塩基配列の多型を利用した植物種を識別を目的とした場合、この遺伝子座の数は過剰であり、得られる情報が過多となり、逆に識別点の抽出、選抜が困難になっている。したがって、より効率的な植物種識別のための遺伝情報整備のためには、対象植物種に共通な主要代謝経路

に関わる酵素遺伝子であり、ゲノムDNA上の相同遺伝子の遺伝子座数が少ない、といった条件を満たす遺伝子を選ぶことが将来的には必要と考えられる。

また、上記のように集積された4'OMTg及び新規対象遺伝子座のデータを用い、ケシ属植物全体をカバーするPCR法等の分子生物学的手法による判別法の確立、ならびにFast PCR法やLAMP法などを利用した迅速、簡便な判別法への発展についても検討が必要である。

以上の研究により、形態や含有成分からの識別に依存していたケシ属植物の識別が、遺伝子情報を用いることにより、より客観的かつ迅速、簡便に可能になり、将来的には、開発した識別法を基盤技術に用いた、不法栽培の監視に関わる現場における鑑別に使用可能なキットとしての製品化も可能と期待される。

#### E. 参考文献

1) Hosokawa, K., Shibata, T., Nakamura, I., Hishida, A. Discrimination among species of *Papaver* based on the plastid *rpl16* gene and the *rpl16-rpl14* spacer sequence. *Forensic Sci. Int.* **139**, 195-199 (2004)

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1) 河野徳昭, 薬用植物資源の高度利用を目指して, 日本生薬学会第56回年会若手企画シンポジウム「これからの生薬 - 6年制教育のもたらす変革を意識して-」(2009年10月, 京都)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

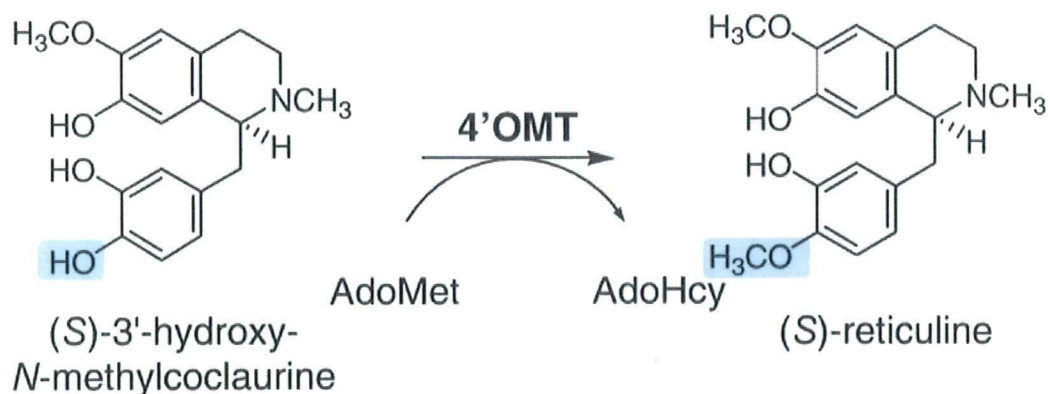
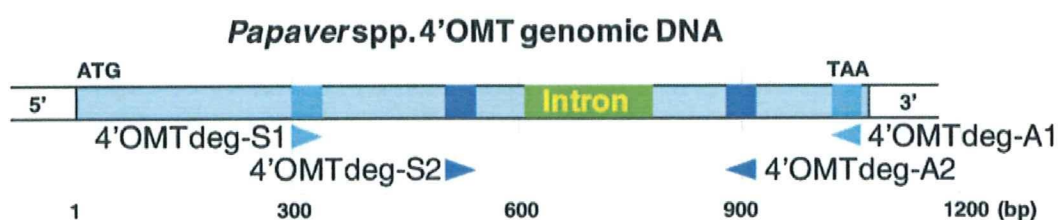


図1. ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成経路鍵酵素4'OMTの行う反応



**Sequence used for degenerate primer design**

*Papaver somniferum* 4'OMT: AY217333, AY217334; 6OMT: AY217335, AY268894  
*Coptis japonica* 4'OMT: D29812, 6OMT: D29811  
*Thalictrum flavum* 4'OMT: AY610510

図2. ケシ属植物4'OMTgの構造の概念図及び縮重入りプライマー設計に用いた配列 (EMBL/DDBJ/GenBank アクセッション番号)

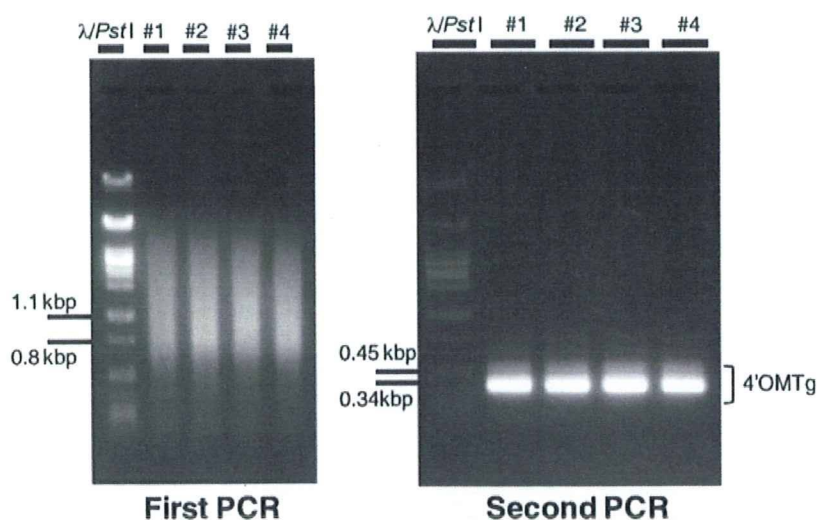


図3. 縮重入りプライマーを用いたnested-PCR例 [アツミゲシ (27ピンク)]

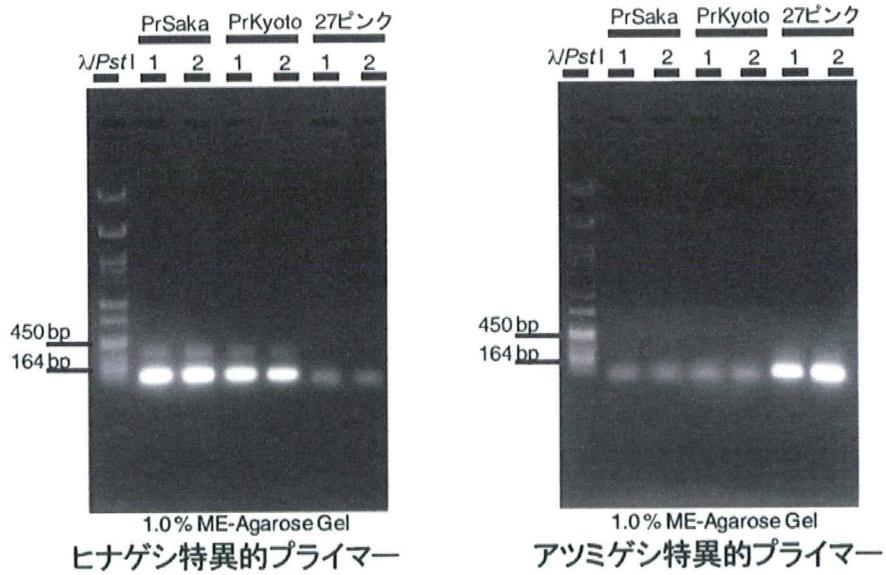


図4. ヒナゲシとアツミゲシのPCR法による識別結果

各植物由来4'OMTg特異的なプライマーにより両植物は識別可能である。



図5. FTAカードを用いた核酸調製

(左) ヒナゲシ(PrGifu)、(右) アツミゲシ(28朱)

いずれも左から、植物体、FTAカードに転写した状態、転写操作後の新鮮葉。

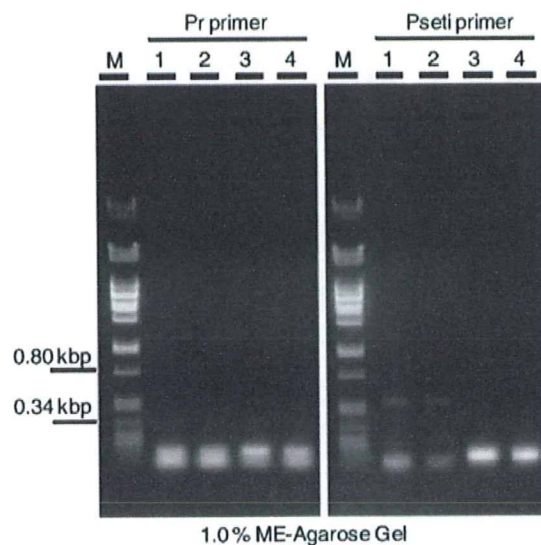


図6. FTAカードを使用したアツミゲシ、ヒナゲシのPCR識別結果

(左) ヒナゲシ特異的プライマー使用、(右) アツミゲシ(ケシ) 特異的プライマー使用。レーン1,2: ヒナゲシ(PrGifu)を鑄型として使用、レーン3,4: アツミゲシ(28朱)を鑄型として使用。白矢印: アツミゲシ特異的増幅産物。

表1. ケシ(一貫種)由来クローンのタイプ分類

4'OMTg types	代表クローン	<i>P. somniferum</i> standards			出現頻度	<i>P. somniferum</i>	
		PsIK1	PsIK2	PsIK		Ps作東	PsIndia6
		#1	#2	IK4OMTg		#17A	#7
I	PsIK2-11	4	4	2	10	3	0
II	PsIK1-11	2	4	1	7	2	0
III	PsIK1-4	3	2	2	7	1	1
IV	PsIK1-13	2	0	0	2	4	3
V	PsIK1-6	1	1	1	3	2	2
VI	PsIK2-10	0	1	0	1	2	0
VII	PsIK2-6	0	1	0	1	0	0
VIII	PsIK2-16	0	1	0	1	0	0
6OMT	PsIK1-14	1	0	0	1	0	1
others		0	0	0	0	0	0
	total	13	14	6	33	14	7

ケシ(一貫種)由来のクローンは8タイプ(及び6OMT)に分類され、ケシ由来の4'OMTgクローンをほぼ網羅するものと考えられる。Ps作東、PsIndia6由来のクローンもすべてこれらのタイプに帰属する。

表2. アツミゲシ由来4'OMTgクローンのタイプ分類

4'OMTg types	<i>P. setigerum</i>				
	28朱 Pseti#134	27ピンク 1016-1	27ピンク 1016-2	190-00 K3	190-00 Mixed
I	1	2	0	3	1
II	3	2	0	1	3
III	0	0	1	2	0
IV	2	0	1	2	2
V	0	0	2	0	3
VI	1	1	0	1	0
VII	3	1	2	2	2
VIII	0	0	0	0	0
6OMT	1	0	0	2	0
others	3	0	1	2	4
total	14	6	7	15	15
Clones not classified into 4'OMTg types.	134-10r 134-15r 134-18r		#2-5	K3-6r K3-8r	1-6 1-8 1-4 1-5

大部分はケシの標準クローンに帰属されるが、一部、どのタイプにも帰属されないクローンが存在することが判明した。

表の下部に示すクローンのうち同色の網掛けのものは同一配列のクローン。

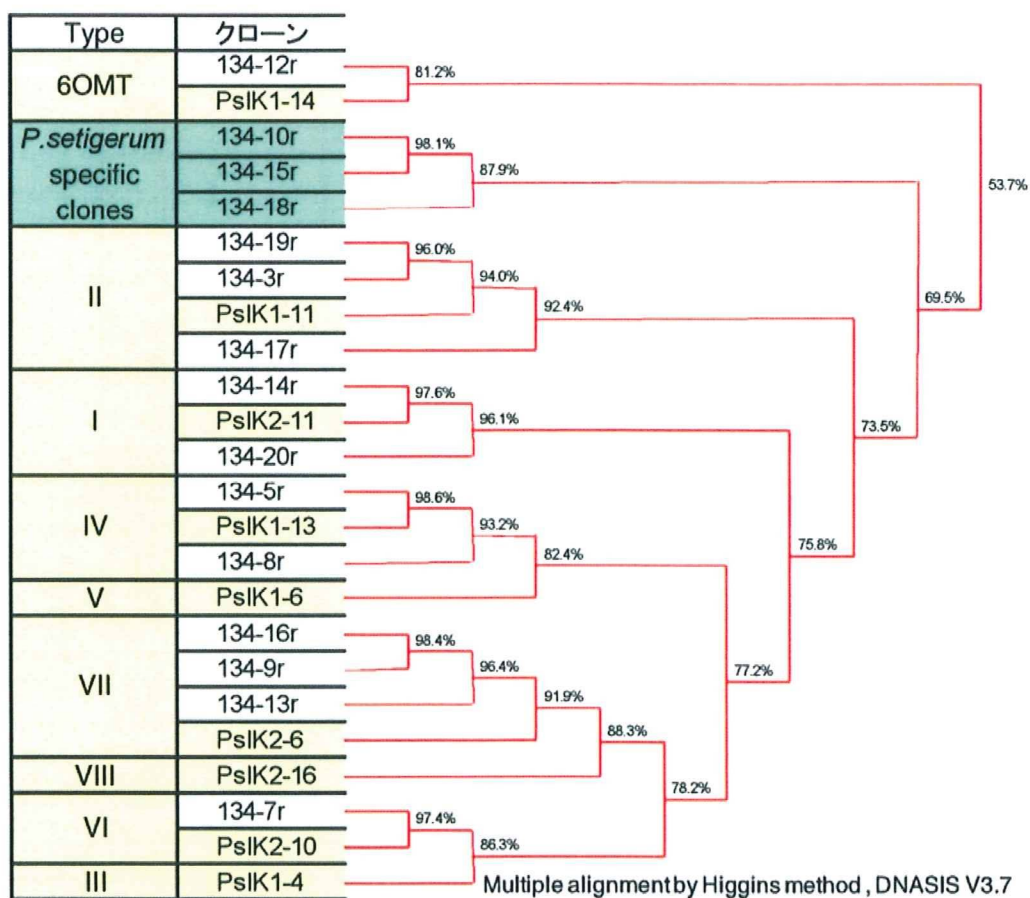


図7. *P. setigerum* 28株(Pseti#134)由来の4'OMTgクローンをケシ4'OMTg基準系統樹に挿入した結果、いずれのタイプにも属さないクローンの存在(緑色部分)が明らかになった。

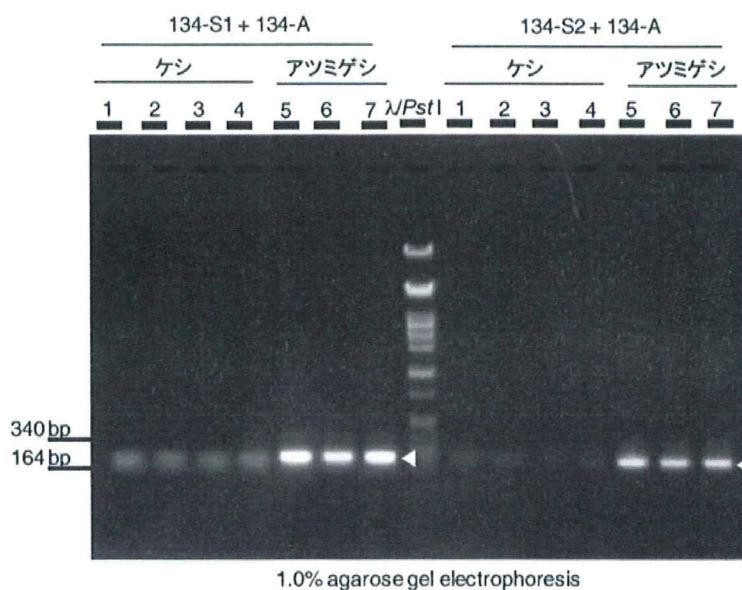


図8. ケシとアツミゲシのPCR法による識別結果

アツミゲシ由来クローン134-10r特異的プライマーにより両植物の識別に成功した。白矢印：植物種特異的増幅産物

鋳型DNA: Lane #1 PsIK, #2: PsIndia6, #3: PsFrance, #4: PsMY, #5: 27ピンク, #6: 28朱, #7: 190-00

分担研究課題 植物系薬物の調査と分析及び代謝物の合成に関する研究

分担研究者 徳島文理大学香川薬学部 准教授 代田 修

要旨 幻覚性サルビアの主活性本態であるサルビノリン A に対するモノクローナル抗体の作成を検討した。また、カートの活性本態であるカチノンについて、揮発性イオンペア試薬を用いた分析法の確立を検討すると共に、網羅的合成法によりカチノン類縁体の合成を試みた。

研究協力者

竹谷孝一 東京薬科大学薬学部

A. 研究目的

麻薬や覚せい剤などは法律により厳しく規制される一方、幻覚性植物がそれらの代用としてお香（スモークインセンス）や植物標本、観賞用植物などの名目で法律や監視の目を潜り抜けて売られてきた。これらはいわゆる「違法ドラッグ」であり、含有される成分が麻薬や覚せい剤、医薬品などの化合物とその構造が類似するものも多い。これら違法ドラッグの一つであったマジックマッシュルームが麻薬原料植物として規制され、また、幻覚物質であるサルビノリン A を含有するサルビア (*Salvia divinorum*) が薬事法の指定薬物に指定されたことは記憶に新しい。本研究では、これら植物系違法ドラッグの監視・取締に役立つような新しい分析法を開発すべく、幻覚性サルビアの主活性本態であるサルビノリン A に対するモノクローナル抗体の作成を検討すると共に、麻薬であるカチノンを含有するとされるカート (khat: *Catha edulis*) の分析のための標品の網羅的合成を検討し、HPLC-CAD (コロナ荷電化粒子検出器) および UPLC-MS によるカートの分析予試験を行った。

B. 研究方法

1. サルビノリン A に対するモノクローナル抗体の作成の検討

使用した機器及び器具は以下のとおりである。:

マトリックス支援レーザー脱離イオン化時間飛行型質量分析 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-

Mass Spectrometry : MALDI-TOF-MS ) :  
Voyager-DE RP Biospectrometry  
Workstation

ゲル濾過カラムクロマトグラフィー用カラム : HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare)

アフィニティーカラムクロマトグラフィー用カラム : Hitrap IgM purification HP 1 mL (GE Healthcare)

脱塩用カラム : PD-10 Desalting column (GE Healthcare)

電気泳動用泳動槽 : MODEL AE-6500 及び Power station 1000XP MODEL AE-8750 (ATTO)

使用した試薬類は以下のとおりである。:  
N,N-4-ジメチルアミノピリジン (DMAP)、N-ヒドロキシサクシンイミド (NHS) (Acros Organics)、水溶性カルボジイミド (EDC) (Peptide)、牛血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA) (ICN Biomedicals)、卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA) (MP Biomedicals)、ヒト血清アルブミン (Human serum albumin: HAS) (和光純薬工業)、アンモニア過酢酸 (APS) (ICN Biomedicals)、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (和光純薬工業)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (Acros Organics)、オルトフェニレンジアミン (OPD) (関東化学)、ダルベコ変法イーグル培地 (DMEM)、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン (HAT)、ヒポキサンチン-チミジン (HT) (Gibco)、牛胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) (Biowest)、トリフルオロ酢酸 (TFA) (Aldrich)。

Salvinorin A (1) は、幻覚性サルビアより単離したものをを用いた。



細胞融合には、マウス骨髄腫細胞 P3/NS1/1-AG4-1 (NS-1) を用いた。

免疫動物にはマウス BALB/c (SPF グレード)、オス、5 週齢 (日本クレア) を用いた。

## 2. エフェドラアルカロイド及びカートアルカロイドの網羅的合成およびカートの分析法の検討

エフェドラアルカロイド全 6 種の合成は、初年度に報告したノルエフェドリンからの変換合成を再検討した。また、カートアルカロイドであるカチノン類縁体の合成は、エフェドラアルカロイド合成の類似手法で行うこととした。

カートの分析は、以下の手順で行った。

植物材料：

カート (khat: *Catha edulis*) は、(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部より譲り受けた株を 2 年間生育させたものと、本研究室で所有の株を 3 年間生育させたもの (研究室内及び温室で生育) を用いた。試料溶液の調製：

細断した試料 1 g に対して酸性水溶液 (0.1 N HCl) 10 mL で 2 回にわたり 30 分間超音波抽出し、遠心後の上澄み液を凍結乾燥して 2 mL の移動相に溶解、フィルターろ過したものを分析試料溶液とした。

HPLC-CAD (コロナ荷電化粒子検出器) による分析：以下の測定条件で行った。

装置：Prominace LC-20 (Shimadzu)

検出器：Corona CAD (ESA)

カラム：Mightysil RP-18; 4.6 φ x 250 mm; 5 μm (関東化学製)

カラム温度：35 °C

インジェクション量：10 μL

移動相：0.1% TFA/アセトニトリル (7 : 93)

流量：1.0 ml/min

UPLC-MS による分析：以下の測定条件で行った。

装置：Acquity Ultra Performance LC (UPLC; Waters)

検出器：Q-ToF micro (Micromass/Waters); Capillary voltage: 2800 V; Sample Cone voltage: 35 V; Desolvation Temp.: 240°C; Source Temp.: 120°C

カラム：Acquity UPLC HSS T3; 2.1 φ x 100 mm; 1.8 μm (Waters)

カラム温度：35 °C

インジェクション量：10 μL

移動相：0.1% TFA/アセトニトリル (5:95-10:90/1-10 min)

流量：0.35 ml/min

## C. 研究結果

### 1. サルビノリン A に対するモノクローナル抗体の作成の検討

Salvinorin A (1) のキャリアータンパク質へ幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) の主活性本態である Salvinorin A (1) に対するモノクローナル抗体の作成を目的として、まずキャリアータンパク質への結合のために salvinorin A (1) を加水分解することにより salvinorin B (2) へと導き、続いてグルタル酸無水物を salvinorin B (2) の 2 位水酸基とエステル結合させカルボン酸 (3) とした (スキーム 1)。さらに、末端カルボン酸をタンパク質と効率的に縮合させるため *N*-ヒドロキシサクシンイミド (NHS) による活性エステル体 (4) へと導いた。活性エステル体 (4) と縮合させるキャリアータンパク質には、ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA) を選択した。また、ELISA 法における固相抗原のキャリアータンパク質としては、卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA) 及びヒト血清アルブミン (Human serum albumin: HSA) の二種のタンパク質を用いることとした。活性エステル体 (4) と BSA との反応後、脱塩カラムおよびゲル濾過クロマトグラフィーによりタンパク質溶出フラクションを分取し、salvinorin A-BSA コンジュゲート (5) を得た。本化合物を MALDI-TOF-MS にて分子量測定を行ったところ (図 1)、平均分子量は 78,328 であったことから、BSA 1 分子あたり平均 22 分子のカルボン酸 (3) が結合していると考えられた (表 1)。同様に、OVA 及 HSA についても同様の操作で活性エステル体 (4) と縮合させ、それぞれ salvinorin A-OVA コンジュゲート (6)、salvinorin A-HSA コンジュゲート (7) を得た。これらについても同様に MALDI-TOF-MS にて分子量を測定したところ、salvinorin A-OVA コンジュゲート (6) は、OVA 1 分子あたり平均 10 分子のカルボン酸 (3) が結合していると考えられた (図 2)。一方、salvinorin A-HSA コンジュゲート (7) については測定不能であったため、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ったところ、HAS (平均分子

量約 67 kDa) より高分子領域 (66.3~97.4 kDa) にバンドを確認したため、目的化合物を合成したと推定した (図 3)。

免疫動物にはマウス BALB/c、オス、5 週齢を用いることとし、抗原 salvinorin A-BSA コンジュゲート (5) (50  $\mu$ g/mouse) をマウス 5 匹へ免疫した。4 回目の免疫を終えた時点で、salvinorin A-OVA コンジュゲート (6) を固相抗原とした非競合的 ELISA 法により血中抗体価測定を行ったところ、5 匹のうち 1 匹で十分な抗体価を得られたと判断したため (図 4)、salvinorin A-BSA コンジュゲート (5) の単独投与により再度免疫応答を惹起し、その 3 日後に免疫マウスの脾細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行った。これをハイブリドーマのみを選択的に培養するために HAT 培地にて培養後、HT 培地で培養してハイブリドーマ群のみを得た。また、抗原に反応性を示す細胞群を選別するため、非競合的 ELISA 法にてスクリーニングを行ったところ、8 つのウェルで陽性反応を示した。またサブクラスを確認したところ、8 つ全てのウェルで複数のクローンが混在していることが示唆された (表 2)。このコロニーの中から特に反応性の良好なウェル 2A11-0、3E6-0、2F9-0 につき、限界希釈法にてクローニングを行い、非競合的 ELISA 法により固相抗原 salvinorin A-OVA コンジュゲート (6) 及び salvinorin A-HSA コンジュゲート (7) に対する反応性の結果からクローンを選択し、3 種のクローン 2A11、3E6、2F9 を得たが、いずれのクローンもサブクラスは重鎖  $\mu$  軽鎖  $\kappa$  の IgM 抗体であった (表 3)。続いて、得られた 3 種クローンの大量培養を行い、遠心分離にて細胞を除去し上清を採取し、アフィニティーカラムクロマトグラフィーにて IgM 抗体精製を行い、続いてゲル濾過カラムクロマトグラフィーにて再度精製を行うことでタンパク質溶出画分を脱塩して精製度の高い抗体を得た。

得られた抗体 2A11 および 3E6 に対し、固相抗原 salvinorin A-HSA コンジュゲート (7) を用いて、まず抗体濃度と吸光度値に関する条件検討を行った (図 5)。次に、抗体の salvinorin A (1) に対する反応性を求めた。しかし、作製した二つの抗体は salvinorin A (1) に対して反応性を示さず、良好な結果を得ることができなかった (図 6)。そこで、固相抗原及びマウス免疫に使用した抗原 salvinorin A-BSA コン

ジュゲート (5) について、固相に salvinorin A-HSA コンジュゲート (7) を固定し、競合的 ELISA 法にて二種の抗体の反応性を salvinorin A (1) と同様の手法で検討したところ、二種の抗体はこれらコンジュゲート (5)、(6)、(7) に対して反応性を示した (図 7, 8, 9 : A)。しかし、抗体の構造認識部位がキャリアータンパク質部分である可能性も考えられたため、コンジュゲートを構成するキャリアータンパク質 BSA、OVA、HSA 単独のものにつき、同様に競合的 ELISA 法により反応性を検討したところ、これらには反応性を示さなかった (図 7, 8, 9 : B)。これより、キャリアータンパク質表面に露呈した salvinorin A (1) 構造を認識していることが考えられた。そこで、salvinorin A (1) 類似化合物として抗原を合成する過程で得られた salvinorin B (2) 及びリンカーを導入したカルボン酸 (3) について同様に競合的 ELISA 法にて反応性を検討したが、二種の抗体はそれぞれの化合物とは良好な反応性を示さなかった (図 10)。これより、得られた抗体は salvinorin A (1) 及びキャリアータンパク質双方の構造を認識していると考えられた。

## 2. エフェドラアルカロイド及びカートアルカロイドの網羅的合成およびカートの分析法の検討

エフェドラアルカロイドの合成は、初年度にノルエフェドリンからの変換合成を報告しているが、今回、新たに検討を加えた。L-アラニンキラルな出発物質とし、Boc による保護、エステル化後にフェニルリチウムと反応させてプソイドノルエフェドリン (カチン) Boc 保護体を得た後、前回と同様な手法によって全 6 種のエフェドラアルカロイドを合成できると考えた (スキーム 2)。鍵となるカチン Boc 保護体を得る反応において、現在のところ収率が低く、更なる検討を続けている。

また、カートにはカチノンの他に、類縁成分としてメルカチノン類が含まれることが知られている。そこでそれらを標品として得るために、カートアルカロイドを網羅的に合成することも検討した。カートアルカロイドの合成も、エフェドラアルカロイドの合成と同様に L-アラニンをキラルな出発物質とし、フェニルリチウムの代わりに桂皮酸から誘導したスチリル

リチウムを用いてメルカチン Boc 保護体を得ることで、網羅的に合成できると考えた (スキーム 3)。現在、反応条件の検討を進めている。

さらに、カートの新鮮葉に含有されるカチノン (cathinone) の分析を行う目的として、先般確立した揮発性イオンペア試薬を添加した移動相による逆相 HPLC でのエフェドラアルカロイド一斉分析の条件を用いて分析を行うこととした。試料溶液の調製は、当初、日本薬局方収載のマオウにおけるエフェドリン類の抽出方法で行ったが、この方法ではカートからは目的とするカチノンは疎かエフェドリン類も検出が困難であった。そこで、細断した試料を酸性水溶液で超音波抽出して分析試料を調製することとした。用いたカートは、(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部より譲り受けた株を 2 年間生育させたものと、本研究室で所有の株を 3 年間生育させたもの (研究室内及び温室で生育) を用いた。この 2 系統においては、種外島研究部からの株が葉の色が緑色で小さいのに対し、当研究室で保有の株では葉の色が赤く大きいという違いがあった (図 1 2)。これらについて、まず、HPLC-CAD により試験サンプルの分析を行った。標品には 7 種を用い、ノルエフェドリン (NE ; 16.9 min)、ノルプソイドエフェドリン (NPE ; カチン ; 18.6 min)、カチノン (CA ; 19.1 min)、エフェドリン (EP ; 22.8 min)、プソイドエフェドリン (PEP ; 24.5 min)、メチルプソイドエフェドリン (MPE ; 26.8 min)、メチルエフェドリン (ME ; 28.2 min) の順に溶出した。また、比較対象として、マオウを用いた。図 1 3 に示すように、カートからはノルエフェドリンとノルプソイドエフェドリン (カチン) が検出されたが、カチノンはピークとしては検出できなかった。これは、カチノンの存在比がとても小さく、ノルプソイドエフェドリン (NPE) のピークのテーリング部分に重なってしまうためと考えられた。そこでそれを確認すべく、UPLC-MS による分析を行った。UPLC ではグラジエント溶出条件とし、ピークが比較的によく分離する条件を設定した。MS による検出では、それぞれのピークが脱水物 ( $[M-H_2O + H]^+$ ) として観測された。このことにより、ピークが多少重なっても成分を検出同定することが可能となった。しかし、この条件下で試料溶液を分析したが、カートからはカチノンの存在を確認することが

できなかった。これは、移動相に TFA を添加しているため、サンプルのイオン化が押さえられたために感度が低下したとも考えられた。

#### D. 考察

##### 1. サルビノリン A に対するモノクローナル抗体の作成の検討

Salvinorin A (1) の認識を目的とするモノクローナル抗体の作製を行ったが、得られた三種のうち二種の抗体は salvinorin A (1) と良好な特異的反応性を示さなかったが、salvinorin A (1) を含むタンパク質構造を認識することがわかった。今後、抗体がどのような構造を認識しているのかを解明するとともに、salvinorin A (1) に特異的な反応性を示す抗体の作製を検討していきたいと考えている。そのためにはタンパク質表面に結合する分子数、ハプテンのデザイン、抗原投与回数、及び細胞融合の方法等様々な改善点があるためこれらを再度検討し目的クローン作製を遂行するよう努めていきたいと考えている。

##### 2. エフェドラアルカロイド及びカートアルカロイドの網羅的合成およびカートの分析法の検討

今回検討を開始したエフェドラアルカロイドの網羅的合成は、未だ満足行く収率を得られていない。また、カートアルカロイドの網羅的合成は反応条件の検討を開始したに過ぎない。今後、反応条件の更なる検討を行うと共に、全種類の化合物を合成する予定である。また、カートの分析では、HPLC-CAD においては、他の成分との重なりのためにカチノンの検出が困難であった。UPLC-MS においては、MS による成分の判別が可能となったものの、この条件下でのカチノンの存在が確認できなかった。今後、本当にカチノンが存在しないのか確認するため、より感度の良い条件の設定を検討したい。

#### E. 参考文献

- 1) S. Geissshusler and R. Brenneisen, *J. Ethnopharmacol.*, **19**, 269-277, (1987).
- 2) K. Mathys and R. Brenneisen, *Pharm. Acta Helv.*, **68**, 121-128, (1993).

#### F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表等

なし

学会発表

久保泰裕、蓮田知代、山崎 朗、青柳 裕、代

田 修、関田節子、竹谷孝一、幻覚性ジテルペン salvinorin A に対するモノクローナル抗体の作製及びその応用、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月 28-30 日、岡山.