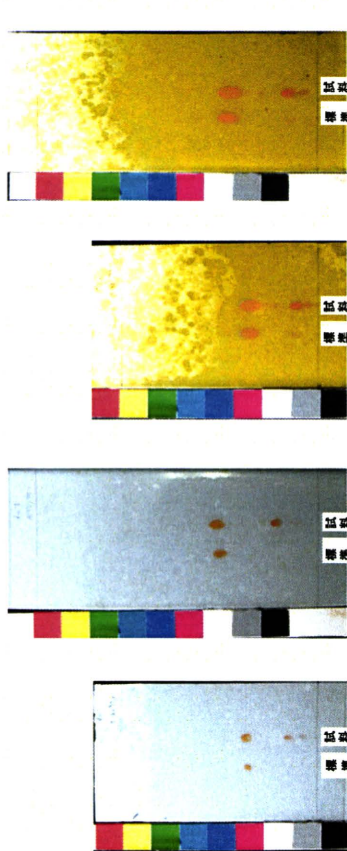


ペラドソナコンのTLC



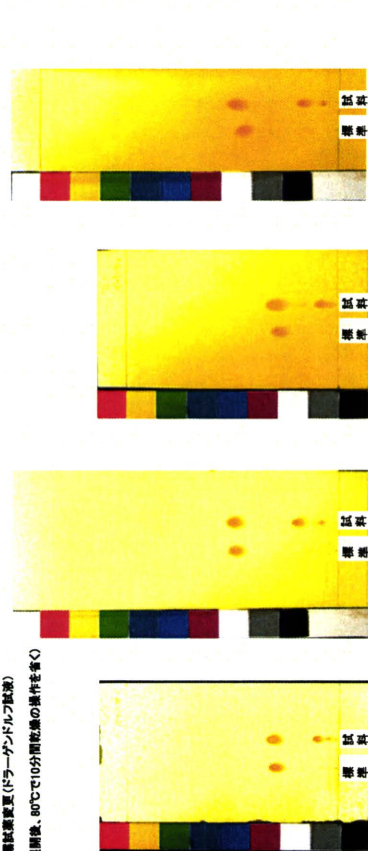
写真① Merck 製 (7mm展開)
R f 値 : 0.34 (黄赤色)
展開時間 : 11分

写真② Merck 製 (10cm展開)
R f 値 : 0.35 (黄赤色)
展開時間 : 18分

写真③ Wako 製 (7cm展開)
R f 値 : 0.34 (黄赤色)
展開時間 : 8分

写真④ Wako 製 (10cm展開)
R f 値 : 0.32 (黄赤色)
展開時間 : 13分

噴霧試薬変更 (ドラッグアンドルーフ試薬)
(展開後、80℃で10分間乾燥の操作を省く)



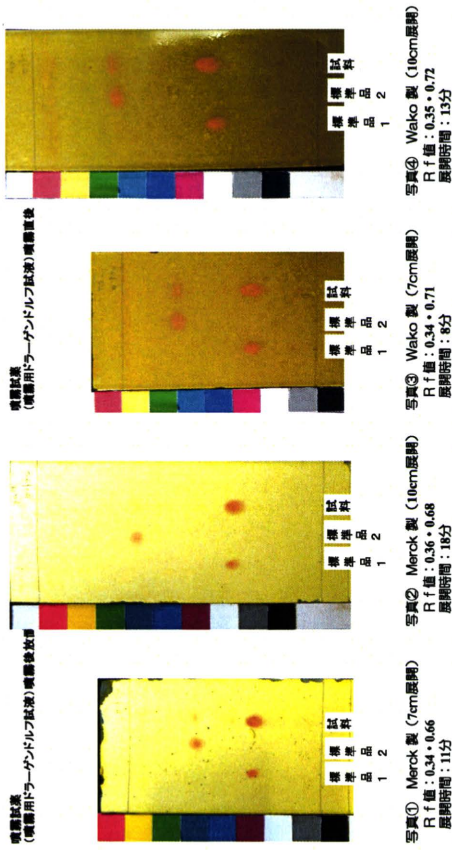
写真① Merck 製 (7mm展開)
R f 値 : 0.31 (黄赤色)
展開時間 : 11分

写真② Merck 製 (10cm展開)
R f 値 : 0.35 (黄赤色)
展開時間 : 18分

写真③ Wako 製 (7cm展開)
R f 値 : 0.31 (黄赤色)
展開時間 : 8分

写真④ Wako 製 (10cm展開)
R f 値 : 0.31 (黄赤色)
展開時間 : 13分

ロートコンのTLC



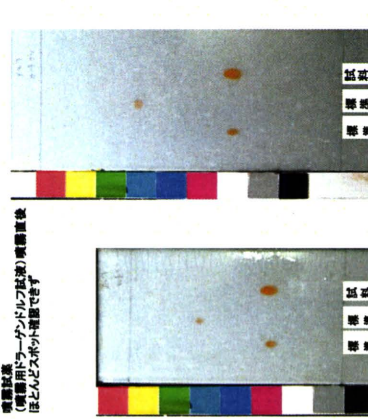
写真① Merck 製 (7mm展開)
R f 値 : 0.34 * 0.66
展開時間 : 11分

写真② Merck 製 (10cm展開)
R f 値 : 0.36 * 0.68
展開時間 : 18分

写真③ Wako 製 (7cm展開)
R f 値 : 0.34 * 0.71
展開時間 : 8分

写真④ Wako 製 (10cm展開)
R f 値 : 0.35 * 0.72
展開時間 : 13分

噴霧試薬
(ドラッグアンドルーフ試薬) 展開直後
ほごしとスプレッドできます



写真① Merck 製 (7mm展開)
R f 値 : 0.34 * 0.66
展開時間 : 11分

写真② Merck 製 (10cm展開)
R f 値 : 0.36 * 0.68
展開時間 : 18分

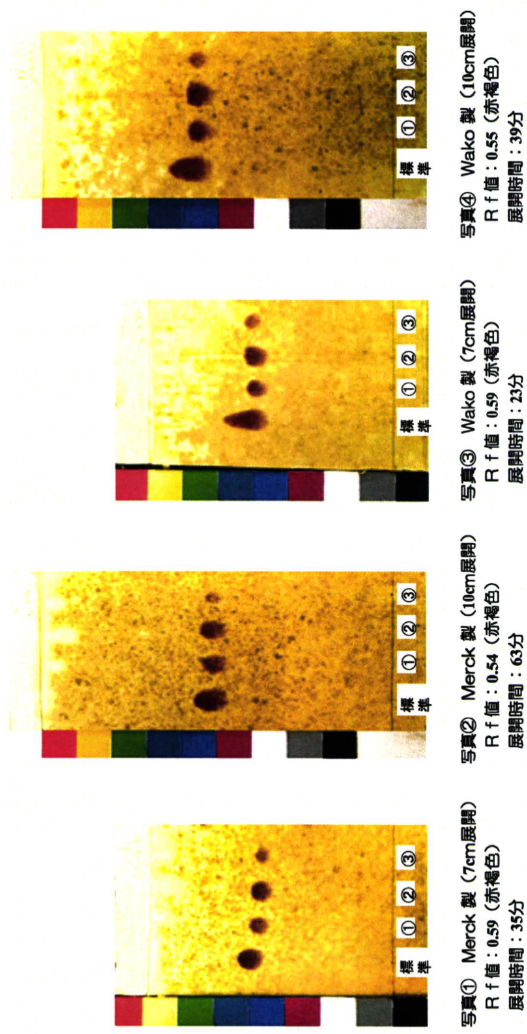
写真③ Wako 製 (7cm展開)
R f 値 : 0.34 * 0.71
展開時間 : 8分

写真④ Merck 製 (10cm展開)
R f 値 : 0.36 * 0.72
展開時間 : 13分

試料 : 生薬粉末 2008年 2月入手

Fig. 12

ピンロウジのTLC

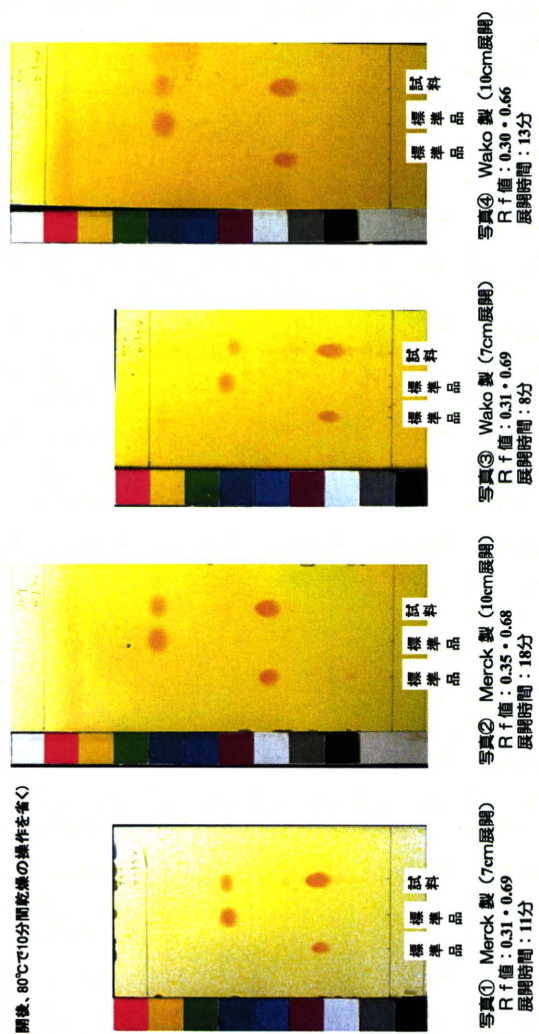


※「赤褐色」⇒「茶褐色」

- ① 中国 (2008年 6月入手)
- ② 中国 (2007年 5月入手)
- ③ ミャンマー (2004年 8月入手)

ロートコンのTLC (続き)

噴霧試薬変更(ドラッグアンドルーフ試液)
(展開後、80℃で10分間乾燥の操作を省く)

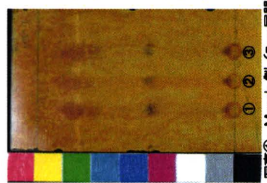


試料: 生薬見本 2006年 2月入手

Fig. 13

ヤクモソウのTLC

※薬液を多量に噴霧



写真① Merck製 (7cm展開)
R f値：0.43 (取褐色)
展開時間：44分

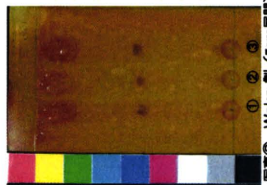
- ①中国 (2008年11月入手)
- ②中国 (2007年9月入手)
- ③中国 (2006年11月入手)

※薬液を適量噴霧

⇒Merck:スポット検出せず・Wako:わずかにスポット検出



写真② Merck製 (10cm展開)
R f値：0.44 (取褐色)
展開時間：96分



写真③ Wako製 (7cm展開)
R f値：0.47 (取褐色)
展開時間：26分

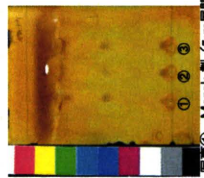


写真① Merck製 (7cm展開)
R f値：0.43 (取褐色)
展開時間：44分

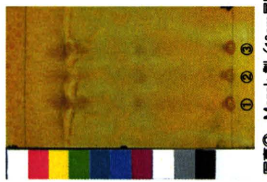


写真③ Wako製 (7cm展開)
R f値：0.47 (取褐色)
展開時間：26分

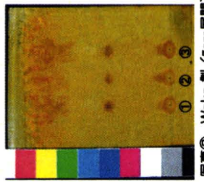
ヤクモソウのTLC (試験液更迭試)



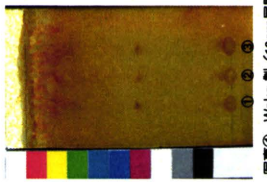
写真① Merck製 (7cm展開)
R f値：0.45 (取褐色)
展開時間：42分



写真② Merck製 (10cm展開)
R f値：0.45 (取褐色)
展開時間：96分



写真③ Wako製 (7cm展開)
R f値：0.44 (取褐色)
展開時間：29分



写真④ Wako製 (10cm展開)
R f値：0.45 (取褐色)
展開時間：47分

Fig. 14

リョウキョウのTLC



①中国 (2010年1月入手)
②中国 (2008年6月入手)
③中国 (2003年8月入手)



リョウキョウのTLC検出法変更追試

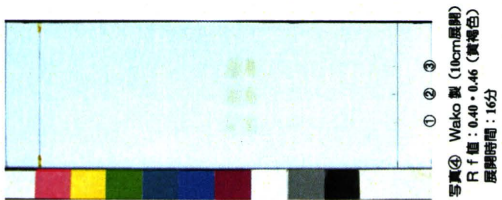
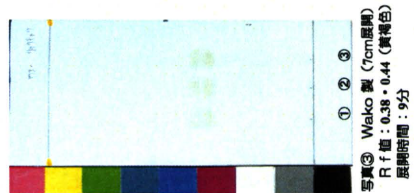
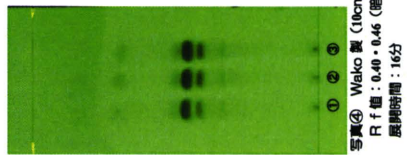
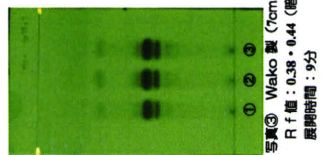
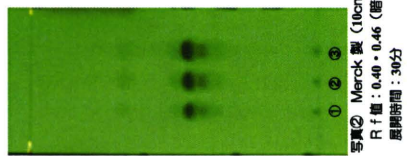
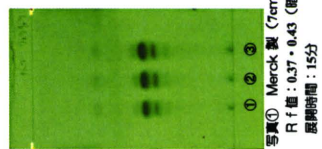


Fig. 15

平成22年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための
基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）
分担研究報告書

分担研究課題 漢方薬に用いられる薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究

研究分担者 富山大学 和漢医薬学総合研究所 教授 小松かつ子
国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 部長 合田 幸広
(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 河野 徳昭

研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長 丸山 卓郎
名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授 水上 元
岩手医科大学 薬学部 准教授 林 宏明
富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教 朱 姝

5 種類の繁用生薬の遺伝子鑑別に関する情報を整備することを目的にして、現在の日本市場に流通している生薬市場品の遺伝子解析を行い、各生薬の基原種の同定に適する遺伝子領域を次のように明らかにした；ニンジン：18S rRNA 遺伝子及び *trnK* 遺伝子、ショウキョウ：*trnL-F* IGS 領域、オウゴン：*rpl16-rpl14* 領域、カンゾウ：ITS 領域、ソウジュツ：ITS1 領域。また、当該領域の解析結果から、5 生薬各市場品の基原を明らかにした。

A. 研究目的

漢方薬の有効性と安全性は、その大部分が漢方薬に配合される生薬に基づいている。生薬において有効性と安全性を担保するためには一定の品質の生薬を用いるべきであるが、殊、生薬に関しては天然物に由来するため、品質にバラツキが生じることは否めない。しかし、生薬も薬である以上、標準化された安定した品質のものを供給するように最大限務めることが必要である。

品質を規定する要因は多々あるが、第一に、生薬の基原が重要である。そこで本研究では、漢方薬に配合される重要生

薬を順次選び、それらの基原の、日本市場における実態を明らかにすることを目的とする。

今年度は5種類の生薬、すなわち、ニンジン、ショウキョウ、オウゴン、カンゾウ、ソウジュツについて、日本市場品の基原の状況を明らかにする目的で、国際塩基配列データベース（DDBJ/EMBL/GenBank; INSD）における薬用植物の登録データを参考にして生薬ごとに遺伝子領域を選択し、遺伝子解析を行った。その結果に基づいて、選択した遺伝子領域の植物分類における有用性、市場品の基原と遺伝子型を明らかにした。

これは、「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究」の一環として行われるもので、将来的に正しい基原の生薬の流通を促し、生薬の安定性確保に繋がることが期待される。

遺伝子解析の結果、新知見が得られた場合、それらの塩基配列を国際塩基配列データベースに登録し、アクセッション番号を取得した後、順次、「薬用植物の総合情報データベース」に構築する予定である。

また、本データベースへの登録を目的にして5種類の生薬及びそれらの基原植物の遺伝子鑑別に必要な情報を収集することも目的とした。

本報告書では生薬ごとに遺伝子解析の結果を報告する。

B. 研究方法

実験材料

本研究で使用した試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料の一部を譲渡されたものである。試料の詳細は、生薬ごとに記す。

1. ニンジン（小松、朱）

B.1.1. 実験材料

ニンジン 16 市場品を試料とした。全形生薬については 1 検体、刻み生薬については 2 検体を解析した（Table 1-1）。

B.1.2. 実験方法

各試料をナイフで削り、約 90 mg を steel beads（数粒）と共に 2 mL チュー

ブに入れ、 -80°C で 2 時間冷凍した。

TissueLyser（Qiagen）で 30/sec、2 分間振動させ、試料を粉末にした。Steel beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit（Qiagen, Germany）を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 3 μL を取り、1% アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。

得られた全 DNA を鋳型とし、PCR 法で核 DNA の 18S rRNA 遺伝子の部分領域及び葉緑体 DNA の *trnK* 遺伝子のイントロン部分領域を増幅した。*trnK* イントロン領域においては、一度に増幅することが困難のため、3 分割（fragments 1~3 in Fig. 1）して増幅した。使用したプライマーは、18S rRNA 遺伝子領域では 18S5'F（5'- CAA CCT GGT TGA TCC TGC CAG T-3'）及び 18S-800R（5'- TGT ATC CAG AGC GTA GGC TTG C -3'）の 2 種類、*trnK* イントロン領域では、matKAF（5'- CTA TAT CCA CTT ATC TTT CAG GAG T-3'）と matK4R（5'- CGG AGA AAG ATG AAG ATG G -3'）、matK3F（5'- CTC CAA ATA AAG CCG GTT CTT C -3'）と matK8R（5'- AAA GTT CTA GCA CAA GAA AGT CGA -3'）及び matK5F（5'- GTA ACG TAT TGG GGC ATC C -3'）と *trnK2R*（5'- AAC TAG TCG GAT GGA GTA G -3'）の 3 セット。PCR 反応には、3'→5' exonuclease 活性のある正確性の高い東洋紡社の KOD-plus DNA polymerase を使用した。増幅できなかったサンプルについては、増幅効率が高いとされる東洋紡社 KOD FX DNA polymerase を用いた。反応条件は、両酵素とも同様に、ホットスタート 94°C 3 分、続いて熱変性 94°C 30 秒、アニーリング

52°C 30 秒、伸長反応 68°C 50 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 68°C 10 分で終了した。得られた PCR 産物を精製後、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, U.S.A.) でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyz (Applied Biosystems, U.S.A.) で、塩基配列を決定した。

C.1. 研究結果

本研究室のこれまでの研究結果 (Zhu et al., *Planta Med.*, 2003, **69**: 647-653.) に基づき、ニンジンの基原解析に有用である核 DNA の 18S rRNA 遺伝子の部分領域及び葉緑体 DNA の *trnK* 遺伝子のイントロンの部分領域に着目し、解析を行った。解析した 18S rRNA 遺伝子の 5'側 660 bp の塩基配列は、全検体において同一の配列を示し、GenBank に登録された *Panax ginseng* C. A. Meyer の同領域の配列 (D83275) と完全に一致した (Table 1-2)。 *trnK* 遺伝子のイントロン領域では、3'側の約 1600 bp の塩基配列を解析した結果、3 試料 (4 検体) 以外の全検体が同一配列を示し、GenBank に登録された *P. ginseng* の同領域の配列 (AB087999) と完全に一致した (Table 1-3)。一方、3 試料 (4 検体) では、AB087999 の配列において、1 箇所 (AB087999 の配列を基準に上流から 1292 番目) に M (Adenine/Cytosine) の 2 重ピークが観察された。

D.1. 考察

3 試料 (4 検体) の *trnK* イントロン領域の塩基配列において、1 箇所に 2 重ピーク Adenine/Cytosine が観察された。こ

れまで解析してきた 100 検体以上の同属植物及び生薬試料において、この箇所はすべて Adenine であり、塩基置換は認められなかった。この原因については現在確認中である。

E.1. 結論

ニンジンの基原解析においては、核 18S rRNA 遺伝子の 5'側部分領域及び葉緑体 *trnK* イントロンの 3'側部分領域の塩基配列が有用であることは、これまでの研究により立証している。本研究により、ほとんどのニンジンの試料が同一の配列 (3 試料を除く) を示したことから同領域の有用性が示された。3 試料で 2 重ピークが観察されたが、今回の解析結果から、日本国内市場に流通しているニンジンは、全て *Panax ginseng* に由来することが明らかになった。また、今回用いた実験方法は、蒸すなどの加工を施された紅参の同定にも有効であった。

2. ショウキョウ (合田、丸山)

B.2.1. 実験材料

ショウキョウ 16 市場品を試料とした (Table 2)。

B.2.2. 実験方法

各試料をナイフで削り、その 20 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて粉砕した。このものに、SNET buffer (20 mM Tris/HCl pH8.0, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS, 200 µg/mL Proteinase K) 400 µL を加え、55°C, 18 時間インキュベーションし、genomic DNA を抽出した。インキュベーション終了後、95°C, 10 分加温し、Proteinase K を失活させた後、

20000 x G, 1 分間遠心し、上清 100 μ L を分取し、DNA 試料液とした。このものを鋳型とし、植物の核 ribosomal DNA (核 rDNA) 遺伝子あるいは葉緑体 DNA *trnL-F* 領域に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする核 rDNA internal transcribed spacer (ITS) 領域あるいは、葉緑体 DNA *trnL-F* 領域を含む DNA 断片を増幅した。ただし、*trnL-F* 領域については、*trnL* intron 領域と *trnL-F* intergenic spacer (IGS) 領域に分けて増幅を行った。PCR は、Ampdirect Plus (Shimadzu)-Nova Taq Hot Start DNA polymerase (Merck) の系を用いて、以下の温度プログラムにより行われた: 95°C 10 min; 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 45 sec, 40 cycle; 72°C 7 min。得られた PCR 産物を MinElute PCR purification kit (Qiagen) により精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。ダイレクトシーケンスにおける PCR 産物の蛍光ラベлизацияは、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems) により行った。得られた塩基配列の多重配列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

C.2. 研究結果

1) 核 rDNA ITS 領域

ダイレクトシーケンスの結果、得られたシーケンスデータは、複数の配列の混合物と思われる波形を示した (Fig. 2-1)。このような現象は、多コピー遺伝

子である rDNA においては、度々観察されており、ショウキョウと同じショウガ科に属する *Curcuma* 属植物でも見出されている。このような場合、塩基配列解析を行うには、PCR 産物をプラスミド DNA へ組み込み、大腸菌へと形質転換し、個々の塩基配列に分離した後に、シーケンス解析を行う必要がある。しかし、そのような方法を用いた場合においても、得られた塩基配列は、試料として用いられた個体が持つ多数の rDNA 遺伝子の 1 コピーの配列に過ぎない。このような手法は、ショウキョウの基原植物である *Zingiber officinale* の種としての進化、成立過程等を考察する際には、有用であると思われるが、種の鑑別を目的とした塩基配列情報の整備を指向する本研究の目的には適さない。以上のことから、ITS 領域については、これ以上の解析は行わなかった。

2) 葉緑体 DNA *trnL-F* 領域

ITS 領域と異なり、葉緑体 DNA *trnL* intron 領域及び *trnL-F* IGS 領域共に、配列解析は可能であった。ただし、*trnL-F* IGS 領域については、一塩基の挿入/欠失に基づくと思われるマイナーなピークが認められた (Fig. 2-2)。この領域については、メインのピークを基に、塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、*trnL* intron 領域、*trnL-F* IGS 領域共に、全試料において同一の配列を示し、前者が、519 bp、後者が、328 bp だった。

D.2. 考察

塩基配列を決定出来た *trnL* intron 領

域、*trnL-F* IGS 領域共に、全試料において同一の配列を示した事から、国内市場に流通するショウキョウは、上記の遺伝子領域において、遺伝的に均質である事が明らかになった。それぞれの領域について、Blast search program により国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) に登録されている配列と同一性検索を行った結果、*trnL-F* IGS 領域については、データベース上の 4 つの *Z. officinale* の配列 (Acc. no.: HM567394 ~ HM567397) と完全に一致した。一方、*trnL* intron 領域は、Fig. 2-3 に示すように、上記 4 つの *Z. officinale* の配列と前半部の配列に大きな違いが認められた。これらの配列は、論文報告されていないが、試料の来歴については、マレーシア産の *Z. officinale* の内の Bentong, Bara, Muda 及び Padi と呼ばれる系統であることが、データベース上に記載されている。従って、今回の結果からは、国内市場に流通するショウキョウは、*trnL* intron 領域の塩基配列において、マレーシア産の *Z. officinale* の各系統と判別が可能であると推定された。また、同領域が *Z. officinale* の産地及び系統判別に有用である可能性が示された。

E.2. 結論

2 つの遺伝子領域について、ショウキョウの塩基配列情報を取得した結果、ショウキョウの遺伝子鑑別に、核 rDNA ITS 領域の使用は、不適當であった。また、葉緑体 DNA *trnL-F* 領域では、*trnL* intron 領域が系統判別に、*trnL-F* IGS 領域が種の同定に適していると推定された。

3. オウゴン (河野)

B.3.1. 実験材料

オウゴン 15 市場品を試料とした (Table 3-1)。さらに、(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で維持・保存されているコガネバナの圃場栽培植物体 (筑波研究部導入番号 0480-79) 及び無菌培養物を、新鮮葉からのゲノム DNA 調製試料とした。

B.3.2. 実験方法

1.1) 生薬オウゴンの基原植物の遺伝子鑑別に関する論文情報の収集

PUBMED (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) または、Google Scholar (scholar.google.co.jp/) で '*Scutellaria (baicalensis)*' をキーワードに検索を行い、遺伝子鑑別関連の文献 1~8 を抽出した (Table 3-2)。

1.2) 生薬オウゴンの基原植物の遺伝子鑑別に関する遺伝子情報の収集

DDBJ で '*Scutellaria*' をキーワードに検索を行い、*Scutellaria* 属の主に植物種間識別に関する登録遺伝子情報を抽出した。

2.1) コガネバナ新鮮葉からのゲノム DNA の調製

コガネバナ新鮮葉からのゲノム 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 API バッファー 500 μ L を入れ、破砕機 MS-100 (TOMY) で 4,500 rpm, 1 分間, 2 回粉碎を行い、以後キットのプロトコルに従い調製を行った。

2.2) 生薬オウゴンからのゲノム DNA の調製

オウゴン市場品については、‘刻み’または‘小刻’のものは、刻み生薬片 2 片約 50 mg を 1 つの検体とし、これを 2 つ個別に調製し、検体#1、#2 とした。‘原形’のものは 2 片を選び、それぞれに#1、#2 とナンバリングし、それぞれから約 50 mg を清拭した剪定鋏で採取し、検体#1、 #2 とした。

検体は個別に直径 4.8 mm のステンレスボールと共に 2 mL スクリューキャップチューブに入れ、液体窒素に 5 分間浸漬したのち、MS-100 (TOMY) にセットし 3,000 rpm で 1 分間破碎した。破碎粉末に 1 mL の DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1 バッファー及び 2 μ L の RNase (キット添付のもの) を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノム DNA 調製を行った。最終的にゲノム DNA は 50 μ L の AE バッファーで溶出し、その 1 μ L を PCR に使用した。

3) 核 rDNA ITS 領域の解析

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部において圃場栽培されている系統 (0480-79) または無菌培養物として維持されている系統について、核 rDNA ITS 領域の解析を行った。

文献 1 (Table 3-2) に記載のプライマーのうち、ITS5 と ITS4 の 2 プライマーのセットにより、新鮮葉より調製したゲノム DNA を鋳型に PCR 増幅を行った。

PCR 条件は下記のとおり。

PCR 反応液組成：KOD-Plus- (Toyobo) 1 μ L, ddH₂O 33 μ L, 10 x KOD-Plus- buffer 5

μ L, dNTP 5 μ L, MgSO₄ 2 μ L, プライマー (センス、アンチセンス 100 μ M) 各 0.5 μ L, ゲノム DNA 3 μ L。

PCR 条件：94°C 2 min →(94°C 15 sec. →62°C 30 sec. → 68°C 1 min 30 sec) x 35 cycle →4°C ∞.

プライマー配列は下記のとおり。

Sense primer (ITS5) : 5'-gga agt aaa agt cgt aac aag g-3'

Antisense primer (ITS4) : 5'-tcc tcc gct tat tga tat gc-3'

得られた PCR 産物は、アガロース電気泳動で増幅産物を確認したのち、予想サイズである約 0.74 kbp の増幅産物をクローニング&シーケンシングに供した。塩基配列解析は各試料 8 クローンについて行った。

4) 塩基配列解析 (クローニング&シーケンシング)

PCR 反応液をエタノール沈殿し、全量をアガロースゲル電気泳動に供し、切り出した目的のバンドを含むゲルより PCR 産物を Suprec-02 (TakaraBio) を用い精製した。シーケンシングベクターには *EcoRV* 消化した pT7Blue ベクター (Merck) を用い、精製 PCR 産物を Fast Link DNA Ligation Kit (EPICENTRE Biotechnologies) でライゲーションを行い、DH5 α z-competent cells (ZYMO RESEARCH) に導入した。コロニーとして単離したクローンを液体培養し、Illustra Plasmid Prep Kit (GE Healthcare) を用いプラスミド DNA を調製した。調製したプラスミド DNA について制限酵素処理により目的 PCR 産物の挿入を確認した

後、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて塩基配列を解析した。

5-1) 葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域の解析(クローニング&シーケンシング)

葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域については文献 5 及び 6 (Table 3-2) を参考とし、オウゴン市場品について塩基配列情報の取得を行った。はじめに、本領域が基原植物種の同定に適しているか判断するため、試料番号 NIB-073 及び 174 の 2 試料について、クローニング&シーケンシングの手法で塩基配列情報の収集を行った。

オウゴン市場品の各検体より調製したゲノム DNA#1 及び#2 を試料とし、文献 5 記載のプライマーを使用し、PCR 条件に変更を加え PCR 増幅を行った。PCR 条件等は文献 5 及び 6 に準拠したが、一部変更を加えた。PCR 酵素には正確性の高い KOD-Plus- (TOYOBO) を使用した。

文献 6 と同じサーマルサイクル条件(アニール温度 52°C) で PCR を行い、増幅産物が良好に増幅されることを確認した。次に、アニール温度をグラジエント機能を用い検討し、増幅産物が良好に得られる 58°C に変更した。また、サイクル回数も当初の 35 回から 30 回に変更した。以降、*rpl16-rpl14* 領域の増幅は下記の PCR 条件で行った。

PCR 反応液組成: KOD-Plus- (Toyobo) 1µL, ddH₂O 35µL, 10 x KOD-Plus- buffer 5µL, dNTP 5µL, MgSO₄ 2 µL, プライマー (センス、アンチセンス 100 µM) 各 0.5 µL, ゲノム DNA 1µL。

PCR 条件: 94°C 2 min → (94°C 15 sec. → 58°C 30 sec. → 68°C 1 min 30 sec) x 30 cycle → 4°C ∞, iCycler (BioRad)
プライマー配列は下記のとおり。

A-primer : 5'-aaa gat cta gat ttc gta aac aac ata gag gaa gaa-3'

B-primer : 5'-atc tgc agc att taa aag ggt ctg agg ttg aat cat-3'

得られた増幅産物を電気泳動で解析し、目的サイズ(約 0.55 kbp)の増幅産物についてクローニング&シーケンシングを行った。塩基配列解析には 16 クローンを供した。

5-2) 葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域塩基配列情報のオウゴン市場品からの取得

前項と同じ PCR 条件でオウゴン市場品由来のゲノム DNA を鋳型とし *rpl16-rpl14* の増幅を行った。得られた増幅産物をアガロース電気泳動で解析し、単一バンドであることを確認し、ダイレクトシーケンシングに供した。

5-3) ダイレクトシーケンシング

PCR 産物より NucleoSpin II (TakaraBio) を用いプライマーを除去し、最終的に溶出バッファー 15 µL または 50 µL で溶出し、その 5 µL をシーケンシング反応に供した。シーケンシング反応は、プライマーに PCR 増幅に使用した A 及び B-primer を用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) で両鎖について行った。塩基配列解析には ABI PRISM 3100-Avant DNA sequencer、80 cm キャピラリー、POP-4 ポリマー(ABI)を用い、データ解析は DNASIS-Mac v3.7 (Hitachi

Software)、Finch TV (Geospiza Inc.) で行った。

C.3. 研究結果

1) 遺伝子情報検索の結果

DDBJ において登録配列を検索し、遺伝子鑑別関連の登録データを抽出したものを Table 3-3 にまとめた。*S. baicalensis* の *rpl16-rpl14* 領域については 1 件 AB112068、また ITS 領域については 5 件 (AB557593, AY394851, FJ546846, FJ609732, FJ883534) の登録があった。その他、遺伝子鑑別に関連する配列情報として、*trnL-trnF*、*psbA-trnH*、*matK*、*rpoB*、*accD* 等の遺伝子領域の登録情報が検索された。領域別の内訳は Fig. 3-1 に示した。

2) コガネバナの核 rDNA ITS 領域の解析

コガネバナ筑波研究部保存系統 2 系統の ITS1 及び ITS 2 領域の塩基配列を検討した結果、無菌培養物として維持されている系統の配列には 2 種 (Sbi-ITSa, Sbi-ITSb) が認められ、これらの間の相同性は 92% であり、出現頻度は Sbi-ITSa : Sbi-ITSb = 6 : 2 であった。また、圃場栽培植物からは Sbi-ITSa と 98% の相同性を示す 1 種 (Sbf-ITSa) のみが認められた。これらには、GenBank 登録のオウゴン由来の ITS 領域の 3 配列 (AB557593, FJ609732, AY394851) と完全に一致するものはなかった。今回見出された 3 種の塩基配列についてアラインメント解析を行った結果、Sbi-ITSb では Sbi-ITSa (または Sbf-ITSa) の 98 番目と 99 番目の塩基間に 6 塩基の挿入が認められた。

以上のように、ITS1 及び ITS2 領域の塩基配列は、植物系統の差異によって変異が認められることから、同一植物種内の系統識別に利用できる可能性が示唆された。しかしながら、同一植物から塩基の挿入を伴う複数種の塩基配列が見出されることから、ダイレクトシーケンシングによる塩基配列解析は適しておらず、本研究課題である生薬の基原植物種同定には適さないと判断した。

3-1) 葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域の解析 (予備解析)

葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域の解析のクローニング & シーケンシングによる解析に供した 2 試料 NIB-073 及び NIB-174 については、NIB-073#1 では AB112068 と同一な 1 種の単一の塩基配列、また、NIB-073#2 からは 1 塩基 (AB112068 の塩基番号で 281 番目の塩基が T または C) の変異を有する 2 種の塩基配列が得られた。NIB-174#1 及び #2 からは AB112068 と同一な 1 種の単一の塩基配列のみが得られた。

その他の塩基の挿入・欠失や置換は認められず、文献 6 で報告されている他の *Scutellaria* 属植物由来の塩基配列と本領域の結果を比較することにより基原植物種の同定に利用可能であると言える。また、本領域の解析にはダイレクトシーケンシングの手法も適用可能と判断された。

3-2) オウゴン市場品の葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域の増幅及びダイレクトシーケンシング

15 市場品より調製したゲノム DNA 各 2

検体、合計 30 検体を鋳型とした *rpl16-rpl14* 領域の PCR 増幅の結果を Fig. 3-2 に示す。

PCR 産物が得られた 28 検体のうち、DNA の plus, minus 両鎖が解析でき、高品質な解析結果が得られたのは 12 検体であった。DNA 鎖の一方のみが解析できた検体は 11 検体であり、両鎖が解析できた結果と合わせると、生薬 15 市場品中 13 市場品については、なんらかの塩基配列データが得られた (Table 3-4)。

NIB-142 については、PCR 増幅産物が得られない (NIB-142#2)、もしくは、増幅効率が悪いながらも得られた増幅産物 (NIB-142#1) について解析を行ったが、解析結果が不良であった。NIB175 については NIB-175-#1、#2 とともに PCR 増幅効率が悪く、塩基配列解析結果も不良で、これら 2 試料については配列情報が得られなかった。

3-3) 葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域の塩基配列における変異

高品質の塩基配列情報が得られた *rpl16-rpl14* の遺伝子領域 (部分) については、一部を除くほぼすべての試料由来の塩基配列は AB112068 と同一であった。ただし、AB112068 の塩基番号を基準とすると、174 番目の塩基が AB112068 では A に対し、NIB-036#1 では T であった。また、281 番目の塩基が AB112068 では T に対し、NIB-057#2 及び NIB-073#2 では C であった (Fig. 3-3)。

これらは GenBank に登録されている他の *Scutellaria* 属の同領域の配列 (*S. falericulata*: AB112069, *S. lateriflora*:

AB112072, *S. altissima*: AB112067, *S. incana*: AB112070 及び AB112071) (文献 6) との変異点とは異なり、植物種内変異と考えられる。

D.3. 考察

今回、NIB-073 及び NIB-174 についてはクローニング&シーケンシングを予備実験で行い、*rpl16-rpl14* の塩基配列が NIB-174 ではクローン間で同一であることを確認した。NIB-073 より調製したゲノム DNA 試料 NIB-073#1 については全クローンが同一配列を示したが、NIB-073#2 については、281T (AB112068 で T の 281 番目の塩基) が C または T のバリエーション (出現頻度 281C : 281T = 11 : 3) があることが判明した。本試料は‘刻み’であり、2 種の塩基配列が得られたことは、生薬試料片が異なる個体由来であったことに因るものと推察される。

一方、同じ DNA 試料 (NIB-073#2) を鋳型とした PCR 産物をダイレクトシーケンシングに供した場合、その塩基は C と判断された。波形の解析 (Fig. 3-4) でも C の強度が低いながらも T の存在は確認できず、11 : 3 程度の存在比の場合、ダイレクトシーケンシングではマイナーな塩基配列タイプの存在は検出できない可能性が示された。

解析品質が低く、全長の解析が行えなかった試料では、解析データ途中からスペクトルのシグナル強度の低下やスペクトルの混合が生じており、これらが複数の PCR 増幅産物の混合によるものなのか、検討が必要である。

今回の試料 NIB-175#1 及び#2 のように、

PCRによる *rpl16-rpl14* 領域の増幅に問題がなかったにも関わらず、両鎖とも解析が不能であったものや、一方の DNA 鎖しか解析ができなかったものについては、シーケンシングに供するサンプル量の検討や PCR 産物の精製法などの検討による塩基配列の再精査を検討している

また、NIB-036#2 及び NIB-142#2 のように PCR で増幅産物が得られなかった試料については、ゲノム DNA の再調製や再精製、試料の希釈による PCR を阻害する夾雑物の影響の低減が必要と考えられる。

E.3. 結論

核 rDNA ITS 領域及び葉緑体 *rpl16-rpl14* 領域の 2 つの遺伝子領域について、オウゴンの塩基配列情報を取得した結果、ITS 領域については塩基の挿入・欠失を伴う変異が同一試料内で存在することから、ダイレクトシーケンシングによる生薬の基原植物鑑別には適用が難しいものの、系統間の植物識別に利用できる可能性が示唆された。

一方、*rpl16-rpl14* 領域については、供試生薬試料由来の配列は、種内変異と推察される 1 塩基の変異を除き既報の *S. baicalensis* 由来の配列と同一であり、本領域が生薬オウゴンの基原植物種の同定に適していることが確認された。

4. カンゾウ (林)

B.4.1. 実験材料

カンゾウ 16 市場品を試料とした。このうち、10 市場品が原形、6 市場品が刻み生薬であった (Table 4-1)。

B.4.2. 実験方法

原形生薬の一部または刻み生薬 1 個体を乳鉢と乳棒により粉末化した。刻み生薬からなる市場品のうち、特に刻みが小さかったもの (NIB-090 と NIB-107) については、刻み 1 個体を粉末化したものと、刻み 10 個体を混合して粉末化したものの 2 つの試料を準備した。

DNA の抽出 : DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA の抽出を行った。

核 rDNA ITS 領域の PCR 法による増幅 : (株) ツムラにより報告¹⁾ されている以下の 2 種類のプライマーを用いて PCR を行い、ITS 領域の部分配列を増幅した。

5'-GCA ATG CTC ACG GGA AGC CAA CA-3'

5'-GCC ACG CAC TGT GTT CTC TCC T-3'

PCR 反応には、Anti-Taq High (Toyobo) と Taq DNA polymerase (NEB) を用いて行った。増幅した PCR 産物は ExoSAP It (GE ヘルスケア) によりプライマーの除去を行った。

遺伝子配列の決定 : ExoSAP It 処理した PCR 産物を鋳型として、BigDye terminator v.3.1 Kit (Applied Biosystems) と 3130xl Genetic Analyzers (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。なお、配列決定には PCR に用いたプライマーを使用した。

C.4. 研究結果

今回入手した全てのサンプルから ITS 領域を増幅し、その遺伝子型を決定することができた。今回分析した結果を Table 4-2 に示す。

D.4. 考察

16 市場品のうち 14 市場品は、ITS 領域の 187 番目が C、411 番目から 413 番目が TGC の配列を有し、文献^{1,2)}で示されている *Glycyrrhiza uralensis* Fischer の大部分の検体の配列と同一であった。しかしながら、NIB-054 の原形生薬と NIB-90 の刻み 1 個を分析したものでは、187 番目が C もしくは T となり、ヘテロな配列を示した。ただし、これらの試料においても、411 番目から 413 番目は TGC となり他の試料と同じであった。187 番目と 411 番目から 413 番目が C/T-TGC となる遺伝子型は参考文献^{1,2)}では報告されていない。

E.4. 結論

カンゾウ 16 市場品 18 検体の核 rDNA ITS 領域の遺伝子型を決定したところ、16 検体は、文献記載の *G. uralensis* に高頻度に見られる ITS 領域の遺伝子型に一致した。しかしながら 2 検体は、一部にヘテロな配列をもつ文献にはない遺伝子型であった。

日本国内の市場に流通する中国産カンゾウは、産地や等級の違いにかかわらず、ほとんどが *G. uralensis* と同定できるものであった。

参考文献

1) Shibata S., Kondo K., Terabayasi S.: Identification of the licorice root stored in Shosoin based on the sequences of internal transcribed spacer (ITS) on nrDNA and the chemotaxonomic consideration., Proc. Japan Acad., **79** (B), 176-180 (2003)

2) Kondo K., Shiba M., Yamaji H., Morota T., Cheng Z., Pan H., Shoyama Y.: Species identification of licorice using nrDNA and cpDNA genetic Markers., Biol. Pharm. Bull., **30**, 1497-1502 (2007)

5. ソウジュツ (水上)

B.5.1. 実験材料

ソウジュツ 8 市場品を試料とした (Table 5-1)。

B.5.2. 実験方法

朮類生薬に関しては、核ゲノム中に存在する ribosomal DNA 遺伝子の ITS 領域を鑑別指標とする基原種同定法がすでに確立されている。本研究ではこの方法を用いて同定した。

DNA の調製：ソウジュツからの DNA の調製には SNET buffer を用いた。

1) PCR-RFLP 法による鑑別

ソウジュツの粉末約 20 mg から SNET buffer 400 μ l を用いて調製した DNA 溶液のうち 1 μ l を用いて、ITS 領域の内部に存在する約 140 bp の DNA 断片を増幅した。増幅産物を含む PCR 反応液に制限酵素 *Fau* I または *Msp* I を加えて、それぞれ 55°C 及び 37°C で 2 時間インキュベートして、反応産物を 4% アガロースゲルによる電気泳動によって分析した¹⁾。

2) 直接シーケンスによる鑑別

DNA 抽出液 2 ml を用いて、ITS1 領域のうち主要な鑑別サイトを含む約 200 bp の DNA 断片を増幅した。増幅産物を含む PCR 反応液を exonuclease と alkali phosphatase で処理後、シーケンス反応を行った²⁾。

C.5. 研究結果と考察

1) PCR-RFLP 法による鑑別

市場品 8 試料について電気泳動パターンを Fig. 5 に示した。試料 C と E では、*Fau* I 消化により約 80 bp と 60 bp の 2 つの断片の生成を認め、*Msp* I による消化では切断を認めないことから *A. lancea* を基原とするものであると判定できた。試料のうち B、D、G、H では、*Fau* I による切断は認めず、*Msp* I 消化によって約 90 bp と 50 bp の 2 つの断片の生成を検出した。このことからこれらの試料は *A. chinensis* を基原とするものであると推定した。しかしながら、これらの試料では、かなり強い未切断バンドも検出された。一方、試料 A と F では、いずれの制限酵素によっても切断産物が生じており、両種の交雑植物を基原とするものであることが推定できた。

2) 直接シーケンスによる鑑別

8 試料について、シーケンスの結果を Table 5-2 に示した。試料 C と E では 5 つの鑑別サイトの全てで塩基が *A. lancea* のものと一致した。試料 G と H では同じく *A. chinensis* のものと一致した。また、試料 A と F では、5 つのサイトの全てで *A. lancea* と *A. chinensis* に由来する 2 つの塩基が検出された。一方、試料 B と D では 5 つのサイトのうち 4 つで *A. chinensis* のものと一致したが 1 つでは異なっていた。

D.5. 結論

以上の結果から、提供されたソウジュ

ツ市場品の基原種を Table 5-3 のように判定した。

E.5. 参考文献

1) 丸山卓郎, 近藤健児, 四柳雄一, 山本豊, 川崎武志, 司馬真央, 寺坂和祥, 山根真由, Shu Zhu, 坂田こずえ, 藤田正雄, 穠山 浩, 西村直行, 小松かつ子, 水上元, 合田幸広: PCR-RFLP 法によるビャクジュツのソウジュツに対する純度試験の妥当性確認試験, 生薬学雑誌 **64**, 96-101 (2010)

2) Guo Y., Kondo K., Terabayashi S., Yamamoto Y., Shimada H., Fujita M., Goda Y. and Mizukami H.: DNA authentication of So-jutsu (*Atractylodes lancea* rhizome) and Byaku-jutsu (*Atractylodes* rhizome) obtained in the market based on the nucleotide sequence of the 18S-5.8S rDNA internal transcribed spacer region, J. Nat. Med., **60**, 149-156 (2006)

F. 研究発表

1. 発表論文
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

1. ニンジン

Table 1-1 生薬「ニンジン」の市場品

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	備考 (栽培・野生・等級)
NIB-011	ニンジン	中国吉林省	原形	2009年	生干
NIB-012	ニンジン	中国吉林省	原形	2008年	湯通
NIB-040	ニンジン	中国吉林省	原形	2007年	5-6年根
NIB-056	ニンジン	中国吉林省	原形	2009年	
NIB-061*	ニンジン	中国吉林省	刻み	2009年	湯通し
NIB-067	ニンジン	中国吉林省	原形	2009年	栽培品
NIB-076*	ニンジン	中国吉林省	刻み	2009年	栽培品 生干し (主に使用)
NIB-077*	ニンジン	中国吉林省	刻み	2009年	栽培品 湯通し
NIB-093	ニンジン	中国遼寧省	原形	2009年	
NIB-112	ニンジン	中国吉林省	原形	2010年	栽培品 湯通し人参
NIB-113	ニンジン	中国吉林省	原形	2009年	栽培品 紅参
NIB-114*	ニンジン	中国吉林省	刻	2007年	栽培品 生干 (主に使用)
NIB-149	ニンジン	中国吉林省	原形	2008年	
NIB-170	ニンジン	中国吉林省	原形	2009年	栽培品 (主に使用)
NIB-183	ニンジン	中国吉林省	原形	2010年	生干人参
NIB-184	ニンジン	日本福島県	原形	2009年	湯通人参

* 刻み試料については、2検体ずつ解析した。

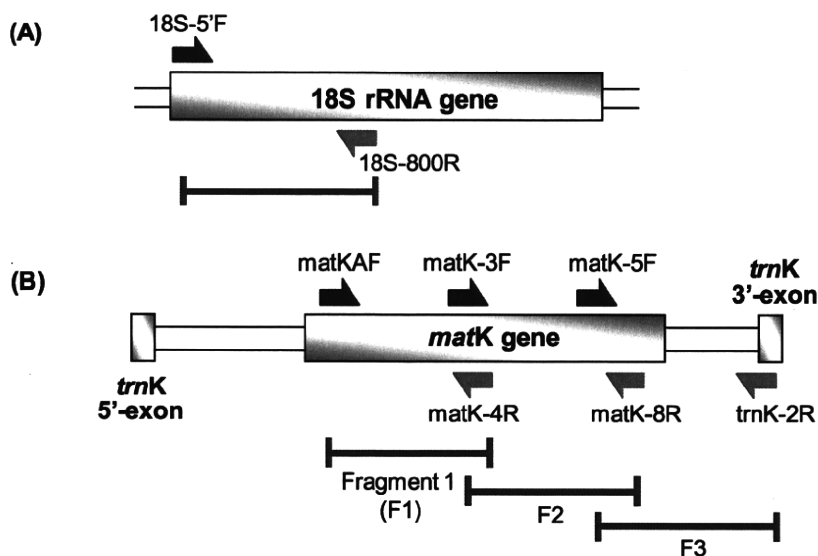


Fig. 1 PCR に使用した primer の各領域における位置及び増幅フラグメント

Table 1-2 ニンジン市場品試料の 18S rRNA 遺伝子の 5'側部分領域の塩基配列と GenBank に登録された *Panax* 属植物 4 種の同領域の配列との比較

	191	496	502	712
<i>Panax ginseng</i> (D83275)	T	TGATTCA		G
<i>P. japonicus</i> (Japan) (D84100)	*	*C***G*		T
<i>P. quinquefolius</i> (D85172)	*	*C*G*G*		*
<i>P. notoginseng</i> (D85171)	T	*C*G*G*		*
NIB-011, 012, 040, 056, 061, 067, 076, 077, 093, 112, 113, 114, 149, 170, 183, 184	*	*****		*

Table 1-3 ニンジン市場品試料の葉緑体 *trnK* イントロンの 3'側部分領域の塩基配列と GenBank に登録された *Panax* 属植物 4 種の同領域の配列との比較

	917	977	1292	1367	1604	1731	1966	2361	2375	2391	2408
<i>Panax ginseng</i> (AB087999)	T	G	A	T	A	C	A	ATCCTTTTTTTATAT		TAGGATGTAGGATGTAGT	
<i>P. japonicus</i> (Japan) (AB088000)	*	*	*	*	*	*	*	*****T***		*****-----*	
<i>P. quinquefolius</i> (AB088001)	A	*	*	*	*	*	*	*****		*****	
<i>P. notoginseng</i> (AB088002)	*	T	*	C	C	A	G	*****_****		*****-----*	
NIB-011, 012, 040, 056, 061, 067, 076b, 093, 112, 113, 114, 149, 170, 183	*	*	*	*	*	*	*	*****		*****	
NIB-076a, 077a, 077b, 184	*	*	M	*	*	*	*	*****		*****	

2. ショウキョウ

Table 2 生薬「ショウキョウ」の市場品

試料番号	管理番号	生薬名	産地	形態	入手年
Sho-1	NIB-008	ショウキョウ	雲南省	全形	2010
Sho-2	NIB-039	ショウキョウ	雲南省	全形	2009
Sho-3	NIB-055	ショウキョウ	雲南省	全形	2010
Sho-4	NIB-060	ショウキョウ	雲南省	刻み	2008
Sho-5	NIB-075	ショウキョウ	雲南省	刻み	2006
Sho-6	NIB-091	ショウキョウ	雲南省	スライス	2009
Sho-7	NIB-110	ショウキョウ	雲南省	刻み	2010
Sho-8	NIB-147	ショウキョウ	雲南省	全形	2010
Sho-9	NIB-169	ショウキョウ	雲南省	全形	2009
Sho-10	NIB-179	ショウキョウ	雲南省	全形	2010

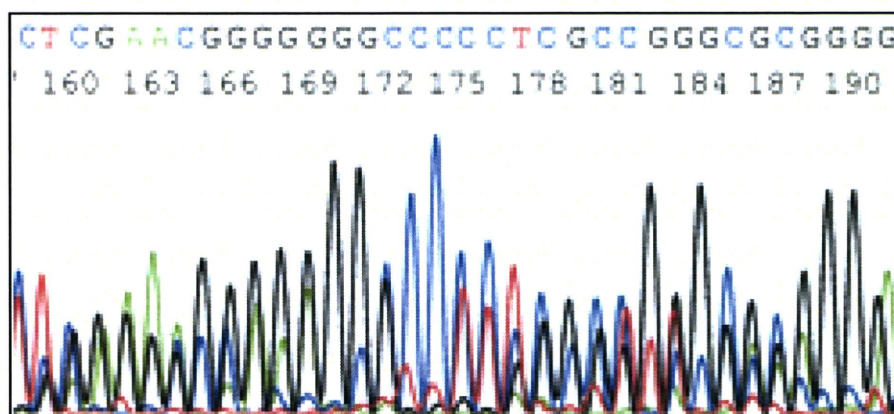


Fig. 2-1 核 rDNA ITS 領域の配列の生データ

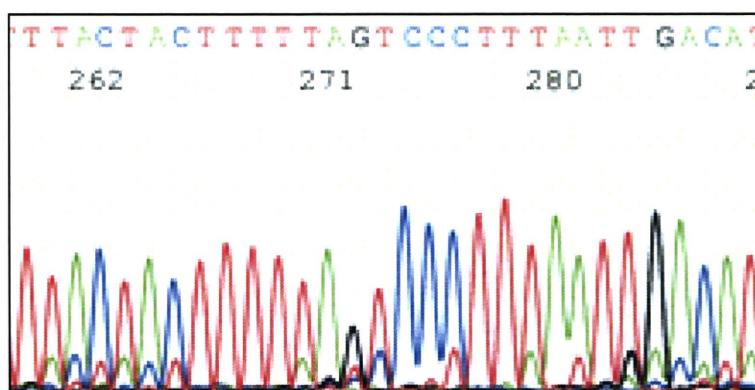


Fig. 2-2 葉緑体 DNA *trnL-F* IGS 領域の塩基配列の生データ
メジャーなピークの一塩基前に同一塩基のマイナーピークが認められる。

All samples	G A T T G G A T T G A G C C T T A G T A A G G A A C C T G C T A A G T G G T A	40
Z. officinale Bentong	- - G N . T G C . G . . . G C C T A . . A . . G . A	36
Z. officinale Bara	. N C . A A T . A . C . A . - C T T G T	37
Z. officinale Muda	- T N G . C . G C A T . . . A C C T A T . A	37
Z. officinale Padi	. . G N . C G A G A C . A . G C G T G C C . . T . G G C	40
All samples	A C T T C C A A A T T C A G A - G A A A C C C T G G A A T T T A A A A T G G G C	79
Z. officinale Bentong	75
Z. officinale Bara	76
Z. officinale Muda	76
Z. officinale Padi A	80
All samples	A A T C C T G A G C C A A A T C C T T A G T T T T A T C A A A C T A G A A T A A	119
Z. officinale Bentong	115
Z. officinale Bara	116
Z. officinale Muda	116
Z. officinale Padi	120
All samples	A A A A A A G G A T A G G T G C A G A G A C T C A A T G G A A G C T G T T C T A	159
Z. officinale Bentong	155
Z. officinale Bara	156
Z. officinale Muda	156
Z. officinale Padi	160
All samples	A C G A A T G A A G T T G A C T A C G T T T C G T T G G T A G T T G G A A T C C	199
Z. officinale Bentong	195
Z. officinale Bara	196
Z. officinale Muda	196
Z. officinale Padi	200
All samples	G T C T A T C A A A A T T A C A G A A A A G A T G T T C C T A T A T A C C T A A	239
Z. officinale Bentong	235
Z. officinale Bara	236
Z. officinale Muda	236
Z. officinale Padi	240
All samples	T A C A T A C G T A T A C A T A C T G A C A T A T C A A A T C A A A C G A T T A	279
Z. officinale Bentong	275
Z. officinale Bara	276
Z. officinale Muda	276
Z. officinale Padi	280
All samples	A T C A T G A C T C G A A T C C A T T A T A T T A T A T G A A T A A T T A T A A	319
Z. officinale Bentong	315
Z. officinale Bara	316
Z. officinale Muda	316
Z. officinale Padi	320
All samples	T A T G A A A A A T T C A G A A T T A G A G T T A T T G T G A A T C C A G T C C	359
Z. officinale Bentong	355
Z. officinale Bara	356
Z. officinale Muda	356
Z. officinale Padi	360
All samples	A A T G G A A G T T G A A A G A A G A A T T G A A T A T T C A A T T C A A T T A	399
Z. officinale Bentong	395
Z. officinale Bara	396
Z. officinale Muda	396
Z. officinale Padi	400
All samples	T T A A A T C A T T C A T T C C A G A G T T T G A T A G A T C T T T T G A A A A	439
Z. officinale Bentong	435
Z. officinale Bara	436
Z. officinale Muda	436
Z. officinale Padi	440
All samples	A C T G A T T A A T T G G A C G A G A A T A A A G A G A G A G T C C C A T T C T	479
Z. officinale Bentong	475
Z. officinale Bara	476
Z. officinale Muda	476
Z. officinale Padi	480
All samples	A C A T G T C A A T A C C G A T A A C A A T G A A A T T T A T A G T A A G A G G	519
Z. officinale Bentong	515
Z. officinale Bara	516
Z. officinale Muda	516
Z. officinale Padi	520

Fig. 2-3 葉緑体 DNA *trnL* intron 領域の塩基配列の多重整列