

したもの) に Fast Link DNA ligation kit (EPICENTRE Biotechnologies) を用いてプラントエンドクローニングし、DH5  $\alpha$  z-competent cells (ZYMO RESEARCH) に導入した。コロニーPCRによる目的ベクター導入確認後、illustra plasmid Prep Mini Spin Kit (GE healthcare) を用いてプラスミドを抽出し、PCR 及び制限酵素処理による確認を行った後、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。

#### ・イントロン6・7 PCR 条件

PCR 反応液組成: KOD-plus (Toyobo) 0.5  $\mu$  L、ddH<sub>2</sub>O 34.5  $\mu$  L、10 x KOD-plus buffer 5  $\mu$  L、dNTP 5  $\mu$  L、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$  L、プライマー (センス、アンチセンス) 各 1  $\mu$  L、ゲノム DNA 1  $\mu$  L。

PCR 条件: 94°C 2 min  $\rightarrow$  (94°C 30 sec.  $\rightarrow$  58°C 30 sec.  $\rightarrow$  68°C 1 min 30 sec) x 40 cycle  $\rightarrow$  68°C 5 min  $\rightarrow$  4°C  $\infty$

プライマー配列は下記のとおり。

Forward primer (CYP88D6-S1179)

5'-gtgctaattgggcaagagc-3'

Reverse primer (CYP88D6-A1420)

5'-agctggtaacgtgacattctgg-3'

#### PCR-RFLP による識別①

上記と同条件にて、KODによるPCRを行った後、PCR産物のカラム精製物 5  $\mu$  L に対して *HincII* を 1  $\mu$  L 加え、37°C で 1.5 時間反応した。反応物を 1% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、切断パターンの違いについて検討した。

#### PCR-RFLP による識別②

イントロン7の内部に GuTS71-08 系統を特異的に増幅可能なプライマーを設計し、カンゾウ各種ゲノム DNA をテンプレートに GoTaq (Promega) による PCR を行った。得られた PCR 産物 10  $\mu$  L に対して、1  $\mu$  L の *HincII* を加えて、1.5 時間処理し、1% アガロ

ースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、切断パターンの違いについて検討した。

#### ・PCR 条件

PCR 反応液組成: GoTaq Master Mix (Promega) 10  $\mu$  L、ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$  L、プライマー (センス、アンチセンス) 各 1  $\mu$  L、ゲノム DNA 1  $\mu$  L。  
PCR 条件: 94°C 2 min  $\rightarrow$  (94°C 30 sec.  $\rightarrow$  56°C 30 sec.  $\rightarrow$  72°C 30 sec) x 30 cycle  $\rightarrow$  72°C 5 min  $\rightarrow$  4°C  $\infty$

プライマー配列は下記のとおり。

Forward primer (CYP88D6intron7Fw)

5'-tagtgccttaagcacatgg-3'

Reverse primer (CYP88D6intron7Rv)

5'-tcatcggtataattgtagcactc-3'

### C. 研究結果

#### SQSイントロン領域を用いたウラルカンゾウ優良系統の遺伝子識別

[カンゾウ属植物 SQS エキソン1-エキソン3の塩基配列情報の取得]

スクアレン合成酵素(SQS)は2分子のフェルネシル2リン酸より炭素数30の直鎖状のスクアレンを合成する、グリチルリチン酸等のトリテルペン配糖体のみならず、植物ステロールの生合成にも関わる重要な酵素である。シロイヌナズナにおいては AtSQS1 (GenBank accession No. AF004560) および AtSQS2(AF004396)の2種の相同遺伝子が見出されており、これらのゲノムDNA構造(エキソン・イントロン構造)はイントロンの挿入されている位置がよく保存されている。このエキソン・イントロン構造は他の植物種でも保存されていることが知られており、カンゾウ属の SQS においてもその構造は保存されていると推定され、エキソン1-エキソン3の領域を PCR で増幅し、とくにイントロン領域の多型情報を収集し、系統間の遺伝子識別が可能か否か検討することとした。

カンゾウ属植物 SQS 増幅用プライマーを用い、カンゾウ属植物2種、GuTS71-08 IV2 (試料番号①)、Gu2-3-2 (試料番号⑦)より調製したゲノムDNAを鋳型にPCRを行っ

た結果、GuSQS1-1S + 282A の組み合わせで約 1.1kbp と約 0.6 kbp の 2 種の増幅産物が得られた。GuSQS1-61S+282A では約 550 bp、GuSQS1-157S + 282A では約 500 bp のほぼ単一な増幅産物が得られた (図 2)。

GuSQS1-1S+282A で得られた 2 種の増幅産物はそれぞれが SQS1 と SQS2 に対応すると考えられたので、これらを個別にクローニング&シーケンシングに供した。その結果、PCR 増幅の約 1.1 kbp のバンドは GuSQS2 と相同性が高く、また、約 0.7 kbp のバンドは GuSQS1 と相同性が高いことが判明し、各遺伝子のゲノム DNA 配列であると推定された。

GuTS71-08 系統からは、GuSQS1 ホモログについては、1b-3、4b-4 type の 2 種の配列が、また、GuSQS2 ホモログについては、1a-4、4a-1 type の 2 種の配列が見出された (図 3、4)。一方、Gu2-3-2 系統からは、GuSQS1 ホモログについては、4b-4、4b-6 type の 2 種が、GuSQS2 ホモログについては 4a-1 type の 1 種のみが見出された (図 3、4)。

各 type の出現頻度は GuSQS1 ホモログでは、GuTS71-08 では 1b-3: 4b-4: 4b-6 = 6: 2: 0 であり、Gu2-3-2 では 1b-3: 4b-4: 4b-6 = 0: 4: 2 であった。また、GuSQS2 ホモログでは GuTS71-08 では 1a-4: 4a-1 = 6: 2 であり、Gu2-3-2 では 1a-4: 4a-1 = 0: 7 であった。

[識別用プライマーを用いたウラルカンゾウ (GuTS71-08, Gu2-3-2) の識別]

GuSQS1、GuSQS2 各ホモログをもとに設計した識別用プライマーセット 2 種を使用し、GuTS71-08 IV2 および Gu2-3-2 各植物試料由来ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。

その結果、その結果、GuSQS2 S1 + A1 のプライマーセットでは GuTS71-08 では約 250 bp の増幅産物が得られたのに対し、Gu2-3-2 では増幅産物が検出されず、すなわち両者の識別が可能であった (図 5)。また、GuSQS1 S1 + A1 のプライマーセットでは増幅産物のサイズが GuTS71-08 の方が Gu2-3-2 よりも若干大きく、そのサイズの差異で識別が可能で

あった (図 5)。

#### CYP88D6イントロン領域を用いたカンゾウ属植物の遺伝子識別

CYP88D6は、グリチルリチン合成において  $\beta$ -amyrin の 11 位の酸化を触媒し、非グリチルリチン生産性のカンゾウでは、相同遺伝子の酵素活性がかなり低いことが報告されており (澤井ら、第 27 回植物細胞分子生物学会要旨集)、グリチルリチン合成において CYP88D6 が重要な機能を担っていることが示唆されている。また、CYP88D6 が属する CYP88D サブファミリー遺伝子はマメ科植物に特異的に見出される遺伝子群であり、マメ科で特異的に進化し、トリテルペンサポニンの代謝に関与している可能性が考えられている。このうち、ゲノム情報が公開されているタルウマゴヤシ、ミヤコグサの CYP88D 遺伝子では、エキソン・イントロン構造がよく保存されていた。そこで、これらゲノム DNA 情報より、カンゾウの CYP88D6 遺伝子のエキソン・イントロン構造を予測し、データベース上の CYP88D6 遺伝子のコーディング配列 (AB433179.1) をもとに、イントロン 6 及び 7 を含む領域を増幅するプライマーを設計し、試料間の CYP88D6 イントロン領域の塩基配列変異に着目し識別を試みた。

GuTS71-08 IV2 及び Gu2-3-2 について、CYP88D6 のイントロンを含む部分を増幅するプライマーを設計し、PCR 及び配列解析を行った結果、イントロン 6 に関しては、111 ~ 131bp の繰り返し回数のバリエーションに富む結果を得たが、系統に特異的ではなく識別は難しいと考えられた。一方、イントロン 7 では、大きく分けて 2 種類の異なる配列 (intron 7-a: 771 ~ 776 bp、intron 7-c: 649/676 bp) を得た。このうち、intron 7-c は、GuTS71-08 に特異的であった (図 8)。さらに、本特異的配列は、intron 7-a には認められない *HincII* サイトを含んでいたことから (図 8)、PCR 増幅産物の *HincII* 処理を行った。カラム精製した PCR 増幅産物を制限酵素処理した

結果、GuTS71-08由来のPCR産物特異的に、約600 bp及び500 bpの制限酵素断片を得た(図6)。

そこでより広範な系統のイントロン7配列の多型について検討するため、GuTS71-08:6系統(IV2, i, C2, C5, IV1, #11)、Gu2:6系統(2-3-2, 2-3-2-i, 2-1-3(1), 2-2-1(1), 2-3-2(B), 2-5-2)、圃場のウラルカンゾウ(Gu)、スペインカンゾウ(Gg)及びロシアカンゾウ(Ggg)についてPCR-RFLPを行った。この際、より簡便にPCR-RFLPを行うため、イントロン7内部にGuTS71-08系統を特異的に増幅可能なプライマーを設計し、GoTaq(Promega)によるPCRを行った後、PCR産物を直接HincII処理した。その結果、増幅・切断パターンは3種に分けることができた(1.GuTS71-08①;2.GuTS71-08②、Gg、Ggg;3. Gu、Gu2)。すなわち、1. GuTS71-08系統のうち3系統(グループ①: GuTS71-08 IV2, i, C2)では目的サイズ(362 bp)に増幅産物を得、HincIIにより約200 bpに切断された。また、2. GuTS71-08の残りの3系統(グループ②: GuTS71-08 C5、#11、IV1)、及び、スペインカンゾウ(Gg)、ロシアカンゾウ(Ggg)では、予想サイズよりも約100bp大きい増幅産物が認められ、この増幅産物はHincIIで切断されなかった。また、3. Gu2系統及び圃場のウラルカンゾウ(Gu)は、増幅産物を与えなかった(図7)。

次に、GuTS71-08 IV2、i、C2と増幅サイズの異なっていたGuTS71-08C5、IV1、#11、スペインカンゾウ、ロシアカンゾウ、また、北海道医療大学系統、北海道農業試験所系統とは由来の全く異なるウラルカンゾウ系統として甘草屋敷系統(KY)、及び、グリチルリチン非生産性の種としてイヌカンゾウ(Gp)について、イントロン7配列についてより詳細な解析を行うため、イントロン6及び7を増幅できるプライマーを用いてKOD plusによるPCRを行い、その塩基配列を解析した(図8)。塩基配列解析の結果、GuTS71-08グループ①は、Gu2系統・圃場のウラルカンゾウの配列とほぼ等しい

intron7-a配列、Gu・Gu2には認められないスペインカンゾウ、ロシアカンゾウと相同性を有するintron7-c配列(Gg、Ggg、GuTS71-08グループ②)の同様の配列に比べ、100 bpほどの欠失があり、HincIIサイトを持つ(図8)の2種類を有するのに対し、GuTS71-08のグループ②では、Gu・Gu2の配列とほぼ等しいintron7-a配列、Gg、Gggと相同性を有するintron7-c配列に加え、甘草屋敷(KY)系統と非常に高い相同性を持つintron7-b配列の計3種類のイントロン7配列を有することが明らかとなった(図9)。

#### D. 考察

##### SQSイントロン領域を用いたウラルカンゾウ優良系統の遺伝子識別

GuTS71-08、Gu2-3-2両系統のSQSゲノムDNA特異的なプライマーにより、両者のPCRによる識別が可能なが示されたが、本プライマーセットで他のカンゾウ属植物を含む他の系統の識別が可能か否かは、他の試料についてもPCRを試み交叉反応性を確認する必要がある、今後の課題である。

##### CYP88D6イントロン領域を用いたカンゾウ属植物の遺伝子識別

グリチルリチン生合成経路において、 $\beta$ -amyrinの11位の酸化を触媒するCYP88D6のイントロン配列によるウラルカンゾウの優良系統の迅速かつ容易な識別法の開発を目指した結果、イントロン7の配列のPCR増幅産物をHincII処理した際に得られる断片長の多型により、PCR-RFLP法により、ウラルカンゾウの優良系統GuTS71-08 IV2とGu2-3-2の簡便な識別法の開発に成功した。また、イントロン7配列の多型は、GuTS71-08 IV2系統をGuTS71-08 IV1、C5、#11及びGu2系統、圃場のウラルカンゾウ(Gu)、ウラルカンゾウ甘草屋敷系統(KY)、スペインカンゾウ、ロシアカンゾウ、イヌカンゾウを識別可能であることを示した。一方で、GuTS71-08 IV2系統とC2系統の識別は、現時点で数塩基の変異が入ったC2系統特異的配列が認められていることからPCRダイレクトシー

ケンス等による識別の可能性はあるが、より簡便かつ迅速な識別を行うためには、他のイントロン配列等においてさらなる多型を見出し、その多型を用いたあるいは、それらを組み合わせた識別法の確立が必要であると考えられる。

また、イントロン7配列の相同性の解析から、Gu、Gu2、KY各系統が、それぞれほぼ単一の塩基配列のみを持つのに対し、GuTS71-08系統は、Gu、Gu2各系統とほぼ同一の配列に加え、スペインカンゾウ(Gg)と低い相同性を示す配列や、甘草屋敷系統(KY)とほぼ同一の配列を持つことから、他の遺伝子についても調べる必要があるが、これら系統の植物との交配の可能性を示唆するものと考えられた。

#### E. 結論

グリチルリチン生合成経路の鍵酵素遺伝子2種のゲノムDNA塩基配列の多型を利用したウラルカンゾウ優良系統の識別を試みた。

その結果、スクアレン合成酵素SQS1及びSQS2のゲノムDNA配列、とくにSQS2のイントロン領域の配列の多型情報を利用した場合、PCR増幅産物の有無によりGuTS71-08 IV2、Gu2-3-2両系統の識別が可能で、カンゾウ属植物優良系統の系統間識別に有用であることが示された。

同様に、 $\beta$ -amyrinの11位の酸化を触媒するCYP88D6のイントロン6及び7を含む部分を増幅するプライマーを設計し、PCR及び配列解析を行った結果、イントロン7の配列の多型により、PCR-RFLP法により、簡便にウラルカンゾウのGuTS71-08 IV2とGu2-3-2を識別できることが示された。

さらに、より広範な系統の識別可能性を検討するため、GuTS71-08系:6系統、Gu2系:6系統、及び、圃場のウラルカンゾウ(Gu)、スペインカンゾウ(Gg)、ロシアカンゾウ(Ggg)について、イントロン7の内部にGuTS71-08系統由来配列を特異的に増幅可能なプライマーを設計し、PCR-RFLPを行ったところ、GuTS71-08系統をGu2系統及びGu、Gg、Gggと区別でき、また、GuTS71-08系統を2グループに分けることが可能であった。

さらにウラルカンゾウの別系統(KY)、及び、グリチルリチン非生産性のイヌカンゾウ(Gp)を含めて、イントロン7配列のシークエンスを行った結果、GuTS71-08 IV2特異的なイントロン7配列は、KY、Gpのイントロン7配列とも区別が可能であることを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

乾貴幸、河野徳昭、柴田敏郎、川原信夫、吉松嘉代

「薬用植物優良品種育成を指向した遺伝子鑑別法の開発」

日本薬学会第131年会(2011.3.31, 静岡)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号 特願2010-250700

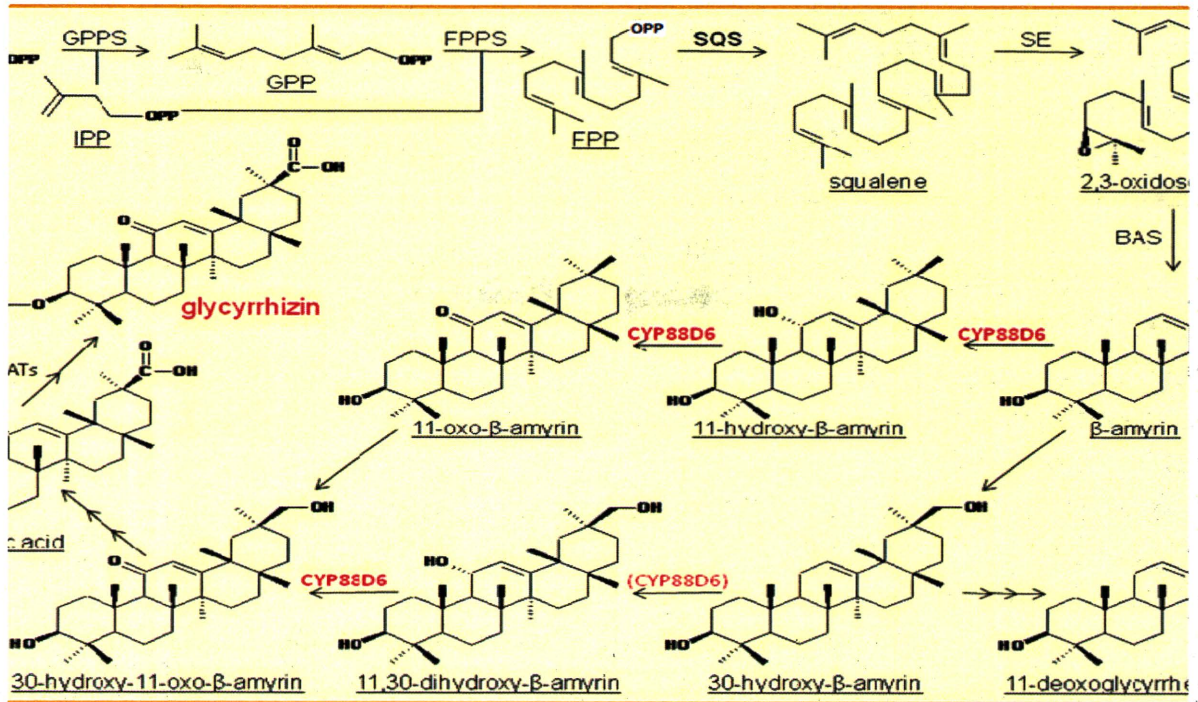
発明者 吉松嘉代、河野徳昭、乾 貴幸、千田浩隆

特許出願人、識別番号(団体名及び弁理士事務所)鹿島建設株式会社(000001373)代理人:丹羽俊輔(100129300)

発明の名称 カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法

出願日 平成22年11月9日

(図表)



DMAPP, dimethylallyl diphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; GPP, geranyl pyrophosphate; GPPS, GPP synthase; FPP, Farnesyl diphosphate; FPPS, FPP synthase; SQS, squalene synthase; SE, squalene epoxidase; BAS, β-amyrin synthase; UGA's, UDP-glucuronosyltransferases.

図1. カンゾウ属植物におけるグリチルリチン生合成経路  
 図中黒太字のSQS及び赤字のCYP88D6を解析対象とした

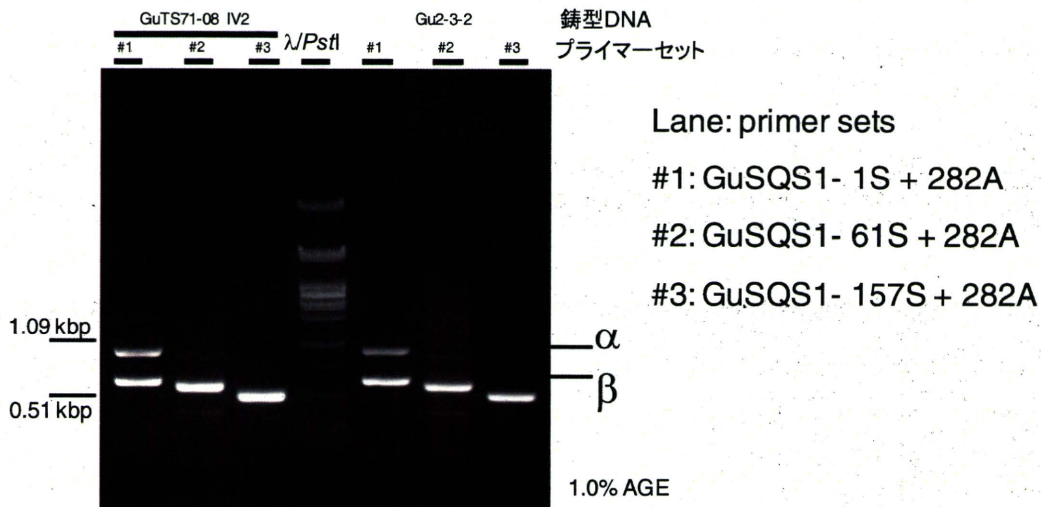


図2. ウラルカンゾウGuTS71-08 IV2及びGu2-3-2各系統より調製した  
 ゲノムDNAを鋳型としたエクソン1-エクソン3領域の増幅結果  
 各レーン#1のバンドα及びバンドβについてクローニング&シーケンシングを行った。

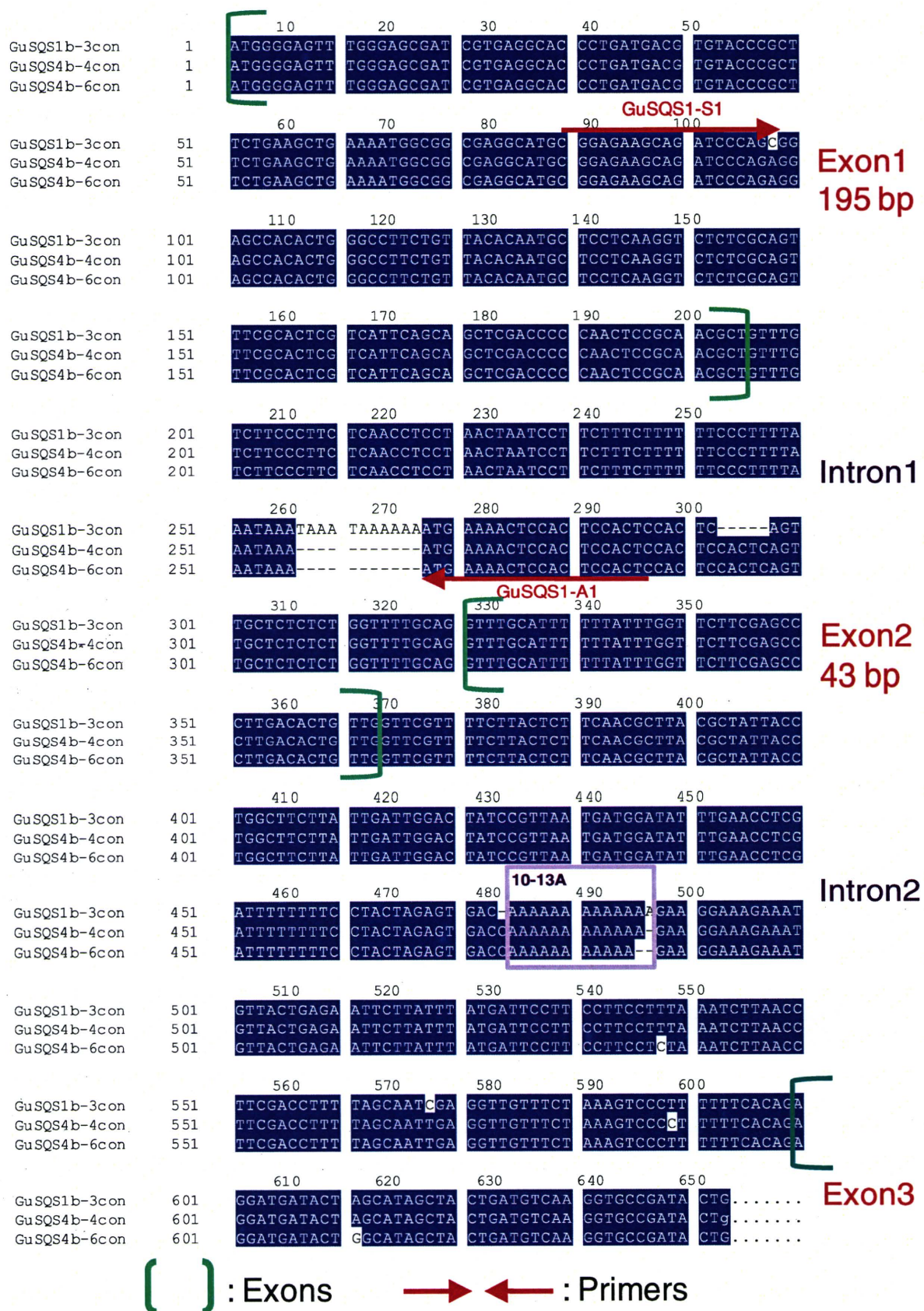


図3. ウラルカンゾウGuTS71-08IV2系統及びGu2-3-2系統より取得したSQS1相同遺伝子 (図2のバンドβに相当) 3種のエクソン1-エクソン3領域の塩基配列アラインメント



図4. ウラルカンゾウGuTs71-08IV2系統及びGu2-3-2系統より取得したSQS2相同遺伝子 (図2のバンドαに相当) 2種のエキソン1-エキソン3領域の塩基配列アラインメント

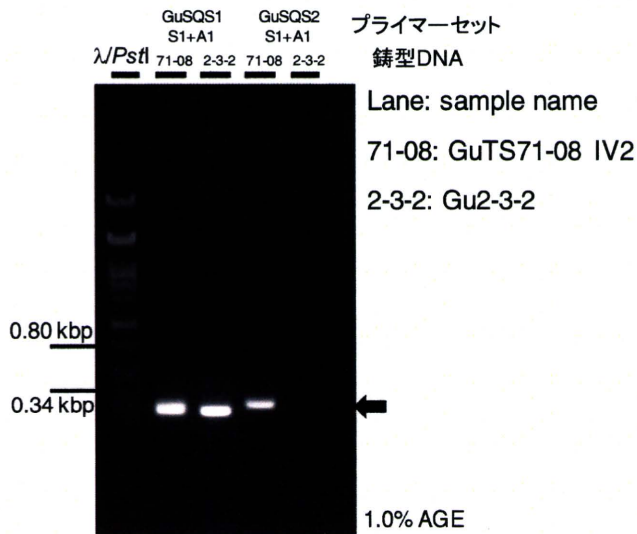


図5. S1S1及びS2S2特異的プライマーによるGuTS71-08 IV2系統とGu2-3-2系統の識別  
 GuS1 S1+A1プライマーセットでは増幅産物のサイズの差により、また、GuS2 S1+A1プライマーセットでは増幅産物の有無により両系統の識別が可能であった。

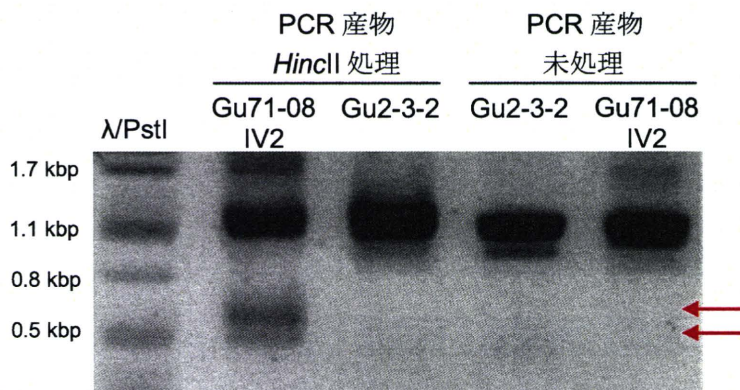


図 6. PCR-RFLP による GuTS71-08 IV2 系統と Gu2-3-2 系統の識別結果

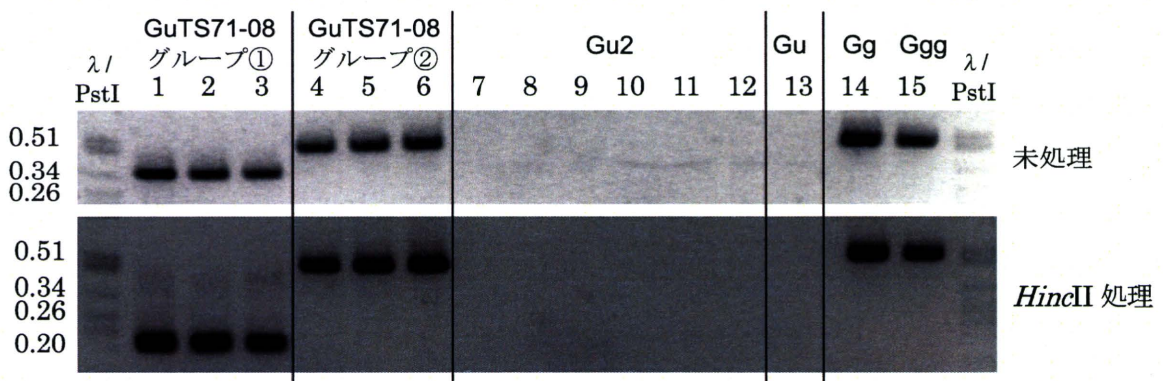


図 7. GuTS71-08IV2 特異的配列に対して設計したプライマーを用いたイントロン 7 配列の増幅  
 上段は PCR 増幅産物、下段は PCR 産物を *HincII* 処理した PCR-RFLP の結果を示す。





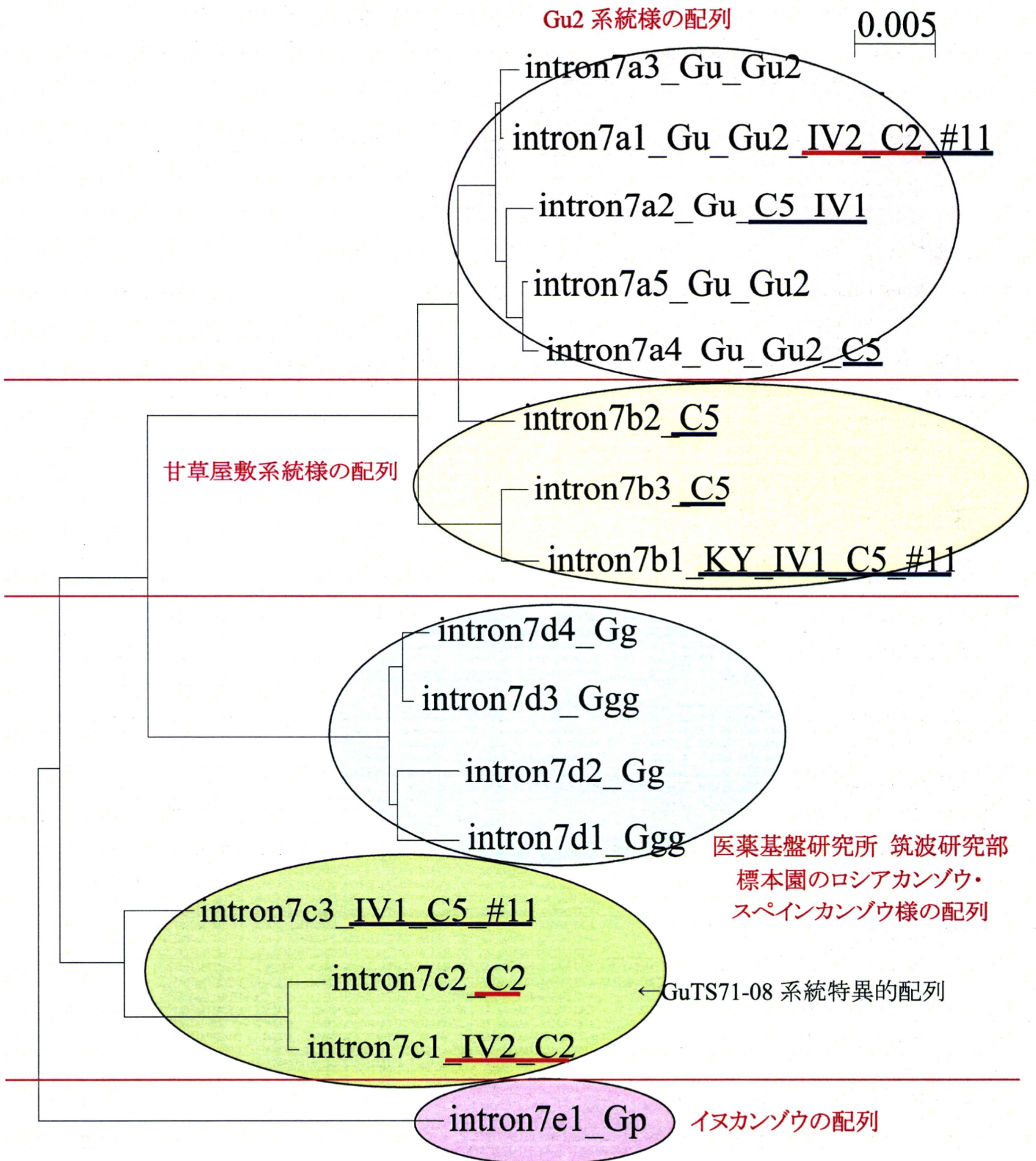


図 9. ウラル・スペイン・ロシア・イヌカンゾウのイントロン 7 配列の分子系統樹 (ClustalX2 で作製)  
 Gu: ウラルカンゾウ(筑波研究部圃場栽培)、KY: ウラルカンゾウ甘草屋敷系統、  
 Gg: スペインカンゾウ、Ggg: ロシアカンゾウ、Gp: イヌカンゾウ、Gu2: Gu2-3-2、  
 IV1, IV2, C2, C5, #11: それぞれ GuTS71-08-IV2, GuTS71-08-C2, (グループ①)  
GuTS71-08-IV1, GuTS71-08-C5, GUTS71-08-#11(グループ②)

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）  
優良形質を持った薬用植物新品種の育成およびそれら種苗の安定供給体制構築のため  
の保存，増殖に関する基盤的研究（H22-創薬総合-指定-015）

分担研究報告書

分担研究課題：DNA塩基配列情報に基づく薬用植物の品種識別法の開発に関する研究

分担研究者 菱田 敦之 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部 室長

協力研究者 林 茂樹 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部 特任研究員

要旨 DNA塩基配列情報に基づくハトムギ「北のはと」の品種識別法を開発するため，本年度は国内で流通，栽培されているハトムギを収集し，その玄穀からの鋳型DNA調製法および種間・品種識別に汎用される葉緑体DNAの5領域に対する増幅の適否を検討した．材料の収集では，ハトムギ「北のはと」の他，外国産7系統，国内産10系統の合計17系統を収集した．ハトムギ種子の種皮を除去した玄穀から鋳型DNAを調製する方法は，玄穀をビーズ式細胞破碎機で破碎して市販キットによりDNAを抽出する方法であり，玄穀 20 mg 程度から 3.8 ~ 50.1 ng/ $\mu$ L 濃度のDNA溶液が調製された．ハトムギ「北のはと」および収集したハトムギから7系統を選び，これらのDNA溶液を鋳型とし，種間および品種識別法に汎用される葉緑体DNAの5領域の増幅を試みた結果，*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域，*atpF-atpA*介在配列領域および*trnS-trnT*領域では供試した全ての試料で増幅が確認され，*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exonでは，8系統中ハトムギ「北のはと」を含む5系統で増幅が確認された．*trnD-trnT*領域では増幅が認められなかった．ハトムギ「北のはと」の鋳型DNAから増幅した*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域の配列を決定し，その塩基長は 471 bp であった．*atpF-atpA*介在配列領域では 273 bp であった．*trnS-trnT*領域では 1198 であった．

以上の結果から，玄穀から調製された鋳型DNA溶液は，PCR法による目的領域の増幅や塩基配列の決定に使用できる高品質な試料であることが示された．PCR法による結果から目的領域および系統による増幅の適否が異なることなり，*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exon領域に系統間の多型配列が存在する可能性が示唆された．

#### A. 研究目的

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部（北海道名寄市）では，従来，栽培品種がほとんどなかった薬用植物について薬用を目的とした品種を育成し，3種12系統の品種を育成した．シャクヤクでは，1996年にシャクヤク「北宰相」（品種登録番号第5005号），2009年にシャクヤク「べにしずか」（品種登録出願第24217号）を育成した．ハトムギでは2007年に寒冷地でも生育が可能な極早生のハトムギ「北のはと」（品種登録番号第15003号），2009年にグリチルリチン含量に特徴があるカンゾウ9系統（特願2009-200179）を育成した．ハト

ムギ「北のはと」は，2008年から商業栽培が始まり，ハトムギ「北のはと」を原料とした健康食品や化粧品が販売され，今後，菓子類の原料への利用が期待されている．ハトムギ「北のはと」の国内市場の拡大に際して「北のはと」を標榜した類似品や粗悪品の流通が危惧され，消費者に安全な原料を供給するためには，原料用に調製された加工品でも品種が識別できる技術が必要である．

そこで本研究は，弊所で育成されたハトムギおよびシャクヤクなどについて，生薬や加工品のように形態的な識別が困難な場合でも正確に識別ができる DNA 塩基配列

に基づく品種識別法を開発することが目的である。

平成 22 年度の研究では、ハトムギ「北のはと」の品種識別法を開発する目的で、ハトムギ「北のはと」および国内外の流通品 17 系統を収集した。収集し試料について種子から DNA 抽出法を検討し、得られた DNA 試料の中から 8 系統を実験材料として、種間および品種間の識別に汎用される葉緑体 DNA の遺伝子および遺伝子間配列の 5 領域の増幅を試みた。さらに、増幅された領域について、その一部の配列を決定した。

## B. 研究方法

**供試材料：**北海道研究部に保存されているハトムギ「北のはと」*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman.) Stapf. ‘KITANOHATO’ および国内で流通するハトムギ 17 系統（表 1）。なお試料の形状は種子であった。

**鋳型DNAの調製：**種子 1 粒をチャック付きビニル袋に入れ、ハンマーで種子を割り、種皮を除去して玄穀を取り出した。20 mg 程度の玄穀は 2 個のジルコニア製ビーズ（直径 5 mm）とともに、2 mL のサンプルチューブ TM-625（（株）トミーメディコ製）に入れ蓋をした後、液田窒素下で十分に冷却した。冷却した試料入りサンプルチューブは、ビーズ式細胞破碎机 Micro Smash MS-100R（（株）トミー精工）にセットし、装置は冷却条件、回転数 4000 rpm、時間 60 秒間で玄穀を粉碎した。この条件で粉碎できない場合は、再び液体窒素下で十分に冷却し、同じ条件で粉碎した。粉碎した玄穀は、DNA の抽出材料として DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により鋳型 DNA を調製した。抽出した DNA 溶液の濃度は、NanoDrop ND-1000 Spectro-photometer (Thermo Fisher Scientific K.K.) により測定した。

**目的領域の増幅：**植物の種および品種の識別で汎用される葉緑体 DNA の次の領域を目的領域 (target region) とした。(1) *rpl16* および *rpl16-rpl14* 介在配列領域、(2) *atpF-atpA* 介在配列領域、(3) *trnS-trnT* 領域、(4) *trnD-trnT* 領域、(5) *trnL* (UAA) 5' exo-*trnL*

(UAA) 3' exon, それぞれの領域に対応したプライマーセット（表 2）を用い PCR 法で特異的に増幅した。(1)~(4) では、PCR 反応液組成は、10  $\mu$ L の Premix Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ株式会社) に、1  $\mu$ L の鋳型 DNA, 終濃度が 0.2  $\mu$ M の各プライマーを加え、超純水を加えて液量を 20  $\mu$ L とした。PCR 反応条件は、(98 $^{\circ}$ C で 10 秒, 55 $^{\circ}$ C で 30 秒, 72 $^{\circ}$ C で 90 秒) を 30 サイクル, さらに 72 $^{\circ}$ C で 7 分間反応させた。(5) では、PCR 反応液組成は、2  $\mu$ L の PrimeSTAR GXL Polymerase (タカラバイオ株式会社), 10  $\mu$ L の 5xPCR Buffer, 終濃度が各 0.2  $\mu$ M の dNTPs, 1  $\mu$ L の鋳型 DNA, 終濃度が 0.2  $\mu$ M の各プライマーを加え、超純水を加えて液量を 50  $\mu$ L とした。PCR 反応条件は、(98 $^{\circ}$ C で 10 秒, 55 $^{\circ}$ C で 15 秒, 68 $^{\circ}$ C で 150 秒) を 30 サイクル, さらに 68 $^{\circ}$ C で 7 分間反応させた。PCR 終了後に 1.2% アガロースゲルを用いた電気泳動法により目的領域の増幅を確認した。

**塩基配列の決定：**塩基配列の決定はダイレクトシーケンス法で行った。ハトムギ「北のはと」の鋳型 DNA から増幅した *rpl16* および *rpl16-rpl14* 介在配列領域、*atpF-atpA* 介在配列領域および *trnS-trnT* 領域の PCR 産物について、PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製した PCR 産物を鋳型とし、BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies K.K.) を用いてサイクルシーケンス法を行い目的領域の塩基配列を決定した。

## C. 研究結果

供試材料として、ハトムギ「北のはと」の他、国内外で流通、栽培されているハトムギについて、外国産 7 系統、国内産 7 系統および弊所で育成または保存されている 3 系統を収集した（表 1, 図 1）。

ハトムギ「北のはと」を含めた 18 系統について市販キットを用いて DNA を抽出した結果、約 20 mg の玄穀を抽出材料に用いると、3.8 ~ 50.1 ng/ $\mu$ L 濃度の DNA が抽出できることが示された。

ハトムギ「北のはと」および収集したハ

トムギから7系統を選び、これらの鋳型DNAを用いて、葉緑体DNAの目的領域の増幅を試みた。その結果、*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域では、供試した全ての系統で特異的な増幅が予測した 550 bp 付近に認められた(図2, 表3)。*atpF-atpA*介在配列領域では、供試した全ての系統で特異的な増幅が予測した 300 bp 付近に認められ、*trnS-trnT*領域では、供試した全ての系統で特異的な増幅が 1200 bp 付近に認められた。*trnD-trnT*領域では供試した全ての系統で増幅が認められなかった。

*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exon領域では、No.01ハトムギ「北のはと」、No.6ハトムギ(ベトナム産)、No.16ハトムギ「オホーツク1号」、No.17ハトムギ「はとむすめ」、No.18ハトムギ中里在来において予測をした 1,200 bp を超えた 3,000 bp 付近で増幅が認められ、他3系統では増幅が認められなかった。

ハトムギ「北のはと」の鋳型DNAから増幅した*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域の配列をダイレクトシーケンス法で決定した結果、その塩基長は 471 bp であった。*atpF-atpA*介在配列領域の塩基長は 273 bp であり、*trnS-trnT*領域の塩基長は 1198 bp であった。

#### D. 考察

ハトムギの品種識別法を開発する目的で、本年度はハトムギ「北のはと」の他、国内で流通、栽培されている17系統のハトムギを収集した。これらは、種子の大小、形状および種皮の色に多少の相違は認められたが、個々の系統を客観的に判別できる特徴は認められず、外形的な識別はできないと判断した。

流通するハトムギは、種子の種皮を除去した形状が多いことから、本研究では、玄穀からDNAの抽出を試みた。玄穀は、主成分の多くがデンプンなどの多糖類であり、多糖類が多く混入したDNA溶液は、PCR法による増幅効率を阻害する可能性がある。そこで、DNA抽出材料とした玄穀の量は、

20 mg 程度とした、またDNA調製法として、その破碎には多数の検体を効率的に破碎できるビーズ式細胞破碎機を用いて破碎し、市販のDNA調製キットにより各系統のDNA抽出を行った。その結果、3.8 ~ 51.0 ng/μL濃度のDNA溶液が得られた。試料No.12(中国湖南省産)のDNA溶液の濃度は、18試料中最も低い 3.8 ng/μL であった。試料No.12は、No.11(中国遼寧省産)とともに、その玄穀物が非常に硬く、ハンマーによる荒粉碎、2回のジルコニア製ビーズによる破碎処理を行っても全てが粉状にならず、その後のDNA抽出操作における抽出効率が極端に低下したと思われる。

ハトムギ「北のはと」と収集したハトムギの中から7系統を選び、これらの鋳型DNAを用いて、種間および品種識別法で汎用されている葉緑体DNAの5領域についてPCR法による各領域の増幅の適否を検討した。

*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域、*atpF-atpA*介在配列領域および*trnS-trnT*領域では、全ての系統において増幅が確認され、*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exonでは、ハトムギ「北のはと」を含む5系統で増幅が確認された。*trnD-trnT*領域では増幅が認められなかった。

この結果は玄穀から調製された鋳型DNA溶液でもPCR法による目的領域の特異的な増幅が可能であることを示している。さらに*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exon領域において、系統による増幅の適否が異なることから、この領域に系統間の多型配列が存在する可能性があると思われる。

ハトムギ「北のはと」の玄穀から抽出された鋳型DNAを出発材料として、*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域、*atpF-atpA*介在配列領域および*trnS-trnT*領域の塩基配列が決定されたことは、玄穀由来のDNA試料であっても高度な遺伝子工学実験に使用できることを示し、今後、玄穀を材料としたハトムギ市場品の品種識別技術の開発が可能であると思われる。

一方、*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exon領域の塩基長は 1,000 ~ 1,500 bp程度と予

測されていたが、今回、アガロースゲル電気泳動法の結果からハトムギでは約 3,000 bpと推定された。従来、この領域は6種類のプライマーを用いて塩基配列の決定を行っているが、ハトムギのそれは塩基長が長いことから、ハトムギの同領域の塩基配列を決定するためには、さらに複数のプライマーを設計する必要があると今後の課題となった。

次年度の研究では、*rpl16* および *rpl16-rpl14* 介在配列領域、*atpF-atpA* 介在配列領域、*trnS-trnT* 領域について、各系統の配列を決定してハトムギ「北のはと」と比較し、*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exon については塩基配列の決定に必要なプライマーの開発を行う必要があると思われる。

#### E. 結論

DNA塩基配列情報に基づくハトムギ品種の識別法を開発するため、本年度はハトムギ「北のはと」の他比較対象となるハトムギを収集し、国内で流通する外国産ハトムギ7系統、国内産7系統および薬用植物資源研究センターで保存されている3系統の合計17系統を収集した。ハトムギ種子の種皮を除去した玄穀から鋳型DNAの調製法は、玄穀を液体窒素で十分に冷却してビーズ式細胞破碎機を用いて破碎し、市販キットによるDNA抽出法で処理し、玄穀 20 mg 程度から 3.8 ~ 50.1 ng/μL のDNA溶液が抽出できた。

ハトムギ「北のはと」および収集した系統から7系統を選び、これらの鋳型DNAを用いて、種間および品種識別法で汎用され

る葉緑体DNAの5領域の増幅を試みた結果、*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域、*atpF-atpA*介在配列領域および*trnS-trnT*領域では供試した全ての試料で増幅が確認され、*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exonでは、8系統中ハトムギ「北のはと」を含む5系統で増幅が確認された。*trnD-trnT*領域では増幅が認められなかった。

この結果は玄穀から調製した鋳型DNAでもPCR法によるDNA増幅が可能であることを示し、目的領域および系統による増幅の適否が異なることから、*trnL* (UAA) 5'exo-*trnL* (UAA) 3'exon領域に系統間の多型配列が存在する可能性が示唆された。

ハトムギ「北のはと」の鋳型 DNA から増幅した *rpl16* および *rpl16-rpl14* 介在配列領域の配列を決定し、その塩基長は 471 bp であった。*atpF-atpA* 介在配列領域の塩基長は 273 bp であり、*trnS-trnT* 介在は列の長さは 1198 bp であった。*trnS-trnT* 領域の塩基長は であった。玄穀から得られた鋳型 DNA を出発材料に塩基配列が決定されたことはその鋳型 DNA が高品位であることを示し、玄穀を材料としたハトムギ市場品の品種識別技術の開発が可能であることを示唆した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし
2. 学会発表  
該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 収集したハトムギ種子の来歴とそのDNA抽出溶液の濃度

No.	品名	生産地	収穫年度	サンプル量 (mg)	A260/A280比	DNA濃度 (μg/μL)	備考
1	ハトムギ「北のはと」	日本 名寄	2008	38.0	1.53	18.6	日本の品種
2	ハトムギ	タイ	2005~2006	22.0	1.72	5.6	
3	ハトムギ	タイ	2005~2006	19.3	1.46	20.1	
4	ハトムギ	ラオス	2005~2006	29.8	1.60	27.4	
5	ハトムギ	ラオス	2006~2007	32.1	1.68	21.0	
6	ハトムギ	ベトナム	不明	24.9	1.68	11.6	
7	ハトムギ	日本 岩手県	不明	36.8	1.77	24.9	
8	ハトムギ	日本 栃木県	2006	22.0	1.88	15.9	
9	ハトムギ	日本 栃木県	2006	24.2	1.78	51.0	
10	ハトムギ	日本 広島県	不明	37.1	1.88	29.2	
11	ハトムギ	中国 遼寧省	不明	29.2	1.57	14.9	
12	ハトムギ	中国 湖南省	不明	32.1	0.94	3.8	
13	ハトムギ 筑波在来	筑波研究部	2006	30.1	1.76	31.1	
14	ハトムギ 岡山在来	筑波研究部	1996	44.7	1.40	12.4	1988年産種子で栽培
15	ハトムギ 水原3号	筑波研究部	1997	37.8	1.64	19.6	韓国の品種
16	ハトムギ 「オホーツク1号」	日本	2008	21.0	1.59	18.5	日本の品種
17	ハトムギ 「はとむすめ」	日本	2006	18.5	1.49	18.5	日本の品種
18	ハトムギ 中里在来	日本	2008	19.4	1.57	13.1	日本の在来種



No.01 ハトムギ「北のはと」



No.06 ハトムギ ベトナム産



No.11 ハトムギ 中国遼寧省産



No.16 ハトムギ「オホーツク1号」

図1 収集したハトムギ流通品の一例

表2 比較対象とした葉緑体部分領域とその増幅プライマーの配列

Target region	Size (bp)	Primer Sequence	Reference
(1) <i>rpl16</i> and <i>rpl16-14</i> spacer	550	AAAGATCTAGATTTTCGTAAACAACATAGAGGAAGAA ATCTGCAGCATTAAAAAGGGTCTGAGGTTGAATCAT	Nakamura, I. <i>et al</i> (1997)
(2) <i>atpF-atpA</i> spacer	60-80	TTACGAGGAGCTCTAGGAACTCTGAATAGTTGTTTG GCCATTACTTCATCAAGACCGTGAATACGAGCAATGCC	Nakamura, I. <i>et al</i> (2000)
(3) <i>trn S - trn T</i>		CGAGGGTTCGAATCCCTCTC AGAGCATCGCATTGTGAATG	Demedure <i>et al</i> (1995)
(4) <i>trn D - trn T</i>		ACCAATTGAACTACAATCCC CTACCACTGAGTTAAAAGGG	Demedure <i>et al</i> (1995)
(5) <i>trn T - trn F</i>	1200	CATTACAAATGCGATGCTCT TCTACCGATTTTCGCCATATC CGAAATCGGTAGACGCTACG GGGGATAGAGGGACTTGAAC	Taberlet, P. <i>et al</i> (1991)

表3 代表的な試料を用いた葉緑体DNAの部分領域の増幅

No.	品名	生産地					
			<i>rpl16</i> , <i>rpl16-rpl14</i> spacer	<i>atpA-atpF</i> spacer	<i>trnS-trnT</i>	<i>trnD-trnT</i>	<i>trnT-trnF</i>
1	ハトムギ「北のはと」	日本 名寄	○	○	○	×	○
2	ハトムギ	タイ	○	○	○	×	×
4	ハトムギ	ラオス	○	○	○	×	×
6	ハトムギ	ベトナム	○	○	○	×	○
11	ハトムギ	中国 遼寧省	○	○	○	×	×
16	ハトムギ 「オホーツク1号」	日本	○	○	○	×	○
17	ハトムギ 「はとむすめ」	日本	○	○	○	×	○
18	ハトムギ 中里在来	日本	○	○	○	×	○

注: 「○」は増幅に成功. 「×」は像 f 区できなかった.

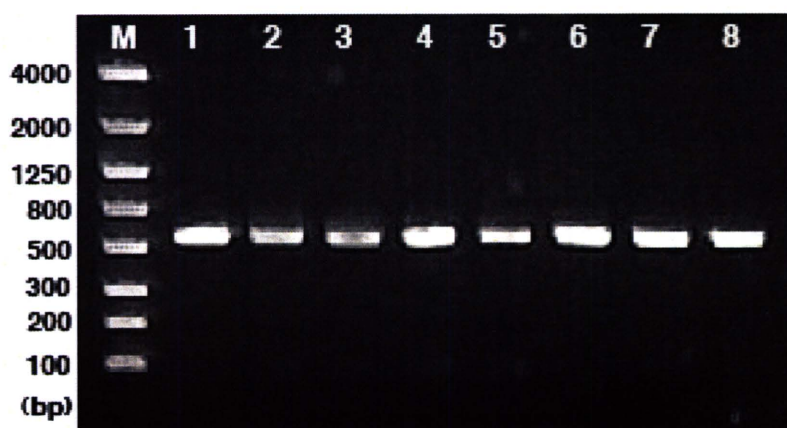


図2 *rpl16* および *rpl16-rpl14* 介在配列領域の増幅  
1.2%アガロースゲルを用いた電気泳動像



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）  
優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のため  
の保存、増殖に関する基盤的研究（H22-創薬総合-指定-015）  
分担研究報告書

分担研究課題：カンゾウの新規品質評価手法に関する検討

分担研究者 所属 （独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

刈野 裕之

協力研究者 所属 （独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

大根谷 章浩

要旨 北海道研究部において栽培されたカンゾウにおいてグリチルリチン酸含量の高い品種が選抜されてきたが、それらの含有成分の市場品との差異はグリチルリチン酸やリクイリチンなどの特定の成分にのみ絞って比較をされている。生薬の品質評価を行うためには成分系全体をみて評価をする必要性があり、微量成分などの差異を総合的に検討することにより生合成系での比較を類推することも可能となる。今回の指定研究ではこれらカンゾウの試料を使った新たな品質評価法構築の試みとして2次元展開法による薄層クロマトグラフィーによる展開後のスポットのTLCMSを行うことを試みた。抽出溶媒はグリチルリチンなどの配糖体を効率よく抽出できる熱水抽出で行い、2次元TLCの展開溶媒としては、第1回目の展開をCHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O（65:30:5）、第2回目の展開をEtOAc-MeOH-AcOH（3:1:2）とすることにより、各種配糖体の成分スポットを展開することができた。また、TLCMSインターフェースによるTLC上のスポットのMSの測定を行い、フラボノイド配糖体のほか、グリチルリチン酸の検出が可能であった。本手法はDART法などの他のTLCMS手法では適用できない2DTLCをベースにしたTLCMS分析が可能であり、今後検討を重ねることにより品質評価にも利用することができると考えられた。

#### A. 研究目的

生薬は本来天然物であるために、その栽培環境や基原により大きな成分の差異がある。また、収穫後の調製方法の違いによっても成分の変化を起こすこともあり、結果的に変異を起こした成分が薬効に関わる成分の場合に漢方薬の薬効にも影響を及ぼし大きな問題となってくる。北海道研究部においては近年グリチルリチン酸の含量が高い品種を選抜してきたが、それらの含有成分の市場品との差異は、主要成分であるグリチルリチン酸やリクイリチンなどの特定の成分にのみ絞ってHPLC等の手法により比

較をされている。

しかしながら、生薬の品質評価を行うためには成分系全体をみて評価する必要性があり、微量成分などの差異を総合的に検討することにより生合成系での比較を類推することも可能となる。2D-TLCは古くから知られるTLC手法であるが、1Dでは重なりあいがあるサンプルも分離させることが可能であり、かつ視覚的に成分全体を観察することが可能である。また近年スイスのTLC関連機器の専門会社であるCAMAG社よりTLC-MSインターフェースが開発された。これは現在既存の日本電子のDARTなどの

TLC-MSでは適用が困難な2DTLCにも適用できる画期的なTLCMSインターフェースであり、既存のLCMSに簡単に装着可能である。今回はカンゾウの新規成分分析手法の開発を目的として、2DTLC-MSを用いた品質評価法の分析条件を検討した。

## B. 研究方法

### 使用試薬及び機器

検討用試料としては内モンゴ産カンゾウ（東北1号）を使用した。

TLC プレートは Merck 社製シリカゲル TLC plate Art5715 (20cm x 20cm)を用いた。

TLC-MS インターフェースはスイス CAMAG 社製を用いた。

LCMS は QSTAR XL (Appliedbiosystems 社製)を用いた。

### 試験用試料の作成

検討用試料としては内モンゴ産カンゾウ（東北1号）を使用した。本生薬をミル（協立理工社製）にて粉碎し、その後その粉末70gに水300mlを加えて加熱還流を2時間行った。その後遠心分離を行い、上澄液を凍結乾燥を1週間行い、完全に乾燥し試験試料とした。

### 2D-TLC の検討

試験試料である内モンゴ産カンゾウ水抽出液を用いて2D-TLCの検討を行った。20cm x 20cmのTLCプレートの角の両端から約2cmの場所に検討試料のメタノール溶液をスポットし、各種展開溶媒にて展開をした。

展開溶媒

(検討1)

第1回目：BuOH-H<sub>2</sub>O-AcOH (7:2:1)

第2回目：AcOEt-H<sub>2</sub>O-HCOOH (5:1:1)

(検討2)

第1回目：AcOEt-MeOH (1:1)

第2回目：CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (6:4:0.8)

(検討3)

第1回目：CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (65:30:5)

第2回目：EtOAc-MeOH-AcOH (3:1:2)

検出はいずれも紫外線吸収（主波長254nm）、紫外線吸収（主波長366nm）、10%硫酸噴霧後加熱、10%硫酸噴霧加熱後紫外線吸収（主

波長366nm）の4種類で行った。

### TLC-MSの検討

上記のようにして展開されたTLCプレートを風乾後に、CAMAG社製TLCMSインターフェースにかけ、目的とするスポットをHPLCでの溶媒にて抽出し直接MS部に導入しLCMS測定を行った。MS条件はイオン源はESI (positive)で行った。

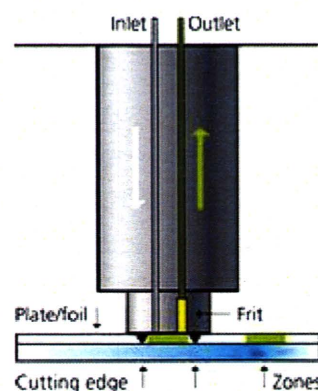
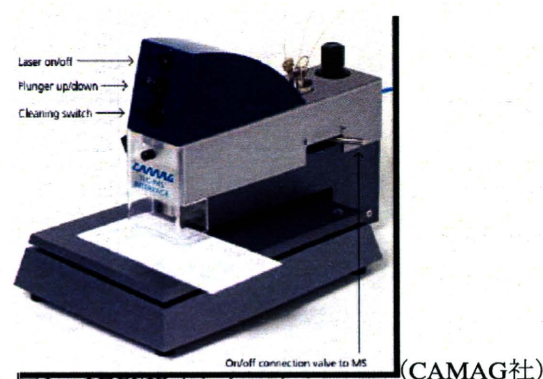
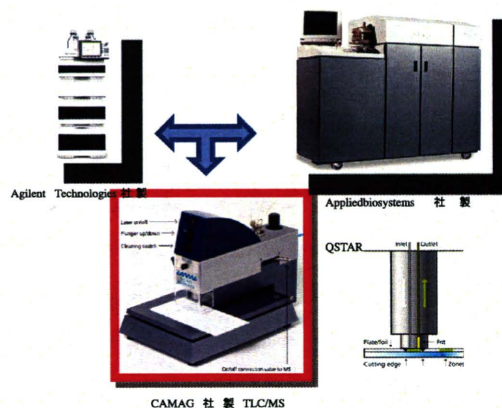


図2 ヘッド拡大図

CAMAG社製TLC-MSインターフェースを用いた



## C. 研究結果

上記TLC展開条件にて展開を行ったが、X軸にブタノールを用いた検討1は成分が良く分離した。しかしながら展開時間が長時間かかり（1展開に6時間以上、2展開に10時間以上）、複数枚の展開が困難である。

TLC-MSを行うためには、10%硫酸を噴霧してはシリカゲル上の成分は変化してしまうために使用することはできないという欠点がある。しかしながらカンゾウの指標成分であるグリチルリチン酸を含めて多くの成分は紫外線吸収を持たず、10%硫酸噴霧加熱などの方法を取らねば検出することができない。そこで、全く同じ条件で2枚2D-TLCを展開し、その後1枚のみを10%硫酸を噴霧し加熱して呈色させ、それをもう1枚に重ね合わせて目的とするスポットの場所を特定することにした。

TLCMSの検討は（検討3）の条件で行った。しかしながら展開後のプレートを10%硫酸で呈色させると、第1回目の展開においてフラボノイド様のスポット（黄色に呈色するスポット）がテーリングしていることが分かった。フラボノイドはその化学構造からシリカゲルには強く吸着する性質を持つためであるが、第2回目の展開ではテーリングはみられていない。第2回目には展開溶媒に酢酸を使用しているためテーリングが抑えられたと考えられる。結果を後ろにTLC図上に予想化合物と観測されたプリカーサーイオンの $m/z$ を示した。

Spot1から4は、いずれもUV吸収を示し、10%硫酸を噴霧後加熱することにより黄色に呈色する。このことからフラボノイドと推定されたが、spot1はその中では最もスポットが多く、主要フラボノイドと推定された。そのMSでは $m/z$  419[M+H]<sup>+</sup>、441[M+Na]<sup>+</sup>にそれぞれ擬似分子イオンピークが現れている他、257[M-hexose]<sup>+</sup>に脱六単糖に相当するピークが現れた。本分子量に相当するカンゾウフラボノイド成分としては

Liquiritinまたはglucoliquiritigeninがある。

Spot2には $m/z$  1123 [2M+Na]<sup>+</sup>、573 [M+Na]<sup>+</sup>、419 [M-pentose]<sup>+</sup>、257 [aglycone]<sup>+</sup>

に相当すると思われるピークが認められた。これらからspot2の化合物はその極性などからも考えてspot1のliquiritinにさらにもう一分子5単糖が結合した構造と推定された。Spot5は構造が確定できないが、 $m/z$  729 [2M+H]<sup>+</sup>、365 [M+H]<sup>+</sup>、203 [M-hexose]<sup>+</sup>と考えられ、6単糖の配糖体と考えられたが、MSのフラグメントからのみでは構造を特定できなかった。Spot6は $m/z$  845 [M+Na]<sup>+</sup>、823 [M+H]<sup>+</sup>、647 [M-GluA]<sup>+</sup>、527 [M-2GluA]<sup>+</sup>が認められ、グリチルリチン酸標準品のMSパターンと一致したことからグリチルリチン酸（グリチルリチン）と特定した。Spot3-5は今回TLCMSの測定を試みたが、インターフェースの不具合によりspotの溶媒溶出がうまくできなかったため、十分なデータが取れなかった。これについては再度検討する予定である。

#### D. 考察

今回 2DTLCMS の条件検討を行い、3種類の展開溶媒を試みた。展開の理想としては対角線上にのみスポットが並ぶのではなく、TLC全体にスポットが広がることであり、かつスポットの重なり合いが見られないことである。今回の検討した溶媒系の中では全体にスポットが分布するパターンは得られなかった。また熱水抽出であったため配糖体が多く抽出されていると考えられ、特にフラボノイド配糖体が多く観察された。それらとグリチルリチン酸が特定できたものの、低極性成分の差異も比較する必要があり、抽出溶媒の再検討が必要である。しかしながらフラボノイド配糖体およびカンゾウの最重要成分であるグリチルリチンのスポットは今回の条件で定性が可能であることがわかり、今後北海道研究部で栽培を行っている高グリチルリチン含量カンゾウの同様な条件での展開を行った場合の可視的な比較が可能となった。

#### E. 結論

結果として、2次元TLCの展開溶媒で第1回目：CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O（65:30:5）

第2回目：EtOAc-MeOH-AcOH (3:1:2)

の条件で展開した場合、数種類のフラボノイド配糖体とグリチルリチンの成分スポットが分離良く展開され、TLCMS の検討が可能であった。

TLCMS インターフェースの設定の不具合により対象となるスポットがうまく抽出されないという面もあったが、その点を改善すれば十分に本分析手法は新しい品質評価法につながる事が可能と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし