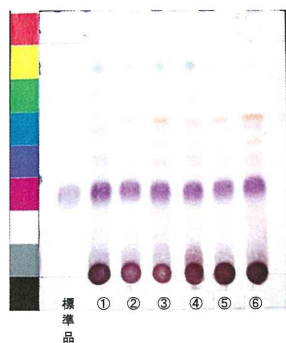
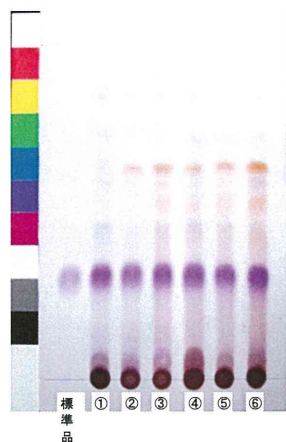


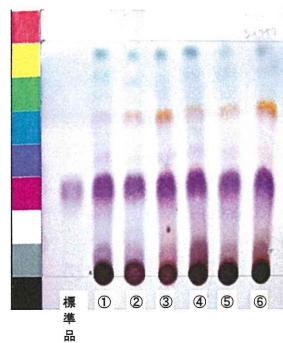
## シャクヤクのTLC



写真① Merck 製 (7cm展開)  
R f 値 : 0.38 (紫色)  
展開時間 : 9分



写真② Merck 製 (10cm展開)  
R f 値 : 0.33 (紫色)  
展開時間 : 13分



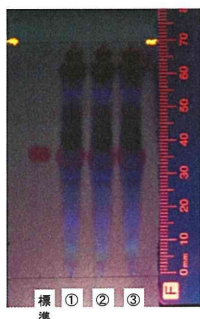
写真③ Wako 製 (7cm展開)  
R f 値 : 0.41 (紫色)  
展開時間 : 6分



写真④ Wako 製 (10cm展開)  
R f 値 : 0.36 (紫色)  
展開時間 : 9分

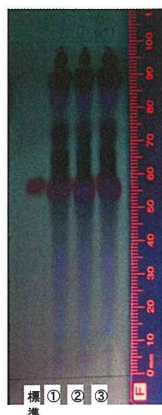
- ① 中国・四川 (2010年 6月入手)
- ② 中国・浙江 (2011年 2月入手)
- ③ 日本・奈良 (2011年 5月入手)
- ④ 中国・安徽 (2009年 8月入手)
- ⑤ 日本・長野 (2009年 7月入手)
- ⑥ 日本・北海道 (2009年 5月入手)

## センブリのTLC



写真① Wako 製 (7cm展開)  
R f 値 : 0.54  
展開時間 : 18分

- 標準品 : スウェルチアマリン
- ① 長野 (2010年産①)
  - ② 長野 (2010年産②)
  - ③ 長野 (2009年産)



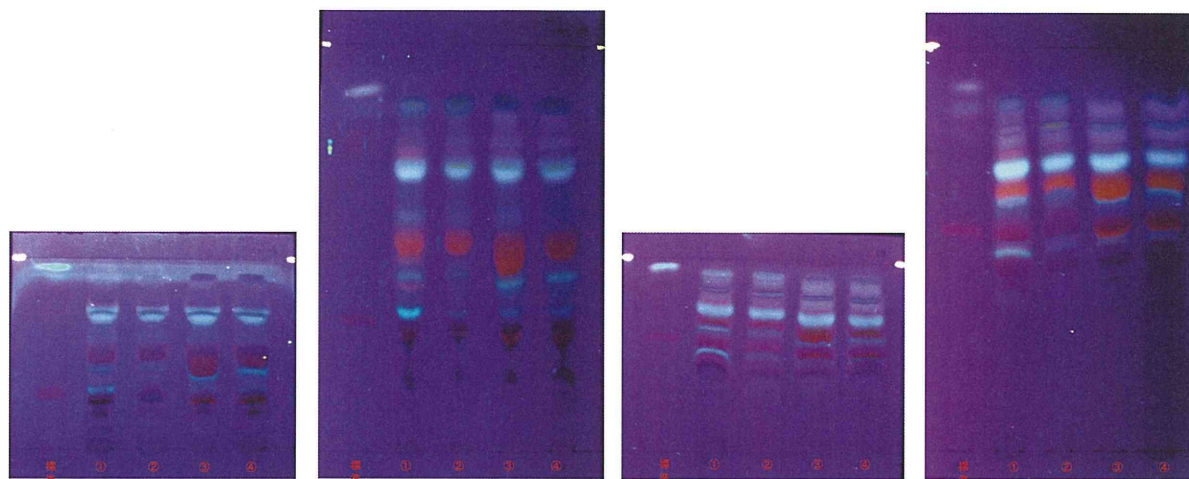
写真② Wako 製 (10cm展開)  
R f 値 : 0.56  
展開時間 : 34分

- JP16 : 赤色のスポット  
(混合蛍光剤入り)

(注) 青紫色のスポットが

Fig. 12

ダイオウ (JP16確認試験) のTLC: センノシ



写真① Merck 製 (7cm展開)  
R f 値: 0.29 (赤色)  
展開時間: 32分

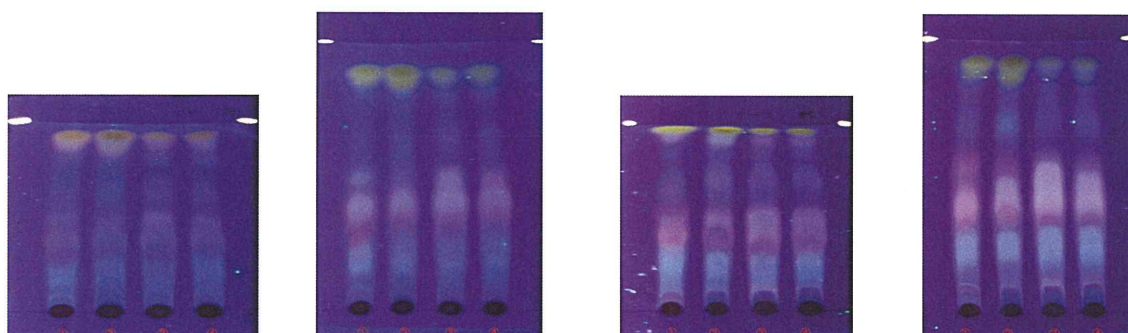
写真② Merck 製 (15cm展開)  
R f 値: 0.32 (赤色)  
展開時間: 104分

写真③ Wako 製 (7cm展開)  
R f 値: 0.63 (赤色)  
展開時間: 21分

写真④ Wako 製 (10cm展開)  
R f 値: 0.56 (赤色)  
展開時間: 84分

標準品: センノシDA  
①中国 (2008年5月入手)  
②中国 (2003年1月入手)  
③中国 (2009年4月入手)  
④中国 (2008年3月入手)

ダイオウ (JP16純度試験) のTLC



写真① Merck 製 (7cm展開)  
展開時間: 23分

写真② Merck 製 (10cm展開)  
展開時間: 38分

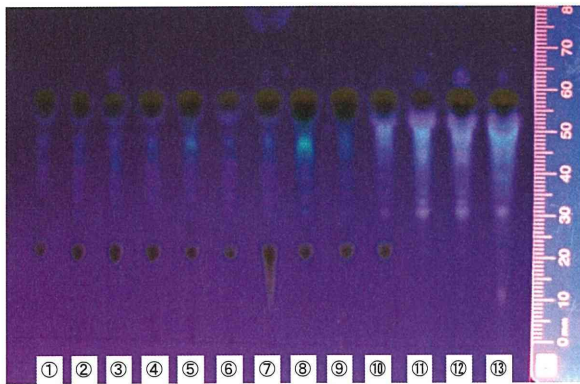
写真③ Wako 製 (7cm展開)  
展開時間: 15分

写真④ Wako 製 (10cm展開)  
展開時間: 28分

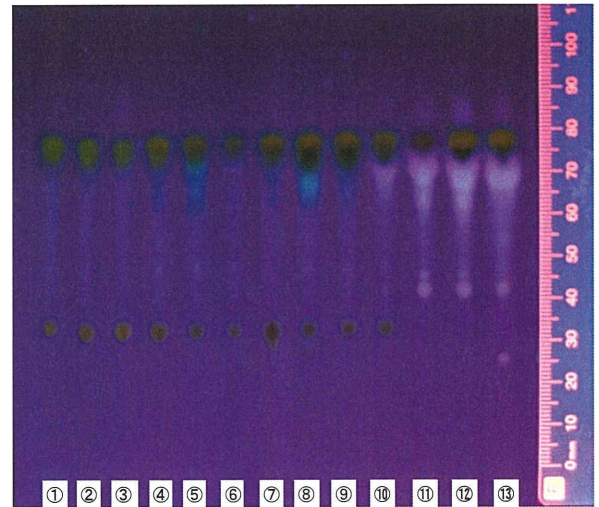
①中国 (2008年5月入手)  
②中国 (2003年1月入手)  
③中国 (2009年4月入手)  
④中国 (2008年3月入手)

Fig. 13

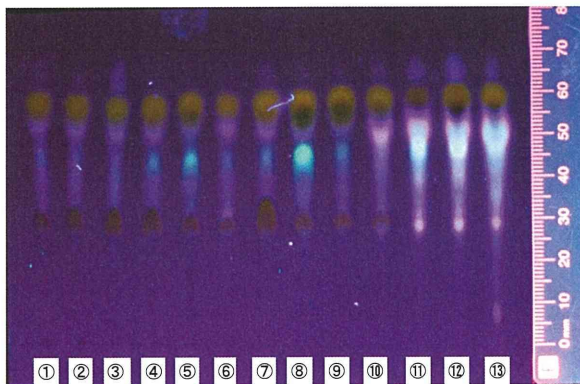
ダイオウ（確認試験改正案）のTLC：レイン



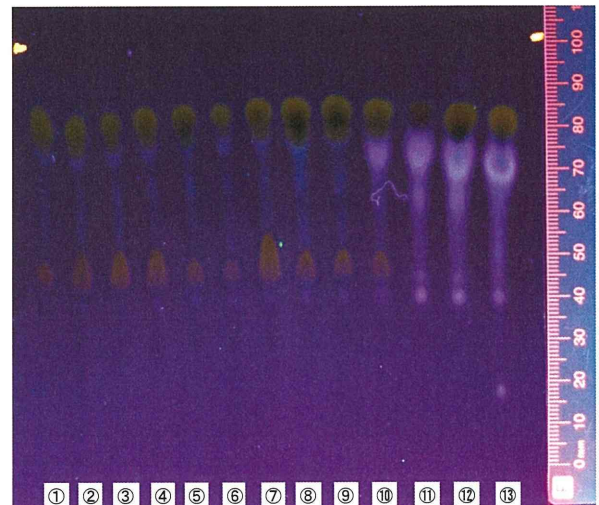
写真① Merck 製（7cm展開）  
R f 値：0.33  
展開時間：12分



写真② Merck 製（10cm展開）  
R f 値：0.34  
展開時間：19分



写真③ Wako 製（7cm展開）  
R f 値：0.43  
展開時間：8分



写真④ Wako 製（10cm展開）  
R f 値：0.46  
展開時間：14分

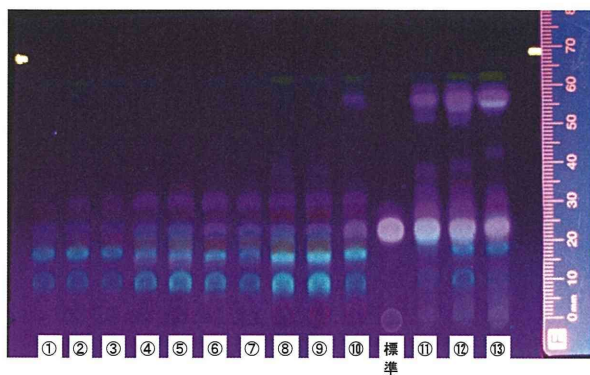
- ① 中国・四川（雅黄，2008年入手）
- ② 中国・四川（雅黄，2003年入手）
- ③ 中国・四川（雅黄，1994年入手）
- ④ 中国・青海（箱黄，2010年入手）
- ⑤ 中国・青海（箱黄，2010年入手・1個体）
- ⑥ 中国・青海（箱黄，2009年入手）
- ⑦ 中国・青海（包黄，2008年入手）
- ⑧ 日本・北海道（信州大黄サンプル）
- ⑨ 日本・北海道（信州大黄サンプル・1個体）
- ⑩ 朝鮮自治区（サンプル）
- ⑪ カラダイオウ（9/13標本園・川原先生）
- ⑫ マルバダイオウ（9/13標本園・川原先生）
- ⑬ 日局不適ダイオウ（中国）

対象：レイン，だいたい色の蛍光を発するスポット

Fig. 14



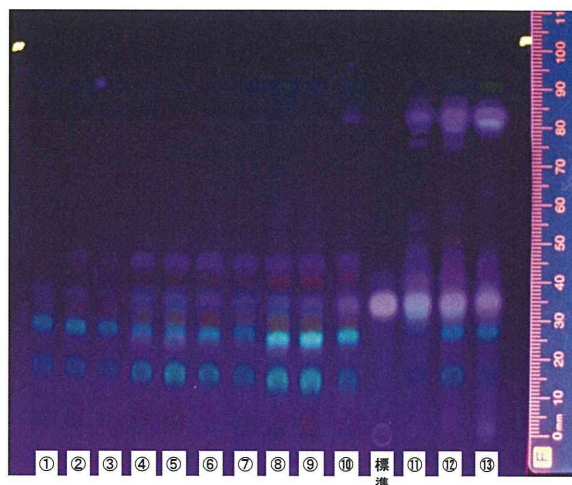
# ダイオウ（純度試験改正案）のTLC



写真① Merck 製 (7cm展開)

Rf 値：0.33

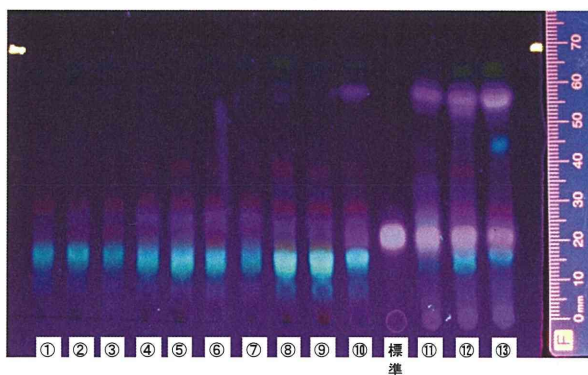
展開時間：13分



写真② Merck 製 (10cm展開)

Rf 値：0.35

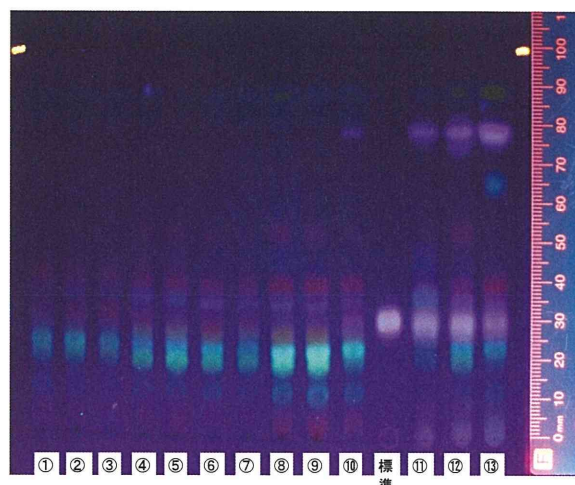
展開時間：22分



写真③ Wako 製 (7cm展開)

Rf 値：0.29

展開時間：9分



写真④ Wako 製 (10cm展開)

Rf 値：0.30

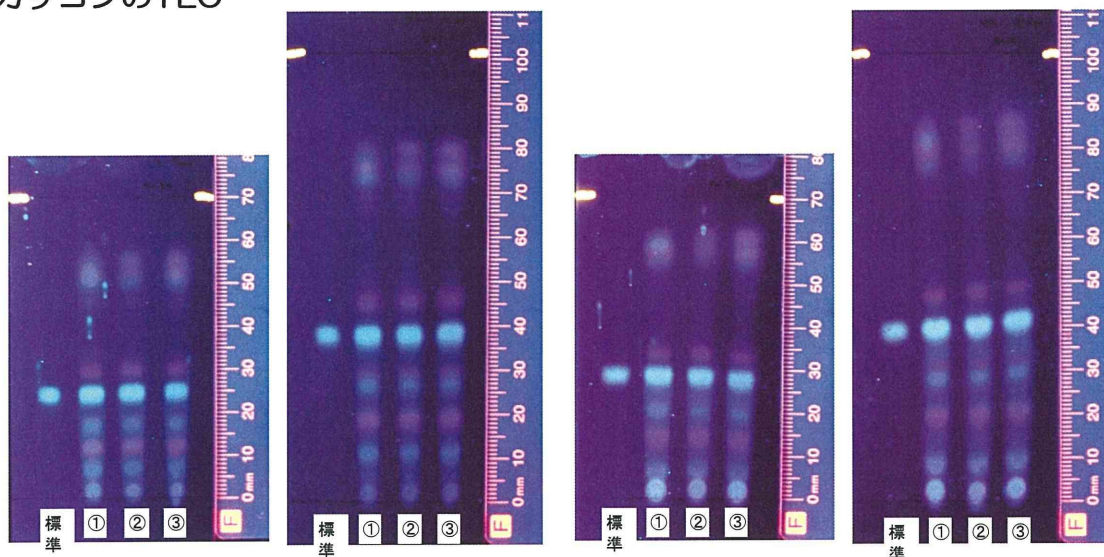
展開時間：15分

- ① 中国・四川（雅黄，2008年入手）
- ② 中国・四川（雅黄，2003年入手）
- ③ 中国・四川（雅黄，1994年入手）
- ④ 中国・青海（箱黄，2010年入手）
- ⑤ 中国・青海（箱黄，2010年入手・1 個体）
- ⑥ 中国・青海（箱黄，2009年入手）
- ⑦ 中国・青海（包黄，2008年入手）
- ⑧ 日本・北海道（信州大黄サンプル）
- ⑨ 日本・北海道（信州大黄サンプル・1 個体）
- ⑩ 朝鮮自治区（サンプル）
- 標準品：ラボンチシン
- ⑪ カラダイオウ（9/13標本園・川原先生）
- ⑫ マルバダイオウ（9/13標本園・川原先生）
- ⑬ 日局不適ダイオウ（中国）

Rf 値 0.3 付近に青色の蛍光を発するスポットを認めない

Fig. 15

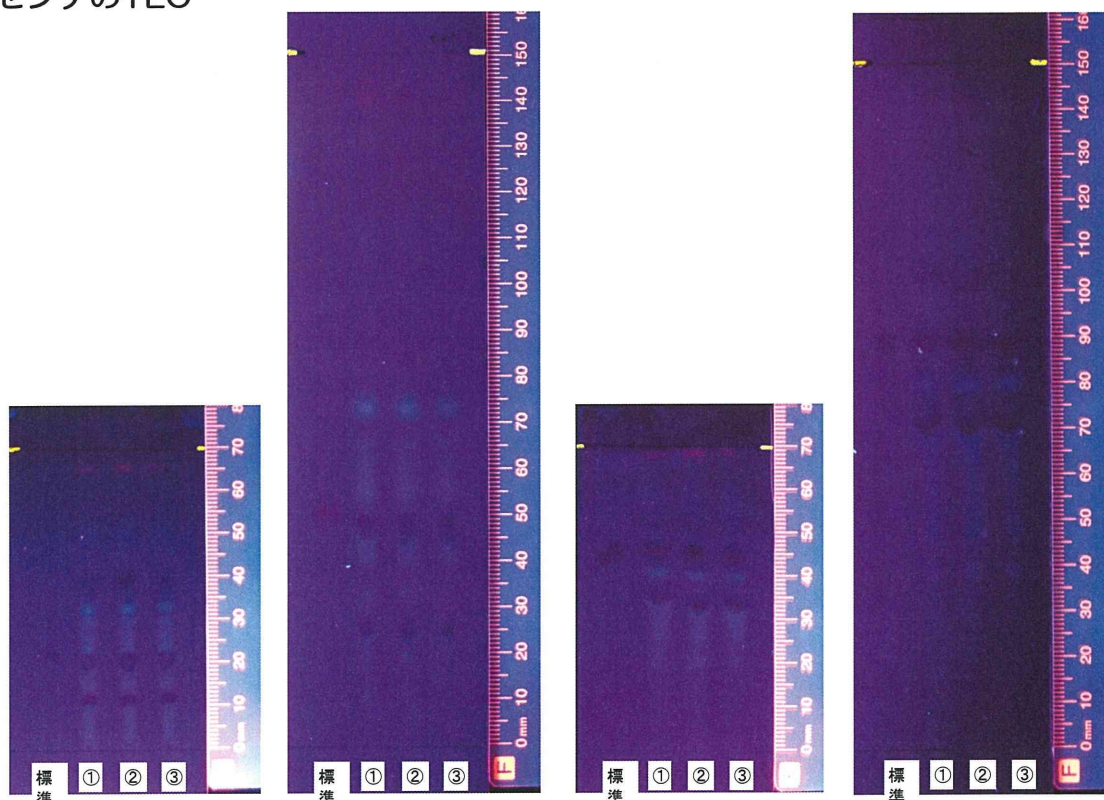
## カクコンのTLC



写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値：0.35 (青白色) 展開時間：13分  
 写真② Merck 製 (10cm展開) R f 値：0.37 (青白色) 展開時間：21分  
 写真③ Wako 製 (7cm展開) R f 値：0.39 (青白色) 展開時間：8分  
 写真④ Wako 製 (10cm展開) R f 値：0.37 (青白色) 展開時間：14分

- ① 中国・四川 (2008年 2月入手)
- ② 中国・四川 (2007年 5月入手)
- ③ 中国・四川 (2006年 5月入手)

## センナのTLC



写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値：0.31 (赤色) 展開時間：35分  
 写真② Merck 製 (15cm展開) R f 値：0.34 (赤色) 展開時間：108分  
 写真③ Wako 製 (7cm展開) R f 値：0.64 (赤色) 展開時間：22分  
 写真④ Wako 製 (15cm展開) R f 値：0.60 (赤色) 展開時間：82分

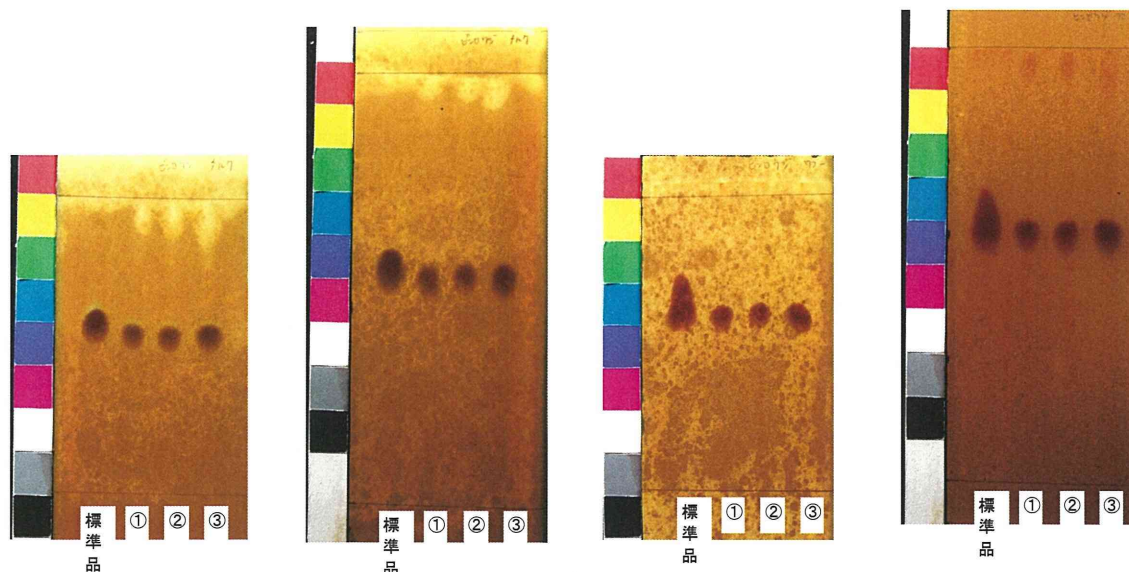
標準品：センノシドA

- ① インド (2010年 1月入手)
- ② インド (2007年 9月入手)
- ③ インド (2006年 11月入手)

**Fig. 16**



## ピンロウジのTLC (JP16)



写真① Merck 製 (7cm展開)

R f 値 : 0.56

展開時間 : 34分

写真② Merck 製 (10cm展開)

R f 値 : 0.55

展開時間 : 62分

写真③ Wako 製 (7cm展開)

R f 値 : 0.61

展開時間 : 18分

写真④ Wako 製 (10cm展開)

R f 値 : 0.59

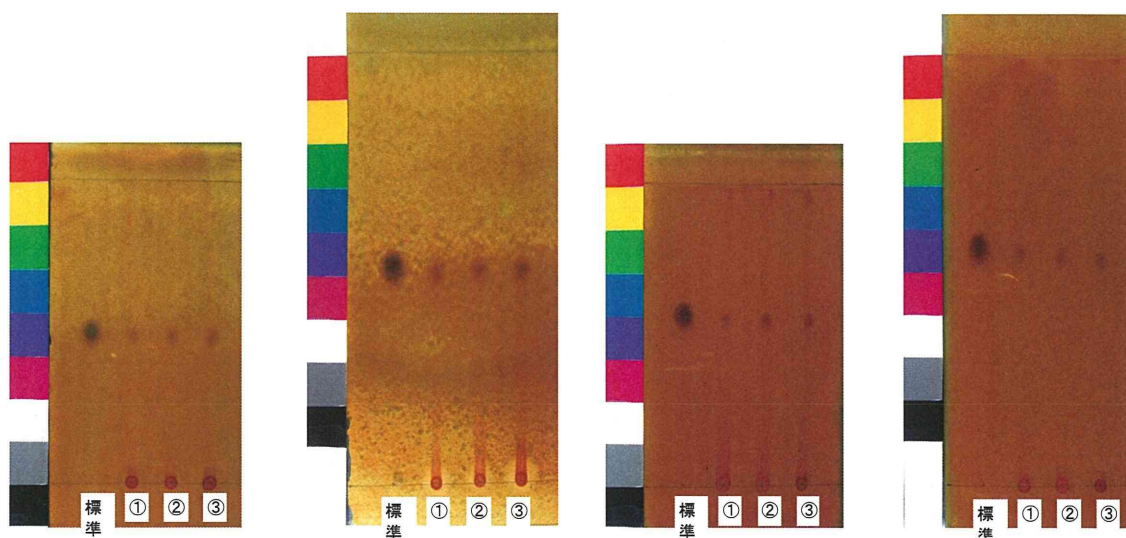
展開時間 : 34分

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)

## ピンロウジのTLC (改正案 : ヨウ素試液 + 亜硝酸ナトリウム試液)



写真① Merck 製 (7cm展開)

R f 値 : 0.50

展開時間 : 35分

写真② Merck 製 (10cm展開)

R f 値 : 0.49

展開時間 : 60分

写真③ Wako 製 (7cm展開)

R f 値 : 0.56

展開時間 : 20分

写真④ Wako 製 (10cm展開)

R f 値 : 0.55

展開時間 : 34分

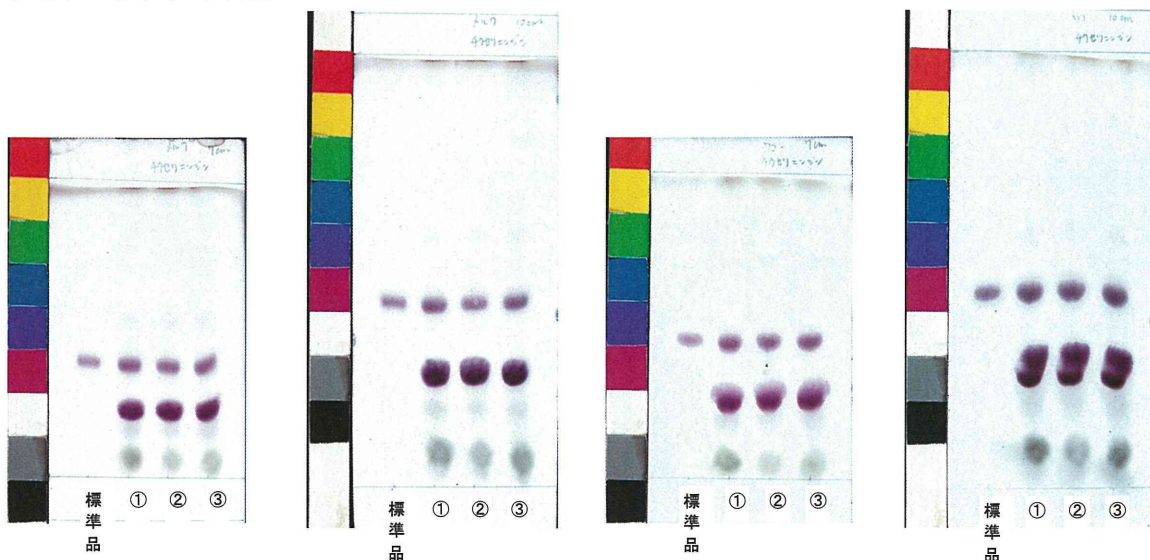
① 中国 (2000年 3月入手)

② ミャンマー (2004年 8月入手)

③ 中国 (2011年 4月入手)

Fig. 17

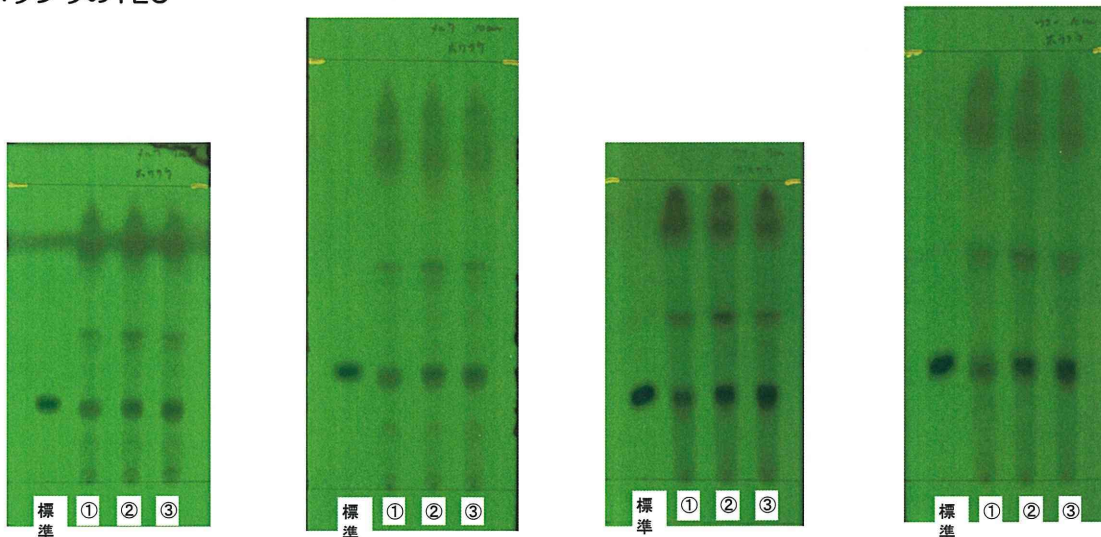
## チクセツニンジンのTLC



写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値 : 0.39 (赤紫色) 展開時間 : 27分  
 写真② Merck 製 (10cm展開) R f 値 : 0.43 (赤紫色) 展開時間 : 46分  
 写真③ Wako 製 (7cm展開) R f 値 : 0.45 (赤紫色) 展開時間 : 14分  
 写真④ Wako 製 (10cm展開) R f 値 : 0.45 (赤紫色) 展開時間 : 25分

- ① 日本・秋田 (2009年 12月入手)
- ② 日本・秋田 (2008年 11月入手)
- ③ 日本・山形 (2008年 6月入手)

## ポウフウのTLC



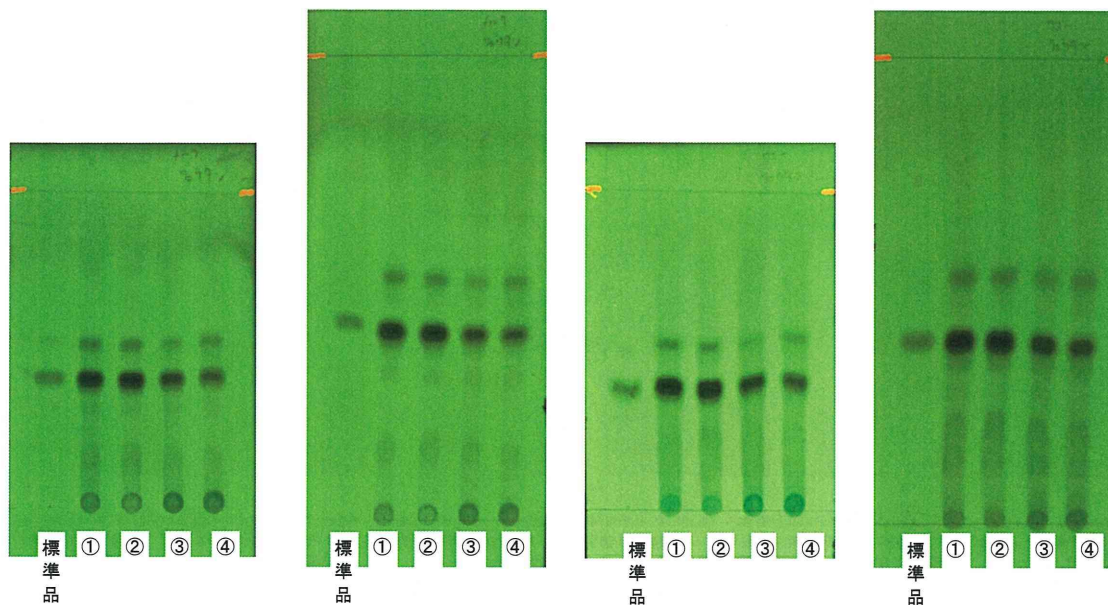
写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値 : 0.26 展開時間 : 13分  
 写真② Merck 製 (10cm展開) R f 値 : 0.27 展開時間 : 21分  
 写真③ Wako 製 (7cm展開) R f 値 : 0.28 展開時間 : 9分  
 写真④ Wako 製 (10cm展開) R f 値 : 0.26 展開時間 : 14分

- ① 中国 (2010年 4月入手)
- ② 中国 (2009年 1月入手)
- ③ 中国 (2007年 12月入手)

Fig. 18



## リュウタンのTLC



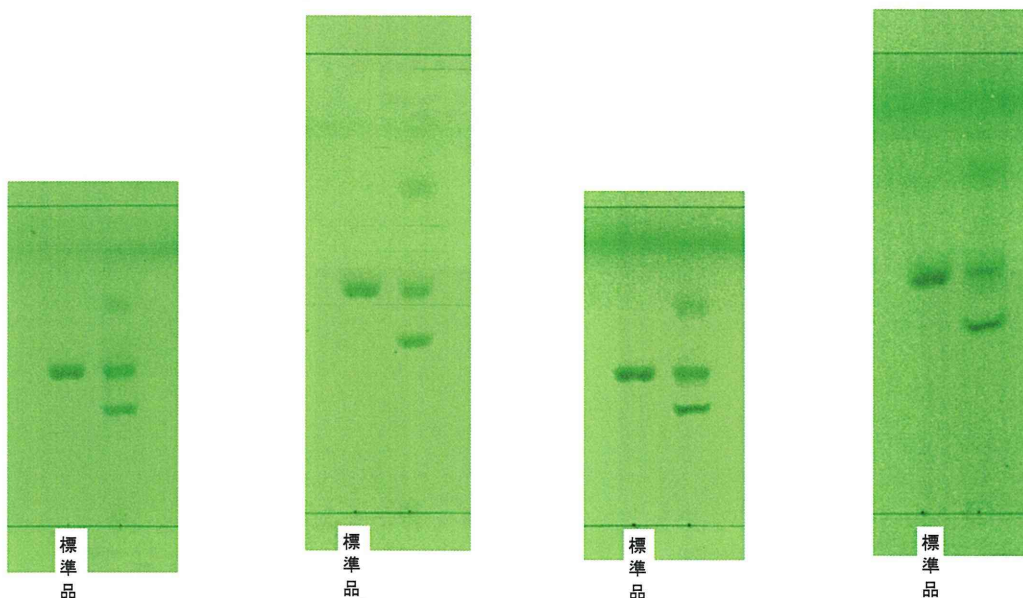
写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値：0.41 展開時間：13分  
 写真② Merck 製 (10cm展開) R f 値：0.44 展開時間：22分  
 写真③ Wako 製 (7cm展開) R f 値：0.40 展開時間：9分  
 写真④ Wako 製 (10cm展開) R f 値：0.40 展開時間：17分

標準品：ゲンチオピクロシド

- ① 中国・遼寧 (2011年入手)
- ② 中国・遼寧 (2009年入手)
- ③ 中国・遼寧 (2006年入手)
- ④ 中国・吉林 (2010年入手)

JP16：暗紫色のスポット

## ローヤルゼリーのTLC

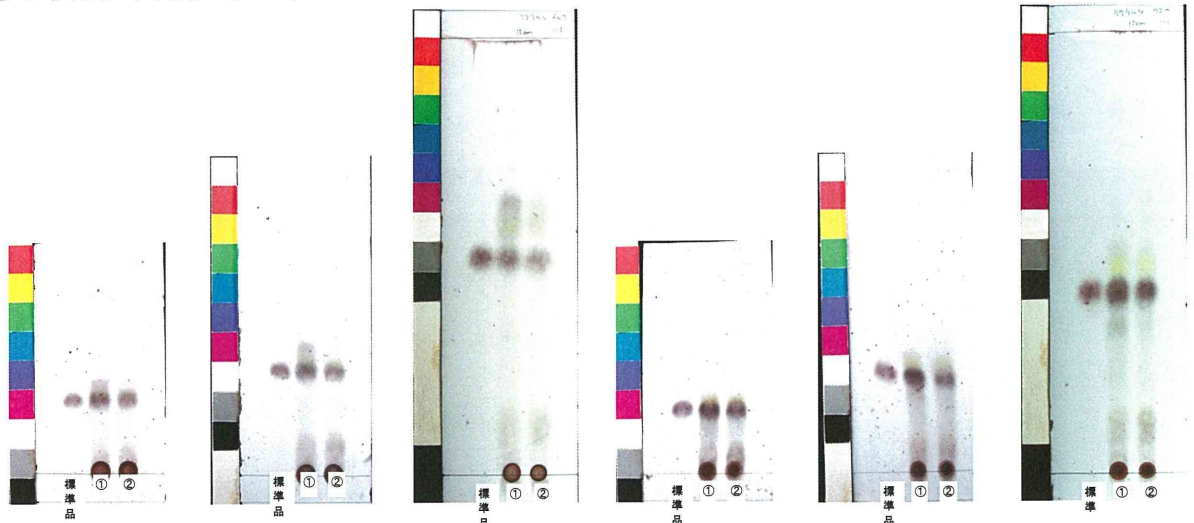


写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値：0.58 展開時間：44分  
 写真② Merck 製 (10cm展開) R f 値：0.48 展開時間：80分  
 写真③ Wako 製 (7cm展開) R f 値：0.54 展開時間：31分  
 写真④ Wako 製 (10cm展開) R f 値：0.49 展開時間：60分

Fig. 19



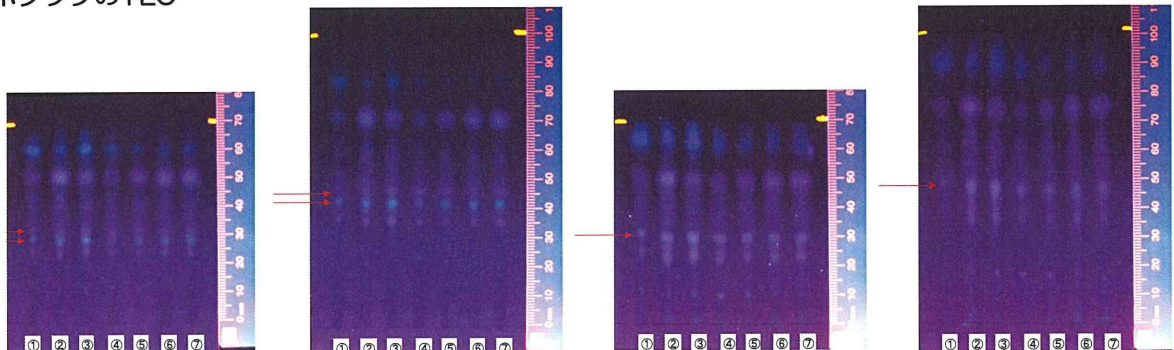
## ウワウルシのTLC (JP)



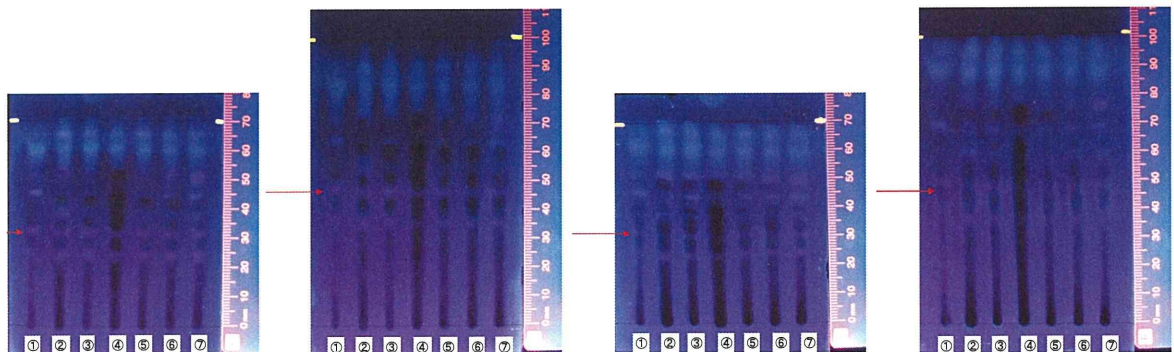
写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値: 0.36 (黄褐色~黒褐色) 展開時間: 18分  
 写真② Merck 製 (10cm展開) R f 値: 0.36 (黄褐色~黒褐色) 展開時間: 31分  
 写真③ Merck 製 (15cm展開) R f 値: 0.49 (黄褐色~黒褐色) 展開時間: 105分  
 写真④ Wako 製 (7cm展開) R f 値: 0.34 (黄褐色~黒褐色) 展開時間: 10分  
 写真⑤ Wako 製 (10cm展開) R f 値: 0.36 (黄褐色~黒褐色) 展開時間: 19分  
 写真⑥ Wako 製 (15cm展開) R f 値: 0.43 (黄褐色~黒褐色) 展開時間: 56分

- ① スペイン (2009年 6月入手)  
 ② スペイン (2007年 9月入手)

## ボクソクのTLC



写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値: 0.39・0.44 (異なる色の蛍光を発する連続した2個のスポット) 展開時間: 12分  
 写真② Merck 製 (10cm展開) R f 値: 0.41・0.45 展開時間: 22分  
 写真③ Wako 製 (7cm展開) R f 値: 確認不可・0.41 展開時間: 10分  
 写真④ Wako 製 (10cm展開) R f 値: 確認不可・0.45 展開時間: 18分



写真① Merck 製 (7cm展開) R f 値: 0.44 (1個のスポットは蛍光を発する)  
 写真② Merck 製 (10cm展開) R f 値: 0.45  
 写真③ Wako 製 (7cm展開) R f 値: 0.41 (確認しにくい)  
 写真④ Wako 製 (10cm展開) R f 値: 0.45 (確認しにくい) (1個のスポットは蛍光を発する)

- ①徳島 (アベマキ), ②長野 (2009年入手), ③長野 (2008年入手), ④長野 (2007年入手), ⑤長野 (2006年入手), ⑥長野 (2006年), ⑦長野 (2004年入手)

Fig. 20





Table 2. 展開時間の比較		平均			
生薬名	溶媒系	M7	M10	W7	W10
アカメガシワ	酢酸エチル/エタノール(95)/水混液(100:18:13)	13	24	9	16
アラビアゴム	アセトン/水(9:1)	12	22	7	13
アロエ	酢酸エチル/アセトン/水/酢酸(100)混液(20:5:2:2)	13	26	8	17
ウワウルシ	ギ酸エチル/水/ギ酸(8:1:1)	17	36	11	20
エンゴサク	メタノール/酢酸アンモニウム溶液(3→10)/酢酸(100)(20:1:1)	18	38	13	25
オウギ	酢酸エチル/メタノール/水(20:5:4)	14	26	10	18
オウギ(追試)	酢酸エチル/メタノール/水(20:5:4)	13	26	10	17
ガイヨウ	酢酸エチル/ヘキサン/酢酸(100)(20:10:1)	10	18	6	12
カッコウ	ヘキサン/アセトン(9:1)	8	13	6	10
カッコウ(追試)	ヘキサン/アセトン混液(9:1)	8		6	
カクコン	酢酸エチル/メタノール/水(12:2:1)	12	22	8	15
カンキョウ	酢酸エチル/ヘキサン(1:1)	9	16	6	11
キクカ	酢酸エチル/2-ブタノン/水/ギ酸混液(25:3:1:1)	11	21	8	16
ゲンチアナ	酢酸エチル/エタノール(99.5)/水混液(8:2:1)	13	25	9	16
コウイ	2-ブタノン/水/酢酸(100)混液(3:1:1)	30	56	19	37
コウジン	酢酸エチル/メタノール/水(14:5:4)	15	28	11	20
コウベイ	ヘキサン/アセトン混液(5:2)	8	14	6	10
サイコ	酢酸エチル/エタノール(99.5)/水(8:2:1)	13	25	9	17
シャクヤク	アセトン/酢酸エチル/酢酸(100)(10:10:1)	8	15	6	11
センナ	1-プロパノール/酢酸エチル/水/酢酸(100)(40:40:30:1)	30	56	19	36
センブリ	酢酸エチル/1-プロパノール/水混液(6:4:3)	23	47	15	31
ダイオウ現行法(確認試験)	1-プロパノール/酢酸エチル/水/酢酸(100)(40:40:30:1)	30	63	21	46
ダイオウ現行法(純度試験)	イソプロピルエーテル/メタノール/1-ブタノール(26:7:7)	17	34	10	24
ダイオウ改正案(確認試験:レイン)	酢酸エチル/メタノール/水混液(20:3:2)	12	20	8	15
ダイオウ改正案(純度試験)	酢酸エチル/2-ブタノン/ギ酸/水混液(10:7:1:1)	12	22	9	15
チクセツニンジン	酢酸エチル/水/ギ酸(5:1:1)	24	46	13	26
ニンジン	酢酸エチル/メタノール/水(14:5:4)	15	28	11	20
ビンロウジ(追試)	アセトン/水/酢酸(100)(10:6:1)	33	61	17	31
ビンロウジ(変法)	アセトン/水/酢酸(100)(10:6:1)	34	61	18	33
ボウフウ	酢酸エチル/メタノール/水(10:2:1)	12	24	8	15
ボクソク	酢酸エチル/メタノール/水(7:2:1)	12	23	9	16
リュウタン	酢酸エチル/エタノール(99.5)/水混液(8:2:1)	13	23	9	17
ローヤルゼリー	ヘキサン/酢酸エチル混液(2:1)	42	72	29	56

\* M10,W10は15cm展開  
\* Wは広領域プレート  
\* M10,W10は15cm展開

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

分担研究課題 遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究  
－漢方薬に使用さ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  
医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター筑波研究部  
主任研究員 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  
京都大学 大学院薬学研究科 准教授 伊藤美千穂  
富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教 朱 姝  
東京生薬協会 学術委員会 山路 弘樹

11 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有用な遺伝子領域を次のように明らかにした；シャクヤク：ITS 領域、ダイオウ：*matK* 遺伝子、マオウ：*trnK* 遺伝子、トウキ：ITS 領域、サンシシ：ITS2 領域及び *trnL-F* 領域、オウレン：*rpl16-rpl14* 領域及び ITS 領域、ケイヒ：*rbcL* 遺伝子の上流領域、サイコ：ITS 領域、ジオウ：*trnK* 遺伝子、シャゼンシ：ITS 領域、ビャクジュツ：ITS 領域、また、当該領域の解析結果から、11 生薬の市場品の基原を明らかにした。

#### A. 研究目的

生薬の安全性と有効性を担保するために行なわれる品質評価では、第一に生薬の基原の同定が必要である。この同定を最も客観的に行なう方法が遺伝子解析である。本研究は、「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、漢方処方に配合される重要な生薬を順次取り上げ、それらの基原植物の遺伝子鑑別に関する情報を収集することにより、同定に有用な遺伝子領域を選択し、実際に現在の日本市場に流通している生薬市場品に対して当該領域の遺伝子解析を行ない、

有用性の検証を行なうとともに、市場品の基原と遺伝子型を明らかにすることを目的とする。また、本研究で収集した遺伝子鑑別に関する情報及び生薬市場品の遺伝子解析結果は、薬用植物総合情報データベースに構築する。

今年度は11種類の生薬、すなわち、シャクヤク、ダイオウ、マオウ、トウキ、サンシシ、オウレン、ケイヒ、サイコ、ジオウ、シャゼンシ、ビャクジュツを対象にして、遺伝子情報の収集と市場品の遺伝子解析研究を行なった。

本報告書では生薬ごとに研究の方法と結果を報告する。



## 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. シャクヤク（小松、朱）

#### A. 1. 研究目的

芍薬は『神農本草経』の中品に初めて収載された漢薬で、宋代以降 2 種類の芍薬が存在したことが伺われ、『本草綱目』には「白芍薬は脾を益してよく土（脾）の中に於いて木（肝）を瀉し、赤芍薬は邪を散じてよく血中の滯を行る。白い色は補、赤い色は瀉である。」と記されている。現在中国では、芍薬は白芍と赤芍に区別され、白芍は養血、斂陰、柔肝、止痛等の効があるとして筋肉の攣急の緩和、腹痛、下痢等に、また赤芍は活血、通経等の効があるとして婦人科疾患等に用いられる。それぞれの基原について『中華人民共和国薬典』では、白芍は *Paeonia lactiflora* Pallas（中国植物名：芍薬、和名：シャクヤク）の根を湯通しした後に外皮を除去したもの、あるいは外皮を取り除いて湯通ししたものとし、赤芍を *P. lactiflora* または *P. veitchii* Lynch（中国植物名：川赤芍）の根であると規定している。一方、日本では芍薬を白芍と赤芍に区別して用いることは少なく、修治法により真芍薬（周皮を除去し、湯通しして乾燥したもの）、生干芍薬（周皮を取り除き乾燥したもの）、皮付き芍薬の 3 種類に分けられる。古来、鎮痛、鎮痙、収斂薬として汎用され、一般用漢方処方約 3 分の 1 の処方に配合される。『第十六改正日本薬局方』では *P. lactiflora* の根を基原とし、鎮痛、鎮痙、鎮静作用等の薬理作用を示

す paeoniflorin を 2.0% 以上含むことが規定されている。日本漢方生薬製剤協会による平成 20 年度の原料生薬使用量等調査報告書によると、国内使用量は 1,164,126 kg で 2 番目に多く、その内訳は日本産が 41,019 kg、中国産が 1,123,107 kg である。

今回、日本市場に流通するシャクヤクの基原種と系統を明らかにする目的で、核 rDNA の ITS 領域の解析を行なった。

#### B. 1. 1. 実験材料

シャクヤク 15 市場品を試料とした（Table 1-1）。さらに、中国内蒙古自治区またはモンゴル国で採集した野生の *Paeonia lactiflora* 3 検体、日本富山県で栽培される *P. lactiflora* の薬用品種「梵天」1 検体及び中国四川省で採集した *P. veitchii* 1 検体を基原種同定用の比較材料として用いた。また、今回提供された市場品と比較するため、これまでに当研究室で解析済みの中国産白芍及び赤芍の中国市場品及び日本産芍薬の日本市場品も加えた。

#### 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、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 1 時間冷凍した。TissueLyser（QIAGEN）で 30/sec、2.5 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 2  $\mu\text{L}$  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 ITS 領域を増幅した。ITS1 領域はプライマーセット ITS-1F と In 18s-25s-3'R、ITS2 領域はプライマーセット In 18s-25s-5'F と 18s-25s-3'R を使用した。PCR 反応には KOD-plus DNA polymerase（東洋紡社）を用いた。反応条件は、ホットスタート  $94^{\circ}\text{C}$  5 分、続いて熱変性  $94^{\circ}\text{C}$  30 秒、アニーリング  $52^{\circ}\text{C}$

30 秒、伸長反応 68°C50 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 68°C10 分で終了した。得られた PCR 産物 2  $\mu$ L について 1%アガロースゲル電気泳動法で増幅を確認した。残りの 23  $\mu$ L を Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega 社) で精製し、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 (Applied Biosystems, U.S.A.) でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A.) で、塩基配列を決定した。シーケンシング反応には増幅に用いた 4 種類のプライマーの他、ITS-5、Pae-In-518s-5'F 及び 5.8s-77R を用いた。増幅及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置及び配列を Fig. 1-1 及び Table 1-3 に示す。Electropherogram では、同一箇所にも二重のピーク (ヘテロ型のピーク) が確認されたため、ノイズと区別するために、副ピークの高さ/(副ピークの高さ+主ピークの高さ)が 15%以上のものをヘテロ型と判断した。

#### C. 1. 研究結果

*Paeonia* 属植物の核 rDNA の ITS 領域の塩基配列は、ITS1 領域が 267 bp、5.8S rRNA 遺伝子領域が 164 bp、ITS2 領域が 222 bp であった。これまで Sang T.<sup>1)</sup>らにより、*P. lactiflora* を識別するための ITS 領域の塩基配列が報告されているため、それと比較した結果、シャクヤク 15 市場品はすべて *P. lactiflora* 基原であった。*P. lactiflora* は種内多型が顕著であり、全検体にヘテロ型の塩基を示す箇所が認められ、交配が行われてきたことが示唆された。これまで我々は、日本産芍薬、中国産の白芍と赤芍の市場品及び *P. lactiflora* の栽培品種について ITS 領域の遺伝子解析を行い、塩基配列に基づいて多重配列アラインメント ClustalW 法を用いた案内木 (系統樹) を作成した結果、*P. lactiflora* は遺伝的に南方系 (白芍系) と北方系 (赤芍系) に二大別されることを見出し

ている。これら 2 グループの区別には上流から 69 番目、458 番目及び 523 番目の塩基が重要であった。シャクヤク 15 市場品はこれら 3 箇所の塩基に着目すると、2 グループに分けられた。T, A, T の配列をもつ 11 市場品は白芍系、ヘテロ型の C/T, A/C, C/T の配列をもつ 4 市場品は赤芍系であった。中国産のシャクヤクの多く (10/11) が白芍系で、日本産のシャクヤクの多く (3/4) が赤芍系であった。

#### D. 1. 考察

これまでの研究結果では、中国内モンゴル自治区産の *P. lactiflora* 及び赤芍はすべて赤芍系であり、一方、安徽省、浙江省及び四川省産の白芍はすべて白芍系であった。また、日本産芍薬の基原である薬用品種「梵天」や「北宰相」は白芍系であった。今回のシャクヤク市場品の結果はこれまでの知見と多くが一致したが、日本産シャクヤクの基原に関しては異なっていた。日本で栽培される洋種芍薬の多くが赤芍系であることをこれまでに見出しており、日本市場には薬用品種以外の園芸品種が流通していることが示唆された。

#### E. 1. 結論

*Paeonia* 属植物の分子系統分類では核 rDNA の ITS 領域の塩基配列が重要である。これまでの研究で、*P. lactiflora* は遺伝的に南方系 (白芍系) と北方系 (赤芍系) に二大別されることを見出している。2 グループの区別には上流から 69 番目、458 番目及び 523 番目の塩基が重要であった。この研究結果をシャクヤク 15 市場品に適用した結果、11 市場品は南方系 (白芍系)、4 市場品は北方系 (赤芍系) であった。日本産のシャクヤクの 3/4 が赤芍系であり、園芸用の洋種芍薬が日本市場に流通していることが示唆された。

#### F. 1. 参考文献



- 1) Sang T., et al.: Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6813-6817, 1995.
- 2) Pan J., et al.: Molecular phylogenetic evidence for the origin of a diploid hybrid of "*Paeonia*" (Paeoniaceae). Am. J. Bot., 94: 400-408, 2007.
- 3) Sun Y.L., Hong S.K.: Genetic diversity and phylogenetics of genus "*Paeonia*" based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. J. Plant Biotechnol., 38: 234-240, 2011.

## 2. ダイオウ (小松, 朱)

### A. 2. 研究目的

大黄は『神農本草経』の下品に収載され、古来瀉下、駆瘀血、消炎、健胃薬として汎用されている。その基原として、『第十六改正日本薬局方』に、タデ科 *Rheum palmatum* Linn., *R. tanguticum* Maxim., *R. officinale* Bail., *R. coreanum* Nakai 又はそれらの種間雑種の根茎が規定されている。しかし、*Rheum* 属植物は自家不和合性で自然交配が起こりやすく、その結果として形態が連続的に変化するため、植物の同定が難しい。生薬の同定は植物以上に難しく、品質が安定した大黄の供給が問題になっている。大黄の客観的な同定法を開発するため、これまで中国産 *Rheum* 属 9 種 100 検体余の葉緑体 *matK* 遺伝子を解析した結果、*R. palmatum* を中心に種内多型が顕著であった。しかし、分子系統樹を作成した結果、*R. tanguticum* と *R. officinale* は各々 1 系統にまとめられ、*R. palmatum* も 4 系統 (RP I, RP II, RP III, RP IV) に収束した。これまでに、*R. palmatum* に 23 タイプ、*R. tanguticum* に 5 タイプ、*R. officinale* に 3 タイプの遺伝子型を確認

している。さらに遺伝子型が明らかな大黄の成分研究の結果、薬効に関与する 28 成分の組成はこれらの系統と関連性があった。

日本漢方生薬製剤協会による平成 20 年度の原料生薬使用量等調査報告書によると、国内使用量は 439,590 kg で 15 番目に多く、その内訳は日本産が 95,418 kg、中国産が 344,172 kg である。

今回、日本市場に流通するダイオウの基原種と遺伝子型を明らかにする目的で、*matK* 遺伝子の解析を行なった。

### B. 2. 1. 実験材料

ダイオウ 9 市場品を試料とした (Table 2-1)。

### B. 2. 2. 実験方法

各試料をナイフで削り、110~120 mg を steel beads (数粒) と共に 2 mL チューブに入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 1 時間冷凍した。TissueLyser で 30/sec、2.5 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 を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 2  $\mu\text{L}$  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 法で葉緑体 DNA の *matK* 遺伝子と *trnK* イントロン領域の 3' 側を増幅した。この領域を 3 領域に分け、Region 1 はプライマーセット *trnK* 692F と *trnK* 1544R、Region 2 はプライマーセット *matK* 592F と *matK* 8R、Region 3 はプライマーセット *trnK* 1895F と *trnK* 2R を使用した。PCR 反応には KOD FX Neo DNA polymerase (東洋紡社) を用いた。反応条件は、ホットスタート  $94^{\circ}\text{C}$  5 分、続いて熱変性  $94^{\circ}\text{C}$  30 秒、アニーリング  $52^{\circ}\text{C}$  30 秒、伸長反応  $68^{\circ}\text{C}$  90 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に  $68^{\circ}\text{C}$  7 分 30 秒で終了した。得られた PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動法で確認した後、精製し、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant

Genetic Analyzer で、塩基配列を決定した。シーケンシング反応には増幅に用いたプライマーの他、*matK* 225F 及び *trnK* 2499R を用いた。増幅及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置及び配列を Fig. 2-1 及び Table 2-2 に示す。

## C. 2. 研究結果

ダイオウ市場品の *matK* 遺伝子全領域の塩基配列を決定し、これまでの当研究室の研究結果と比較した。*matK* 遺伝子全領域は長さ 1517 bp であった。9 市場品はすべて *Rheum palmatum* に由来し、そのうち 6 市場品は RPI 系統で Rp4 の遺伝子型 (AB115670)、2 市場品は RPII 系統で Rp5 の遺伝子型 (AB115671)、1 市場品は RPIII 系統で Rp13 の遺伝子型 (AB115680) をそれぞれ示した。

## D. 2. 考察

RPI 系統の遺伝子型 Rp4 は、青海省東部～四川省北西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、同地域産出の錦紋大黄の系統であり、円筒状の根茎が発達し、箱黄、包黄の名称で流通する。成分的に最良品質であることが当研究室の研究により確かめられている。RPII 系統の遺伝子型 Rp5 は、四川省北西部～甘粛省南西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、現地ではタングート大黄の名称を持ち、根の発達が良い。RPIII 系統の遺伝子型 Rp13 の大黄は、四川省中西部に産する *R. palmatum* が示す遺伝子型で、雅黄の系統である。

9 市場品のうち 6 市場品 (箱黄、包黄の名称を持つ 2 市場品を含む) が RPI 系統の遺伝子型 Rp4 であったことから、日本では品質の良いダイオウが流通していることがわかった。また、雅黄の名称を持つ 2 市場品については、1 市場品が RPIII 系統の遺伝子型 Rp13、1 市場品が RPII 系統の遺伝子型 Rp5 であったことか

ら、前者は本来の雅黄の産地である四川省中部産であり、後者は四川省北西部産であることが推測された。

## E. 2. 結論

ダイオウ 9 市場品はすべて *Rheum palmatum* に由来し、そのうち 6 市場品 (箱黄、包黄の名称を持つ 2 市場品を含む) が RPI 系統の遺伝子型 Rp4、2 市場品 (雅黄の名称を持つ 1 市場品を含む) が RPII 系統の遺伝子型 Rp5、1 市場品 (雅黄) が RPIII 系統の遺伝子型 Rp13 であることがわかった。日本では品質の良いダイオウが流通していることがわかった。

## 3. マオウ (小松、朱)

### A. 3. 研究目的

「麻黄」は『神農本草経』の中品に収載され、古来、発汗、利水、鎮咳薬として薬用に供されてきた。現在麻黄は、葛根湯や麻杏甘石湯などの感冒の初期に用いられる漢方処方のほか、メタボリックシンドロームに応用される防風通聖散、関節リウマチに応用される越婢加朮湯、水鼻で冷えの伴う発熱に応用される麻黄附子細辛湯、気管支炎や鼻炎に応用される小青龍湯などにも配合されており、漢方ではなくてはならない重要な生薬である。日本で使用される「マオウ」は『第十六改正日本薬局方』に「*Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C. A. Meyer、又は *E. equisetina* Bunge の地上茎で、総アルカロイド (エフェドリン及びプソイドエフェドリン) 0.7 % 以上を含む」と記されており、それらは専ら漢方薬に配合されて使用される。平成 20 年度の原料生薬使用量等調査報告書によると、国内使用量は 568,686 kg で 9 番目に多く、すべて中国から輸入されている。しかし、乾燥地に生育する *Ephedra* 属植物の乱獲による国土の砂漠化への懸念と非合法的な覚せい剤製

造の取締りを目的として、中国では 1999 年から麻黄の輸出規制が行われはじめ、現在許可制により採収と輸出が行われている。一方、中国政府による生薬資源植物の栽培の奨励により、内蒙古自治区や寧夏回族自治区などでは *E. sinica* の栽培が試みられている<sup>1)</sup>が、その生産量は野生品に及ばないとされる。

今回、日本市場に流通するマオウの基原種を明らかにする目的で、葉緑体 DNA の *trnK* 遺伝子のイントロン領域の前半部分に着目し、解析を行った。

### B. 3. 1. 実験材料

マオウ 11 市場品を試料とした (Table 3-1)。

### B. 3. 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、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 2 時間冷凍した。TissueLyser 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 を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 3  $\mu\text{L}$  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 *trnK* 遺伝子のイントロン領域の 5' 側の前半部分を増幅した。プライマーは、*trnK* 3914F と *trnK* In 3R を使用した。PCR 反応には、KOD FX Neo DNA polymerase を用いた。反応条件は、ホットスタート  $94^{\circ}\text{C}$  3 分、続いて熱変性  $94^{\circ}\text{C}$  30 秒、アニーリング  $52^{\circ}\text{C}$  30 秒、伸長反応  $68^{\circ}\text{C}$  50 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に  $68^{\circ}\text{C}$  10 分で終了した。得られた PCR 産物を精製後、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。増幅及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置及び配列を Table 3-2 及び Fig. 3-1 に示す。

### C. 3. 研究結果

当研究室のこれまでの研究結果に基づき、マオウの基原解析に有用である葉緑体 DNA の *trnK* 遺伝子のイントロン領域の前半部分に着目し、解析を行った。*trnK* イントロンの 5' 側約 1200 bp の塩基配列を解析した結果、11 市場品のうち、内蒙古自治区産の 9 市場品が同じ配列を示し、*Ephedra sinica* の同領域の配列 (AB453807) と完全に一致した。新疆ウイグル自治区産マオウ (NIB-034) の配列は、*E. equisetina* の同領域の配列 (AB453795) と完全に一致し、*E. sinica* の配列と 8 箇所に塩基の違いが認められた。甘粛省産マオウ (NIB-210) の配列は、*E. intermedia* の同領域の配列 (AB453797) と完全に一致し、*E. sinica* の配列と比べると 4 箇所に塩基置換、1 箇所に 38 bp の長い挿入が認められた。

従って、今回解析したマオウ 11 市場品の基原植物は、内蒙古自治区産の 9 市場品がすべて *E. sinica* であり、新疆ウイグル自治区産及び甘粛省産各 1 市場品がそれぞれ *E. equisetina* 及び *E. intermedia* であった。

### D. 3. 考察

内蒙古自治区産の市場品は *E. sinica*、甘粛省産の市場品は *E. intermedia* であり、これまでの我々が得ている結果と一致した。*E. equisetina* は、野生資源の著しい減少により、近年市場品にほとんど見られないが、今回、新疆ウイグル自治区産の市場品に確認された。薬用資源保護の観点から、本種の採取制限を希望する。少なくとも *E. sinica* 由来の 2 市場品は栽培品であり、野生品との同等性が担保されるのであれば、栽培品への移行が望まれる。

### E. 3. 結論

マオウ 11 市場品のうち、内蒙古自治区産の 9 市場品が *E. sinica*、新疆ウイグル自治区産の



1 市場品が *E. equisetina*、甘肅省産の 1 市場品が *E. intermedia* であった。また、マオウの基原植物の鑑別には葉緑体 DNA の *trnK* イントロンの 5'側約 1200 bp の塩基配列が有用であった。

#### 4. トウキ (合田、丸山)

##### A. 4. 研究目的

当帰は、代表的な補血薬の一つであり、主に婦人病を目標とした漢方処方に汎用される。第十六改正日本薬局方では、トウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa 又はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino の根であると定義されている。一方、当帰は、中国及び韓国においても使用されるが、これらの国々では、基原植物がそれぞれ、*A. sinensis*, *A. gigas* であり、我が国で使用されるものとは異なっている。日本薬局方が規定する 2 種の基原植物と中国及び韓国のは、核 rDNA の 5S 領域や ITS 領域の配列により区別可能である事が示されている。一方、*A. acutiloba* と *A. acutiloba* var. *sugiyamae* を区別可能な遺伝子領域は、いくつかの論文で報告があるものの、他の報告での結果と一致しない等、混乱が見られる。また、両者の区別については、RAPD 分析の結果より得られた種特異的増幅バンドを利用した鑑別法が特許公開されているが、利用されている遺伝子領域の機能が不明であったり、真菌の遺伝子配列と高い相同性を示す等、問題点も見られる。

さらに、*A. acutiloba* var. *sugiyamae* は、*A. acutiloba* とエゾノヨロイグサ *A. anomala* の交配種であるとする説や *A. acutiloba* の変異種とする説等、諸説があり、定まっていないことから、*Angelica* 属植物に共通して存在する遺伝子領域の内、適切な変異速度を有する遺伝子領域を解析する事により、*A. acutiloba*

と *A. acutiloba* var. *sugiyamae* を区別可能な遺伝子多形を見出すとともに、ホッカイトウキの種としての成立過程についての情報も得られると期待される。

そこで本研究では、中国、韓国の当帰との区別領域として、核 rDNA の ITS 領域の配列解析を行うとともに、*A. acutiloba* と *A. acutiloba* var. *sugiyamae* の区別可能領域の探索として、核 DNA の LEAFY 遺伝子の 2<sup>nd</sup> intron 領域の配列解析を行った。

(日本薬局方における生薬の正名は、カタカナ表記であるが、本報告書では、基原植物名との混乱を避けるため、生薬名を漢字表記、基原植物名をカタカナ表記とした)

##### B. 4. 1. 実験材料

トウキ 12 市場品を試料とした (Table 4-1)。

##### B. 4. 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) を用いて粉碎し、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA あるいは LEAFY 遺伝子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 ITS 領域あるいは LEAFY 遺伝子の 2<sup>nd</sup> intron を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、KOD FX DNA polymerase (Toyobo) を用いて、以下の温度プログラムにより行われた: 94°C 2 min; 98°C 10 sec, 55°C (ITS) or 45°C (LEAFY) 30 sec, 68°C 30 sec, 40 cycle; 68°C 2 min。また、LEAFY 領域においては、nested PCR 法を用いた。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。LEAFY 領域においてヘテロ型の配列を示した試料の内、To-4a, 7, 8, -12 については、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、サブクロー

ニングを行い、得られた各クローンに対して塩基配列解析を行った。塩基配列解析における蛍光ラベル化は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) により行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

#### C. 4. 研究結果

##### 1) 核 rDNA ITS 領域

解析結果を Fig. 4-1 に示した。解析を行った 12 検体全てが、599 bp の配列を有していた (ITS1-5.8S-ITS2)。その内部配列は、To-2, 3, 7 で、64 番目の塩基が G/C、To-5 において、584 番目 (ITS2 として 206 番目) の塩基が同じく G/C であった点を除き、全ての検体で一致した。また、これらの配列は、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) 上の *A. acutiloba* の配列 (Acc. No.: AB569093) と上記のヘテロ部位を除き一致した。また、ヘテロ部位の認められなかった To-1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12 では、完全に一致した。一方、データベース上の *A. sinensis* (Acc. No.: AF393784) 及び *A. gigas* (Acc. No.: DQ263580) とは、それぞれ、91.0-91.2% 及び 98.0-98.2% の相同性に留まり、これらの種とは、明確に区別された。

##### 2) 核 DNA の LEAFY 遺伝子

全 12 検体について解析を行ったところ、多くの遺伝子型が見出された事から、刻み試料である To-2, 3, 4, 5 については、別個体を 1 個体ずつ加え、各検体、2 個体を解析した (To-2a, 2b のように区別した)。12 検体、16 個体の解析結果を Fig. 4-2、Table 4-2 に示した。計 8 つの遺伝子型が確認され、この内、genotype 7 は、genotype 1 と 5 の雑種と推定される配列であった。ヘテロ型の配列を示し

た試料の内、To-4a, 7, 8, 12 については、サブクローニングにより 2 種の配列に分離後、解析を行い、得られた配列を各遺伝子型に帰属した (To-4a type A, B, To-7 type A, B, To-8 type A, B, To-12 type A, B in Table 2)。各遺伝子型の全長は、322-324 bp であり、genotype 7 は、260 番目の塩基に挿入/欠失がある 2 種の配列の混合物であったため、以降の配列は、解析困難だった。なお、To-7 は、ダイレクトシーケンス上、genotype 7 の配列を示したものをサブクローニングによりそれぞれのハプロタイプの配列に分離し genotype 1 と 5 に帰属したものであり、同じパターンの配列を示した To-1, 5b, 11 も同様のハプロタイプを有しているものと推定される。

#### D. 4. 考察

ITS 領域の配列解析結果から、今回解析を行った試料は全て、日本薬局方が定める通り、*A. acutiloba* あるいは *A. acutiloba* var. *sugiyamae* であると推定された。また、今回の結果から、国内に流通する当帰の ITS 配列は、種内及び個体内変異も極わずかであることが明らかになった。ITS 領域は、多コピー遺伝子であるため、PCR 増幅が容易であることから、中国及び韓国当帰との区別には本領域の塩基配列解析が有用であると思われる。一方、LEAFY 領域の遺伝子解析では、7 つの遺伝子型が見出された。この内、genotype 7 は、雑種型であるため、ハプロタイプとしては、6 つの遺伝子型が認められた (厳密には、genotype 3 もヘテロ型であり、9 番目の塩基が adenine に変異した遺伝子型がハプロタイプとして存在し、このものと genotype 1 との雑種が genotype 3 であると推定される)。6 つのハプロタイプの内、genotype 4 及び genotype 6 は、明らかに他のハプロタイプと比べて変異が多く、異質である。このハプロタイプが見出された To-8, 12 は、いずれも国

内本土産であるが、その来歴について興味もたれる。

しかしながら、当初の目的としたトウキ及びホッカイトウキとの鑑別に有用な遺伝子型は、今回、見出されなかった。

#### E. 4. 結論

生薬、当帰の原料植物の遺伝子情報の取得を目的に、核 rDNA ITS 領域並びに LEAFY 遺伝子の 2<sup>nd</sup> intron 領域について、塩基配列解析を行った結果、前者の領域が中国及び韓国当帰と日本薬局方が規定する当帰との区別に有用である事が確認されたが、日本当帰の 2 基原種を区別可能な遺伝子領域は見出せなかった。

### 5. サンシシ (合田、丸山)

#### A. 5. 研究目的

サンシシは、清熱、利胆、鎮静作用などを有する生薬であり、それぞれの作用を目的に、黄連解毒湯、茵陳蒿湯、加味逍遙散が臨床上、汎用されている。第十六改正日本薬局方では、サンシシをアカネ科クチナシ *Gardenia jasminoides* の果実であると定義している。現在の主な産地は、中国、中南部であり、植栽された原植物からの採集がほとんどであることから、基原植物の混乱は少ない生薬である。国際塩基配列データベース上には、*G. jasminoides* の配列として、核 rDNA ITS2 領域及び葉緑体 DNA *trnL-F* IGS 領域の配列が登録されていた事から、これらの領域を解析対象領域とした。

#### B. 5. 1. 実験材料

サンシシ 11 市場品を試料とした (Table 5-1)。

#### B. 5. 2. 実験方法

各試料をナイフで削り、果皮部 5 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて粉碎し、

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出、精製した。試料は、刻み生薬であった San-4, 7 を除き、単一個体を用いた。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA あるいは葉緑体 DNA の *trnL-F* 遺伝子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 ITS2 領域あるいは *trnL-F* IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、Nova Taq DNA polymerase-Ampdirect plus の系を用い、どちらの領域も nested PCR 法を使用した。Nested PCR 法による 2 段階の PCR は、いずれも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, 55°C (ITS2) or 50°C (*trnLF* IGS) 30 sec, 72°C 45 sec, 40 cycle; 72°C 7 min. 上記の方法では、San-1, 3, 4 の ITS2 領域及び San-3, 4, 7 の *trnL-F* IGS 領域において、PCR 産物が得られなかった事から、これらの試料については、Genomic-tip 20/G (Qiagen) を用いて、各試料 20 mg より genomic DNA の調製を行い、さらに、ITS2 領域における San-1, 3, *trnL-F* IGS 領域における San-3, 4, 7 については、*Gardenia* 属植物に特異的なプライマーを領域内に設計し、PCR を行う事により、目的の配列を有する DNA を増幅した。

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。塩基配列解析における蛍光ラベル化は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) により行った。PCR 増幅から塩基配列解析の行程は、酵素による取り込みミスを確認するため、複数回行った。

得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。