

C. 5. 研究結果

各領域の塩基配列解析結果を Table 5-2, Figs. 5-1, 5-2 に示した。

1) 核 rDNA ITS2 領域

Gardenia 属植物の配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行った San-1, 3 については、部分配列 183 bp、その他の試料については、全長配列 201 bp の塩基配列を決定した (Fig. 5-1; San-1 については便宜上、同一の遺伝子型を示した他の全長配列とまとめて示した)。全 11 検体で 7 つの遺伝子型が見出され、その内の一つ (San-1, 5, 7, 9) がデータベース上の *G. jasminoides* の配列 (Acc. no.: GQ434646, GQ434647) と一致した。また、この配列と 198 番目の塩基 (数字は、多重配列解析後の値) のみが異なる配列が、San-6, 10 で検出され、このものとデータベース上の *G. jasminoides* の配列との雑種と考えられる配列が San-11 に認められた。その他の遺伝子型についても、変異箇所が異なるものの、いずれもデータベース上の配列と 1 塩基の違いであった。

2) 葉緑体 DNA *trnL-F* 領域

Gardenia 属植物の配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行った San-3, 4, 7 については、部分配列 311 bp、その他の試料については、全長配列 343 bp の塩基配列を決定した (Fig. 5-2; San-4, 7 については、便宜上、同一の遺伝子型を示した他の全長配列とまとめて示した)。全 11 検体で、4 つの遺伝子型が見出され、その内の一つ (San-2, 5, 7, 8, 9, 10) がデータベース上の *G. jasminoides* (Acc. no.: FJ493345) の配列と一致した (ただし、データベースの配列は、前半 13 塩基が欠けた部分配列である; Fig. 5-2)。他に、San-1, 4, 11 が同一の配列を示し、データベース上の *G. jasminoides* の配列と 2 塩基違いであった。San-6 は、上記 2 種の配列の 1:1 の混合物の

配列パターンを示した。残る San-3 は、311 bp 中、3 塩基の違いを示し、全検体中、最もデータベース上の *G. jasminoides* の配列との違いが大きかった。

D. 5. 考察

今回解析した 2 つの領域において、全ての試料がデータベース上の *G. jasminoides* の配列と一致するかあるいは良く似た配列を示した。データベース上の配列と一致しなかった試料についても、San-3 の *trnL-F* IGS 配列を除いては、その違いはわずかであることから、*G. jasminoides* の種内変異の範囲であると想像される。ただし、データベース上の他の配列と比較すると *G. jasminoides* とその他の同属植物群の配列との違いはわずかであるため、今回の結果のみから、本研究で使用された試料の基原種を *G. jasminoides* と特定するには問題がある。この点については、*G. jasminoides* の標準植物試料を多数、収集し、その種内変異の範囲について情報を得る必要がある。

E. 5. 結論

市場に流通するサンシシの核 rDNA ITS2 領域及び葉緑体 DNA *trnL-F* IGS 領域の塩基配列を解析した結果、全ての試料がデータベース上に登録されている *Gardenia jasminoides* の配列と一致するかあるいは良く似た配列を示した。ただし、この結果のみをもって基原種を特定するには、*G. jasminoides* の種内変異の範囲について情報収集する必要がある。

6. オウレン (河野)

A. 6. 研究目的

生薬オウレン及びその基原植物である *Coptis* 属植物の遺伝子鑑別法に関する情報の収集ならびに、市場流通モデル試料の遺伝子情報の集積により、オウレンの遺伝子鑑別に

関する情報の整備を行う。

生薬オウレンの基原植物についての、第十六改正日本薬局方（平成23年3月24日厚生労働省告示第65号）の記述は下記のとおりである。

「オウレン *Coptis Rhizome* COPTIDIS RHIZOMA 黄連 本品はオウレン *Coptis japonica* Makino, *Coptis chinensis* Franchet, *Coptis deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao 又は *Coptis teeta* Wallich (*Ranunculaceae*)の根をほとんど除いた根茎である。」

B.6.1. 実験材料

生薬オウレン 10 市場品をモデル試料とした (Table 6-1)。さらに、下記の *Coptis* 属植物体または培養物を試料とした。

セリバオウレン (導入番号 3206-91)、キクバオウレン (導入番号 845-87)、*C. chinensis* 植物体、*C. teeta* 植物体、*C. omeiensis* 植物体、Cc (*C. chinensis* 不定胚培養物)、M (ミレン不定胚培養物)、G (ガレン不定胚培養物)、Comp (*Coptis* 属植物不定胚培養物)。

B.6.2. 研究方法

1.1) 生薬オウレン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 ‘Coptis’、‘Coptidis’、‘genetic’等のキーワードで検索を行い、遺伝子鑑別関連の文献を抽出した。

1.2) データベース登録遺伝子情報検索

DDBJ で ‘Coptis’ をキーワードに検索を行い、*Coptis* 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) 生薬オウレンからのゲノム DNA 調製 モデル試料については、「原形」、「刻み」(荒

い刻み) 生薬の 1 片を 1 検体とした。検体 2 片を選び、それぞれに [1]、[2] とナンバリングし、それぞれから清拭した剪定鋏で約 20-50 mg を削りとりゲノム DNA 調製用試料とした。

生薬試料約 20-50 mg を直径 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 2,500 rpm で 1 分間破碎した。(3,000 rpm では、チューブの破損が頻発した。) 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。

2.2) 植物体または培養物からのゲノム DNA 調製

植物体の葉または、不定胚培養物の約 100 mg を試料とし、500 μ L の DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1 バッファーおよび直径 4.8 mm のステンレスボール 2 個と共に 2 mL スクリューキャップチューブに入れ、MS-100(TOMY) にセットし 3,000 rpm で 1 分間 x 2 回破碎した。破碎液に 2 μ L の RNase (キット添付) 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 100 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) ITS1 領域の塩基配列情報の取得

予備実験の結果、生薬由来の DNA を鋳型に、ITS1-ITS2 の全領域の PCR 増幅を安定的に行うことは、その長さから困難と考えられた。そこで、ITS1 領域について PCR 増幅を行い、同領域の塩基配列情報を集積することとした。データベース登録配列に拠れば、ITS1 領域は *C. chinensis* と *C. deltoidea* で同一であ

ったが、これらはいずれも生薬オウレンの基原植物であり、同領域での両植物種の識別は本研究の目的とする生薬の基原植物の鑑別にはとくに必須でないものと考えた。

Coptis 属植物の ITS1 領域の PCR 増幅ために、データベースに登録のあった *Coptis* 属 ITS1 領域の塩基配列データ (HQ829628-HQ829634, EF206702, FJ527849-FJ527853, JF423949, EU370101) から新規に ITS2rev プライマーを設計し、使用した。PCR 条件等は下記のとおり。センスプライマーは ITS5 (文献 1) を使用した。

Primers: ITS5: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'

ITS2rev: 5'-CGT TCT TCA TCG ATG CGA GAG -3'

PCR reaction mixture: KOD-plus 1 μ L, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 μ L each, genome DNA 1 μ L (reaction volume: 50 μ L)

PCR condition: 94 $^{\circ}$ C 2 min. - (94 $^{\circ}$ C 15 sec. - 58 $^{\circ}$ C 30 sec. - 68 $^{\circ}$ C 90 sec.) x 30 - 4 $^{\circ}$ C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

得られた増幅産物は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たのちクローニング&シーケンシングに供した。

クローニング&シーケンシングには多検体を高効率に解析処理するため、コロニーダイレクトシーケンシングの手法をとった。PCR 増幅産物を A-attachment mix (Toyobo) で処理し Ligation Kit Ver.2 (Takarabio) で T-vector (Merck) にライゲーションしたのち、*E. coli* DH5 α を形質転換し、LB (Amp50, X-gal) プレート上培養し、コロニーを単離した。1 検体あたり、8~16 コロニー(クローン)をレプリカプレートに植菌し、コロニーダイレクト PCR に供した。PCR の条件は下記のとおり。

Primers: U-19: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG T-3'

R-20: 5'-CAG CTA TGA CCA TGA TTA CG-3'

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix 12.5 μ L,

primer sense & antisense (100 pmol) 0.25 μ L each,

suspend *E. coli* colony (reaction volume: 25 μ L)

PCR condition: 95 $^{\circ}$ C 5 min. - (95 $^{\circ}$ C 30 sec. - 58 $^{\circ}$ C 30 sec. - 72 $^{\circ}$ C 60 sec.) x 30 - 72 $^{\circ}$ C 10 min. - 4 $^{\circ}$ C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

コロニーダイレクト PCR の増幅産物を AGE で確認したのち、8~16 クローンについて、ExoSAP-IT (GE Healthcare) で処理し、U-19 プライマーを用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) でシーケンシング サイクル反応を行った。塩基配列解析には ABI PRISM 3130-Avant DNA sequencer、80 cm キャピラリー、POP-7 ポリマー(ABI)を用い、データ解析には DNASIS-Mac v3.7 (Hitachi Software), Finch TV (Geospiza Inc.) を使用した。

4) *Rpl16-rpl14* 領域の塩基配列情報の取得

Rpl16-rpl14 の増幅方法は文献 5 に準拠したが、PCR 酵素には正確性の高い pfu 酵素 KOD-plus (Toyobo) を使用し、アニール温度 58 $^{\circ}$ C に、サイクル回数 30 回に変更した。なお、増幅の不良の試料については、サイクル回数を 35 回に変更した。

PCR による *rpl16-rpl14* 領域の増幅には文献 5 記載のプライマーセットを使用した。

Primers: 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'

PCR reaction mixture: KOD-plus 1 μ L, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 μ L each, genome DNA 1 μ L (reaction volume: 50 μ L)

PCR condition: 94 $^{\circ}$ C 2 min. - (94 $^{\circ}$ C 15 sec. - 58 $^{\circ}$ C 30 sec. - 68 $^{\circ}$ C 90 sec.) x 30 - 4 $^{\circ}$ C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

得られた増幅産物は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たもののについてダイレクトシーケンシングに供した。

5) ダイレクトシーケンシング

PCR産物を ExoSAP-IT で処理し、その 5 µL をシーケンシング反応に供した。DNA 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 または B-primer を用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) で行った。塩基配列解析は上記クローニング&シーケンシングと同様に行った。

C.6. 研究結果

1.1) 文献・データベース調査結果

生薬の遺伝子鑑別全般(文献 1-5)及びオウレンの遺伝子鑑別(文献 6-8)に関連する情報は文献の項に記した。

1.2) 遺伝情報検索結果

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 Fig. 6-1 にまとめた。2011 年 10 月時点で、*Coptis* 属関連の遺伝子情報は 342 件登録されており、そのうちゲノム DNA の情報は 198 件であった。ゲノム DNA 情報の植物種別の内訳は、*C. chinensis* が 43 件と最も多く、次いで *C. deltoidea* 及び *C. omeiensis* がそれぞれ 31 件、*C. teeta* が 21 件、*C. japonica* は 11 であった。また、遺伝子領域別では、*psbA-trnH* 領域が 39 件で最も多く、*rbcL* が 35 件、ITS が 26 件、*trnL-trnF* が 23 件の順であった。なお、*rpl16-rpl14* 領域については登録がなかった。

2) モデル試料の ITS1 領域の塩基配列情報収集

10 種のモデル試料より調製したゲノム DNA 各 2 サンプル合計 20 サンプルおよび、

Coptis 属植物、培養物各試料の ITS1 領域の塩基配列の解析結果を Table 6-2 に示す。

これらの試料においては、いずれも 1~数種類の配列タイプが出現し、データベース登録配列と完全一致となり、基原植物種を確定できると考えられる試料は *C. teeta* と推定される #41-2 など、少数であった。しかしながら、配列タイプの出現頻度を勘案すると、その基原植物種は、*C. chinensis* または *C. deltoidea* と判断される(両植物種の ITS1 領域は同一配列)ものがほとんどであった。なお、国内産の試料については、ITS1 領域の配列はセリバオウレンまたはキクバオウレンと相同性が高く、*C. japonica* を基原とするものと判断された。

3) モデル試料および *Coptis* 属植物の *rpl16-rpl14* 領域の塩基配列情報収集

10 種のモデル試料より調製したゲノム DNA 各 2 サンプル合計 20 サンプルを鋳型とした *rpl16-rpl14* 領域の PCR 増幅の結果を Fig. 6-2 (増幅サイクル数: 30 サイクル) および Fig. 6-3 (同 35 サイクル) に示す。

これらの PCR 産物について塩基配列解析を行い、各試料についてアラインメント解析を行った結果、Table 6-2 に示す変異点の情報が得られた。原因は不明であるが、生薬を試料とした場合、本領域の 3' 領域が解析不明瞭となる場合が多かった。しかしながら、雲南省産の試料 #41 及び日本産の #115, #185 そして、四川省産のうち #215-2 が他のモデル試料と異なる配列パターンを示すことが判明した。

Coptis 属植物由来の同領域の塩基配列は、Table 6-2 のように、*C. chinensis* (2 タイプ)、*C. deltoidea*, *C. teeta*, *C. omeiensis*, そして *C. japonica* とタイプ分離することが明らかになった。今回供試したモデル試料より得られた配列と完全に一致したものは不定胚培養物の M 及び Comp と #215-2 のみであり、他の試料

では塩基パターンに類似点はあるものの、完全に一致するものは認められなかった。

D. 6. 考察

Table 6-2 に示すように、ITS1 領域または、*rpl16-rpl14* 領域は、それぞれ生薬オウレンの基原植物鑑別に有用と考えられるが、同領域の情報を用い、総合的に判断することにより、より確度の高い基原植物種鑑別が可能になると考えられる。

Rpl16-rpl14 領域については、比較対象とした *Coptis* 属植物または培養物と、モデル試料より得られた配列で完全一致したものは #215-2 の 1 検体のみであった。本領域を使用したモデル試料の基原植物種の鑑別の確度を向上させるためには、より多種の基準となる *Coptis* 属植物について塩基配列情報の収集を行う必要がある。

また、生薬試料においては 3' 領域が解析不明瞭となる場合が多く、この原因についてさらに検討する必要がある。

E. 6. 結論

生薬オウレンの遺伝子鑑別法について、既存文献情報、遺伝子データベース上に登録されている遺伝子情報を収集した。また、生薬オウレンの市場流通モデル試料 10 検体について、ゲノム DNA を調製し、核リボソーマル DNA ITS1 領域および、葉緑体 DNA *rpl16-rpl14* 領域の塩基配列情報を収集・解析した。その結果、市場流通オウレン由来の ITS1 領域は、1 検体に 1~数種の配列タイプが存在することが判明し、これらは既に報告されているデータベース登録配列と同一であるものと、新規配列である場合があった。また、同検体由来の葉緑体 DNA *rpl16-rpl14* 領域は、まず国内産系統と中国産系統に分類され、さらに中国系統は *Coptis teeta* を基原とするものと、その他に分類されることが判明した。なお、

局方非収載の *C. omeiensis* 型の配列を有する検体は認められなかった。以上の結果から、上記 2 領域は生薬オウレンの基原植物鑑別に利用できると考えられる。

F. 6. 文献

(文献 1) ITS 領域の多型を用いた朮類生薬の鑑別

Identification of Medicinal Atractylodes Based on ITS Sequences of nrDNA. Shiba M., Kondo K., Miki E., Yamaji H., Morota T., Terabayashi S., Takeda S., Sasaki H., Miyamoto K., and Aburada M. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 315-320 (2006)

(文献 2) ITS 領域の多型を用いた朮類生薬の鑑別

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. Guo Y., Kondo K., Terabayashi S., Yamamoto Y., Shimada T., Fujita M., Kawasaki T., Maruyama T., Goda Y., and Mizukami H. *J. Nat. Med.* **60**, 149-156 (2006)

(文献 3) 第十五改正日本薬局方第一追補、参考情報「遺伝子情報を利用する生薬の純度試験」208-0611.pdf

(文献 4) 組換え DNA 技術応用食品の検査方法に関する通知

平成 13 年 3 月、食発第 110 号、一部改正、平成 18 年 6 月、食安発第 0629002 号 2.2.1.2 シリカゲル膜タイプキットを使用する方法

(文献 5) *rpl16-rpl14* linker sequences の多型を用いた高等植物の鑑別

A Proposal for Identifying the Short ID Sequence

Which Addresses the Plastid Subtype of Higher Plants. Nakamura I., Kameya N., Kato Y., Yamanaka S., Jomori H., and Sato Y. *Breeding Sci.* **47**, 385-388 (1997)

(文献 6) [RAPD analysis for genetic diversity of medicinal plant *Coptis omeiensis*]. [Article in Chinese] Zhang C, He P, He J, Zhang Y, Qiao Y, Zhang M, Shi Z, Hu S. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **35**, 138-41 (2010)

(文献 7) [ISSR analysis of genetic diversity of *Coptis deltoidea*]. [Article in Chinese] Zhang C, He P, Hu S, Yuan F, Wang R, Gao S. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **34**, 3176-9 (2009)

(文献 8) [Genetic diversity of *Coptis chinensis* germplasm based on ISSR analysis]. [Article in Chinese] Chen DX, Li LY, Peng R, Qu XY. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **31**, 1937-40 (2006)

(文献 9) Genetic variation among wild and cultivated populations of the Chinese medicinal plant *Coptis chinensis* (*Ranunculaceae*). Shi W, Yang CF, Chen JM, Guo YH. *Plant Biol* (Stuttg). **10**, 485-91 (2008)

(文献 10) Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2010-30 November 2010. Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, SourceDepartment of Biology-University of Padova, via U. Bassi 58/b, Padua, Italy. *Mol Ecol Resour.* **11**, 418-21 (2011)

(文献 11) [Chromosome characteristics of three *Coptis* species]. [Article in Chinese] Xiang G, Fu T, Fan Q. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **35**, 1367-71 (2010)

7. ケイヒ (伊藤)

A. 7. 研究目的

ケイヒは漢方薬材料としてのみならず、香辛料としても多量に流通している生薬である。日本薬局方で定めるケイヒの基原植物はトンキンニッケイ (*Cinnamomum cassia*) だけであるが、香辛料に利用される植物資源にはトンキンニッケイのほか、ジャワニッケイ (*C. burmannii*) やセイロンニッケイ (*C. verum* = (*C. zeylanicum*)) などの同属植物が複数あって、これらは使用部位である樹皮だけになってしまうと、その基原植物種の判別は非常に難しい。

そこで本研究では *Cinnamomum* 属植物各種の塩基配列を比較し、データベースに供する情報を整備するとともに、その塩基配列の差異を利用して生薬基原植物種を区別する簡便な方法として、PCR と制限酵素処理を組み合わせた PCR-RFLP 法を開発することをも目的として研究を行った。

B. 7. 1. 実験材料

本研究に使用した試料の詳細を Table 7-1 および 7-2 にまとめた。Table 7-1 の試料は京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園に植栽しているもので新鮮葉サンプルとして用いたもの、Table 7-2 の試料は国内の生薬メーカーより提供を受けたケイヒ 17 市場品。

B. 7. 2. 実験方法

1) DNA 抽出方法の検討

各試料をはさみで細かく裁断し、さらに粉碎器を用いて粉末状にした。このケイヒ粉末試料と *Cinnamomum* 属植物新鮮葉を材料とし、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)、GMquicker 2 (ニッポンジーン)、Isoplant (ニッポンジーン)、Blood & Cell Culture Mini Kit (Qiagen) をそれ

ぞれ用いて DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動に供し、比較した。また、DNA が抽出できていることが確認できた場合には、その抽出 DNA を鋳型として PCR を行い、生成物についてアガロースゲル電気泳動により比較した。

2) 塩基配列の比較

Cinnamomum 属各種の新鮮葉から DNeasy Plant Mini Kit を用いて DNA を抽出し、核 rDNA (ITS) 領域、及び葉緑体 DNA (*trnL*-intron, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *rbcL* 上流) の各領域に設計したプライマーを用いて PCR を行い、目的とする DNA 断片を増幅した。PCR は、増幅酵素に Blend Taq® polymerase (Toyobo) を用い、以下の温度プログラムにより行った; 94°C 3 min; 94°C 30 sec, (増幅領域に応じた温度、50~60°C) 30 sec, 72°C 40 sec, 38 cycle; 72°C 3 min. PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、増幅断片をアガロースゲルから切り出し、NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) により精製した後、pCR4-TOPO (Invitrogen) に組み込み、配列解析に供した。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラム (Dnasis、日立ソフト) により行った。

3) PCR-RFLP 法の検討

Blood & Cell Culture Mini Kit を用い、生薬粉末 150 mg に 1 mL の Buffer G2 を加え、キットのプロトコールに従って DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型とし、*rbcL* 上流領域を PCR により増幅し、アガロースゲル電気泳動により増幅断片を確認後、これを切り出して NucleoSpin Extract II により精製した。精製した PCR 増幅断片を制限酵素 Dde I (New England Biolab) で処理した後、アガロース電気泳動に供し、処理前および後のサンプルを比較した。

C. 7. 研究結果

1) DNA 抽出方法の検討

4 種類の DNA 抽出キットを使用し、新鮮葉および生薬粉末からの DNA 抽出を試みた。

新鮮葉からの DNA 抽出は、収量に差があったものの、いずれのキットでも可能であった。ただし、*Cinnamomum* 属の葉は粘液質が多く、抽出操作初段階の試料懸濁バッファーを多めにする等何らかの工夫が必要であった。操作の簡便性、収量や不純物量等を考慮し、*Cinnamomum* 属新鮮葉からの DNA 抽出には NDeasy Plant Mini Kit を使用することとした。

ケイヒ生薬試料からの DNA 抽出では、Isoplant, Blood & Cell Culture Mini Kit を用いた場合にのみ、DNA 抽出が可能であった。しかしながら、Isoplant を用いて抽出した DNA は、これを鋳型として PCR を行った際に目的の反応生成物が得られず、抽出 DNA の糖沈殿操作や PCR 条件の最適化など、いろいろ試行錯誤したが、いずれも満足な結果を得ることができなかった。Blood & Cell Culture Mini Kit を用いた場合には、抽出プロトコールに若干の改変を加え、最初の抽出試料量と Buffer G2 の量を、生薬粉末 150 mg に 1 mL の Buffer G2 を加えるとすれば、ほぼいずれのケイヒ生薬試料からでも DNA が抽出できることが明らかとなった。この場合、キット添付試薬のなかで Buffer G2 のみ消費量が多くなってしまいが、本キットは Buffer 組成が公開されているため、不足分は自作して補うことができる。

2) 塩基配列の比較

2.1) *TrnL*-intron 領域

GenBank 等の塩基配列データベース、および各種学術雑誌に掲載された論文等から *Cinnamomum* 属の既知ジェノミック配列を検索したところ、M. Kojoma, et al., Genetic

Identification of Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) Based on the *trnL-trnF* Chloroplast DNA (Planta Med. 68, 94-96 (2002)) の中に、*trnL* intron 領域の一塩基多型により、*C. cassia* とそれ以外の種を区別できるという情報があった。これを参考に、*C. cassia* のみでこの領域が増幅されるようプライマーを作成し、新鮮葉 DNA を鋳型として PCR を行ったが、*C. cassia* のほか実験に供した多くの種で増幅産物が検出された。そこで、この増幅産物をクローニングし、1 種につき複数のクローンを選んで配列解析に供した。その結果、当該領域に種による変異は観察されなかった。

2.2) ITS, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *rbcL* 上流の各領域

核 rDNA 上の ITS 領域、葉緑体上の *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rbcL* 上流の各領域についても 2.1. と同様、新鮮葉 DNA を鋳型として行った PCR の増幅産物をクローニングし、それぞれ複数クローンを選んで配列解析に供した。その結果、*rbcL* 上流の配列中に *C. cassia* とそれ以外の *Cinnamomum* 属植物の配列が異なっている箇所があることが判明した (Fig. 7-1)。また ITS 領域については多様な変異が観察されたが、1 組のプライマーセットで増幅される本領域の配列は多様性に富み、同種内でも多種のタイプがあり、精査すれば種内変異の考察には有用な配列であると予想されたが、種の区別に利用するには適当ではないと考えられた。

3) PCR-RFLP 法の検討

2.2. に述べた葉緑体 DNA, *rbcL* 上流領域の差異がある部位は、制限酵素 Dde I の認識配列 (CTNAG) の一部となっている。そこで、ケイヒの基原植物種の区別や純度確認に Dde I を用いた PCR-RFLP 法が適用できないか、検討を行った。即ち、新鮮葉 DNA および生

葉粉末より抽出した DNA を鋳型として *rbcL* 上流領域を PCR により増幅し、増幅産物を精製した後、制限酵素 Dde I で処理した。Fig. 7-1 に示した全領域を対象として上記の操作を行うと、新鮮葉 DNA については *C. cassia* のみが消化され、それ以外はいずれも消化されない、期待通りの結果が得られるが (Fig. 7-2)、生葉抽出 DNA を用いた場合には PCR 増幅産物量が少なく、また制限酵素処理時間を十分に延長しても未消化物が観察される場合がしばしばあったため (Fig. 7-3)、PCR 増幅領域を狭くし、制限酵素認識部位を含む約 300 bp とし、同様に PCR-RFLP 法を試行した。新しい PCR 用プライマーは、制限酵素認識部位が増幅領域のちょうど中ほどになるように設計した。その結果、制限酵素処理後に生じる 2 つの断片長がほぼ同じ長さ (約 150 bp) となるため、アガロースゲル電気泳動では 1 本の太めバンドに観察され、処理前の 300 bp バンドとほぼ同じ強度で観察できるようになった (Fig. 7-4)。

そこで、提供されたデータベース構築用生葉サンプルについて上記の PCR-RFLP 法を適用したところ、すべてのサンプルについて、その基原植物種は *C. cassia* であるという結果が得られた。

D. 7. 考察

Cinnamomum 属植物は世界でひろく薬用・食用に多用されているにも関わらず、GenBank データや学術論文として報告されている塩基配列情報は驚くほど少ない。これは、特に熱帯性の *Cinnamomum* 属植物については、新鮮葉を材料とした時でも、生葉 (乾燥させた樹皮) を材料とした時でも、植物中に粘性物質が非常に多く、核酸抽出が困難であるからであろうと考えられる。本研究においても、加工食品や乾燥植物体からの核酸抽出に適しているとされる DNA 抽出キットを 4 種類試

したが、ケイヒの生薬サンプルについて使用可能なものは1種類、Blood & Cell Culture Mini Kit のみであった。本キットを使用した場合でも、他の植物から抽出した場合に比べて DNA 収量は少なく、また夾雑物の除去も困難で、これを鋳型とする PCR 条件等はその都度微調整が必要になってくる。操作を一般化する際には、再度試行錯誤が必要であろうと思われる。Blood & Cell Culture Mini Kit を使用した核酸抽出では、他のキットに比べて時間が多少長くかかるが、Buffer 組成が公開されているため、不足分を自作することが可能であると言う利点がある。ケイヒの DNA 抽出では1種類の Buffer のみ多量に消費するため、組成が公開されていることは好都合であった。

上述のように、生薬からの DNA 抽出が困難であったこと、また日本薬局方に定められたケイヒの基原植物種は *C. cassia* ただ1種であるが、世界的に見れば *Cinnamomum* 属植物由来で生薬や薫香料、香辛料として利用されているものは多種類あること、などから、遺伝子情報取得のための配列解析は、*Cinnamomum* 属各種の新鮮葉から抽出した DNA を使って行った。その結果、*trnL*-intron 領域については既報に配列の報告があるにも関わらず、その情報には残念ながら再現性が無く、本研究の対象領域として利用することは不可能であった。また、いくつかの生薬で種の判別に有用であると報告されている ITS 領域については、*Cinnamomum* 属植物の場合には変異が非常に多く、1個体中に複数コピーが存在していると予想された。この配列の重複パターンを丁寧に調べれば、*C. cassia* 種内の分類、例えば、ベトナム産 MN ケイヒ（中・南部産）と同 YB ケイヒ（北部産）、中国産東興ケイヒと同西江ケイヒの弁別などには利用可能かもしれないと思われた。

葉緑体 DNA の各領域の配列は、いずれも

種間で相同性が高く、細かな1塩基変異がところどころに観察された。*RbcL* 上流の配列については *C. cassia* とそれ以外の種で異なっており、さらにその配列が制限酵素認識部位に含まれていたため、PCR-RFLP 法を考案することができた。PCR-RFLP 法は、サンプルごとのシーケンス解析よりも簡便で低コスト、短時間で結果が得られる等の利点があると考えられ、さらに、わずかな違いで結果が大きく変わってしまう PCR に制限酵素処理を組み合わせることで、PCR だけを使った弁別方法よりも信頼性が高まると考えられる。この方法をケイヒについて考案した。*RbcL* 上流域の種間で相同性が高い領域を比較的広範囲に（約 600 bp）増幅した場合には、新鮮葉 DNA サンプルでは期待通りの結果が得られたものの、生薬サンプルを使って行った場合に制限酵素処理で未消化物が観察された。これはケイヒの基原が *C. cassia* の“樹皮”であって、樹皮表面には地位類や真菌類の付着生物が入り込んでいる可能性が高く、PCR 時にこれらの DNA を鋳型とした類似領域が増幅されてしまったためではないか、と予想された。また、生薬抽出 DNA サンプルでは、生薬の経時劣化や加熱処理等で DNA が損傷している場合や、夾雑物の影響と思われる PCR 増幅量不良の解決が難しく、制限酵素処理後のアガロースゲル電気泳動では、短くなった断片の検出感度が非常に低かった。

そこで、これらの問題を解決するため、PCR 増幅量向上と外来 DNA の増幅防止のために増幅領域を短縮し、制限酵素処理後の検出感度を向上させるために、2つの処理後断片の長さがほぼ同じになって、重なった1本の断片として検出されるように増幅領域を再設計して試験を行った。その結果、生薬サンプルを使った場合でも、多くの場合で感度よく検出できた。しかし、いくつかの生薬サンプルではこの方法でも検出が困難であった。この

場合は、PCR を行って増幅した産物をスピニングカラムなどで精製し、この精製した増幅産物を鋳型として2回目のPCRを行い、この産物を制限酵素処理に供することで検出できる状態となった。本方法を一般化しようとする際には、1回目のPCRプライマーセットの増幅領域内側に2回目のPCRプライマーセットを設計し (nested primers)、増幅産物の配列正確性を高める工夫が必要になると考えられる。

E. 7. 結論

ケイヒの核および葉緑体の複数の遺伝子領域について検討した結果、日本薬局方に定められたケイヒの基原植物種である *C. cassia* について、塩基配列を利用した方法でそれ以外の種と区別するためには、*rbcL* 上流の配列が適していると考えられた。また、この領域を使ったPCR-RFLP法を考案した。

8. サイコ (山路)

A. 8. 研究目的

国内に流通する生薬サイコの遺伝子情報を整備することを目的に、収集された10サンプルについて調査した。

サイコの遺伝子鑑別においては、Wu et al. (2005), Yang et al. (2007), Xie et al. (2009)が核リボゾームDNA中のITS領域の塩基配列が有効であると報告している。本研究でも同領域の調査を行い、遺伝子データベース (DDBJ/EMBL/GenBank)上の既知の配列と比較して基原種鑑別を行った。

B. 8. 1. 実験材料

サイコ10市場品を試料とした (Table 8-1)。

B. 8. 2. 実験方法

1) DNAの抽出

生薬粉末約500 µgからDNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)を用いてDNAを抽出した。抽出

したDNAはAE Buffer 200 µlに溶解した。PCR増幅がみられなかったサンプルは、抽出したDNAをQIAGEN® Plasmid Mini Kit (Qiagen)を用いて精製してから再度PCR増幅を試みた。またそれでもPCR増幅がみられなかったサンプルは、QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen)を用いて再抽出した。なお、DNAeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)およびQIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen)を用いてのDNA抽出は核酸抽出精製装置 QIAcube (Qiagen)を使用して、プロトコルに従って行った。

2) PCR

ITS領域はITS1とITS2の二つのスペーサー領域を別々に増幅した。使用するプライマーセットはITS1領域はforward: ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; White et al. 1990), reverse: ITS2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'; White et al. 1990)、ITS2領域はforward: ITS3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'; White et al. 1990), reverse: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'; White et al. 1990)である。

PCRに用いた反応液 (30 µl)の組成は、10×Gene Taq Buffer (Nippon Gene) 3 µl, dNTP mix (Nippon Gene) (2.5 mM) 2.4 µl, Forward Primer (10 pmol/µl) 1.5 µl, Reverse Primer (10 pmol/µl) 1.5 µl, template DNA 3 µl, Gene Taq (Nippon Gene) 0.15 µl, D.D.W.15.45 µl, DMSO 3 µlである。

PCR反応サイクルは以下の通り。

(94°C, 4 min)×1 cycle, (95°C, 30 sec; 70°C, 15 sec; 72°C, 15 sec)×3 cycles, (95°C, 30 sec; 66°C, 15 sec; 72°C, 15 sec)×3 cycles, (95°C, 30 sec; 62°C, 15 sec; 72°C, 15 sec)×3 cycles, (95°C, 30 sec; 58°C, 15 sec; 72°C, 15 sec)×3 cycles, (95°C, 30 sec; 5°C, 15 sec; 72°C, 15 sec)×3 cycles, (95°C, 30 sec; 48°C, 1.5 min; 72°C, 2.5min)×20 cycles, and (72°C, 7min.)×1 cycle。

PCRに使用したサーマルサイクラは

GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)または Tprofessional thermocycler (Biometra)である。

3) 精製

反応液は E-Gel® EX Gel, 2% (Invitrogen)を用いて電気泳動して分離し、目標バンドだけを切り出して GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham biotech) を用いて精製した。

4) DNA シーケンス

精製産物を BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.1.1 と Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。シーケンスの際には PCR に用いたプライマーを使用し、両端より forward、reverse 両方を読んで配列を決定した。ダイレクトシーケンスのクロマトグラフィーに観察された塩基の重なりは IUPAC (IUB)コードにしたがって表記した。

C. 8. 研究結果

全てのサンプルで、ITS 領域の一部ないし、全長の塩基配列の決定に成功した。NTB-190 では個体間で差異が見られたため、調査した 3 個体の配列を枝番付き記で記した(Fig. 8-1)。

それぞれのサンプルについて、GenBank に登録されている配列との類似性に基づき基原種の鑑定を試みたところ、調査したサンプルは大きく 3 系統に分けられ、それぞれミシマサイコ *Bupleurum falcatum* L., *Bupleurum chinense* DC.および *B. scorzonerifolium* Willd. と鑑定された (Table 8-1)。

D. 8. 考察

国内に流通する生薬サイコには、大きく分けて 3 系統あり、それぞれミシマサイコ *Bupleurum falcatum* L., *B. chinense* DC.および *B. scorzonerifolium* Willd. と鑑定された。

大井 (1965) によると、*Bupleurum chinense*

DC. および *B. scorzonerifolium* Willd. は *B. falcatum* L. のシノニムとされており、*B. falcatum* の種内変異の範疇と考えられる。第十六改正日本薬局方にはサイコ基原植物としてミシマサイコ *Bupleurum falcatum* L. のみが収載されているが、本試験で調査したサンプルは全て日局基原適合品である。

E. 8. 結論

国内に流通する生薬サイコの遺伝子情報を整備することを目的に、収集された 10 サンプルの核リボゾーム DNA 中の ITS 領域の塩基配列を調査した。得られた配列と GenBank に登録されている配列との類似性に基づき基原種の鑑定を試みたところ、調査したサンプルは大きく 3 系統に分けられ、それぞれ *Bupleurum falcatum* L., *Bupleurum chinense* DC. および *B. scorzonerifolium* Willd. と鑑定された。*B. chinense* および *B. scorzonerifolium* はミシマサイコ *B. falcatum* L. のシノニムとされており、*B. falcatum* の種内変異の範疇と考えられるため、本試験で調査したサンプルは全て日局基原適合品である。

F. 8. 参考文献

- 1) 大井次三郎. 1965. 改訂新版 日本植物誌. 至文堂、東京
- 2) White et al.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds.), pp. 315 - 322. Academic Press, San Diego, 1990.
- 3) Wu Y., Liu C., Liu Y., and Yan Y.: ITS sequence identification of radix Bupleuri. China Journal of Chinese Materia Medica, 30: 732-734, 2005. (in Chinese)
- 4) Xie H., Huo K., Chao Z., Pan S.: Identification of Crude Drugs from Chinese Medicinal Plants of

the Genus *Bupleurum* Using Ribosomal DNA ITS Sequences. *Planta Med.*, 57: 89-93, 2009.

5) Yang Z., Chao Z., Huo K., Xie H., Tian Z.: ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China. *Phytomedicine*, 14: 416-422, 2007.

9. ジオウ (水上)

A. 9. 研究目的

生薬の遺伝子鑑別は、環境変異や個体変異による影響を受けない優れた方法であることがすでに明らかにされている。地黄の基原植物であるカイケイジオウとアカヤジオウの ITS 領域および葉緑体ゲノムに存在する *trnK* 領域の塩基配列を比較して、両種の鑑別サイトを検索するとともに、そのサイトを指標として研究グループから提供された地黄 11 市場品の基原種同定を試みた。(植物名との混乱を避けるため、生薬名を漢字表記にする)

B. 9. 1. 実験材料

生薬試料は、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターから提供を受けた地黄 11 市場品。カイケイジオウ *Rehmannia glutinosa* Liboschitz、アカヤジオウ *Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpurea* Makino は、武田薬品京都薬草園から分与され、本学薬用植物園で栽培されているもの、金城学院大学薬学部および鈴鹿医療科学大学薬学部、医薬基盤研究所薬用資源研究センターから提供された新鮮葉(ただし、これらは養命酒製造株式会社薬草園由来のものである)を用いた。

B. 9. 2. 実験方法

1) DNA の調製

カイケイジオウ、アカヤジオウおよび地黄からの DNA 調製には、DNeasy Plant Mini Kit

(Qiagen) を用いた。

2) 直接シーケンスによる鑑別

2.1) カイケイジオウとアカヤジオウの ITS 領域の増幅

DNA データバンクに登録されているカイケイジオウの rDNA の塩基配列 (accession No. FJ770249) に基づき、18S-rDNA の 3'-end および 26S-rDNA の 5'-end にプライマーを設計し、ITS 1, 5.8S-rDNA, ITS 2 を含む約 700 bp の領域を増幅した。

2.2) カイケイジオウとアカヤジオウの *trnK* 領域の増幅

DNA データバンクに登録されている *Rehmannia* sp. の *trnK* の塩基配列 (accession No. FN773554) に基づき約 2500 bp の領域を 5 つに分けて増幅した。

2.3) カイケイジオウとアカヤジオウの ITS 領域および *trnK* 領域の塩基配列の解読

PCR 反応液を exonuclease と alkali phosphatase 混合液で処理し、シーケンス反応を行った。シーケンスには ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

2.4) 地黄の *trnK* 領域の塩基配列の解読

地黄の DNA 調製液の 1 μ l を用いて、*trnK* 領域内の 2 つの鑑別サイトを含むそれぞれ約 150 bp の領域を増幅し、PCR 反応液を exonuclease と alkali phosphatase 混合液で処理後、シーケンス反応を行った。

C. 9. 結果と考察

国内各所より入手したアカヤジオウ、カイケイジオウの各 3 系統について、ITS 領域の塩基配列を比較したところ、その配列は完全に一致した。したがって、ITS 配列は地黄基

原種の鑑別マーカーとしては使用できないことが明らかになった。

次に、*trnK* 領域の全長約 2600 塩基について比較したところ、*trnK*-5'-half と *matK* 領域の間のイントロン部および *matK* コード領域内の各 1 サイトでアカヤジオウとカイケイジオウの間で塩基置換が存在しており、生薬の基原種鑑別のためのマーカーとして利用できる可能性が認められた (Fig. 9-1)。そこで、それぞれをサイト 1 およびサイト 2 として、提供を受けた生薬について塩基配列の解読を行うこととした。

サイト 1 およびサイト 2 を含む約 150 bp の領域が増幅できるようにプライマーを設計し、生薬から調製した DNA 溶液を鋳型として PCR 増幅を試みた。SNET-Protenase K 混合液で抽出し、Ampdirect Plus (Shimadzu) と Nova Taq (Merck) を用いて PCR を行う方法、DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を用いて DNA を調製し、Amplitaq Gold Master Mix (Applied Biosystems) を用いる方法のいずれでも PCR 産物は得られなかった。そこで、サイト 1 は内部プライマーを用いて、サイト 2 は同じプライマーの組合せで nested PCR を行ったところ、どちらの方法で DNA を調製した場合でも、PCR 産物を得ることが出来た。この PCR 溶液の 5 μ l を用いて ExoSap-It (GE Healthcare) 処理後にシーケンス反応を行うことにより、サイト 1 およびサイト 2 の塩基を同定することが出来た。この方法を用いて提供された地黄 11 市場品について、シーケンス結果を Table 9-1 に示した。

供試した生薬のうち 8 市場品では、サイト 1、サイト 2 で mixed nucleotide の配列タイプを示した。また、3 市場品ではサイト 1 およびサイト 2 がともに G の配列タイプを示し、これまでに供試したアカヤジオウ、カイケイジオウのシーケンスタイプと一致しなかった。今後、さらにサンプル数を増して検討するこ

とが必要であるが、この領域は基原種鑑別に適さないかもしれない。

D. 9. 結論

以上の結果から、提供された地黄の基原種を Table 9-2 のように判定した。

1 0. シャゼンシ, ビャクジュツ (水上)

A. 1 0. 研究目的

生薬の遺伝子鑑別は、環境変異や個体変異による影響を受けない優れた方法であることがすでに明らかにされている。兎類生薬および車前子に関しては、核ゲノム中に存在する ribosomal DNA 遺伝子の internal transcribed spacer (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 [1,2]。本研究では、研究グループから提供を受けた生薬シャゼンシ 7 市場品, ビャクジュツ 4 市場品の基原種をこの方法を用いて同定した。

B. 1 0. 1. 実験材料

生薬試料は、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターから提供を受けた生薬シャゼンシ 7 市場品, ビャクジュツ 4 市場品。

B. 1 0. 2. 実験方法

1) DNA の調製

シャゼンシ, ビャクジュツからの DNA の調製には SNET buffer を用いた。

2) 直接シーケンスによる鑑別

2.1) シャゼンシ

DNA 抽出液 1 μ l を用いて約 600 bp の ITS 領域を 2 つに分けて増幅した。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 [1]。

2.2) ビャクジュツ

DNA 抽出液 2 µl 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。増幅産物を含むは PCR 反応液を exonuclease と alkali phosphatase で処理後、シーケンス反応を行なった [2]。

C.1 0. 結果と考察

1) シャゼンシ

6 市場品について、シーケンスの結果を Table 10-1 に示した。いずれの試料も、中国に分布するオオバコ *P. asiatica* Linne に見られるタイプ A 2 と完全に一致したことから、オオバコを基原種とするものと判定した。

2) ビャクジュツ

4 市場品について、シーケンスの結果を Table 10-2 に示した。3 市場品はオケラ *Atractylodes japonica* Koidzumi et Kitamura の配列と完全に一致していた。1 市場品では、配列はオオバナオケラ *A. ovata* DC. (= *A. macrocephala* Koidzumi) と類似していたが、3 つのサイトで塩基置換が生じていた。

D.1 0. 結論

以上の結果から、提供されたシャゼンシおよびビャクジュツ市場品の基原種を Table 10-3 および 10-4 のように判定した。

E.1 0. 参考文献

- 1) Sahin, F. P. et al.: DNA authentication of plantago herb based on nucleotide sequences of 18S–28S rRNA internal transcribed spacer region. Biol. Pharm. Bull., 30: 1265-1270, 2007.
- 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.

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1-1. 河野徳昭, 吉松嘉代, 川原信夫, 丸山卓郎, 合田幸宏, 小松かつ子「市場流通生薬の遺伝子情報による安全性・品質確保に関する研究—黄芩—について」日本生薬学会第 58 回年会 (2011.9.24-25, 東京)
- 1-2. 河野徳昭, 丸山卓郎, 合田幸広, 小松かつ子, 吉松嘉代, 川原信夫「漢方薬に使用される薬用植物の遺伝子鑑別に関する研究—黄連について—」日本薬学会第 132 年会 (2012.3.28-31, 札幌).

2. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

H. 健康危険情報

なし

1. シャクヤク

Table 1-1 生薬「シャクヤク」の市場品と同定結果

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	備考(栽培・野生・等級)	同定結果	
						原植物	Clade*
NIB-023	シャクヤク	中国安徽産	原形	2010年	皮付き	<i>Paeonia lactiflora</i>	I
NIB-024	シャクヤク	中国浙江産	原形	2010年	皮付き	<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-046	シャクヤク	中国四川省	原形	2009年		<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-063	シャクヤク	日本長野県	刻み	2009年		<i>P. lactiflora</i>	II
NIB-072	シャクヤク	中国安徽省	原形	2009年	栽培品	<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-082	シャクヤク	中国安徽省	刻み	2008年	栽培品(主に使用)	<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-083	シャクヤク	中国安徽省	刻み	2008年	皮付き	<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-098	シャクヤク	中国四川省	原形	2009年	原形	<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-128	シャクヤク	中国安徽省	刻み	2009年	栽培品(主に使用)	<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-129	シャクヤク	日本奈良県	刻み	2010年	栽培品・大和芍薬	<i>P. lactiflora</i>	II
NIB-130	シャクヤク	日本新潟県	原形	2010年	栽培品・奈良県以外で栽培した国産芍薬	<i>P. lactiflora</i>	II
NIB-157	シャクヤク	中国安徽省	原形	2010年		<i>P. lactiflora</i>	II
NIB-172	シャクヤク	中国安徽省	原形	2009年	栽培品(主に使用)	<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-197	シャクヤク	日本奈良県	刻み	2010年	大和芍薬	<i>P. lactiflora</i>	I
NIB-225	シャクヤク	中国四川省	原形			<i>P. lactiflora</i>	I

*Clade: I: 南方系(白芍系)、II: 北方系(赤芍系)

Table 1-2 比較のための植物材料及び生薬材料

植物材料	No.	採集地	標本番号	採集年月日	備考
<i>Paeonia lactiflora</i>	P1	中国内蒙古自治区多倫県	Wei S.L. 2007-1	2007年1月28日	野生
	P2	中国内蒙古自治区阿爾山五岔沟	Murakami M.	2007年8月11日	野生
	P3	モンゴル国	623-63	1967年	野生
	Pcv	富山県薬用植物指導センター	34	2007年10月24日	栽培品種「梵天」
<i>P. veitchii</i>	P7	中国四川省甘孜県	Komatsu K.	1996年7月10日	野生

生薬材料	産地	入手先	入手年月日	TMPW No.
赤芍	D12 中国内蒙古自治区	赤峰栄興堂薬業有限責任公司	2002年9月14日	21565
白芍	D1 中国安徽省亳州	中薬材交易中心	2006年5月2日	25071(1級、5年生)
芍薬(梵天)	D52 日本富山県	福田商店	2008年2月15日	25836

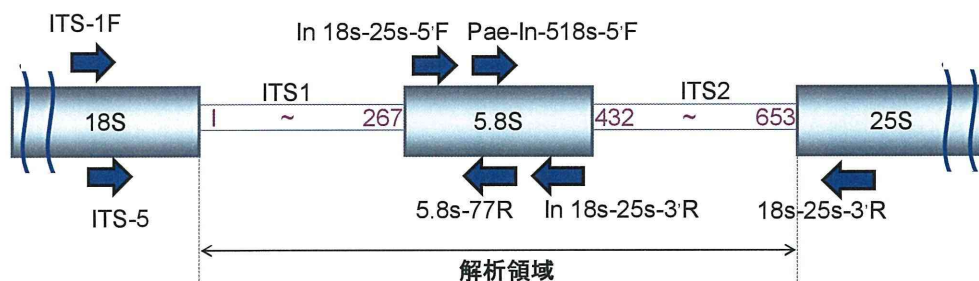


Fig. 1-1 PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置

2. ダイオウ

Table 2-1 生薬「ダイオウ」の市場品と同定結果

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	備考(栽培、野生、等級)	同定結果			
						原植物	Clade	matK sequence type ¹⁾	genotype
NIB-028	ダイオウ	中国四川省	原形	2010年		<i>Rheum palmatum</i>	RPI	Pq3 (AB115670)	Rp4
NIB-049	ダイオウ	中国四川省	原形	2009年		<i>R. palmatum</i>	RPI	Pq3 (AB115670)	Rp4
NIB-101	ダイオウ	中国青海省	刻み	2008年		<i>R. palmatum</i>	RPII	Ps5 (AB115671)	Rp5
NIB-134	ダイオウ	中国四川省	刻み	2009年	野生品、雅黄(主に使用)	<i>R. palmatum</i>	RPIII	Ps14 (AB115680)	Rp13
NIB-135	ダイオウ	中国青海省	原形	2004年	野生品、錦紋大黄(箱黄)	<i>R. palmatum</i>	RPI	Pq3 (AB115670)	Rp4
NIB-161	ダイオウ	中国四川省	原形	2009年	3~4等級	<i>R. palmatum</i>	RPI	Pq3 (AB115670)	Rp4
NIB-201	ダイオウ	中国青海省	原形	2009年	包黄	<i>R. palmatum</i>	RPI	Pq3 (AB115670)	Rp4
NIB-202	ダイオウ	中国四川省	原形	2008年	雅黄、1級	<i>R. palmatum</i>	RPII	Ps5 (AB115671)	Rp5
NIB-223	ダイオウ	中国青海省	原形			<i>R. palmatum</i>	RPI	Pq3 (AB115670)	Rp4

1) The sequence type recorded in Yang D.Y., Fushimi H., Cai S. Q., Komatsu K., *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, 27(3): 375-383. Number in parenthesis is the corresponding accession number in the DDBJ, EMBL, and GenBank nucleotide sequence databases.

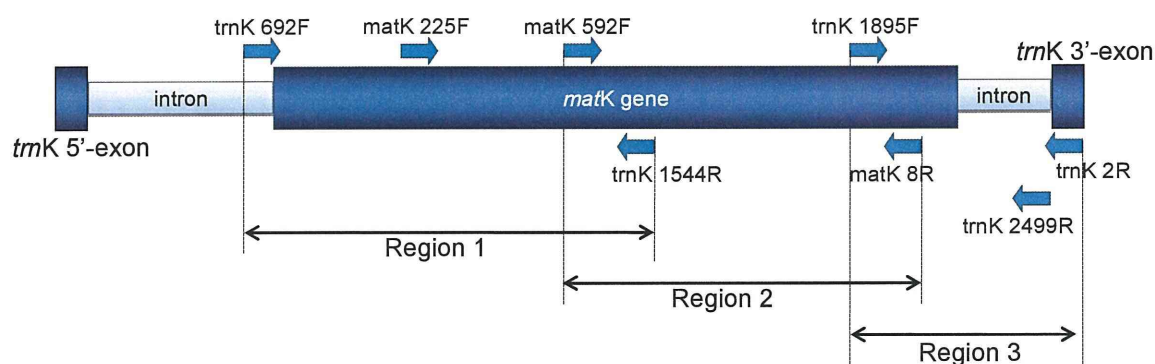


Fig. 2-1 PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置

Table 2-2 PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの配列

<i>trnK</i> gene		
Primer	Sequence (5'→3')	Length (bp)
Forward Primer		
* trnK 692F	GAC TGT ATC GCA CTA TGT ATC	21
matK 225F	GTA TTC TCA ACA GAT CTC AGA G	22
* matK 592F	TCC TAC GTG TGT GAA TGC G	19
* trnK 1895F	GAC ATC CCA TTA GTA AGC C	19
Reverse Primer		
* trnK 1544R	GGA TAA CCC CAG AAT GCT TAG	21
* matK 8R	AAA GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG	23
trnK 2499R	CAT TGC ACA CGG CTT TCC CTA	21
* trnK 2R	AAC TAG TCG GAT GGA GTA G	19

*: Primers for PCR amplification

3. マオウ

Table 3-1 生薬「マオウ」の市場品と同定結果

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	備考(栽培・野生・等級)	同定結果
NIB-033	マオウ	中国内蒙古自治区	刻	2010年	刻	<i>Ephedra sinica</i>
NIB-034	マオウ	中国新疆ウイグル自治区	刻	2009年	刻	<i>E. equisetina</i>
NIB-053	マオウ	中国内蒙古自治区	刻み	2009年		<i>E. sinica</i>
NIB-088	マオウ	中国内蒙古自治区	刻み	2008年	栽培品「主に使用」	<i>E. sinica</i>
NIB-104	マオウ	中国内蒙古自治区	刻み	2009年		<i>E. sinica</i>
NIB-141	マオウ	中国内蒙古自治区	刻み	2008年	野生品	<i>E. sinica</i>
NIB-144	マオウ	中国内蒙古自治区	刻み	2008年	栽培品	<i>E. sinica</i>
NIB-166	マオウ	中国内蒙古自治区	刻み	2004年		<i>E. sinica</i>
NIB-209	マオウ	中国内蒙古自治区	刻	2009年		<i>E. sinica</i>
NIB-210	マオウ	中国甘肅省	刻	2009年		<i>E. intermedia</i>
NIB-216	マオウ	中国内蒙古自治区	原形			<i>E. sinica</i>

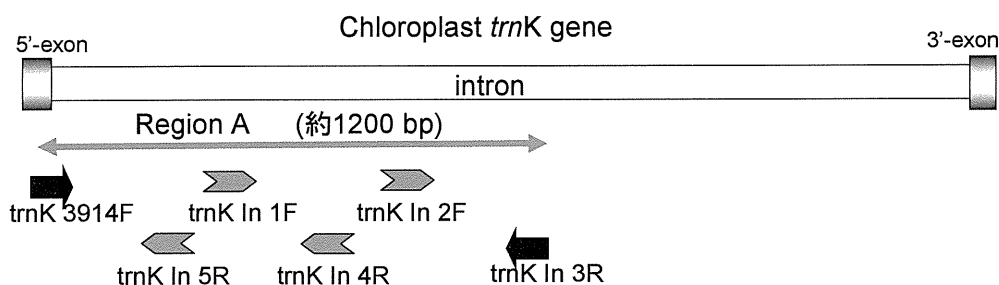


Fig. 3-1 PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置

Table 3-2 PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの配列

<i>trnK</i> gene		
Primer	Sequence (5'→3')	Length (bp)
Forward Primer		
* trnK 3914F	TGG GTT GCT AAC TCA ATG G	19
trnK In 1F	ATG ACG ATT GAG ATT CTT TC	20
trnK In 2F	AAT TTT CAA TCA GTC TTT TCT CTA	24
Reverse Primer		
trnK In 5R	CTT AGC AAC CAG GCG TTC TC	20
trnK In 4R	AGA TAG TTT TGT TGA TGT AAT AGC	24
* trnK In 3R	CTT TAG CAA TCT TAT CGT GTC TTT	24

*: Primers for PCR amplification

Table 3-3 マオウ市場品の *trnK* イントロンの 5'側約 1200 bp の塩基配列と GenBank に登録された *Ephedra* 属植物 4 種の配列の比較

Species	Chloroplast <i>trnK</i> gene									Accession No.	
	1	2	5	5 6	6 ~	6 0	7	8	1 0		1 1
	8	5	3	8		5	8	2	2	6	
	2	0	6	(units No.) [△]		7	5	7	7		
<i>Ephedra sinica</i>	T	C	C	(1)		G	G	C	G	AB453807	
<i>E. intermedia</i>	A	*	*	(2or3)		*	A	*	*	AB453797	
<i>E. przewalskii</i>	A	*	*	(1)		*	*	*	*	AB453802	
<i>E. equisetina</i>	A	G	T	(1)		*	*	T	*	AB453795	
サンプルの解析結果										Identity	
NIB-033	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>Ephedra sinica</i>	
NIB-053	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>E. sinica</i>	
NIB-088	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>E. sinica</i>	
NIB-104	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>E. sinica</i>	
NIB-141	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>E. sinica</i>	
NIB-144	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>E. sinica</i>	
NIB-166	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>E. sinica</i>	
NIB-209	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>E. sinica</i>	
NIB-216	*	*	*	(1)		*	*	*	*	<i>E. sinica</i>	
NIB-034	A	G	T	(1)		*	*	T	*	<i>E. equisetina</i>	
NIB-210	A	*	*	(2)		*	A	*	*	<i>E. intermedia</i>	

1) Numerals above sequence are nucleotide positions of *E. sinica*, which correspond to all other species except *E. intermedia*.

2) Asterisk indicates the identical nucleotide to which of *E. sinica*.

GTGTTATTTTATTTCTAAAAAGAAAGGTTTAGGAGGTT (38 bp).

Two or three of this sequence unit have been observed in *E. intermedia*.