

D. 考察

前年度に引き続き、グリチルリチン生合成経路において β -amyrinの11位の酸化を触媒するCYP88D6のイントロン7の配列情報の蓄積を進め、本配列をダイレクトシーケンスにより比較することで、カンゾウ属の多くの植物 (*G. ularensis*, *G. glabra*, *G. glabra* var. *glandulifera*, *G. inflata*, *G. pallidiflora*, *G. echinata*) を識別可能であることを示した。また、*G. inflata*では、*G. glabra*様の配列の他に*G. ularensis*と相同な配列が得られたことから、*G. ularensis*との交雑の可能性も考えられ、既に報告のあるリボソーマルDNAのITS領域 (文献2) 等、他の遺伝子についても比較検討する必要があると考えられた。

甘草市場品生薬についても、CYP88D6のイントロン7部分配列をダイレクトシーケンスにより解析し、すべての試料に*G. ularensis*の優良系統であるGuTS71-08 IV2あるいはIV1に特徴的な配列と相同な配列が含まれることを示唆する結果を得た。したがって、今回使用した約270bpの部分配列による優良系統と市場品生薬の識別は、それぞれの試料から一定数以上の配列をクローニングシーケンスし、含まれている全配列の種類と比率を比較することで可能ではあるが、PCR等による簡便な識別は容易ではないと考えられた。

甘草市場品生薬の分析ではさらに、上記優良系統に特徴的に認められた配列の出現頻度とグリチルリチン含量との間に良い相関性があることを明らかとした。本実験ではタンパク質には翻訳されないイントロン領域の変異と成分含量の間に相関性が認められたことから、イントロン配列の変異とエクソン配列の変異ならびに酵素活性の差異等との関係に興味を持たれるところである。

以上、本配列は、養液栽培におけるグリチルリチン生産性を指標に選抜された優良系統に特徴的に認められたこと、また、市場品生薬試料においてその出現頻度と含量の間に高い相関性が認められたことから、今後、より正確性を高めるためには分析サンプル数をさらに増やす等の必要はあるが、高グリ

チルリチン含量カンゾウ育種のための遺伝子マーカーとしての応用が期待される。

E. 結論

前年度までに β -amyrinの11位の酸化を触媒するCYP88D6の相同遺伝子のイントロン7配列の多型により、複数のカンゾウ属植物及び系統を区別可能であることを示していた。

本年度は、さらに3系統のカンゾウ属植物のイントロン7配列情報を収集した。また、甘草市場品生薬試料についてもCYP88D6遺伝子のイントロン7の部分配列情報を収集し、優良系統と配列を比較した。その結果、市場品試料の多くに優良系統に特徴的な配列と相同な配列が含まれることを明らかとした。また、クローニングした甘草市場品生薬のイントロン7部分配列のうち優良系統と相同な配列の出現頻度とグリチルリチン含量との間には高い相関性が見いだされた。

以上の結果から、本配列は、地下部を収穫してグリチルリチン含有量を確認することなく、地上部からゲノムDNAを抽出し配列を比較することで優良系統の選抜を可能とする遺伝子マーカーとしての応用が期待された。

参考文献

(文献1) 研究代表者 柴田敏郎, 厚生労働省 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」平成22年度 総括・分担研究報告書, (H22-創薬総合-指定-015), pp. 36-48, 平成23年3月

(文献2) Kondo K, Shiba M, Yamaji H, Morota T, Zhengmin C, Huixia P, Shoyama Y. 'Species identification of licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers.' *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1497-1502 (2007)

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

乾 貴幸, 河野徳昭, 吉松嘉代, 柴田敏郎,
川原信夫, 飯田 修

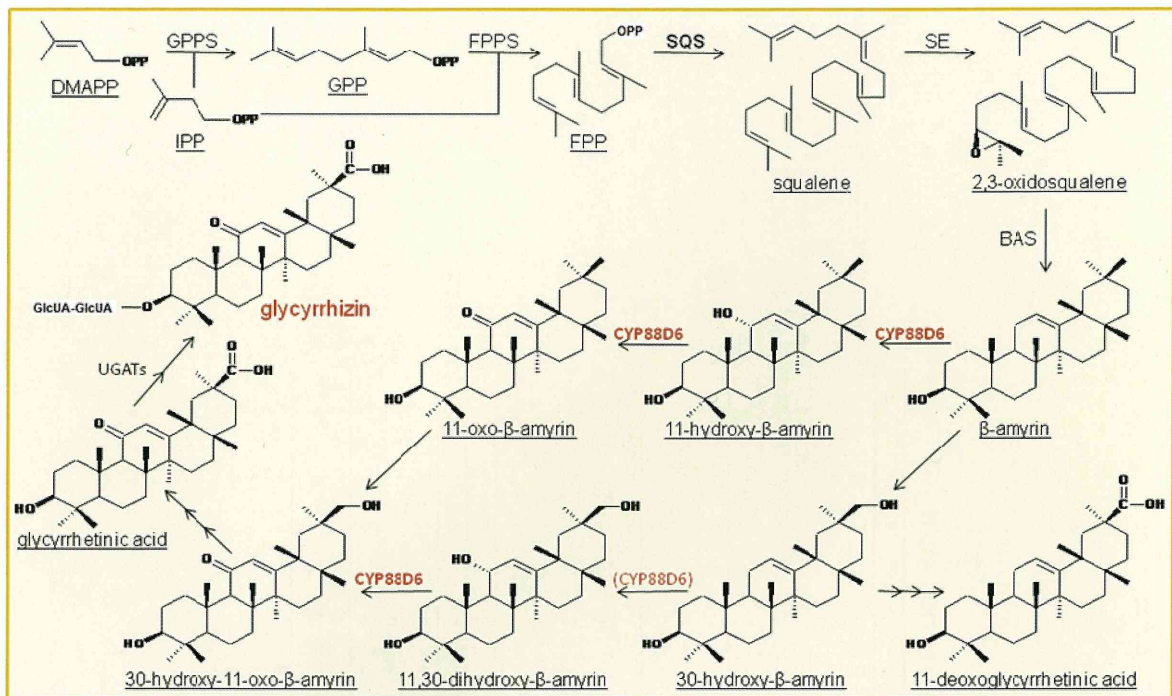
「薬用植物優良品種育成を指向した遺伝子
鑑別法の開発(2)」

日本生薬学会第58回(2011年)年会
(2011.9.24-25, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(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; UGATs, 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

表 1. 本研究で用いた甘草市場品生薬

管理番号	形態	産地	備考	
1	NIB003	原形	中国内蒙古自治区	西北甘草丁級
2	NIB004	原形	中国寧夏	西北甘草丁級
3	NIB005	原形	中国内蒙古自治区	東北甘草1号
4	NIB006	原形	中国内蒙古自治区	東北甘草2号
5	NIB007	原形	中国内蒙古自治区	東北甘草3号
6	NIB037	原形	中国内蒙古自治区	東北甘草3号
7	NIB038	原形	中国甘肅省/内蒙古自治区	西北甘草丁級
8	NIB054	原形	中国吉林省	
9	NIB074	刻み	中国甘肅省	西北甘草・野生品
10	NIB090	刻み	中国寧夏	西北甘草 (ゲノム DNA は3片の混合物から抽出)
11	NIB107	刻み	中国寧夏	西北甘草丙級・野生品
12	NIB108	刻み	中国寧夏	西北甘草乙級・野生品
13	NIB109	刻み	中国内蒙古自治区	東北甘草丙級・野生品
14	NIB146	刻み	中国甘肅省	西北甘草
15	NIB168	原形	中国内蒙古自治区	野生品
16	NIB176	原形	中国内蒙古自治区	東北甘草2号・野生品

表2 G. glabraのCYP88D6遺伝子イントロン7配列 (1-859) のダイレクトシーケンスによる比較

	80	98	373	410	419	835
Gg1	G/A	T/C	G/A	A/T	T	T/C
Gg2(SC15)	G/A	T/C	G/A	A/T	T	T/C
Ggg	G	T	G/A	A	T/-	T

表3 クローニングシーケンスにより得られたカンゾウ属植物及び甘草市場品生薬のイントロン7部分配列 (100-304) の比較

	107	118	130-132	136	141	143	144	149	159	165	181	183	188	208	225	226	227	229	236	239	243	245	246	263	264	275	295	297	298	303-304		
a1	a	g	aat	g	t	t	a	a	g	t	a	t	c	g	t	g	t	t	c	t	-	a	g	c	g	g	t	t	g	--	Gu/Gu2/IV1/IV2/C2/C5/#11/NIB	
a2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	g	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	a	*	c	*	*	IV1/#11/NIB/Gi
a3	*	*	cat	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NIB
a4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	g	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NIB/Gi
a5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	g	*	a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NIB
b1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	g	*	a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	c	*	*	a	*	c	a	*	IV2/C2/NIB	
b2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	g	a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	c	*	*	a	*	c	a	*	NIB
b3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	c	*	*	a	*	c	a	*	IV2
c1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	g	*	*	*	c	*	*	*	*	*	*	*	*	t	*	*	*	*	*	*	ta	C5/NIB
c2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	t	c	*	*	*	*	*	*	*	*	t	*	*	*	*	*	*	ta	IV1/C5/#11/GuKY/NIB
c3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	t	c	*	*	*	*	c	*	*	*	t	*	*	*	*	*	*	ta	NIB
c4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	t	c	*	c	*	*	c	*	*	*	t	*	*	*	*	*	*	ta	NIB
c5	g	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	t	c	*	*	*	*	*	*	*	*	t	*	*	*	*	*	*	ta	NIB
d1	*	a	*	-	*	c	g	*	c	*	g	*	*	*	*	*	*	c	t	*	t	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NIB
d2	*	*	*	-	c	c	*	*	c	*	g	*	*	*	*	*	*	c	t	*	t	g	*	*	a	*	*	*	*	*	*	Gg1/Gg2/Ggg/NIB
d3	*	*	*	-	c	c	*	g	c	*	g	*	*	*	*	*	*	c	t	*	t	g	*	*	a	*	*	*	*	*	*	Gi
d4	*	*	*	-	c	c	*	g	c	*	g	*	*	*	*	*	*	c	t	*	t	g	*	*	a	a	*	*	*	*	*	Gi
d5	*	*	*	-	c	c	*	g	c	*	g	*	*	*	*	*	*	c	t	*	t	g	*	*	a	a	*	c	*	*	Gi	
e1	*	*	*	*	*	*	*	*	c	g	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	a	c	c	*	*	Ge	
f1	*	*	---	*	*	*	*	*	c	g	*	*	*	*	*	a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	c	*	Gp	

↑
Gp
特異的
欠失

↑
Gg,Ggg,Gi
特徴的変異

↑
Gi
特異的
変異

↑
Gu
特異的
変異

↑
Ge,Gp
特徴的変異

↑
IV1
系統
特徴的
変異

↑
Gp
特異的
変異

↑
Gg,Ggg,Gi
特徴的変異

↑
Gg,Ggg,Gi
特徴的変異

↑
IV2
系統
特徴的
変異

↑
IV1
系統
特徴的
変異

↑
Gg,Ggg,Gi
特徴的変異

↑
Ge
特異的
変異

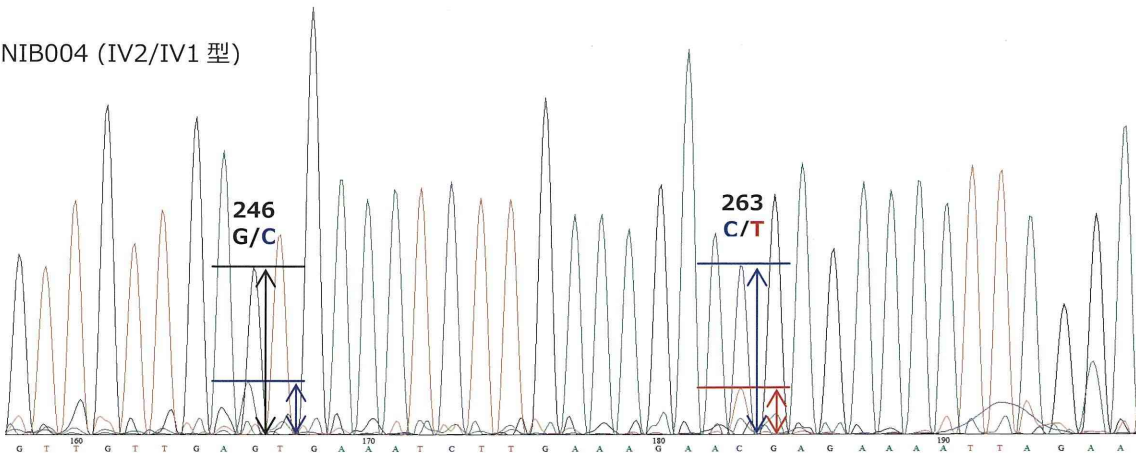
↑
IV2
系統
特徴的
変異

↑
IV1
系統
特徴的
変異

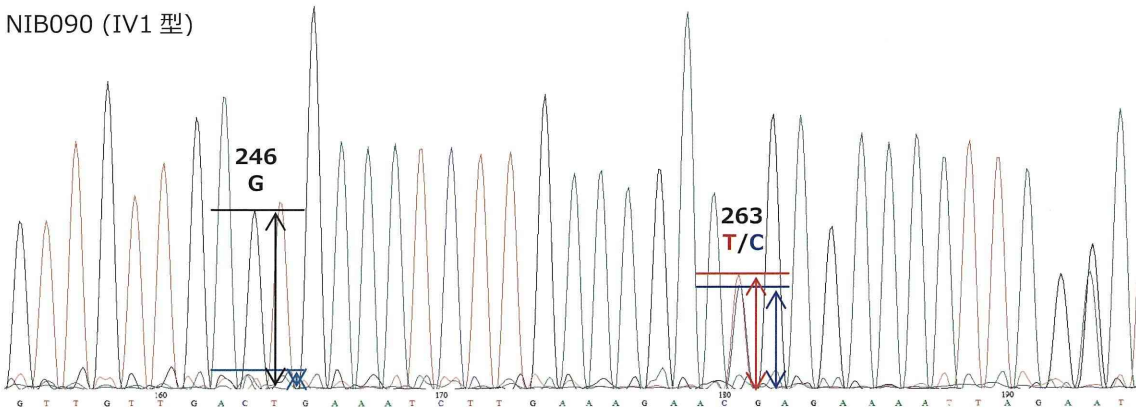
* は、a1と同一塩基であることを示す。

G T T G T ¹⁶⁰ T G A G T G A A A T ¹⁷⁰ C T T G A A A G A A ¹⁸⁰ C G A G A A A A T T ¹⁹⁰ A G G A

NIB004 (IV2/IV1 型)



NIB090 (IV1 型)



NIB054 (IV2 型)

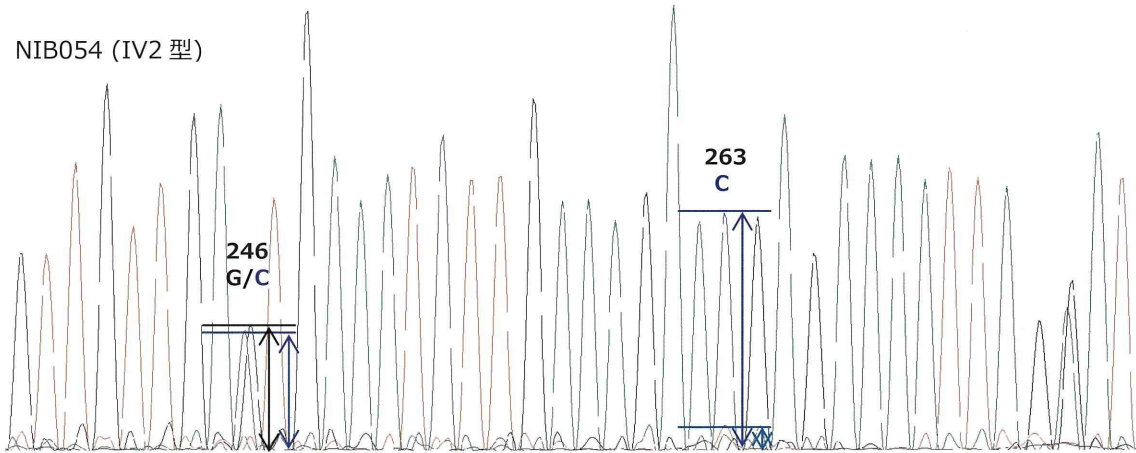


図 2. 甘草市場品生薬のダイレクトシーケンスデータの解析

*IV1/IV2 は、数種の CYP88D6 イントロン 7 配列が増幅されるため、それら配列間で塩基が異なる個所では、複数の塩基のシグナルが混ざって検出される（例えば、IV1 は、263 番目が T の配列と C の配列が 2 種が増幅されるので T の赤と C の青、両方のシグナルが検出される）。

表4 甘草市場品生薬とカンゾウ属植物のCYP88D6遺伝子イントロン7部分配列のダイレクトシーケンスによる解析および比較

Sample	Genotype	136	141	143	144	159	162	181	183	188	208	225	229	236	243	245	246	263	275	297	298	303-304
Gu	a	G	T	T	A	G	A	A	T	C	G	T	T	C	-	A	G	C	G	T	G	--
Gu2-3-2	a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GuIV2	ab	*	*	*	*	*	*	A/G	*	C/A	*	*	*	*	*	*	G/C	*	G/A	T/C	G/A	*
GuC2	ab	*	*	*	*	*	*	A/G	*	C/A	*	*	*	*	*	*	G/C	*	G/A	T/C	G/A	*
GuC5	ac	*	*	*	*	*	*	A/G	*	*	G/T	*	*	*	*	*	*	C/T	G/A	T/C	*	--/TA
Gu#11	ac	*	*	*	*	*	*	A/G	*	*	G/T	*	*	*	*	*	*	C/T	G/A	T/C	*	--/TA
GuIV1	ac	*	*	*	*	*	*	A/G	*	*	G/T	*	*	*	*	*	*	C/T	G/A	T/C	*	--/TA
GuKY	ac	*	*	*	*	*	*	A/G	*	*	G/T	*	*	*	*	*	*	C/T	G/A	T/C	*	--/TA
NIB003	acb	*	*	*	*	*	*	A/G	*	C/A	G/T	*	*	*	*	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
NIB004	abc	*	*	*	*	*	*	A/G	*	C/A	G/T	*	*	*	*	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
NIB005	abd	G/-	*	T/C	A/G	G/C	A/C	A/G	T/A	C/A	*	T/C	T/C	C/T	-/T	*	G/C	*	G/A	T/C	G/A	*
NIB006	acbd	G/-	*	T/C	A/G	G/C	A/C	A/G	*	C/A	G/T	T/C	T/C	C/T	-/T	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
NIB007	abc	*	*	*	*	*	*	A/G	T/A	C/A	G/T	*	*	*	*	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
NIB037	abc	*	*	*	*	*	*	A/G	*	C/A	G/T	*	*	*	*	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
NIB038	acb	*	*	*	*	*	*	A/G	*	C/A	G/T	*	*	*	*	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
NIB054	ab	*	*	*	*	*	*	A/G	T/A	C/A	*	*	*	*	*	*	G/C	*	G/A	T/C	G/A	*
NIB074	acd	G/-	*	T/C	A/G	G/C	A/C	A/G	*	*	G/T	T/C	T/C	C/T	-/T	*	*	C/T	G/A	T/C	*	--/TA
NIB090	ac	*	*	*	*	*	*	A/G	*	*	G/T	*	*	*	*	*	*	C/T	G/A	T/C	*	--/TA
NIB107	ab	*	*	*	*	*	*	A/G	*	C/A	*	*	*	*	*	*	G/C	*	G/A	T/C	G/A	*
NIB108	ab	*	*	*	*	*	A/C	A/G	*	C/A	G/T	*	*	*	*	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	*
NIB109	abcd	G/-	*	T/C	A/G	G/C	A/C	A/G	*	C/A	G/T	T/C	T/C	C/T	-/T	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
NIB146	ac	*	*	*	*	*	*	A/G	*	*	G/T	*	*	*	*	*	*	C/T	G/A	T/C	*	--/TA
NIB168	acb	*	*	*	*	*	A/C	A/G	*	C/A	G/T	*	*	*	*	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
NIB176	acb	*	*	*	*	*	A/C	A/G	T/A	C/A	G/T	*	*	*	*	*	G/C	C/T	G/A	T/C	G/A	--/TA
Gg	G	-	C	C	*	C	*	G	*	*	*	C	C	T	T	G	*	*	*	*	*	*
ダイレクトシーケンスから予想される遺伝子型				C	C	C	C	C/A	G/T	C	C	T	T	G/C	C/T	G/A	--/TA					
				↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑					
				Gg	Gg	IV2	IV1	Gg	Gg	Gg	Gg	Gg	Gg	IV2	IV1	IV2	IV1					
				特	特	特	特	特	特	特	特	特	特	特	特	特	特					
				徴	徴	徴	徴	徴	徴	徴	徴	徴	徴	徴	徴	徴	徴					
				的	的	的	的	的	的	的	的	的	的	的	的	的	的					
				波	波	波	波	波	波	波	波	波	波	波	波	波	波					
				形	形	形	形	形	形	形	形	形	形	形	形	形	形					

注1) 赤字の生薬試料は クローニングシーケンスにも供した。

注2) a,b,c,dの各記号は、表3のa,b,c,dに対応

注3) 表中の*は、Guと同塩基であることを示す。

表5 クローニングシーケンスで得られたCYP88D6相同遺伝子のイントロン7の各配列出現割合と含量

Sample	Genotype	クローニングシーケンスで得られた 各配列の全配列に対する出現割合 (%)						含量 (DW %)						
		a	b	c	d	a+b	a+c	b+c	グリチルリチン	リキリチン	イソリキリチン	リキリチゲニン	イソリキリチゲニン	グリシクマリン
NIB004	abcd	56	25	6	13	81	63	31	3.53	1.24	0.17	0.25	0.01	0.02
NIB005	abd	40	40	0	20	80	40	40	2.98	1.23	0.13	0.06	0.00	0.00
NIB006	abcd	31	38	13	19	69	44	50	3.17	1.57	0.21	0.00	0.04	0.03
NIB007	acb	25	31	44	0	56	69	75	6.79	2.95	0.54	0.00	0.03	0.10
NIB074	acd	43	0	36	21	43	79	36	2.54	1.32	0.18	0.10	0.02	0.03
NIB107	abc	56	31	13	0	88	69	44	4.66	2.05	0.21	0.56	0.02	0.06
NIB146	acb	43	7	50	0	50	93	57	3.92	1.79	0.22	0.50	0.04	0.09
NIB176	abc	27	40	33	0	67	60	73	7.24	2.86	0.26	0.00	0.00	0.10

Gu IV2 IV1 Gg

表6 CYP88D6イントロン7の各配列出現割合と成分含量間の相関係数

	グリチルリチン	リキリチン	イソリキリチン	リキリチゲニン	イソリキリチゲニン	グリシクマリン
a	-0.532	-0.609	-0.593	0.755	-0.166	-0.457
b	0.418	0.328	0.131	-0.385	-0.428	-0.010
c	0.433	0.552	0.566	0.053	0.507	0.783
d	-0.796	-0.789	-0.536	-0.426	-0.098	-0.892
a+b	-0.006	-0.149	-0.325	0.206	-0.533	-0.356
a+c	0.096	0.171	0.197	0.585	0.432	0.527
b+c	0.874	0.926	0.760	-0.293	0.181	0.877

* a,b,c,dの各記号は、表3のa,b,c,dに対応

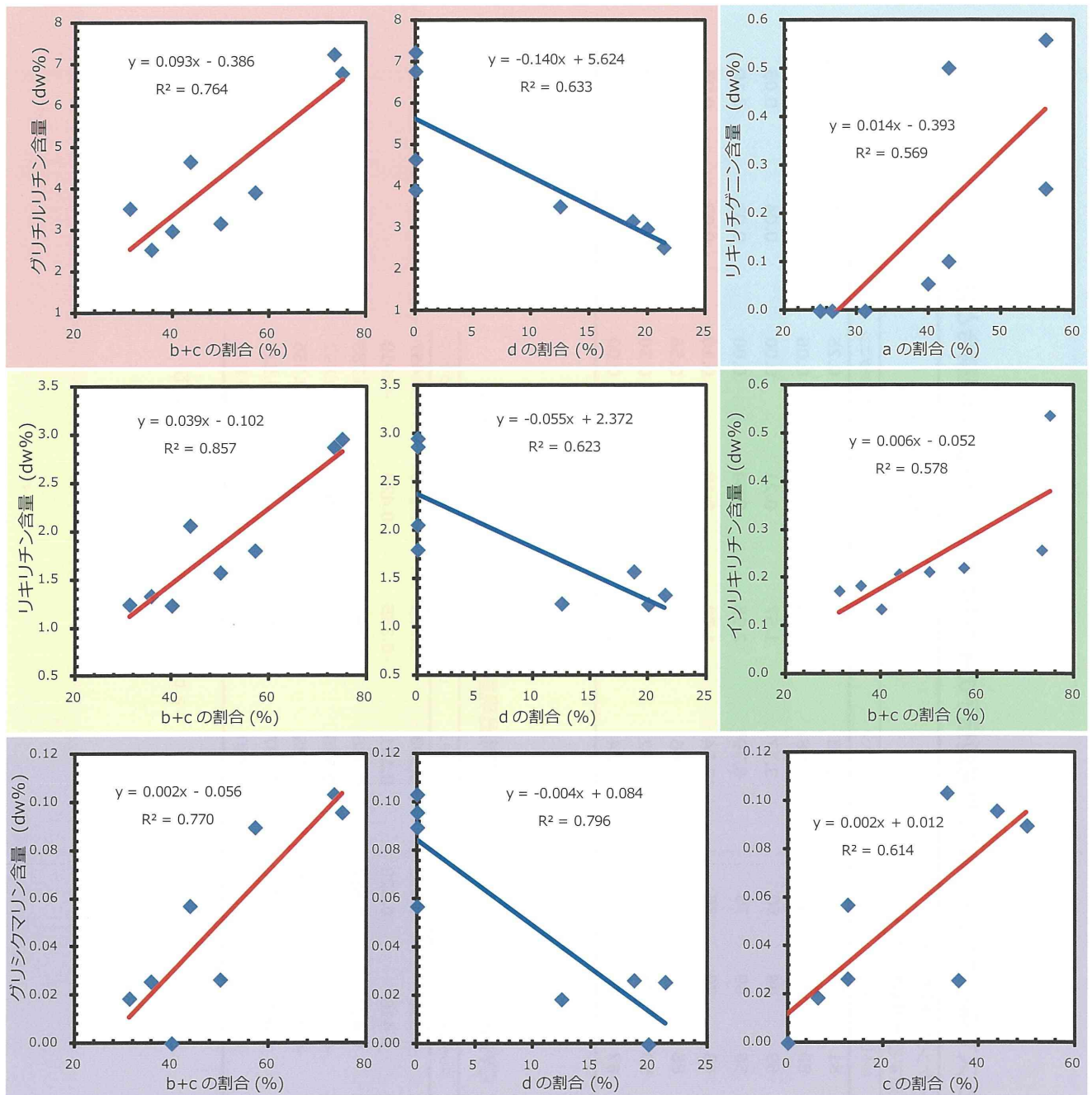


図3 CYP88D6イントロン7の各配列の出現頻度と含量の関係（相関係数 $R \geq 0.71$ ($P < 0.05$) のもの)

平成23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：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

研究分担者 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 研究フリーダー
研究協力者 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 研究員

要旨 ハトムギ「北のはと」の品種識別を行う目的で、葉緑体DNAの部分配列3領域、リボソームDNAの部分配列1領域を決定して比較した。ハトムギ「北のはと」の目的領域の部分配列は、*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域の塩基長が536bp、*atpF-atpA*介在配列領域の塩基長が350bp、*trnS-trnT*領域の塩基長は1238bpおよびリボソームDNAのITS4-ITS5の遺伝子間領域の塩基長が574bpであった。他の7系統の塩基配列を決定して比較したところ、何れの領域でも品種を区別できる塩基の変異は認められなかった。ハトムギ「北のはと」の品種識別を行うためには、遺伝子や遺伝子間の配列を利用した識別法ではなく、DNA上に多く存在するリピート配列領域（マイクロサテライト領域）を利用した識別法を検討する必要があると判断した。

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23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3領域とリボソームDNAの遺伝子間領域の配列を決定して比較した。

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7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、液体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、ビーズ式細胞破碎機 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。

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およびリボソーム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*領域および(4) ITS4-ITS5遺伝子間領域を特異的に増幅するプライマーセット（表2）を用いPCR法で増幅した。PCR法の条件は、反応液組成が、10 μ LのPrime Star HS (Premix)（タカラバイオ株式会社）に、1 μ Lの鋳型DNA、終濃度が0.2 μ Mの各プライマーを加え、超純水を加えて液量を20 μ Lとした。PCR反応条件は、(98°Cで10秒、55°Cで15秒、72°Cで90秒)を30サイクル、さらに72°Cで7分間反応させた。PCR反応液は、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製してPCR産物とした。

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。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

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、葉緑体DNAの部分配列3領域、リボソームDNAの部分配列1

領域を決定して比較した。ハトムギ「北のはと」の目的領域の部分配列を決定した結果、*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域の塩基長は536bpであった（表3）。*atpF-atpA*介在配列領域の塩基長は350bpであった（表4）。*trnS-trnT*領域の塩基長は1238bpであった（表5）。リボソームDNAのITS4-ITS5の遺伝子間配列の塩基長は574bpであった（表6）。他の7系統の塩基配列を決定して比較したところ、比較した領域では品種を区別できる塩基の変異は認められなかった。

D. 考察

植物の属種間の識別に利用される葉緑体DNAおよびリボソームDNAの部分配列比較によるハトムギの品種識別を検討した。目的領域とした(1) *rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域は、薬用植物の識別法として、ケシを含むケシ属や、コガネバナ（生薬名：黄芩）を含むタツナミソウ属等の識別部位に利用されており、*atpF-atpA*介在配列領域は、トウキ、ホッカイトウキおよびミヤマトウキの変種間識別に利用されている。これら2領域に加え植物の識別で汎用されている*trnS-trnT*領域およびリボソームDNAのITS4-ITS5遺伝子間領域を加え、4領域の塩基配列を決定してハトムギ系統間の比較を行った。その結果、今回比較した領域では系統間を判別する領域は見いだせなかった。

当初、ハトムギ「北のはと」は在来種に比べ極めて開花が早い系質を持ち、その母種の来歴から本州の在来種と長年隔離された環境にあったことから、在来種とは遺伝的に異なる系統であると予測した。比較の変異が多い領域とされる葉緑体DNAの*atpF-atpA*介在配列領域、リボソームDNAのITS4-ITS5遺伝子間領域において系統間の差を見いだすことができなかった。従ってハトムギ「北のはと」の品種識別を行うためには、遺伝子や遺伝子間の配列を利用した識別法ではなく、イネ科植物であるコメ、ムギおよびシバで実用化されているDNA

上に多く存在するリピート配列領域（マイクロサテライト領域）を利用した識別法を検討する必要があると判断した。

E. 結論

ハトムギ「北のはと」の品種識別を行う目的で、葉緑体DNAの部分配列3領域、リボソームDNAの部分配列1領域を決定して比較した。ハトムギ「北のはと」の目的領域の部分配列は、*rpl16*および*rpl16-rpl14*介在配列領域の塩基長が536bp、*atpF-atpA*介在配列領域の塩基長が350bp、*trnS-trnT*領域の塩基長は1238bpおよびリボソームDNAのITS4-ITS5の遺伝子間領域の塩基長が574bpであった。他の7系統の塩基配列を

決定して比較したところ、何れの領域でも品種を区別できる塩基の変異は認められなかった。比較的に変異が多い領域とされる葉緑体DNAの*atpF-atpA*介在配列領域、リボソームDNAのITS4-ITS5遺伝子間領域において系統間の差を見いだすことができなかったことから、ハトムギ「北のはと」の品種識別を行うためには、遺伝子や遺伝子間の配列を利用した識別法ではなく、イネ科植物であるコメ、ムギおよびシバで実用化されているDNA上に多く存在するリピート配列領域（マイクロサテライト領域）を利用した識別法を検討する必要があると判断した。

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

No.	品名	生産地	収穫年度	サンプル量 (mg)	A260/A280比	DNA濃度 (µgµL)	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	
4	ハトムギ	ラオス	2005～2006	29.8	1.60	27.4	
6	ハトムギ	ベトナム	不明	24.9	1.68	11.6	
11	ハトムギ	中国 遼寧省	不明	29.2	1.57	14.9	
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

Target region	Size (bp)	Primer Sequence	Reference
(1) <i>rpl16</i> and <i>rpl16-14</i> spacer	550	AAAGATCTAGATTTCGTAAACAACATAGAGGAAGAA	Nakamura, I. <i>et al</i> (1997)
		ATCTGCAGCATTAAAAAGGGTCTGAGGTTGAATCAT	
(2) <i>atpF-atpA</i> spacer	60-80	TTACGAGGAGCTCTAGGAACTCTGAATAGTTGTTTG	Nakamura, I. <i>et al</i> (2000)
		GCCATTACTTCATCAAGACCGTGAATACGAGCAATGCC	
(3) <i>trn S - trn T</i>		CGAGGGTTCGAATCCCTCTC	Demedure <i>et al</i> (1995)
		AGAGCATCGCATTTGTAATG	
(4) ITS4	700	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS5		GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	

表3 葉緑体DNA *rpl16*及び*rpl16-rpl14*介在領域の塩基配列

1	TAAAGATCTA	GATTTTCGTAA	ACAACATAGA	GGAAGAATGA
41	AGGGAAAATC	CTGCCGAGGC	AATCATATTT	GTTTTGGTAG
81	ATATGCTCTT	CAAGTACTTG	AACCCGCTTG	GATCACCCGC
121	AGACAGATAG	AAGCAGGACG	AAGAGCAATG	ACACGATATG
161	CACGTCGTGG	TGGAAAAATA	TGGGTGCGTA	TATTTCCCGA
201	CAAACCGGTT	ACAATAAGAC	CCACAGAAAC	ACGTATGGGC
241	TCGGGAAAGG	GATCCCCCGA	ATATTGGGTA	GCCGTTGTTA
281	AACCAGGTCG	AATACTTTAT	GAAATGAGCG	GAGTATCCGA
321	AACTGTAGCT	AGAGCAGCTA	TCTCTATAGC	TGCCAGTAAA
361	ATGCCCATAC	GAAGTCAATT	TCTTCGATTA	GAGATATAGA
401	ACCCCCAAAA	GGAGTATTGA	AGATAAAAAA	CCCCTGGTTT
441	TTCTTTCTGG	AAAGACAATA	TTTCTTTCAT	CCTTTTGCAT
481	TGAAATAACA	AATGGAAATC	AAAATAATAT	GATTCAACCT
521	CAGACCCTTT	TAAATG		

表4 葉緑体DNA *atpA-atpF*介在領域の塩基配列

1	TTTACGAGGA	GCTCTAGGAA	CTCTGAATAG	TTGTTTGAAT
41	ACCGAGTTAC	ATTTCCGTAC	GATTCGTGCT	AATATTGGCA
81	TTCTCGGGGC	CATAGAATGG	AAGAGATAAT	TAAATTTATT
121	AGGTTTTGAA	CTTCTACTTT	TGTTTAGAAT	TTAGGCATTA
161	TTTTTCCCTT	GCTTCCAAAA	AAAAATTAAT	GAAACACTAA
201	TGGCAACCCT	TCGAGTCGAC	GAAATTAATA	CAATTCTCCG
241	CAAACGTATT	GAACAATATA	ATAGGAAAGT	AGGGATTGAG
281	AATATCGGTC	GCGTAGTGCA	AGTGGGGGAT	GGCATTGCTC
321	GTATTCACGG	TCTTGATGAA	GTAATGGCCA	

表5 葉緑体DNA *trnS-trnT*介在領域の塩基配列

1	TNGGTCTCGG	TTCAATCCGA	NGTCGGCTTT	TTTTTCTATC
41	GATGTTCCAT	GAACAAGAAT	TTCTCTTTTT	CTCCGAATTA
81	AATGGGGAAT	CCAGGGTCTA	TTATGTCGTT	TTACCTTACA
121	ATTTTGCTAG	ATACAAACCA	TAAAAATAAA	TAATATATAT
161	ACAAAAAATC	CAGATGTTGA	TGAAATTCCA	TTTTTTGTGT
201	TACTCCATTT	TTTGTGTTAC	TTTAGTAGAT	TTACTCTGT
241	TTATCCTTTA	GTTTAATTCT	GTTTGAATTT	CGCTGTATTC
281	TGTAATGTAA	ATAGAACGAA	ATTTATTGTG	TAAAATGAAA
321	TTTCAATAAA	ATAAAAAAGG	AGTCTTCATG	TCCCGTTATC
361	GAGGGCCTCG	TTTAAAAAAA	ATACGCCGTC	TGGGAGCTTT
401	ACCAGGACTC	ACTAGAAAAA	CGCCTAAATC	CGGAAGTAAT
441	CAGAAAAAGA	AATTCATTTC	TGGGAAAAAA	GAGCAATATC
481	GTATTCGTCT	TCAAGAAAAA	CAGAAATTGC	GTTTTCATTA
521	TGGTCTGACA	GAACGACAAT	TACTTAGATA	TGTACATATC
561	GCTGGAAAAG	CAAAAAGATC	CACAGGTCAG	GTTTTACTAC
601	AATTAATTGA	AATGCGTTTG	GATAATATCC	TTTTTCGATT
641	GGGTATGGCT	TCAACCATTTC	CTGGGGCCCG	ACAATTAGTT
681	AACCATAGAC	ATATTTTAGT	TAATGATCGT	ATAGTTGATA
721	TACCAAGCTT	TCGTTGCAAA	CCCCGAGATA	TTATTACTAC
761	GAAGGATAAC	CAACGATCAA	AACGTTTGGT	TCAAATTAT
801	ATTGCTTCAT	CCGATCCGGG	CAAATTACCA	AAGCATTTGA
841	CGGTTGACAC	ATTGCAATAT	AAAGGACTAG	TAAAAAAAAT
881	TCTAGATAGG	AAGTGGGTCG	GTCTCAAAT	AAATGAGTTG
921	TTAGTTGTAG	AATATTATTC	TCGCCAGACT	TGAACCTAAT
961	GAAAAAAGGA	AAGGTTCATA	GAATTTTTTT	TCCCTTCCCC
1001	TTCCCCGAA	CTAAATCGAC	CTAAGGCTCT	TAATTCGTAT
1041	TTTCCCGTTC	ACCTAGCAGA	AATAGATTAA	CCCTAGGATC
1081	CTTTTTTCTT	TTTTGTTATT	TCCTCGATGT	GTATTTTACA
1121	TACCACAGTA	ATTTGCTATA	GAGAATTTTT	ATTAATTATT
1161	AATTAAGGT	ATTATTGTTG	GAATAAATTG	TTATTTAATT
1201	TGATACATTG	GATCGCTAAC	ATGATAATAA	GANAACGA

表6 核DNA ITS4-ITS5領域の塩基配列				
1	CGGTCCGAGC	GACGGTGCGC	TGCGGTGCCC	GATGGATCCT
41	TAGGGCCGAT	GTGCTGGCTG	CGTGCCGGGG	CGCTGCACCG
81	AGAACAATA	GGTGTGCCCC	ACCACGTGCT	GTGCCCCGACA
121	CGATTCGCCG	GCAGCCCCAA	CTTCGGCCCA	CCGCGCCTTG
161	CGGCGCGGGG	GGCCAGACAC	CACGTCCCTC	CCCGGGGGTG
201	GGTTGGGAGT	GTCTTTTGGC	GTGACGCCCA	GGCAGACGTG
241	CCCTTGCCA	GAAGGCCTCG	GGCGCAACTT	GCGTTCAAAA
281	ACTCGATGGT	TCGCGGGATT	CTGCAATTCA	CACCAGGTAT
321	CGCATTTTGC	TACGTTCTTC	ATCGATGCGA	GAGCCGAGAT
361	ATCCGTTGCC	GAGAGTCGTG	TGTATTAAGA	TATCATCGCT
401	GCGCGGGGAG	CGGAAGGCAG	GCCGACCGCT	CCGCCGAGCA
441	AGGCAGCATT	AGTGTTCTT	GACGCCTAAG	GCGCCGTGGG
481	TTCTGTTGCG	GCCCCTCCGC	CCCGGGACGG	AGCTCGGGGG
521	CCTTCGGCCG	GGCCGAAGCC	CGATGGCACG	AGAGACGGGT
561	TCGCGGTCTG	CTTT		

平成23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： 薬用植物の新規品質評価方法の構築
—カンゾウの一斉成分分析について—

研究分担者 瀧野 裕之 独立行政法人医薬基盤研薬用植物資源研究センター

要旨 生薬は天然品である故に、その栽培環境や調製方法による時に著しく成分の変化を受ける。このような成分差異というのはその生薬を配合する漢方処方薬の薬効に影響するため、生薬の品質管理というのは大変重要である。生薬成分の定量は品質の管理の上で重要であり、今年度はカンゾウの成分の一斉定量法の検討を行なった。HPLCにおける定量では一部の市場品を用いた定量において重なりが起るため、LCMSを用いた定量法を検討した。その結果、MRM法においては十分な分離が見られ、今後本方法を用いたカンゾウ成分の一斉定量が可能と考えられた。

研究協力者
大根谷章浩（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター）
新井 玲子（東京理科大学薬学部）
菱田 敦之（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター）
林 茂樹（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター）

A. 研究目的

生薬は植物、鉱物、動物由来といずれも天然由来であるため、その生育環境により個体差を生じやすい。植物由来の生薬は最も多く、全体の9割を占めるが、植物は栽培方法、例えば野生品、栽培品の違いや、栽培地域の土壌の違いなどで成分が影響を受ける。また植物由来生薬は、多くの場

合に生薬にする段階で乾燥などの加工調製を必ず受けることになるが、その段階での成分変化がおこることがあり、そのようなことから生薬の品質管理は重要であり、その評価方法としての成分分析方法の確立は重要である。

本研究事業においては昨年度までは2次元TLCMSを用いた品質評価方法の構築を試みてきた。しかしながら2次元TLCを展開する場合、例えばUV吸収を示さない化合物の場合、希硫酸噴霧などの呈色試薬を用いて検出しなければTLCMS検出をする当該スポットの確定ができない。その場合、同条件で複数枚展開し、1枚に希硫酸などの呈色試薬を噴霧し呈色させ、展開した他方のプレートに重ね合わせて当該スポットの位置を推測し印をつけ、その部分にTLCMSを行

うといった工程が生じることとなる。しかしこの場合、同条件で複数枚 2 次元 TLC を展開することが難しく、微妙なスポットのずれが生じ、そのため全く同一の二次元 TLC を展開するためにはカマガ社のリノマートや自動展開層などの機器を使用しなければ得ることが難しく、結果的に効率の良い 2 次元 TLCMS の方法を確立することができなかった。

今年度はカンゾウの成分を LCMS を用いて一斉定量を行うことを試みることにした。カンゾウには多くの成分の報告があるが、それらを一斉に HPLC で定量するには極性の問題などがあり非常に困難である。そのためにはカラムの選定など条件の検討を行う必要がある。カラム選定や測定条件の検討、ならびに LCMS 法を用いた定量についても検討を行なった。

B. C. 研究方法および結果

試料について

カンゾウ市場流通品および北海道研究部において育成中のカンゾウを用いた。

表 1 カンゾウ試料

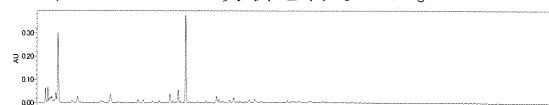
No.	産地	
1	内 蒙 古	西北丁級
2	寧 夏	西北丁級
3	内 蒙 古	東北 1 号
4	内 蒙 古	東北 2 号
5	内 蒙 古	東北 3 号
6	内 蒙 古	東北 3 号
7	甘 肅 省	西北丁級
8	吉 林 省	
9	甘 肅 省	野生品西北
10	寧 夏 省	西北甘草
11	寧 夏 省	野生品・西北甘草・丙
12	寧 夏 省	野生品・西北甘草・乙
13	内 蒙 古	野生品・東北甘草・丙
14	甘 肅 省	西北

15	内 蒙 古	野生品
16	内 蒙 古	野生品 (東北甘草 2 号)
17	北海道研究部	Soil freezing
18	北海道研究部	Snow cover
19	北海道研究部	Control
20	北海道研究部	No. 5
21	北海道研究部	No. 10
22	北海道研究部	No. 15
23	北海道研究部	No. 20
24	北海道研究部	No. 46
25	北海道研究部	No. 53
26	北海道研究部	No. 70
27	北海道研究部	No. 75
28	北海道研究部	No. 79

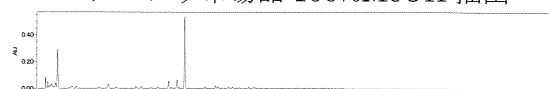
1) HPLC による検討

抽出条件の検討を最初に行なった。一斉定量を行う場合、それぞれの成分が効率よく抽出される条件を探さなくてはならない。

カンゾウ市場品サンプルを用いて、粉碎後に遠沈管に採取し、各種溶媒にて室温下 15 分間振り混ぜて抽出し、遠心分離後の上澄み液を試料溶液とし、HPLC にて分析を行なった。



カンゾウ市場品 100%MeOH 抽出



カンゾウ市場品 70%EtOH 抽出



カンゾウ市場品 50%EtOH 抽出

Glycyrrhizin 抽出には 70%EtOH 抽出が効率よい。局方にはカンゾウの Glycyrrhizin の定量に 70%EtOH を使用していることから Glycyrrhizin などの配糖体には適した溶媒系と言えるが、現在入手可能な 9 種類の市販標準品 (下表) において、glabridin、Lichocalcone A は配糖体ではないため

MeOH 抽出が効率がよいと考えられる。しかしながら今回は分析条件検討のために 70%EtOH 抽出エキスにおいて検討を行なった。カラム選定においては市販の 4.6mm φ x150mm、あるいは 4.6mm φ x100mm のカラムを用い、250mm 長のカラムは避けた。

(定量法) 本品の粉末約 0.5g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、70%エタノール 70mL を加えて 15 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物は更に希エタノール 25mL を加え、同様に操作する。全抽出液を合わせ、希エタノールを加えて正確に 100mL とし、試料溶液とする。別にグリチルリチン酸標準品約 25mg を精密に量り、70%エタノールに溶かして正確に 100mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20μL ずつを正確にとり、液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のグリチルリチン酸のピーク面積 A_T 及び A_S を測定する。

表 2 今回用いた標準品

No.	Compound name	Molecular weight
1	Glycyrrhizin	822.942
2	Glabridin	324.376
3	Liquiritin	418.398
4	18b-Glycyrrhetic acid	470.694
5	Licoricesaponin H2	822.4
6	Licoricesaponin G2	838.4
7	Glycyrrhetic acid 3-O-gluA	646.818
9	Lichocalcone A	338.403

HPLC 条件を検討した結果、0.1%TFA/H₂O と CH₃CN 混液のグラジエント条件がもっとも分離がよかった。またカラム種類も検討した結果、ODS 系の Kinelex PFP,100A (50 x 4.6 mm) を用いることとした。

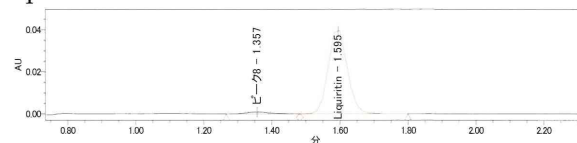


9種類標準品混合物の HPLC チャート

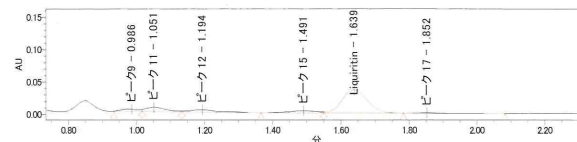
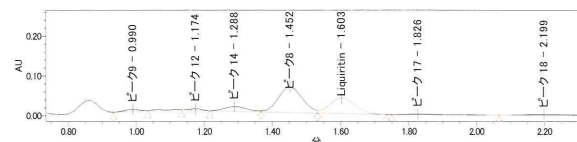
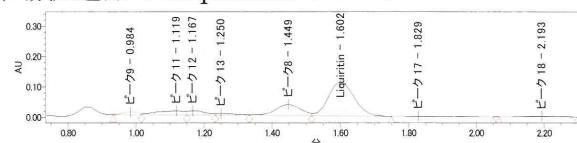
この条件においては Lichocalcone A と Glabridin が分離しないが、HPLC 定量においてはこの条件で行った。

市場流通品の 70%エタノール抽出エキスの比較を行ったところ、Glycyrrhizin と Liquiritin のピークは明瞭に現れたが、それ以外の 7 種類のピークは検出困難であった。よって、HPLC における定量においては Glycyrrhizin と Liquiritin の 2 種類において検討を行った。

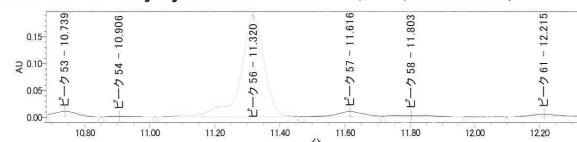
Liquiritin standard



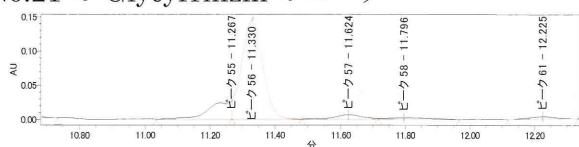
市場流通品の Liquiritin のピーク



No. 18 の Glycyrrhizin のピーク (shoulder)



No.21 の Glycyrrhizin のピーク



この条件において、Liquiritin ほどの試料においても重なりがみられずに定量は可能と考えられたが、Glycyrrhizin においては、一部の試料 (No.18, No.21 など) において分離が悪いピークとなったが、この二種類の成分に関しては十分 HPLC における同時定量は可能と考えられた。

LCMS による定量

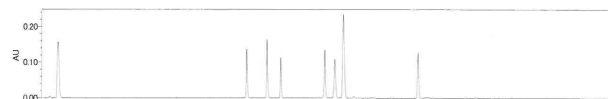
次に LCMS による定量を試みた。四重極を用いた LCMS においては定量が可能であり、当センター所有の API3000 (ABSciex 社製) はイオン源として ESI および APCI が用いることができ、さらに MS/MS 測定を行うことが可能であり、これにより広範囲の成分における MRM (Multiple Reaction Monitoring: 多重反応モニタリング) 定量を行うことができる。MRM は、一度イオン化されたイオンに対して、そのプロダクトイオンをみて目的のフラグメントにあったものを選択的に検出することができるため、バックグラウンドに夾雑物があったとしても目的のイオンを選択的に拾うことができ、感度のよい定量を行うことが可能である。同じ保持時間に同一の分子量、プロダクトイオンを示すものがなければ原理的には分別定量が可能である。また HPLC に比較し LCMS は格段に感度が高くなるため、高感度で目的物の定量が行える利点がある。

(条件) 使用機器: API3000 (ABSciex)

イオン源: TIS (ESI)

カラム: Kinetex C18 100A

溶媒: 0.1%TFA/H₂O-CH₃CN グラジエント



9 種類の標準品混合物の LC チャート

Q3、MS(2)に 8 種類のデータを入力し検討した。

Glycyrrhizin と LiH2 は保持時間が近く分子量と MSMS が同じであるため、誤定量される傾向があった。しかしそれ以外は分別定量が可能と考えられた。後ろに今回の MRM 定量における該当ピークの定量チャートを示した。

D. 考察

今回カンゾウの 9 種類の成分の一斉定量を HPLC および LCMS において検討したが、抽出溶媒の検討において、配糖体類の定量には 70% エタノールが良いと判断したが、一部の非糖体においては抽出効率が必ずしも良いとは言えず、100% メタノールあるいは加熱抽出条件の検討も必要と考えられた。HPLC による定量においては、Liquiritin と Glycyrrhizin の同時定量は可能と考えられたが他成分については含量が低く、高感度の LCMS を用いる必要性があり、LCMS による定量を検討したが、一部の同一分子量の化合物の重なりが見られたもののほぼすべての成分の定量が可能と思われた。しかしながら一部装置の不具合のために実際の定量まではいたらなかった。

E. 結論

カンゾウ 9 成分の一斉定量は LCMS を用いて行うことが可能と考えられたが、今後はさらに抽出溶媒の検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

G. 研究発表

- 1. 論文発表 なし
- 2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得 なし
- 2. 実用新案登録 なし
- 3. その他 なし