

文字サイズ変更
大 標準 小

NIBIO 薬用植物総合情報データベース

[トップ](#) | [総合検索](#) | [生薬検索](#) | [植物検索](#) | [化合物検索](#) | [モデル試料検索](#) | [データ一覧](#)

生物活性試験結果情報

測定データ種別	% inhibition							
動物種								
濃度単位	mg/ml							
備考								
	No.	モデル試料	生薬	濃度	試験結果	判定	活性情報 ファイル	備考
	1	NIB-0001	オウゴン	0.1	NO production inhibitory activity : 67.6% Cell viability : 93.1%			Water extract
	2	NIB-0002	オウゴン	0.1	NO production inhibitory activity : 34.2% Cell viability : 105.4%			Water extract
	3	NIB-0035	オウゴン	0.1	NO production inhibitory activity : 48.9% Cell viability : 104.8%			Water extract
	4	NIB-0036	オウゴン	0.1	NO production inhibitory activity : 15.8% Cell viability : 108.5%			Water extract
	5	NIB-0057	オウゴン	0.1	NO production inhibitory activity : 23.9% Cell viability : 108.6%			Water extract
	6	NIB-0059	オウゴン	0.1	NO production inhibitory activity : 70%			Water extract

図 30. 生物活性試験結果画面（オウゴンの生物活性試験結果一覧）

文字サイズ変更
大 標準 小

NIBIO 薬用植物総合情報データベース

[トップ](#) | [総合検索](#) | [生薬検索](#) | [植物検索](#) | [化合物検索](#) | [モデル試料検索](#) | [データ一覧](#)

データ一覧

リンクをクリックするとデータベースに登録されている情報を一覧に表示します。

- [▶ 薬用植物一覧](#)
- [▶ 生薬一覧](#)
- [▶ 日本薬局方収載生薬一覧](#)
- [▶ 漢方処方情報一覧](#)

免責事項・著作権について

Copyright © 2012 Research Center for Medicinal Plant Resources, Nibio All rights reserved.

図 31. データ一覧（選択画面）

それぞれのメニューをクリックすると、植物、生薬、日本薬局方収載生薬、漢方処方情報の一覧画面を表示する。

生薬、植物、化合物情報の主要な項目に対して検索を行います。(部分一致)



図 32. 総合検索画面

生薬、植物、化合物情報を対象にキーワード検索を行う。

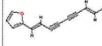
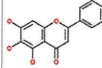
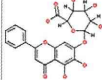
--全項目--

部分一致 完全一致

絞り込み検索

リンクをクリックすると、詳細情報を表示します。

1-20件表示/25件中 1 2 次へ>>

構造式	名称	別名
	Aconitine (アコニチン)	
	Albiflorin (アルビフロリン)	(1R,4R)-9-[[Benzoyloxy)methyl]-1-(beta-D-glucopyranosyloxy)-4-hydroxy-6-methyl-7-oxatricyclo[4.3.0.0.3,9]nonan-8-one
	Alisol A (アリソールA)	(8a,9β,14β,23S,24R)-11β,23,24,25-Tetrahydroxy-5a-dammar-13(17)-en-3-one
	Alisol B Acetate (酢酸アリソールB)	(8a,9β,14β,23S,24R)-23-Acetoxy-24,25-epoxy-11β-hydroxydammar-13(17)-en-3-one
	Alisol B (アリソールB)	
	Amygdalin (アミグダリン)	[(6-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy](phenyl)acetone nitrile
	Astragaloside IV (アストラガロシドIV)	[(20R,24S)-3β-[(β-D-Xylopyranosyl)oxy]-20,24-epoxy-16β,25-dihydroxy-9,19-cyclolanostan-6a-yl]β-D-glucopyranoside
	Atractylenolide III (アトラクテレノリドIII)	(4aS)-4a,5,6,7,8,8a,9,9a-Octahydro-9aβ-hydroxy-3,8aβ-dimethyl-5-methylenenaphtho[2,3-b]furan-2(4H)-one
	Atractylodin(アトラクテロジジン)	2-(1,7-Nonadiene-3,5-diynyl)furan, 9CI. 1-(2-Furanyl)-1,7-nonadiene-3,5-diyne.
	Atropine Sulfate (アトロピン硫酸塩)	(8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)3-hydroxy-2-phenylpropanoate;sulfuric acid
	Aucubin (アウクビン)	
	baicalein(バイカレイン)	Baicaleine, 5,6,7-Trihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one,
	baicalin(バイカリン)	Baicalein 7-glucuronide, 5,6-Dihydroxy-4-oxo-2-phenyl-4H-1-benzopyran-7-yl beta-D-Glucopyranosiduronic Acid
	Barbaloin (ババルロイン)	
	Benzoylmesaconine Hydrochloride (ベンゾイルメサコニン塩酸塩)	
	Berberine Chloride (ベルベリン塩化物)	
	Bisdemethoxycurcumin (ビスデメトキシクルクミン)	
	Bufotalin (ブホタリン)	
	Catalpol (カタルポール)	
	cinnamaldehyde (シナナムアルデヒド)	

1-20件表示/25件中 1 2 次へ>>

ダウンロード

戻る

図 33. 化合物情報一覧画面

化合物情報詳細

名称		baicalin(バイカリン)	
別名		Baicalein 7-glucuronide, 5,6-Dihydroxy-4-oxo-2-phenyl-4H-1-benzopyran-7-yl beta-D-Glucopyranosiduronic Acid	
構造式		 <p>baicalin.mol</p>	
IUPAC名		(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(5,6-dihydroxy-4-oxo-2-phenyl-chromen-7-yl)oxy-3,4,5-trihydroxy-tetrahydropyran-2-carboxylic acid	
CAS		21967-41-9	
CHEBI		2981	
CHEMPDB			
KEGG		C10025	
NIKKAJI		J94.473D	
PUBCHEM		12211	
分子式		C21H18O11	
分子量		446.364	
文献情報			
備考		オウゴン	
NMR情報	1H	No	マシン名
		1	日本電子 ECS400
	2	JEOL ECA600	
	13C	No	マシン名
1		JEOL ECA600	
(LC/GC)MS情報	管理番号((LC/GC)MSの名称)	LC/GC情報	MS情報
	NIB-0001(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0001(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0002(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0035(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0036(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0057(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0059(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0073(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0089(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0105(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0106(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0142(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0145(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0167(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0167(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0174(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0175(ESI-Q-TOF(+))	LC情報	MS情報
	NIB-0002(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0035(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0036(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0057(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0059(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0073(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0089(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0105(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0106(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
	NIB-0142(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報
NIB-0145(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報	
NIB-0174(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報	
NIB-0175(ESI-Q-TOF(-))	LC情報	MS情報	
化合物を含有する生薬名	オウゴン		
生物活性情報			

戻る

図 34. 化合物情報詳細画面(バイカリンの例)

文字サイズ変更
大 標準 小

NIBIO 薬用植物総合情報データベース

トップ 総合検索 生薬検索 植物検索 化合物検索 モデル試料検索 データ一覧

日本薬局方収載生薬一覧

リンクをクリックすると、詳細情報を表示します。

1-20件表示/120件中 1 2 3 4 5 6 次へ>>

生薬名	生薬ラテン名	生薬英名	薬局方情報(分類)
1 オウゴン	SCUTELLARIAE RADIX	Scutellaria Root	定量法, 確認試験法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, 純度試験
2 オウレン	COPTIDIS RHIZOMA	Coptis Rhizome	定量法, 確認試験法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, 純度試験
3 カンゾウ	GLYCYRRHIZAE RADIX	Glycyrrhiza	定量法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, エキス含量, 純度試験
4 ゴシツ	ACHYRANTHIS RADIX	Achyranthes Root	定量法, 確認試験法, 乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, 純度試験
5 サイコ	BUPLEURI RADIX	Bupleurum Root	定量法, 確認試験法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, エキス含量, 純度試験
6 サンシシ	GARDENIAE FRUCTUS	Gardenia Fruit	定量法, 確認試験法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, 純度試験
7 ジオウ	REHMANNIAE RADIX	Rehmannia Root	定量法, 灰分_1, 灰分_2, 酸不溶性灰分_1, 酸不溶性灰分_2, 純度試験_1, 純度試験_2
8 シャクヤク	PAEONIAE RADIX	Peony Root	定量法, 確認試験法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, 純度試験
9 シャゼンシ	Plantago Seed	Plantago Seed ,Plantaginis Semen	定量法, 確認試験法, 灰分, 酸不溶性灰分, 純度試験
10 センキュウ	CNIDI RHIZOMA	Cnidium Rhizome	定量法, 灰分, 酸不溶性灰分, 純度試験
11 ソウジュツ	ATRACTYLODIS LANCEAE RHIZOMA	Atractylodes Lanceae Rhizoma	定量法, 灰分, 酸不溶性灰分, 精油含量, 純度試験
12 ソウオウ	PERILLAE HERVA	Perilla Herb	定量法_1, 定量法_2, 確認試験法(TLC)_1, 確認試験法(TLC)_2, 乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, 精油含量, 純度試験_1, 純度試験_2
13 ダイオウ	RHEI RHIZOMA	Rhubarb	定量法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, エキス含量, 純度試験
14 トウキ	ANGELICAE RADIX	Japanese Angelica root	定量法, 灰分, 酸不溶性灰分, エキス含量, 純度試験
15 ニンジン	GINSENG RADIX	Ginseng	定量法, 確認試験法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, エキス含量, 純度試験
16 ビャクジュツ	ATRACTYLODIS RHIZOMA	Atractylodes Rhizome	定量法, 確認試験法, 灰分, 酸不溶性灰分, 精油含量, 純度試験
17 マオウ	EPHEDRAE HERBA	Ephedra Herb	定量法, 確認試験法(TLC), 灰分, 酸不溶性灰分, 純度試験
18 ケイヒ	CINNAMOMI CORTEX	Cinnamon Bark	定量法, 確認試験法(TLC), 乾燥減量, 灰分, 精油含量, 純度試験
19 ショウキョウ	ZINGIBERIS RHIZOMA	Ginger	定量法, 確認試験法(TLC), 灰分, 純度試験
20 ブクリョウ	PORIA	Poria Sclerotium	定量法, 確認試験法, 灰分_1, 灰分_2, 純度試験_1, 純度試験_2

1-20件表示/120件中 1 2 3 4 5 6 次へ>>

ダウンロード 戻る

免責事項・著作権について
Copyright © 2012 Research Center for Medicinal Plant Resources, Nibio All rights reserved.

図 35. 日本薬局方収載生薬一覧画面

独立行政法人 医薬基盤研究所

NIBIO 薬用植物 総合情報データベース

この「総合情報データベース」は、漢方薬・生薬に用いられる薬用植物に関するさまざまな情報を、簡単な操作で検索・閲覧することができる、薬用植物の「総合図鑑」です。薬用植物の情報・生薬の情報・成分・遺伝子に関する情報・栽培法に関する情報等に加え、国内に伝播する代表的な生薬を「*...*」として集め、これらの成分等について実際に測定・解析したデータを収載しています。また、薬用植物の栽培や増殖に関する情報、生薬の内部形態の情報なども充実しています。下の「検索する」ボタンより検索画面にお進みください。

このデータベースについて詳細情報を見る

検索する

漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース (厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進事業)
Copyright©2013 Research Center for Medicinal Plant Resources, Nibio All rights reserved.

図 36. 薬用植物総合情報データベースのホームページ

このサイトを訪れた人が、「どのような情報があるのだろうか?」と本データベースに興味を持ち、思わず検索システムを使ってみたくするというコンセプトでホームページを作成した。

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための
基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）
分担研究報告書

研究分担課題 データベース構築及び遺伝子鑑別情報に関する研究
—生薬（ゴシツ、ゴシュユ、チンピ）の遺伝子情報について—

研究分担者 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

生薬ゴシツ、ゴシュユ、チンピの遺伝子鑑別に関する情報の収集を行った。ゴシツについては基原植物を含む*Achyranthes*属植物または生薬の核リボソーマルDNA ITS1領域、葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域、同*atpF-atpA*領域の3領域の解析を行った。その結果、モデル生薬のITS1領域の配列はすべて*A. bidentata*と同一であり、*A. aspera*とは18ヶ所の変異点で区別できることが明らかになったが、他の2領域については、局方試験用トウゴシツ、同ヒナタイノコズチ、そして*A. aspera*のいずれとも変異が認められた。

ゴシュユについては基原植物を含む*Euodia*属植物または生薬のITS1-ITS2領域、ITS1領域、そしてITS2領域の配列について系統樹解析を行うと、それらは、いずれも生薬ゴシュユの基原植物種のクレードに入り、他の非基原植物種とは別のクレードに分かれ、モデル生薬はいずれも基原植物のバリエーションの範囲に入ることが確認された。

チンピについては、*Citrus*属植物のITS領域の系統樹解析の結果、同領域による基原種鑑別が困難と考えられたので、ヘスペリジン生合成経路のカルコン合成酵素遺伝子の多形に着目し、基原種鑑別への利用について検討を行った。

A. 研究目的

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、薬用植物資源の安定供給を志向し、生薬情報の多様性の確認を目的として、生薬及びそれらの基原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、生薬の遺伝子鑑別に関する情報の整備を行う。

成分情報等生薬に関する多角的な情報とともに遺伝子鑑別法のデータベース化を行うことは、国内に流通する生薬の安全性の確保ならびに品質の向上に貢献するものと期待される。

本報告書では、生薬ゴシツ及びその基原植物

を含む *Achyranthes* 属植物、生薬ゴシュユ及びその基原植物を含む *Euodia* (*Evodia*, *Tetradium*) 属植物、そして生薬チンピ及びその基原植物を含む *Citrus* 属植物の遺伝子鑑別に関する情報について報告する。

B. 研究方法

B-1. ゴシツについて

生薬ゴシツ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。

「ゴシツ 牛膝 *Achyranthes* Root ACHYRANTHIS RADIX 本品はヒナタイノコズチ *Achyranthes*

fauriei Leveillé et Vaniot 又は *Achyranthes bidentata* Blume (*Amaranthaceae*)の根である。」

また、参考情報（日本薬局方の学名表記と分類学的に用いられる学名表記）には、下記の記述がある。

「ヒナタイノコズチ *Achyranthes fauriei* Leveillé et Vaniot = *Achyranthes fauriei* H. Lev. & Vaniot; *Achyranthes bidentata* Blume; *Amaranthaceae* ヒユ科」

さらに、インターネット上の情報として、中医世家：<http://www.zysj.com.cn/zhongyaocai/> には下記の記述がある。

牛膝：*A. bidentata* Blume. (別名：懷牛膝、紅牛膝、杜牛膝、土牛膝（野生品）) 主産河南

土牛膝：*Achyranthes aspera* L. (ケイノコズチ) 福建、広西、広東、四川、雲南等

川牛膝：*Cyathula officinalis* Kuan (*Amaranthaceae* ヒユ科) 四川、貴州、雲南

味牛膝：*Strobilanthes grossus* C. B. Clarke あるいは *S. forrestii* Diels (*Acanthaceae* キツネノマゴ科)

湖北、四川

生薬ゴシツの遺伝子鑑別に関する文献の収集

PUBMED (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) または、Google Scholar (scholar.google.co.jp/)で 'Achyranthes', 'Achyranthis', '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。

データベース登録遺伝子情報検索

DDBJで'Achyranthes'をキーワードに検索を行い、植物寄生バクテリア、ウイルス等の塩基配列を除外する等の処理を加え、*Achyranthes*属の主に植物種間識別に関する遺伝子情報を抽出した。

供試生薬試料

本研究に供した生薬ゴシツの市場流通品モデル試料は表1のとおり。

*Achyranthes*属植物試料

本研究に供した、*Achyranthes*属植物体試料は下記のとおり。括弧内の記号は本研究中の試料コードである。

標本園ヒナタイノコズチ(Af)、標本園トウゴシツ(Ab), *A. aspera* (葉、ベトナム) (Aa-V)。

生薬試料及び乾燥試料

本研究に供したモデル生薬以外の生薬試料及び乾燥試料は下記のとおり。括弧内の記号は本研究中の試料コードである。

局方試験用トウゴシツ(Ab-Std)、局方試験用ヒナタイノコズチ(Af-Std)、ヒナタイノコズチ(70°C、6日間乾燥) (Af-T)。

生薬ゴシツからのゲノムDNA調製及びPCR増幅

各モデル試料、生薬試料そして乾燥試料について原形、刻み(荒い刻み)生薬の1片を1試料とし2試料を解析に供した。DNA調製キットにはDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を標準的に使用した。剪定鋏で削りとった生薬片約20-50 mgを個別に直径4.8 mmのステンレスボールと共に2 mLスクリ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。破碎粉末に1 mLのDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1バッファー及び2 µL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 µLのAEバッファーで溶出し、その1 µLをPCRに使用した。

Rpl16-rpl14, ITS, *atpF-atpA*各領域ともにPCR増幅には基本的にKOD -plusを使用し、アニール58°C, 30サイクルで行った。増幅効率の悪い検体についてはサイクル数を35サイクルに増加した。

PCRでITS1領域が増幅されない試料についてはgenome DNA調製キットをDNeasy Plant Mini Kitから Blood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic-tip 20/G (QIAGEN)に変更した。

さらに、KOD-plusで35サイクルで増幅しないものについては、Ampdirect Plus + Nova TaqのPCR系による増幅を検討した。

経年サンプルからのBlood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic-tip 20/G (QIAGEN)を使用したgenome DNA調製

生葉からのgenome DNA調製の標準方法として使用しているDNeasyで調製したgenome DNAを鋳型としてPCRを行った場合、検体によっては、増幅産物が得られない場合があった。試料入手年の古いNIB-0096, 0152及び、入手年不詳のNIB-0212についてはDNeasyにより調製したgenome DNAではいずれの遺伝子領域についてもPCR増幅が不調であった。

そこで、国立衛研生薬部丸山氏、京大伊藤氏より調製困難な試料においてgenome DNA調製が可能であると報告されたBlood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic- tip 20/G (QIAGEN) によるgenome DNA調製を試み、調製DNAを鋳型とした各領域のPCR増幅に供した。

植物体からのゲノムDNA調製

植物体の葉、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。

各遺伝子領域の増幅・塩基配列解析

以下に、KOD-plusを使用した標準的な各遺伝子領域の増幅～遺伝子解析の流れについて記す。

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°C 2 min. - (94°C 15 sec. - 58°C 30 sec. - 68°C 90 sec.) x 30 - 4°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、単一バンドの場合は直接、複数バンドの場合はゲル精製を行い、クローニング&シーケンシングまたは、ダイレクトシーケンシングに供した。

ダイレクトシーケンシングは、PCR増幅産物をExoSAP-IT (GE Healthcare)で処理したのち、標的領域の増幅に用いたプライマーを用い、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。

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試料あたり、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。コロニーダイレクト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°C 5 min. - (95°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 60 sec.) x 30 - 72°C 10 min. - 4°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、ExoSAP-IT (GE Healthcare)で処理したのち、シーケンシングベクター用プライマーU-19またはR-20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。

葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域の増幅・解析

オウゴンで基原植物種同定に実績のあった *rpl16-rpl14*領域 (文献1) について、遺伝子情報を収集した。本領域のDDBJへの登録は2012年4月時点で、*A. aspera* (EF688661)の1件のみであるが、増幅が容易であり、single copyでダイレクトシーケンシングで配列決定が容易と期待された。なお、増幅塩基長約570 bpと少々長い為、低品質のDNA試料では増幅されない可能性が危惧された。

Primers:A-primer:5'-AAAGATCTAGATTTTCGTAAACAACATAGAGGAAGAA-3'

B-primer:5'-ATCTGCAGCATTAAAGGGTCTGAGGTTGAATCAT-3'

核リボソームDNA ITS領域の増幅・解析

本領域については、DDBJに*A. bidentata*由来の塩基配列のみ、複数登録されており、これらを検討した結果、ITS1領域で植物種の識別が可能と考えられた。一方、多コピーのため、1試料から複数の配列種が得られる可能性があり、クローニング&シーケンシングの手法の適用の可否については確認を要した。プライマー配列は文献2に拠った。

Primers:ITS5(sense-primer):5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

ITS4(antisense-primer):5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

葉緑体DNA *atpF-atpA*領域の増幅・解析

本領域の *Achyranthes* 属植物のDDBJへの登録は2012年4月時点では無かった。

Primers:atpF-A:5'-TTACGAGGAGCTCTAGGAAC TCTGAATAGTTGTTTG-3'

atpA-B:5'-GCCATTACTTCATCAAGACCGTGAA

TACGAGCAATGCC-3'

葉緑体DNA *atpF-atpH*領域の増幅・解析

国際バーコードオブライフプロジェクト (Consortium for the Barcode of Life: CBOL)において植物の網羅的識別への利用が提唱されている遺伝子領域のひとつである (文献3) が、本領域の *Achyranthes* 属植物のDDBJへの登録は2012年4月時点では無かった。

atpF-atpH (primer sequences provided by Ki-Joong Kim; kimkj@KOREA.AC.KR)

Primers:atpFf:5'-ACTCGCACACACTCCCTTTCC-3'
'atpHr:5'-GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT-3'

PCR増幅困難な試料のPCR増幅条件の検討

KOD-plusでのPCR増幅が困難な検体については、正確性の高いKOD-plusから増幅効率を重視したAmpdirect Plus + Nova Taqの系に変更し、PCR増幅を試みた。

PCR reaction mixture: Milli-Q water 7.4 µl, 2x Ampdirect Plus 10 µl, primer sense & antisense (10 pmol) 1.0 µl each, Nova Taq polymerase 0.1 µl, genome DNA 0.5 µl (reaction volume: 20 µl)

PCR condition: 95°C 10 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 60 sec. - 72°C 60 sec.) x 40 - 72°C 7 min. - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

B-2. ゴシユユについて

生薬ゴシユユ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。

「ゴシユユ 呉茱萸 *Euodia* Fruit **EUODIAE FRUCTUS** 本品はゴシユユ *Euodia ruticarpa* Hooker filius et Thomson (*Evodia rutaecarpa* Benthams), *Euodia officinalis* Dode (*Evodia officinalis* Dode)又は *Euodia bodinieri* Dode (*Evodia bodinieri* Dode)(*Rutaceae*)の果実である。」

生薬ゴシユユの遺伝子鑑別に関するデータベ

ース登録遺伝子情報検索

NCBI GenBank データベースにおいて "Tetradium", "Euodia", "Evodia" の各キーワードで検索を行い、hit件数を集計した。

供試生薬試料

本研究に供した生薬ゴシュユの市場流通品モデル試料は表1のとおり。

Tetradium属植物試料

本研究に供した、*Tetradium*属植物体試料は下記のとおり。括弧内の記号は本研究中での試料コードである。

種子島研究部ホンゴシュユ-1♀ (g1)、同ホンゴシュユ-6 (g2)、同コホクゴシュユ-4 (g3)、同コホクゴシュユ-5 (g4)、同ゴシュユ-1 (g5)、同ゴシュユ-2 (g6)。

モデル生薬及び植物試料の基原植物種鑑別に 関する遺伝子解析

データベース登録のITS領域の塩基配列を用い、系統樹を作製した。各試料からの遺伝子試料調製法、解析法は、前項ゴシツと同様である。なお、モデル生薬の果実3粒を1検体として、各モデル生薬より2検体を遺伝子解析に供した。

(例：NIB423 → 423#1, 423#2)

B-3. チンピについて

生薬チンピ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。

「チンピ 陳皮 *Citrus Unshiu Peel AURANTII NOBILIS PERICARPIUM* 本品はウンシュウミカン *Citrus unshiu* Marcowicz 又は *Citrus reticulata* Blanco (*Rutaceae*) の成熟した果皮である。本品は定量するとき、換算した乾燥物に対し、ヘスペリジン4.0%以上を含む。」

生薬チンピの遺伝子鑑別に関するデータベー

ス登録遺伝子情報検索

植物種等の遺伝子識別に一般的に用いられるITS領域について、*Citrus*属植物の遺伝子識別に利用可能か検討した。データベース(DDBJ)において "citrus", "ITS1" をキーワードとして検索を行い、hitした塩基配列のうち、ツムラグループの取得した75配列について多重整列解析を行った。

供試生薬試料

本研究に供した生薬チンピの市場流通品モデル試料は表1のとおり。

Citrus属植物試料

本研究に供した、*Citrus*属植物体試料は下記のとおり。

- ・ウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marcowicz) : 筑波研究部圃場 (市場購入品)
- ・ヒラミレモン (シークワサー) *Citrus depressa* (*Citrus × depressa*, formerly *C. pectinifera*) : 沖縄県名護市 (市場購入品)
- ・ユズ (*Citrus ichangensis* × *C. reticulata*, formerly *C. junos* Siebold ex. Tanaka; : 茨城県久慈郡大子町 (121101採集)

チンピ (生薬) からのゲノムDNAの調製

他の生薬試料と同様にDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用し、ゲノムDNA調製を試みたが、得られたDNAを鋳型とした場合、ITS領域や *rpl16-rpl14* 領域の増幅が困難なケースが多かった。そこで、Genomic-tip 20/G (QIAGEN) を使用し、ゲノムDNAの調製を行った。

チンピ (生薬) のITS領域のPCR増幅及び塩基配列解析

常法に従い、ITS領域 (ITS1-ITS2) の増幅を行った。PCR増幅産物はゲル精製ののち、末端A付加を行い、T-vector にクローニングし、各検体について8クローンの塩基配列の解析を行った。

ヘスペリジン生合成経路鍵酵素遺伝子の多型による基原植物種鑑別の試み

植物種等の遺伝子識別に一般的に用いられるITS領域について*Citrus*属植物における多型情報を検討したところ、*Citrus*属植物のITS領域は近縁植物種間で非常に相同性が高く、本領域での基原植物種鑑別は困難と考えられた。

そこで、日本薬局方において成分含量が規定されているヘスペリジンの生合成(図3)に着目し、その鍵酵素と考えられるchalcone synthase (CHS)の遺伝子多型による基原植物種の鑑別が可能か検討することとした。まず、DDBJ登録の*Citrus*属植物のCHS遺伝子情報を検索し、登録済みの塩基配列を抽出し、多重整列解析(アラインメント)を行った。解析に使用した配列及びアクセッション番号は下記及び図3のとおりである。

CHSゲノムDNA増幅用プライマーの設計

*C. sinensis*由来CHS(EU410483)と、シロイヌナズナ由来AtCHS(At5g13930.1)のゲノム構造との比較から、CHSに1ヶ所存在するイントロンの位置は植物種間を超えてほぼ保存されていると予想される。このイントロン(非翻訳)領域には変異が蓄積され、植物種識別に利用可能な多型が存在すると期待される。そこで、FJ887898(*C. unshiu* CHS)の全長配列でBlastn検索を行い、ヒット上位の下記遺伝子の保存領域について、図4及び下記に示す3セット計6種のプライマーを設計した。

Blastn検索結果

Sequences producing significant alignments:

Score (bits) E Value

FJ887898|FJ887898.1 *Citrus unshiu* chalcone synthase

(CHS) mRNA

2952 0.0

AB009351|AB009351.1 *Citrus sinensis* mRNA for

chalcone synthase

2617 0.0

GQ892059|GQ892059.1 *Citrus maxima* cultivar Feng
wei chalcone synthase

2270 0.0

EU410483|EU410483.1 *Citrus sinensis* cultivar Ruby
chalcone synthase

2250 0.0

AB050890|AB050890.1 *Citrus jambhiri* CHS mRNA
for chalcone synthase

1582 0.0

Oligo-DNAs for Citrus CHS genome amplification

[1] Citrus-CHS-1S: 5'- ATG GCA ACC GTT CAA
GAG ATC -3'

[2] Citrus-CHS-129S: 5'- C ACA AAG AGC GAG
CAT ATG AC -3'

[3] Citrus-CHS-341A: 5'- AT GGC CTT TGT AGC
AGC TTC T -3'

[4] Citrus-CHS-491A: 5'- CA TCC TTG TTG GTA
CAT CAT G -3'

[5] Citrus-CHS-745S: 5'- GAC TCT GAC GGT GCA
ATT GAC -3'

[6] Citrus-CHS-1176A: 5'- TCA AGC TTT GAT GGG
GAC ACT -3'

1S+491Aまたは、129S+341Aの組み合わせでは、CHSゲノムDNAの5'末端側に存在するイントロン(EU410483では100 bp、*A. thaliana*では86 bp)を挟み増幅されると予想される。予想増幅サイズ(イントロン100 bp含む)は次のとおり。
1S+491A : 約590 bp、129S+341A : 約313 bp、
745S+1176A : 約432 bp。

ウンシュウミカン新鮮葉より調製したゲノムDNAを鋳型としたCHS遺伝子(部分配列)の増幅及び塩基配列解析

ウンシュウミカン(*Citrus unshiu* Marcowicz) : 筑波研究部圃場(市場購入品)の新鮮葉よりDNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を使用しゲノムDNAを調製し、これを異が都として、CHSゲノム領域の増幅を行った。なお、アニール温度58°Cでは非特異的増幅産物が多かったため、ア

ニール温度を62°Cに変更しPCRを行った。

制限酵素Taq Iによる2種のCHS genomic cloneの識別

ウンシュウミカン由来の2 typeのCHSゲノム配列は、制限酵素Taq Iの消化パターンで識別が可能と考えられた。そこで、N末側領域のPCR増幅にひきつづきTaq I消化を行い、ウンシュウミカンと他のミカン科植物（ユズ、ヒラミレモン）の識別が可能か検討した。

また、モデル試料NIB399(#1,#2)についても検討対象とした。なお、これら試料に対するTaq I消化による予想バンドサイズは下記のように予想された。

CHS-A type: 374, [106, 88] (, 28 invisible) → 2 bandsに見えると予想

CHS-B type: 289, [106, 88, 86] (, 28 invisible) → 2 bandsに見えると予想

両type mix: 374, 289, [106, 88, 86] (, 28 invisible) → 3 bandsに見えると予想

e.g. *C. unshiu* (圃場) → mixed 3 bands

C. sinensis (AB009351, EU410483) → 2 bands

ここでは下記の試料を解析対象とした。

・ウンシュウミカン(*Citrus unshiu* Marcowicz) : 筑波研究部圃場 (市場購入品)

・ヒラミレモン (シークワーサー) *Citrus depressa* (*Citrus* × *depressa*, formerly *C. pectinifera*) : 沖縄県名護市 (市場購入品)

・ユズ (*Citrus ichangensis* × *C. reticulata*, formerly *C. junos* Siebold ex. Tanaka; : 茨城県久慈郡大子町 (121101採集)

・モデル試料NIB399 (#1,#2)

上記試料に対し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用し、ウンシュウミカンについては葉より、ヒラミレモン及びユズについては果皮より、DNAを調製し、PCRの鋳型として用いた。なお、NIB399については、Genomic-tip 20/G (QIAGEN) で調製したゲノムDNAを鋳型とした。

C. 研究結果

C-1. ゴシツについて

文献・データベース調査結果

生薬の遺伝子鑑別全般 (文献4-8) 及びゴシツの遺伝子鑑別 (文献9-11) に関連する情報は、文献の項に記した。

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表2にまとめた。2012年4月時点で、キーワード”achyranthes”のhit数は30件であり、うち、*Achyranthes*属植物由来の配列は18件であった。なお、*atpF-atpA*領域、*atpF-atpH*領域については登録がなかった。

葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域の増幅・解析

本領域は塩基長が503 bp (*A. aspera*の場合) (プライマー領域を除く) と比較的長いため、DNAの品質の低い検体ではPCR増幅が不可能であったが、増幅されたものについては、すべてダイレクトシーケンシングにより解析が可能であった。その結果、モデル試料間での変異は認められず、AbとAf間で変異点は無いこと、Aa(Vitenam)とAb/Af間で5ヶ所の変異点が存在することが明らかになった。モデル生薬はすべて、Ab/Afタイプと1塩基異なる(411A/C)変異を示し、この変異点についてはクローニング&シーケンシングで確認した。

核リボソームDNA ITS領域の増幅・解析

あらかじめ、クローニング&シーケンシングで確認したところ、1検体から取得される配列型は1種のみであり、ゴシツ、*Achyranthes*属植物の遺伝子鑑別にはダイレクトシーケンスの手法が適用可能と判断された。

ITS領域の全長は、約700 bpと長いため、DNAの品質の低い検体では増幅できないものがあった。それらについてはITS1領域 (約330 bp) の増幅は可能であったため、ITS1領域の塩基配列情報を解析した。ITS2領域については、新規

プライマー(ITS3rev)を設計し、トウゴシツ (標準)、*A. aspera* (ベトナム)、NIB152(genomic-tip精製)の各試料より抽出したgenome DNAを鋳型にPCR増幅を試みたが、増幅されなかった。

NIB96#6についてはAmpdirect Plus + Nova Taq系で増幅した産物をクローニング&シーケンシングに供したところ、クローン間の変異が認められた。これはNovaTaqの増幅性能に因ると考えられるが、さらなる検討が必要である。

また、ITS領域の増幅において、検体番号NIB16#1、NIB96#6においては、植物由来の増幅産物に加え、サイズの異なる真菌類(fungus)由来の増幅産物が得られた。これらは生薬に付着していた可能性が高い。

Ab-std, Af-std, Af-TのITS領域の塩基配列はDDBJ登録:*Achyranthes bidentata*: AB558157、富山大伝統医薬データベース登録試料、牛膝(ごしつ)、入手先 日本、大阪府、(株) 栃本天海堂(Lot.No. 003708002)と同一であった。また、モデル試料のITS1領域(約330 bp)の配列はすべてAb-stdと同一であった。ITS1領域(約330 bp)における*A. aspera* (Vietnam)とAb-Std間の変異点は18ヶ所認められた。

葉緑体DNA *atpF-atpA*領域の増幅・解析

本領域は増幅塩基長が短い(331 bp、うち、プライマー74 bp)こともあり、各試料において良好に増幅された。ヒナタイノコズチ及び、トウイノコズチについては過去の報告と同様の結果が得られたが、生薬由来の配列は両植物種の配列と異なる解析結果となった。植物体と生薬で塩基が異なる領域はAが連続するpoly(A)領域で、PCR増幅、シーケンシングの際に正しく増幅または解読ができていない可能性も否定できない。

葉緑体DNA *atpF-atpH*領域の増幅・解析

本領域についてはCBOLの情報に従ったプライマーでPCRを行ったが、増幅産物が得られなかった。

C-2. ゴシユユについて

生薬ゴシユユの遺伝子鑑別に関するデータベース登録遺伝子情報検索

"Tetradium"で検索 hit件数 135件(うち8件はLinum由来と考えられる。)

"Euodia"で検索 hit件数 26件

"Evodia"で検索 hit件数 79件

上記の検索結果について、重複するhitを整理し、植物種及び領域別にhit件数を表2にまとめた。

モデル生薬及び植物試料の基原植物種鑑別に 関する遺伝子解析

データベース登録のITS領域の塩基配列を用い、系統樹を作製すると、*Euodia hortensis*, *E. hylandii*, *E. pubifolia*の3植物種由来のITS領域の塩基配列は、他のTetradium属植物由来の配列と比較し、変異が大きく系統樹解析では距離が大きく離れた。そこで、これら3種の植物種は除いて系統樹解析を行った。

その結果、ITS1またはITS2領域で、ゴシユユの基原植物である、*E. ruticarpa*, *E. officinalis*, *E. bodinieri*と、他のTetradium属植物とをそれらの入るクレード(系統樹の分枝)で識別可能であることが示唆された(図1,2)。

一方、ゴシユユの基原植物である、*E. ruticarpa*、*E. officinalis*、*E. bodinieri*の3種を同領域で識別することは困難とみられ(図3)、これらの鑑別については他の遺伝子領域の利用についてさらなる検討が必要である。

生薬ゴシユユのITS領域の遺伝子解析にダイレクトシーケンシング法が適用可能か検討するため、NIB423についてPCR増幅ののち、シーケンシングベクターにクローニングし、クローン毎に塩基配列解析を行った。その結果、1検体から複数タイプの塩基配列が得られたため、ダイレクトシーケンシングは適用できず、クローニング&シーケンシング法を適用することとした。

なお、生薬ゴシユユより調製したゲノムDNA

を鋳型としてPCRでITS領域を増幅したところ、植物だけではなく、bacteriaやfungus由来の増幅産物が共に増幅されることが多かった。それらはゴシュユ基原植物のITS領域の増幅産物よりもややサイズが小さく、アガロースゲル電気泳動で分離し、目的の植物由来のバンドを切り出した際に、バクテリア由来の増幅産物の混入を避けることが困難であった。そのため、クローニングベクターに導入する際に、バクテリア由来の増幅産物が混入し、検体によっては、バクテリアのITS領域の割合が植物由来のものよりも多くなったケースもあった。そのため、検体によっては、クローン数が5と少ないものがある。

各検体について5-13クローンの塩基配列を解析したところ、各検体より1-数タイプの配列が得られた。これらのうち各検体について代表的な1または2配列を選びITS1-ITS2領域（全長）、ITS1領域、そしてITS2領域についてそれぞれ、データベース登録配列とともに系統樹解析を行った。

その結果、モデル試料由来のITS1-ITS2領域、ITS1領域、そしてITS2領域の配列はいずれも *Tetradium rutilcarpum* のクレードに入り、他の非基原植物種とは別のクレードに分かれた。すなわち、モデル生薬はいずれも基原植物のバリエーションの範囲に入ることが確認された（ITS1領域の系統樹解析結果について図4に示す）。

なお、モデル生薬とともに解析に供した種子島研究部で保存されている、ゴシュユ、ホンゴシュユ、コホクゴシュユよりクローニングした同領域の配列もすべてモデル植物と同じクレードに分類された。

C-3. チンピについて

生薬チンピの遺伝子鑑別に関するデータベース登録遺伝子情報検索

図1.に示すように同一植物種由来の配列が複数のクレードに入り、塩基配列パターンと植物種が一對一に対応しないことが確認された。と

くに、チンピの基原植物がハッサクやマンダリンオレンジと同じクレードに入ることが示され、すなわち、ITS1領域によるチンピの基原植物種鑑別は困難であることが示唆された。

チンピモデル生薬ITS領域のPCR増幅及び塩基配列解析

PCR増幅 DNeasyを用いて調製したゲノムDNAを鋳型とした場合、NIB253では検体#1, #2共に *rpl16-rpl14* 領域の増幅産物が得られなかった。

（ITS領域はNIB253(#1)では増幅されたが未解析。）そこで、genomic-tip 20/Gを使用し、ゲノム調製を行ったところ、検体によってはPCR増幅が可能であった（例、図1）。

NIB673、NIB674の両サンプルについては、genomic-tip 20/Gを使用した場合でもITS領域は増幅されなかった（図1）。

塩基配列解析 解析可能であったNIB399(#2)、NIB665(#2)のITS領域の塩基配列は、NIB399(#2)由来の配列は#2-1 type, #2-2 type, #2-5 typeの3 typeに分けられた。一方、NIB665(#2)由来の配列は#2-1 typeの1種であった。

系統樹解析 これらの塩基配列をツムラグループの登録した *Citrus* 属植物ITS領域の塩基配列と共に分子系統樹解析を行ったところ、NIB399(#2-1)は *C. unshiu* 及び *C. kinokuni* が含まれるクレードに入ることが明らかになった（図2）。また、NIB399 (#2-3, #2-5)及びNIB665 (#2-1)は *C. hassaku* 及び *C. sinensis* と近縁のクレードに入ることが判明した。

以上の結果から、ITS領域の塩基配列の多型によりチンピの基原植物鑑別を行うことは困難と結論された。

ウンシュウミカンCHS遺伝子ゲノム配列の解析

CHS遺伝子に対するプライマーセット1S + 491A（イントロンを含む予想増幅サイズ：約590 bp）の増幅産物(Lane #1, 2)について、ゲル精製し、クローニングしたのち塩基配列解析を行っ

た。その結果、ウンシュウミカンには2 typeのCHSゲノム配列(CHS-A, CHS-B)が存在することが明らかになった (図6)。

CHS 遺伝子の多型による *Citrus* 属植物の PCR-RFLP解析

CHS遺伝子を増幅するPCRの結果、イントロンを含むN末側領域は植物種にかかわらず、ほぼ同一サイズの増幅産物が得られた (図7)。

これらを制限酵素 *Taq* I で消化したところ、目視で、Lane #1, 2, 9, 10の4レーンで3バンドに、また、その他のレーンで2バンドに消化された (図8)。(Lane #1, 2とlane #9, 10のパターンが同一か再検討が必要。) この結果は、ウンシュウミカンにCHSが2種存在していることを示し、NIB399がウンシュウミカン型のCHS配列を有していることを示唆する。また、ユズ、ヒラミレモンには、*Taq* Iサイトの少ないタイプのCHSのみが存在することが示唆された。

以上の結果は、本PCR-RFLP法が生薬チンピの基原植物鑑別に使用できる可能性を示すものである。

D. 考察

D-1. ゴシツについて

ゴシツについては、核リボソームDNA ITS1領域、葉緑体DNA *rpl16-rpl14* 領域、葉緑体DNA *atpF-atpA* 領域の3領域の解析に成功し、モデル生薬のITS1領域の配列はすべて、DDBJ登録の *Achyranthes bidentata* (AB558157)と同一であり、ベトナム産の *A. aspera* とは18ヶ所の変異点で区別できることを明らかにした。なお、葉緑体DNA *rpl16-rpl14* 領域及び *atpF-atpA* 領域については、モデル生薬由来の配列と他のリファレンスとなる配列が一致するものがない結果となり、これらについてはさらなる多種・多数の検体について塩基配列情報の収集を要すると考えられる。

D-2. ゴシユユについて

コホクゴシユユ(*Tetradium hupehensis*)は生薬ゴシユユの基原植物として規定されていないが、ITS領域の塩基配列について系統樹解析を行うと、基原植物であるゴシユユ、ホンゴシユユと同じクレードに入ることが明らかになった。今後、より精度の高い基原植物種鑑別のため、コホクゴシユユと他の *Tetradium* 属植物を明確に区別できる領域について検討が必要である。

ITS領域は植物種間のみならず、bacteriaやfungus等でも高度に保存されており、PCRで増幅する場合、両者に由来する増幅産物が同時に得られることが多い。これは、基原植物のITS領域の解析の障害となる場合が多いが、生薬のカビや雑菌などによる汚染を検知する手法として活用することもできると考えられ、遺伝子情報整備により、付着している生物種の特特定も可能になると思われる。

D-3. チンピについて

生薬チンピからのゲノムDNA調製法の検討

生薬チンピからのゲノムDNA調製について、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)またはGenomic-tip 20/G (QIAGEN)の使用を検討したところ、前者を使用した場合、ITS領域(ITS1-ITS2)がPCRで増幅できない検体があった。その場合、Genomic-tip 20/Gを使用すると、PCR増幅が可能な場合もあったが、モデル生薬NIB674のように入手年の古い検体の場合、Genomic-tip 20/Gで調製した場合でも増幅産物が得られないケースもあった。チンピの場合、古いもの(陳久品)が優れているとされていることもあり、このような古い検体からの高品質ゲノムDNAの調製法の確立が課題である。

また、ITS1-ITS2は約700-800 bpと推定されるため、古い試料由来の分解の進んだゲノムDNAを鋳型とする場合、増幅産物が得られにくいと考えられる。そのため、より短いITS1領域またはITS2領域を個別に増幅する手法、もしくは、nested PCR法を併用した手法等を検討する必要がある。

CHS領域を標的としたチンピ基原植物種鑑別の可能性

上記の結果から、CHS遺伝子のゲノム領域PCR-RFLP法により基原植物種を鑑別できる可能性が示された。今後、他のミカン科植物についてCHSゲノム領域の解析を行う必要がある。

E. 結論

本年度は、ゴシツ、ゴシユユ、チンピの3種の生薬について基原植物鑑別に関する情報の収集、ならびに各生薬のモデル生薬の遺伝子鑑別対象領域の塩基配列解析を行った。

ゴシツについては、核リボソームDNA ITS1領域、葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域、葉緑体DNA *atpF-atpA*領域の3領域の解析を行った。その結果、モデル生薬のITS1領域の配列はすべて、DDBJ登録の *Achyranthes bidentata* (AB558157)と同一であり、ベトナム産の *A. aspera*とは18ヶ所の変異点で区別できることが明らかになった。葉緑体DNA *rpl16-rpl14*領域については、モデル生薬はすべてトウゴシツ(*A. bidentata*)またはヒナタイノコズチ(*A. fauriei*)と1塩基異なる変異を示した。葉緑体DNA *atpF-atpA*領域については、モデル生薬由来の配列は、局方試験用トウゴシツ、同ヒナタイノコズチ、そして *A. aspera*のいずれともAが連続するpoly (A)領域のA個数が異なる変異を示した。

ゴシユユについては、モデル試料由来のITS1-ITS2領域、ITS1領域、そしてITS2領域の配列について系統樹解析を行うと、いずれも生薬ゴシユユの基原植物として規定されている *Tetradium rutilicarpum*のクレードに入り、他の非基原植物種とは別のクレードに分かれることが明らかになった。すなわち、モデル生薬はいずれも基原植物のバリエーションの範囲に入ることが確認された。

チンピについては、ITS領域について基原植物鑑別に使用可能か検討したが、*Citrus*属植物において生薬チンピの基原植物である *C. unshiu*及

び *C. reticulata*由来の配列が、*C. hassaku* (八朔)や、*C. sinensis* (バレンシアオレンジ) と近縁のクレードに入ることが判明するなど、基原植物県別に使用可能な遺伝子領域が確定できていない。また陳久品からPCRの鋳型として使用できる品質のゲノムDNA調製法の確立が課題となっているが、ヘスペリジン生合成経路の鍵酵素であるカルコン合成酵素(CHS)の多型により基原植物種を鑑別できる可能性を示すデータが得られた。

F. 文献

(ゴシツ関連の文献)

Ref. 1) 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)

Ref. 2) 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)

Ref. 3) A DNA barcode for land plants. CBOL Plant Working Group. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **106**: 12794-12797 (2009)

Ref. 4) DNA分子マーカーと薬用植物への応用 [Review] DNA Molecular Marker and Its Applications in Medicinal Plants JI YL. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* **2008-04** (2008)

Ref. 5) [Review] Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes Ming LI, Hui CAO, Paul Pui-Hay BUT, Pang-Chui

SHAW.

Journal of Systematics and Evolution Special Issue: Plant DNA barcoding in China, **49**, 271-283 (2011)
DOI: 10.1111/j.1759-6831.2011.00132.x

Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences

(概要) 中国における薬用植物の遺伝子解析 (DNAバーコーディング) に関するレビュー。

Ref. 6) 薬用植物種識別の新規DNAバーコードとしてのITS2領域の検証

Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species.

Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, et al.

PLoS ONE **5**(1): e8613 (2010) doi:10.1371/journal.pone.0008613

本研究で解析された*Achyranthes bidentata* ITS2配列がDDBJに登録されている。

(*Achyranthes bidentata*: GQ436229)

Ref. 7) 核18S rDNA、葉緑体*rbcL*、*atpB*、そして*matK*配列に基づくナデシコ目植物の分子系統学

Molecular phylogenetics of *Caryophyllales* based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences

Cuenoud P, Savolainen V, Lars W, Chatrou LW, Powell M, Grayer RJ and Chase MW.

American Journal of Botany **89**, 132-144 (2002)

Ref. 8) DNA配列及びSNPsを用いた生薬として有用な植物の識別

Development of health enhancing and prophylactic drugs. Differentiation of plants useful as galenicals by DNA sequence and SNPs.

HISHIDA A. (National Inst. Health Sciences, JPN)

若手研究者奨励研究総合報告書平成13-15年度, 83-87 (2004)

(概要) *Rpl16-rpl14*領域の配列によって6種の*Achyranthes*属植物を識別することはできなかった。(遺伝子配列登録なし)

Ref. 9) *Achyranthes bidentata*根のリボソームDNA ITS配列の解析

Ribosomal rDNA ITS sequence analysis of root of *Achyranthes bidentata*.

Wang SM, Liang SW, Zhou KY, Liu ZQ, Feng WS, Wu MX.

Acta Pharmaceutica Sinica **35**, 559-562 (2004) (in Chinese)

DOI: CNKI:SUN:ZCYO.0.2004-05-035

(概要) ITS配列の変異により*A. bidentata*の根を他の種(*Cyathula officinalis* Kuan及*A. aspera*)と識別することが可能であった。

Ref. 10) Nested PCR及びDNAシーケンシング法による*Achyranthis Bidentatae Radix* (牛膝) と*Cyathulae Radix* (川牛膝) の識別

Discriminating between *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* in Chinese Medicine Preparations by Nested PCR and DNA Sequencing Methods.

Lu KT, Cheng HY, Lo CF, Chang HC, Lin JH.

Planta Med **73**, 1322-1326 (2007) DOI: 10.1055/s-2007-990219

(概要) 処方中のゴシツが、*Achyranthis Bidentatae Radix* (牛膝) であるか、*Cyathulae Radix* (川牛膝) であるか、nested PCR法で増幅したITS領域の配列で識別が可能であった。

登録塩基配列情報 (*Achyranthes bidentata*: DQ497186, *Cyathula officinalis*: DQ497187)

Ref. 11) RAPD法による中国と韓国の牛膝の薬用資源の遺伝的關係に関する研究

[Study on the genetic relationship between Chinese and Korean medicinal materials of niuxi by the method of RAPD].[Article in Chinese]

Zheng XZ, Guo BL, Yan YN.

Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. **27**, 421-423 (2002) PMID:12774630

(概要) 韓国で自殖栽培した*A. japonica*は*A. bidentata*に近縁であった。

G 研究発表

1. 学会発表

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、薬用植物総合情報データベースの構築－生薬の遺伝子鑑別に関する情報整備－、第 30 回日本植物細胞分子生物学会（生駒）大会・シンポジウム（2012年8月、奈良）

2. 論文発表

無し

H. 知的財産権の出願，登録状況

無し

I. 健康危険情報

無し

(図表) ゴシツの部

表1. 生薬ゴシツ 市場流通品モデル試料一覧

管理番号	生薬名	ロット番号	モデル試料提供時形態	産地	等級等	導入年月日	モデル試料入手年
NIB-0016	ゴシツ	43-4004	原形	中国河南省	特級去頭	30-Jun-10	2010
NIB-0079	ゴシツ	770064	刻み	中国河南省	栽培品「主に使用」	29-Jul-10	2008
NIB-0096	ゴシツ	10G016S-8	原形	中国河南省		21-Jul-10	2007
NIB-0120	ゴシツ		刻み	中国河南省	栽培品	21-Jul-10	2009
NIB-0152	ゴシツ	ロット8	刻み	中国河南省		19-Aug-10	2007
NIB-0189	ゴシツ	003710002	刻み	中国河南省		27-Aug-10	2009
NIB-0212	ゴシツ		原形	中国河南省		17-Nov-10	

表2. 遺伝子情報データベース検索結果

Accession	Origin	Region	Length
AY042534	<i>Achyranthes arborescens</i>	matK	824 bp
EF688734	<i>Achyranthes aspera</i>	trnL-trnF	1,054 bp
EF688661	<i>Achyranthes aspera</i>	rpl16	1,015 bp
AY270048	<i>Achyranthes aspera</i>	rbcL	1,343 bp
AY514815	<i>Achyranthes aspera</i>	trnK-matK	2,432 bp
HM850676	<i>Achyranthes aspera</i> var. <i>sicula</i>	matK	807 bp
HM849741	<i>Achyranthes aspera</i> var. <i>sicula</i>	rbcL	1,363 bp
GQ434275	<i>Achyranthes aspera</i>	matK	804 bp
GQ435413	<i>Achyranthes aspera</i>	psbA-trnH	477 bp
GQ435799	<i>Achyranthes aspera</i>	ycf5	379 bp
FJ572039	<i>Achyranthes bidentata</i>	ITS1-ITS2	692 bp
DQ813300	<i>Achyranthes bidentata</i>	ITS1-ITS2	778 bp
AB558157	<i>Achyranthes bidentata</i>	ITS1-ITS2	665 bp
DQ497186	<i>Achyranthes bidentata</i>	ITS1-ITS2	587 bp
GQ434786	<i>Achyranthes bidentata</i>	ITS2	199 bp
GQ435410	<i>Achyranthes bidentata</i>	psbA-trnH	445 bp
GQ436715	<i>Achyranthes bidentata</i>	rbcL	703 bp
GQ436229	<i>Achyranthes bidentata</i>	rpoC1	487 bp
AY174421	<i>Cyathula prostrata</i>	ITS2	348 bp
AY514862	<i>Cyathula achyranthoides</i>	trnK-matK	2,436 bp
DQ497187	<i>Cyathula officinalis</i>	ITS1-ITS2	591 bp
AB044410	<i>Strobilanthes forrestii</i>	ITS	252 bp

表3. ゴシツ及び*Achyranthes*属植物試料のPCR増幅、塩基配列解析状況（まとめ）

管理番号	生薬・検体名	検体ID	<i>rpl16-rpl14</i>	ITS1-2	ITS1	<i>atpF-atpA</i>
NIB-0016	ゴシツ	#1	OK	2 bands (C&S)	nt	OK
		#2	OK	OK	nt	OK
NIB-0079	ゴシツ	#1	OK	OK	nt	OK(re)
		#2	OK	OK	nt	OK
NIB-0096	ゴシツ	#1	NG	NG	NG	nt
		#2	NG	NG	NG	nt
		#1(gt)	nt	nt	NG(35)	nt
		#2(gt)	NG	nt	NG(35)	nt
		#3(gt)	NG	nt	non-spec	OK
		#4(gt)	NG	nt	NG	NG
		#5(gt)	OK	nt	OK	OK
		#6-1(gt)	NG(AD)	nt	nt	nt
#6-2(gt)	amb.(AD)	nt	2 bands (AD, C&S)	OK(35)(AD)		
NIB-0120	ゴシツ	#1	OK	OK	nt	OK
		#2	OK	OK	nt	OK
NIB-0152	ゴシツ	#1	NG	NG	OK(35)	nt
		#2	NG	NG	OK(35)	nt
		#1(gt)	OK(AD)	NG	OK(35)(AD)	OK(35)(AD)
		#2(gt)	OK(AD)	NG	OK(35)(AD)	OK(35)(AD)
NIB-0189	ゴシツ	#1	OK(C&S)	OK(C&S)	nt	OK
		#2	OK(C&S)	OK(C&S)	nt	OK
NIB-0212	ゴシツ	#1	NG	NG	NG	nt
		#2	OK	seq NG	OK	nt
		#1(gt)	NG	nt	NG(35)	NG
		#2(gt)	nt	nt	OK(35)	OK
		#3(gt)	NG	nt	OK	OK
		#4(gt)	OK	nt	OK	OK
#5(gt)	OK	nt	OK	OK		
Aa-V	<i>Achyranthes aspera</i>	#1	OK	OK(C&S)	OK	OK
	(葉)ベトナム	#2	amb.	OK(C&S)	nt	OK(35)
Ab-Std	局方試験用	#1	OK	OK	OK	OK
	トウゴシツ	#2	OK	OK	nt	OK
Af-Std	局方試験用	#1	OK	OK	nt	OK
	ヒナタイノコズチ	#2	OK	OK	nt	OK
Af-T	ヒナタイノコズチ	#1	OK(C&S)	OK(C&S)	nt	OK
	70°C、6日間乾燥	#2	OK(C&S)	OK(C&S)	nt	OK
Af	標本園ヒナタイノコズチ	#1	OK	OK	nt	OK
		#2	OK	OK	nt	OK
Ab	標本園トウゴシツ	#1	OK	OK	nt	OK
		#2	OK	OK	nt	OK

OK: Direct sequencing により塩基配列情報を取得。; OK(C&S): Cloning & sequencing により塩基配列情報を取得。; NG: PCRで増幅されなかった。; (gt): Genomic-tip精製のDNA。; amb.:配列不確定点あり。; (35):KOD-Plus-35 cycleで増幅（他は30 cycle）。; (AD): AmpDirectPlus+ NovaTaq, 40 cycleで増幅された。; nt: 未実施。