

表3 サイコスペクトルリスト (2)

8	18.51	348.2748 (6.60E6)	C18H38O5N ([M+NH4]+)	313.2373(15, C18H33O4), 277.2160(7, C18H29O2), 213.1480(65, C12H21O3), 195.1374(2.53E5; 100, C12H19O2)	18.51	329.2324 (5.93E7)	C18H33O5	311.2215(35, C18H31O4), 293.2110(30, C18H29O3), 229.1435(3.99E5; 100, C12H21O4), 211.1331(65, C12H19O3), 183.1385(5, C11H19O2)
9	18.6	927.5313 (1.35E7)	C48H79O17	909.5192(10, C48H77O16), 891.5093(10, C48H75O15), 781.4719(10, C42H69O13), 765.4779(30, C42H69O12), 747.4670(10, C42H67O11), 619.4202(5, C36H59O8), 603.4252(8, C36H59O7), 601.4093(15, C36H57O7), 585.4147(10, C36H57O6), 583.3989(12, C36H55O6), 471.1706(10, C18H31O14), 439.3569(25, C30H47O2), 421.3464(6.72E4; 100, C30H45O), 403.3360(15, C30H43), 309.1181(10, C12H21O9)	18.57	985.5370 (4.09E7)	C50H81O19 ([M+AcO]-)	925.5157([M-H]-, C48H77O17)
10	19.35	927.5317 (5.83E6)	C48H79O17	909.5189(15, C48H77O16), 891.5086(5, C48H75O15), 765.4774(10, C42H69O12), 747.4670(10, C42H67O11), 601.4094(10, C36H57O7), 471.1698(7, C18H31O14), 421.3465(4.12E4; 100, C30H45O), 403.3358(10, C30H43), 309.1180(10, C12H21O9)	19.33	985.5371 (1.89E7)	C50H81O19 ([M+AcO]-)	925.5147([M-H]-, C48H77O17)
11	21.08	781.4706 (2.67E7)	C42H69O13 Saikosaponin- a, b2	763.4622(30, C42H67O12), 745.4513(8, C42H65O11), 619.4199(5, C36H59O8), 601.4095(15, C36H57O7), 583.3990(5, C36H55O6), 455.3519(4.31E5; 100, C30H47O3), 437.3414(55, C30H45O2), 419.3308(15, C30H43O), 407.3310(10, C29H43O)	21.03	839.4792 (5.82E7)	C44H71O15 ([M+AcO]-)	779.4560 ([M-H]-, C42H67O13) 779 → 617.4029(9.62E6; 100, C36H57O8)
12	22.23	781.4707 (7.23E6)	C42H69O13	763.4626(20, C42H67O12), 745.4517(40, C42H65O11), 619.4200(10, C36H59O8), 601.4099(8, C36H57O7), 583.3988(10, C36H55O6), 455.3518(55, C30H47O3), 437.3414(1.14E5; 100, C30H45O2), 419.3308(15, C30H43O), 407.3310(8, C29H43O)	22.2	839.4792 (1.58E7)	C44H71O15 ([M+AcO]-)	779.4574 ([M-H]-, C42H67O13) 779 → 617.4029(9.62E6; 100, C36H57O8)

表3 サイコスペクトルリスト (3)

13	23.32	823.4814 (1.41E7)	C44H71O14	805.4725(80, C44H69O13), 787.4620(25, C44H67O12), 455.3518(55, C30H47O3, 437.3413(1.51E5; 100, C30H45O2), 419.3307(C30H43O)	23.29	881.4897 (2.68E7)	C46H73O16 ([M+AcO]-)	821.4678 ([M-H]-, C44H69O14)
14	24.19	781.4703 (2.50E6)	C42H69O13 Saikosaponin- d	763.4620(65, C42H67O12), 619.4201(7, C36H59O8), 601.4092(5, C36H57O7), 583.3987(5, C36H55O6), 473.3619(7, C30H49O4), 455.3517(1.70E5; 100, C30H47O3), 437.3413(20, C30H45O2), 425.3413(5, C29H45O2), 419.3308(15, C30H43O)	24.13	839.4778 (5.80E6)	C44H71O15 ([M+AcO]-)	

表4 ソヨウスペクトルリスト (1)

Positive				Negative			
保持時間 (min)	m/z (強度)	推定組成	Product Ions	保持時間 (min)	m/z (強度)	推定組成	Product Ions
11.22	655.1124 (3.55E6)	C27H27O19	479.0821(20, C21H19O13), 303.0499(1.13E6; 100, C15H11O7: -GlcUA)				
11.57	277.1915 (1.87E6)		259.0709(8,), 232.1327(40), 171.1373(15), 157.1329(15), 147.0434(2.60E5; 100, C9H7O2), 131.1536(35), 114.1272(25)				
11.76	327.1080 (6.24E6)	C15H19O8	309.0972(2.42E6; 100, C15H17O7), 165.0541(10, C9H9O3), 147.0435(45, C9H7O2)	11.06	325.0920 (2.27E7)	C15H17O8	265.0706(3.82E6; 100, C13H13O6), 235.0602(80, C12H11O5), 205.0499(15, C11H9O4), 163.0397(8, C9H7O3)
				11.62	325.0920 (1.30E7)	C15H17O8	265.0705(3.74E6; 100, C13H13O6), 235.0601(90, C12H11O5), 205.0498(15, C11H9O4), 163.0396(20, C9H7O3)
				11.84	481.0990 (1.70E7)	C21H21O13	463.0860(45, C21H19O12), 345.0811(4.17E5; 100, C14H17O10), 315.0709(50, C13H15O9)
11.97	697.1224 (1.19E6)	C29H29O20	521.0924(80, C23H21O14: -GlcUA), 345.0606(6.86E5; 100, C17H13O8: 521- GlcUA), 299.0550(20, C16H11O6)				
12.13	483.1127 (6.25E6)	C21H23O13	321.0604(40, C15H13O8), 167.0332(5.63E5; 100, C8H7O4), 155.0332(40, C7H7O4), 137.0227(10, C7H5O3)				
12.28	327.1079 (7.95E6)	C15H19O8	309.0972(1.09E6; 100, C15H17O7), 165.0540(10, C9H9O3), 147.0434(45, C9H7O2)	11.94	325.0920 (1.30E7)	C15H17O8	265.0705(3.74E6; 100, C13H13O6), 235.0601(90, C12H11O5), 205.0498(15, C11H9O4), 163.0396(20, C9H7O3)
12.35	595.1647 (6.42E6)	C27H31O15	577.1555(1.27E6; 100, C27H29O14), 559.1451(25, C27H27O13), 529.1342(20, C26H25O12), 475.1235(15, C23H23O11), 457.1130(C23H21O10)				
12.38	639.1180 (1.51E7)	C27H27O18	463.0871(25, C21H19O12: -GlcUA), 287.0550(1.73E6; 100, C15H11O6: 463-GlcUA)	11.98	637.1062 (7.10E7)	C27H25O18	351.0555(2.09E7; 100, C12H15O12), 285.0394(30, C15H9O6)
12.58	639.1180 (4.53E7)	C27H27O18	463.0872(25, C21H19O12: -GlcUA), 287.0551(1.24E7; 100, C15H11O6: 463-GlcUA)	12.29	637.1063 (9.98E7)	C27H25O18	351.0554(2.45E7; 100, C12H15O12), 285.0393(30, C15H9O6)

表4 ソヨウスペクトルリスト (2)

				12.78	354.1187 (4.81E7)	C16H20O8N	294.0970(7.55E6; 100, C14H16O6N), 188.0557(90, C7H10O5N), 161.0450(98, C6H9O5)
13.04	387.2017 (5.35E6)	C19H31O8	369.1908(30, C19H29O7), 225.1480(10, C13H21O3), 207.1374(7.44E5; 100, C13H19O2), 189.1268(15, C13H17O), 149.0954(10, C10H13)				
13.44	479.0815 (1.07E7)	C21H19O13	303.0500(5.54E6; 100, C15H11O7: -GlcUA)	13.18	477.0674 (9.92E6)	C21H17O13	397.0546(10, C20H13O9), 373.0547(15, C18H13O9), 343.0443(10, C17H11O8), 301.0340(1.57E6; 100, C15H9O7: -GlcUA)
				13.37	621.1087 (3.97E7)	C27H25O17	
13.56	625.1384 (2.82E6)	C27H29O17	463.0871(9.09E5; 100, C21H19O12: -Glc), 287.0549(90, C15H11O6: 463-GlcUA)				
13.86	623.1233 (3.87E7)	C27H27O17)	447.0924(50, C21H19O11: -GlcUA), 271.0600(6.21E6; 100, C15H11O5: 447-GlcUA)	13.52	621.1116 (6.46E7)	C27H25O17	487.0859(5, C23H19O12), 351.0554(2.70E6; 100, C12H15O12), 269.0445(3, C15H9O5)
13.95	775.2049 (2.28E6)	C36H39O19	757.1990(4.68E5; 100, C36H37O18), 613.1559(30, C30H29O14: -Glc), 595.1452(45, C30H27O13), 467.1185(10, C21H23O12), 305.0656(20, C15H13O7: 467-Glc)	13.85	773.1972 (5.45E6)	C36H37H19	663.1525(7), 611.1370(5.69E5; 100, C30H27O14: -Glc), 593.1272(15, C30H25O13), 501.1014(30, C24H21O12), 465.1019(20, C21H21O12), 447.0914(10, C21H19O11), 303.0498(7, C15H11O7), 285.0393(20, C15H9O6: 447-Glc), 267.0288(10, C15H7O5)
14.1	449.1076 (1.19E7) LuteolinGlc	C21H21O11	287.0551(5.68E6; 100, C15H11O6: -Glc)	13.97	447.0933 (1.04E7)	C21H19O11	285.0392(3.42E6; 100, C15H9O6: -Glc)
14.19	465.1022 (3.64E6)	C21H21O12	303.0499(1.16E6; 100, C15H11O7: -Glc)	14.08	463.0870 (4.35E6)	C21H19O12	301.0341(1.11E6; 100, C15H9O7: -Glc)
				14.12	773.1968 (6.55E6)	C36H37H19	663.1525(15), 611.1371(1.74E6; 100, C30H27O14: -Glc), 593.1273(20, C30H25O13), 501.1014(35, C24H21O12), 465.1019(15, C21H21O12), 447.0914(10, C21H19O11), 303.0499(5, C15H11O7), 285.0394(15, C15H9O6: 447-Glc), 267.0288(10, C15H7O5)
14.31	757.1945 (8.91E6) Shisonin	C36H37O18	595.1454(7.55E6; 100, C30H27O13: -Glc), 449.1080(10, C21H21O11), 287.0550(30, C15H11O6: 449-Glc)				

表4 ソヨウスペクトルリスト (3)

14.86	463.0871 (3.19E7) LuteolinGlcUA	C21H19O12	287.0553(2.65E6; 100, C15H11O6: -GlcUA)	14.69	461.0711 (4.74E7)	C21H17O12	285.0391(2.65E6; 100, C15H9O6: -GlcUA)
15.38	665.1691 (1.73E6)	C30H33O17	629.1512(5, C30H29O15), 503.1185(20, C24H23O12: -Glc), 471.1497(40, C21H27O12), 453.1392(10, C21H25O11), 357.0817(10, C15H17O10), 309.0968(1.89E5; 100, C15H17O7: 471-Glc), 291.0862(10, C15H15O6)	15.37	663.1589 (4.64E6)	C30H31O17	501.1014(3.02E6; 100, C24H21O12: -Glc)
15.7				15.6	359.0765, 2- (2.12E7)	C36H30O16	539.1167(15, C27H23O12), 519.0907(30, C27H19O11), 223.0238(10, C10H7O6), 197.0447(45, C9H9O5), 179.0343(30, C9H7O4), 161.0239(8.19E5; 100, C9H5O3), 135.0447(15, C8H7O2)
	721.1738 (2.37E6)	C36H33O16	703.1675(10, C36H31O15), 611.1398(15, C30H27O14), 523.1237(9.61E4; 100, C27H23O11), 505.1128(20, C27H21O10), 413.0869(15, C21H17O9), 343.0812(30, C18H15O7)		719.1644 (1-)	C36H31O16	539.1168(40, C27H23O12), 521.1068(20, C27H21O11), 495.1276(C26H23O10), 359.0757(5.37E5; 100), 341.0653(20, C18H13O7),
				15.87	449.2030 (1.85E7)	C20H3311	431.1903(3, C20H31O10), 287.1487(3, C14H23O6), 269.1382(3.40E6; 100, C14H21O5: -GlcOH), 251.1278(7, C14H19O4), 209.1174(10, C12H7O3)
				16.23	355.1390 (2.85E7)	C17H23O8	179.0555(7.23E4; 100, C6H11O6), 161.0452(15, C6H9O5)
16.24	197.1174 (1.14E7)	C11H17O3	179.1064(5.82E6; 100, C11H15O2), 161.0957(25, C11H13O), 135.1163(65, C10H15), 107.0851(10, C8H11)				
16.34	317.1025 (1.22E6)	C17H17O6	197.0440(1.09E6; 100, C9H9O5)				
16.37	195.1019 (2.05E6)	C11H15O3	177.0905(3.66E5; 100, C11H13O2), 159.0798(40, C11H11O), 117.0694(65, C9H9)				
16.55	447.0923 (1.08E7)	C21H19O11	271.0602(3.71E6; 100, C15H11O5: -GlcUA)				

表4 ソヨウスペクトルリスト (4)

16.71	361.0921 (1.28E7)	C18H17O8	163.0384(1.35E6; 100, C9H7O3)	16.48	359.0764 (1.33E8)	C18H15O8	223.0238(15, C10H7O6), 197.0448(45, C9H9O5), 179.0344(35, C9H7O4), 161.0239(1.51E7; 100, C9H5O3)
	163.0388	C9H7O3	163(45), 145.0279(2.31E6; 100, C9H5O2), 135.0435(15, C8H7O2), 117.0331(10, C8H5O)				
				16.79	569.2612 (9.48E6)	C28H41O12	387.1643(2.86E6; 100, C18H27O9), 369.1541(7, C18H25O8)
				16.83	429.2128 (9.12E6)	C21H33O9	369.1902(2.15E5; 100, C19H29O7), 269.0444(15, C15H9O5), 179.0555(95, C6H11O6), 161.0451(15, C6H9O5), 143.0346(10, C6H7O4)
				17.41	187.0968 (2.30E7)	C9H15O4	125.0968(2.97E6; 100, C8H13O)
17.88	195.1381 (2.48E6)	C12H19O2	177.1268(50, C12H17O), 135.1162(7.43E5; 100, C10H15)				
17.88	220.1804,2+ (5.13E6)		422.3262(3, C25H44O4N), 300.2168(3.59E5; 100, C16H30O4N), 203.1424(10, C14H19O), 158.9957(15), 123.1162(20, C9H15)				
	439.3526 (1+)	C25H47O4N2					
				17.89	181.0861 (1.07E7)	C10H13O3	181(8.82E5; 100), 137.0970 (90, C9H13O)
					373.1862 (1.66E7)	C18H29O8	211.1331(1.14E6; 100, C12H19O3: -Glc), 193.1228(40, C12H17O2)
				18.9	179.0704 (1.79E7)	C10H11O3	179(2.91E5; 100), 151.0761(30, C9H11O2), 135.0812(80, C9H11O9), 133.0659(3, C9H9O)
				19.35	193.0860 (2.15E7)	C11H13O3	193(1.30E6; 100), 133.0658(3, C9H9O)
19.84	287.0556 (9.29E6) Luteolin	C15H11O6	287(45), 269.0440(10, C15H9O5), 241.0491(15, C14H9O4), 183.0282(1.14E5; 100, C8H7O5), 153.0175(85, C7H5O4)	19.85	285.0395 (1.72E7)	C15H9O6	285(6.74E5; 100), 241.0497(20, C14H9O4), 217.0498(15, C12H9O4), 199.0394(15, C12H7O3), 175.0396(12, C10H7O3)
20.8	301.1078 (2.69E7)	C17H17O5	197.0439(3.57E6; 100, C9H9O5)				
				21.1	373.1861 (5.49E7)	C18H29O8	313.1642(7.32E6; 100, C16H25O6)

表4 ソヨウスペクトルリスト (5)

21.12	824.3983, 2+ (2.75E6)		1385.7089(15), 1314.6725(80), 1274.5896(4.59E5; 100), 1144.5667(13), 934.4299(30), 757.8795(15), 714.3666(30), 693.8597(10), 658.3415(10), 374.2076(50), 334.1247(25)				
				21.27	369.1549 (2.32E7)	C18H25O8	237.1486(8.13E3; 100, C14H21O3)
				21.42	371.1706 (1.34E7)	C18H27O8	239.1642(3.32E6; 100, C14H23O3)
22.02	271.0606 (2.97E6) Apigenin	C15H11O5	271(7.89E4; 100), 153.0176(98, C7H5O4)	22.06	269.0445 (3.41E6)	C15H9O5	269(6.01E5; 100), 225.0547(35, C14H9O3), 201.0549(7, C12H9O3)
				22.44	375.2018 (2.53E7)	C18H31O8	315.1799(1.27E6; 100, C16H27O6)
				23.47	327.2169 (3.22E7)	C18H31O5	309.2058(30, C18H29O5), 291.1954(70, C18H27O3), 239.1278(20, C13H19O4), 229.1436(2.65E5; 100, C12H21O4), 211.1331(60, C12H19O3), 171.1022(50, C9H15O3)

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 成分分析データ、遺伝子鑑別情報及び成分分析情報に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部部長 合田 幸広

生薬、ハンゲの遺伝子情報について

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

国内の市場に流通するハンゲの遺伝子情報の整備を目的に、塩基配列解析を行った。類似生薬であるテンナンショウとの鑑別用途のために、葉緑体 DNA の *trnL-trnF* IGS 領域を、*Pinellia* 属植物内及び種内の系統分類のために、核 rDNA の ITS1 領域を標的配列に選定し、解析を行った。その結果、前者の領域の解析により *Arisaema* 属植物との鑑別が可能であった。一方、後者の領域の解析結果からは、*P. yaoluopingensis* を基原とする試料が多数を占めていることを示唆する結果が得られた。この点については、現地調査を行うなど、慎重な確認作業が必要である。

A. 研究目的

「漢方薬に使用される薬用植物の総合データベース」のコンテンツの一つとして、生薬、ハンゲの遺伝子情報の整備を目的とした。

ハンゲは、鎮咳去痰薬に分類される生薬の一つであり、主な薬理活性として嘔吐抑制作用が知られている。また、一般用漢方処方承認審査基準に記載される漢方処方の約 20% に配合される重要生薬である。

第十六改正日本薬局方では、カラスビシャク *Pinellia ternata breitenbach* のコルク層を除いた塊茎であると定義されている。一方、ハンゲと外観が良く似た類似生薬としてテンナンショウがあり、日本薬局方外生薬規格 2012 では、このものの基原は、ハンゲと同じサトイモ科のマイヅルテンナンショウ *Arisaema heterophyllum* Blume, *A. erubescens* schot 又は *A. amurense* Maximowicz であると規定されている。

ハンゲとテンナンショウは、外観及び理化学試験による鑑別が難しく、両者はしばしば互いに混入する。このため、日本薬局方では、ハンゲの *Arisaema* 属植物に対する純度試験として鏡検による粘液道の確認を規定しているが、コルク層とともに周皮が除かれている場合が多く、実効性に乏しい。従って、現行のものに代わる純度試験法の設計が望まれている。

そこで本研究では、ハンゲの遺伝子情報の整備とともに、*Arisaema* 属植物との鑑別も目的の一つとした。

Arisaema 属は、大きな属であり、中国に分布する種だけでも、80 種近くに及ぶ。従って、遺伝子情報によるハンゲとテンナンショウの鑑別を考えると、それらの種、全ての配列情報を揃えるのは、極めて難しい。一方、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) には、Sasamura らが、非常に多種の *Arisaema* 属植物の

葉緑体 DNA の *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列情報を登録している。このため、本研究では、ハンゲとテンナンショウの鑑別のための標的配列として上記の遺伝子領域を選択するとともに、カラスビシャク内の種内変異を調べるための標的配列として、核 rDNA の ITS1 領域を選択した。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された試料の詳細を Table 1 にまとめた。これらの試料は、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。

2. 実験方法

2-1. 核酸調製

各試料を、MM-300 (Qiagen) により粉砕し、試料の粉末、約 10 mg を TE buffer 200 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit (Promega) に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16 Instrument (Promega) により、genomic DNA を抽出、精製した。

2-2. 塩基配列解析

2-1. で調製された genomic DNA を鋳型とし、植物の核 rDNA 領域あるいは、葉緑体 DNA の *trnL* 3'-exon 及び *trnF* 領域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 ITS1 領域あるいは、葉緑体 DNA の *trnL-trnF* IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、Ampdirect plus (Shimadzu) 及び BIOTAQ HS DNA polymerase (Bioline) を用いて、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 30 sec, 72°C 30 sec, 40 cycle; 72°C 7 min. 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リ化は、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配列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

C. 結果

1. *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析

医薬基盤研究所より提供を受けた 21 検体の内、HaKw-9, -13 を除く 19 検体から PCR 産物が得られ、塩基配列解析が可能であった。解析結果を Table 2 及び Fig. 1 に示した。

本領域の全長は、全ての検体で 413 bp だった。内部配列は、HaKw-6, -7, -11 を除いて全て同一の配列を示した。また、HaKw-11 も一塩基の違いのみであった。HaKw-1, -6, -7 の配列を Blast search program による相同性検索に供したところ、HaKw-1 の配列は、*P. ternata* 及び *P. yaoluopingensis* の配列 (AY248968, AF469020, AF469023) と完全に一致した。HaKw-6, -7 の配列も、上記 2 種の配列と最も高い相同性を示したが、その相同性は、98% だった。また、*Arisaema* 属植物各種との比較では、42 番目の塩基の挿入/欠失によって明確に区別された。

2. ITS1 領域の塩基配列解析

実験に用いた 21 検体の内、HaKw-8, -9, -13 を除く 18 検体で PCR 産物が得られ、塩基配列解析が可能だった。解析結果を Table 3 及び Fig. 2 にまとめた。

ITS1 領域の全長は、HaKw-14, -15 の 2 検体で 272 bp だった他は、全て 270 bp だった。また、その内部配列においても、HaKw-14, -15 が、他の検体とやや異なる配列を示した。この 2 検体は、いずれも北朝鮮産であった。一方、HaKw-3, -7 の配列は、複数の塩基が重なる箇所が、他の配列よりも多く見られ、この塩基の重なりは、HaKw-14, -15 を除く他の配列と HaKw-14, -15 の配列の雑種を想定することで説明がつくパターンを示していた。HaKw-1, -14, -15 の配列を *trnL-trnF* IGS 領域と同様に相同性検索に供したところ、HaKw-1

の配列は、*P. yaoluopingensis* の配列 (Acc. no.: AF469038) と完全に一致し、*P. ternata* の配列 (AF469036) とは、96% の相同性であった。HaKw-14, -15 は、上記の配列と 96% 及び 94% (HaKw-14), 93% (HaKw-15) の相同性を示し、一致する配列は見られなかった。

D. 考察

今回、*trnL-trnF* IGS 領域で 2 検体、(HaKw-9, -13) ITS1 領域で 3 検体 (HaKw-8, -9, -13) から PCR 産物が得られず、塩基配列解析が不可能だった。他の多くの試料の付帯情報には、「無流 (「無硫」の意と推定)」の記載があり、試料の漂白等を目的とした硫黄燻蒸が施されていないことが示されている。一方、PCR 産物が得られなかった上記の検体には、「無流」の記載が無く、逆説的に考えるとこれらの試料は、硫黄燻蒸により、DNA がより断片化していたことが推察される。同様の事象は、博物館などにおいて、各種標本の消毒のためのエチレンガス処理により、DNA が断片化することが知られている。

葉緑体 DNA の *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析では、各検体間の変異が少なく、多くの検体が同一の配列を示した。これらの配列は、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) 上の *P. ternata*, *P. yaoluopingensis* の配列と同一の配列を有し、*Arisaema* 属植物由来の配列とは明確に区別された。従って、本領域の解析目的である *Arisaema* 属植物との鑑別には有用であったが、*P. ternata* と *P. yaoluopingensis* との区別が不可能だった。

一方、ITS1 領域の塩基配列では、上記データベース上の配列を比較する限りにおいては、*P. ternata* と *P. yaoluopingensis* の区別が可能であり、今回の解析結果からは、HaKw-3, -7, -14, -15 の 4 検体を除き、いずれも *P. yaoluopingensis* 型の塩基

配列を示した (genotype A in Table 2)。同種は、安徽省、江蘇省などに分布し、*P. ternata* が、葉柄の基部に小瘤のある塊茎 (いわゆる、「むかご」) を有するのに対し、本種は、上記の特徴を有さない点で別種とされている。本研究結果とデータベース上のデータのみからは、現在の国内市場に流通するハンゲの基原の大部分は、*P. yaoluopingensis* ということになるが、この点については、*P. ternata*, *P. yaoluopingensis* 両種の種内変異の範囲に関する情報が不足しているため、今後更に検討が必要である。

また、北朝鮮産の 3 検体 (HaKw-11, -14, -15) の内、HaKw-14, -15 は、他の検体と異質の配列 (genotype B in Table 2) を示した。また、甘粛省産の 2 検体 (HaKw-3, -7) では、上記の *P. yaoluopingensis* 型の配列と HaKw-14, -15 型の配列の雑種と思われる混合配列が見出された。HaKw-14, -15 の配列を持つ試料の基原植物とその分布域に興味を持たれる。

E. 結論

国内に流通するハンゲの基原植物は、日本薬局方が規定する *P. ternata* とは異なり、*P. yaoluopingensis* である可能性を示す結果が得られた。しかし、標準植物試料の情報が不足しているため、拙速な結論は避け、今後、慎重に確認すべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1 Details of the commercial *Pinellia* Tubers used in this study.

sample no.	voucher no.	Habitat	collection year	description
HaKw-1	NIB-0251	甘肅省	unknown	
HaKw-2	NIB-0330	甘肅省	2011	乙丙級，無流 99-4369
HaKw-3	NIB-0331	甘肅省	2010	乙丙級，無流 99-4165
HaKw-4	NIB-0332	四川省	2010	乙級，無流 99-4363
HaKw-5	NIB-0333	甘肅省	2009	乙丙級，無流 99-3935
HaKw-6	NIB-0334	甘肅省	2009	甲級，無流 99-3827
HaKw-7	NIB-0335	甘肅省	2008	乙丙級，無流 99-3703
HaKw-8	NIB-0336	四川省	2008	乙級，99-3578
HaKw-9	NIB-0337	四川省	2007	乙級，99-3451
HaKw-10	NIB-0338	貴州省	2007	丙級，無流 99-3306
HaKw-11	NIB-0339	北朝鮮	2006	99-3251
HaKw-12	NIB-0340	甘肅省	2005	丙級，無流 99-3020
HaKw-13	NIB-0341	湖北省	2002	丙級，99-2238
HaKw-14	NIB-0342	北朝鮮	1998	
HaKw-15	NIB-0343	北朝鮮	2000	
HaKw-16	NIB-0430	甘肅省	2009	丙級
HaKw-17	NIB-0431	四川省	2009	乙級
HaKw-18	NIB-0443	貴州省	2011	
HaKw-19	NIB-0444	貴州省	2011	
HaKw-20	NIB-0644	四川省	2011	
HaKw-21	NIB-0735	湖北省	unknown	

Table 2 *trnL-trnF* IGS sequences found in the commercial *Pinellia* Tubers.

Sample no.	Aligned position																					Genotype					
	10	24	28	46	48	49	53	54	59	60	64	68	71	89	106	134	146	166	208	247	254		255	256	257	261	
HaKw-1	T	C	T	A	G	G	G	C	-	-	T	T	C	T	C	T	G	C	A	T	C	G	-	-	C	A	
HaKw-2	Y	A
HaKw-3	S	K	Y	Y	.	.	.	S	M	AB	
HaKw-4	Y	K	A	
HaKw-5	A	
HaKw-6	T	Y	A	
HaKw-7	S	K	Y	Y	.	.	.	S	M	AB	
HaKw-10	Y	.	.	M	Y	A	
HaKw-11	Y	A	
HaKw-12	.	.	.	M	Y	A	
HaKw-14	.	A	C	.	C	T	.	.	C	T	G	.	T	.	.	.	C	A	B	
HaKw-15	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.	G	.	T	.	.	.	S	.	R	.	T	T	G	T	.	B	
HaKw-16	.	.	.	M	A	
HaKw-17	G	A	
HaKw-18	.	.	.	M	A	
HaKw-19	.	.	.	M	A	
HaKw-20	.	.	.	M	Y	A	
HaKw-21	Y	A	

Table 3 ITS1 sequences found in the commercial Pinellia Tubers.

Sample no.	Aligned position												
	20	44	52	100	138	143	145	171	178	193	284	298	395
HaKw-1	C	C	T	C	C	C	C	C	G	C	G	T	G
HaKw-2
HaKw-3
HaKw-4
HaKw-5
HaKw-6	T	T	.	T	T	T	T	T	.	T	.	.	.
HaKw-7	.	.	C	A	.	R	.	R
HaKw-8
HaKw-10
HaKw-11	A	.
HaKw-12
HaKw-14
HaKw-15
HaKw-16
HaKw-17
HaKw-18
HaKw-19
HaKw-20
HaKw-21

HaKw-1	C A A A A A A A C C A T T T G A C C T C C T A A G T A T T T T T C C T C C T T T	40
HaKw-6 T	40
HaKw-7	40
HaKw-1	C C G C C G G T G A C T C A A A A T T C A C T A T G T T T T C C A T T T A C T C	80
HaKw-6	. . . T	80
HaKw-7 C	80
HaKw-1	T A T T C T T T C A C A A A A A G A T C C G A G C G T T T T A T G C T T A G T T	120
HaKw-6 T	120
HaKw-7	120
HaKw-1	T A G C A C A A G T T T T T G T G C A A T A C A C G T A C A A G A A A A T A T A	160
HaKw-6 T . . . T . T	160
HaKw-7	160
HaKw-1	T G T A C A A A G G C T C T C G A G T A T T G A A T T T T T C A C T A T T C A C	200
HaKw-6 T T	200
HaKw-7 A	200
HaKw-1	A A T C T A T A T T G T T T T G T T A G G T T A T C C T T A C A C T T A T A A A	240
HaKw-6	240
HaKw-7	240
HaKw-1	T A T C A A A A A A T C T T C C T T T T T T A A G A C C A A A A A A T T T C	280
HaKw-6	280
HaKw-7	280
HaKw-1	A G G G A T T A G G T A A G G G T T T T A A A A C C T T T T G T C C T T T T A A	320
HaKw-6	320
HaKw-7	. . . R	320
HaKw-1	T A G A C A T A A A C A C A A G C A A G T C C C T A G T A A G A T A A G G C A A	360
HaKw-6	360
HaKw-7	360
HaKw-1	T G C A T G G A A A A T G G T C G G G A T A G C T C A G T T G G T A G A G C A G	400
HaKw-6	400
HaKw-7 R	400
HaKw-1	A G G A C T G A A A A T C	413
HaKw-6	413
HaKw-7	413

Fig. 1 *trnL-trnF* IGS sequence alignment for the commercial Pinellia Tubers

HaKw-1	T C G A C A C A C T C G C G A A C G G T T G A C C C C T C A C C A T A T C T A T	40
HaKw-3	40
HaKw-14 A . . . C	40
HaKw-15 C	40
HaKw-1	C C C G G A G G G G G T G C G G C T - - A C A T C C C T T C C C A C T C T G G G	78
HaKw-3 S - - . . . K . . . Y . . . Y	78
HaKw-14 C T C T . . . G T	80
HaKw-15 C C - - . . . G T	78
HaKw-1	A T A A A T A T T T T C C C C G C C T C C G A C G C G T C C G G C C G A C G G G	118
HaKw-3	118
HaKw-14	120
HaKw-15	118
HaKw-1	A G A C T C C C G A C G A T C G C A C C G T G G G G C G G C G G A C G A C G A	158
HaKw-3 S	158
HaKw-14 C	160
HaKw-15 S	158
HaKw-1	A C C C T C C C G G C G C G G C A T G C G C C A A G G A A C A C G T C A A G T G	198
HaKw-3 M	198
HaKw-14 A	200
HaKw-15	198
HaKw-1	A C G G C C C A C G T G A T C C A T C C G T C C G T G C G G C G G A G G C A C G	238
HaKw-3	238
HaKw-14	240
HaKw-15 R	238
HaKw-1	C G G T G C T C A T C A C C G - - A T A C G A A A C G A G T C T C G	270
HaKw-3 - -	270
HaKw-14 - -	272
HaKw-15 T T G T	272

Fig. 2 ITS1 sequence alignment for the commercial Pinellia Tubers

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 成分分析データ、遺伝子鑑別情報及び漢方処方関連情報に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部部長 合田 幸広

生薬、カッコンの遺伝子情報について

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

国内に流通する生薬、カッコンの遺伝子情報を整備する事を目的に、核 rDNA ITS2 領域の塩基配列解析及び 5S rDNA の IGS 領域の塩基配列長の違いを利用したジェノタイピング解析を行った。その結果、前者の遺伝子情報は、検体間における配列のバラツキが小さく、また、多コピー遺伝子であるため、PCR 増幅も容易であり、本生薬の基原種鑑別に有用であると思われた。後者の解析からは、粉葛根の基原植物である *Pueraria thomsonii* と *P. lobata* の雑種が流通している可能性を示唆する結果が得られ、今後の調査が必要であると思われた。また、同解析はカッコンの基原植物の系統解析に有用であると思われる。

A. 研究目的

「漢方薬に使用される薬用植物の総合データベース」のコンテンツの一つとして、生薬、カッコンの遺伝子情報の整備を目的とした。

カッコンは、代表的な辛涼發表薬の一つであり、主に感冒治療を目標としたものを中心に幅広い漢方処方に汎用される。第十六改正日本薬局方では、クズ *Pueraria lobata* Ohwi の周皮を取り除いた根であると定義されている。一方、カッコンは、中国薬典にも収載されており、同じく *P. lobata* の根と規定されている。また、中国薬典には、他に同属の *P. thomsonii* Benth. を基原とする粉葛も収載されている。他の類似植物としては、*P. montana* Merr. があるが、*P. thomsonii* や *P. montana* は、*P. lobata* に比べ、イソフラボン類の含量が低いことが知られており、現在、日本薬局方において、TLC 法によるプエラリンの確認試験及び HPLC 法による同化合物の定量を規定することにより、これ

らの植物の混入を防止している。

これらの同属植物群との遺伝子鑑別に関する研究は、Sun らが、核 rDNA の ITS 領域及び 5S rDNA の IGS 領域を用いた鑑別を報告しているが、研究に供した材料の数が少なく、種内変異に関する情報が不十分であることから、真偽の程度は不明である。

そこで本研究では、国内市場に流通するカッコンの遺伝子情報の整備と上記の研究の真偽を確認するため、核 rDNA の ITS 領域の配列解析を行うとともに、5S rDNA の IGS 領域の塩基配列長の違いを利用したジェノタイピングを行った。ただし、ITS 領域の配列解析においては、ITS1 領域に guanine のホモポリマーが存在し、ダイレクトシーケンスによる配列解析が困難であったことから、ITS2 領域に限定して解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された試料の詳細及び 5S rDNA IGS 領域における遺伝子型を Table 1 にまとめた。これらの試料は、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。

2. 実験方法

2-1. 核酸調製

各試料を、MM-300 (Qiagen) により粉砕し、試料の粉末、約 10 mg を TE buffer 200 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit (Promega) に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16 Instrument (Promega) により、genomic DNA を抽出、精製した。

2-2. ITS2 領域の塩基配列解析

2-1. で調製された genomic DNA を鋳型とし、植物の核 rDNA 領域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 30 sec, 68°C 30 sec, 40 cycle; 68°C 2 min. 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。得られた塩基配列の多重配列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

2-3. 5S rDNA 領域のジェノタイピング

Sun らが報告している *P. lobata*, *P. thomsonii*, *P. montana* の 5S rDNA の IGS 領域の塩基配列の多重配列解析を行い、各配列間に塩基の挿入/欠失が認められる部位を含む領域を増幅するプライ

マーを下記の通り、設計した。Pue-5S-S1, 5'-GGA AGT CCT CGT GTT GCA C-3'; Pue-5S-AS1, 5'-CAC GGG GCC CACAATAC-3'。2-1. で調製された genomic DNA を鋳型とし、上記のプライマー対を用いて PCR を行うことにより、目的とする 5S rDNA の IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、Ampdirect plus (Shimadzu) 及び BIOTAQ HS DNA polymerase (Bioline) を用いて、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, 58°C 30 sec, 72°C 30 sec, 40 cycle; 72°C 7 min.

マイクロチップ電気泳動装置、MCE-202 (Shimadzu) により、目的の DNA 断片が増幅されていることを確認した後、Pue-5S-S1 プライマーの 5' 位に蛍光色素である FAM を標識した新規プライマーを設計し、上記と同じ条件で PCR を行い、増幅産物を 30 倍に希釈した後、サイズスタンダードと混和し、ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) による microsatellite 解析に供した。得られた electropherogram は、GeneMapper (Applied Biosystems) により解析を行った。

C. 結果

1. ITS2 領域の塩基配列解析

医薬基盤研究所より提供を受けた 25 検体の内、PuKw-17, -18, -20, -21 を除く 21 検体で PCR 産物が得られ、塩基配列解析が可能だった。解析結果を Table 2 及び Fig. 1 にまとめた。

ITS2 領域の全長は、全ての検体で 242 bp だった。内部配列中、変異が見られた箇所は、117 番目と 240 番目の 2 箇所のみであり、117 番目の塩基は、cytosine, guanine あるいは両塩基の混ざりだった。240 番目の塩基は、guanine, thymine あるいは両塩基の混ざりだった。国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) に登録されている *P. lobata* の配列では、117 番目の塩基は、cytosine あるいは thymine であり、guanine のものは無かった。一方、240 番目の塩基については、Fig. 1 に示す通り、guanine, thymine 双方の配列が

既に INSD に登録されていた。

2. 5S rDNA の IGS 領域のジェノタイピング

蛍光標識されていないプライマー対で行った PCR の電気泳動結果から、PuKw-20, -21 を除く 23 検体で PCR 産物が得られたことから、これらについて、ジェノタイピング解析を行った。その結果を Table 1 に示すとともに、electropherogram を Fig. 2 に示した。また、Sun らが報告している 5S rDNA の IGS 領域の配列に基づく、各遺伝子型の帰属は、Fig. 3 に示した。Fig. 2 において、単一の遺伝子型に複数の配列長が検出されているのは、同一の遺伝子型に帰属した配列の中にも少数の塩基の挿入／欠失を含んでいること、PCR 増幅に使用した Taq DNA polymerase が持つ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 活性による塩基の付加が起こったものとそうでないものが共存していることに起因していると思われる。

解析した 23 検体からは、Sun らが、*P. montana* 由来の配列として報告している genotype E を除く、全ての遺伝子型が見出され、その他に、未同定の genotype X が 3 検体で認められた。Genotype X については、今後、サブクローニングにより内部配列を決定する必要がある。Genotype A は、PuKw-5, -7, -9, -15 の 4 検体で検出され、そのいずれもが、微量の genotype D のピークを伴っていた。Genotype B は、最も多い 18 検体で検出され、この内、PuKw-2, -3, -10, -11, -14, -25 の 6 検体では、genotype B のみからなるホモ体、PuKw-4, -6, -12, -13, -16, -17, -19, -23 の 8 検体では、genotype B と genotype C からなるヘテロ体であった。Genotype C は、genotype B に次いで多い 11 検体で認められ、この内、PuKw-8, -24 の 2 検体が genotype C のみからなるホモ体であった。Genotype D は、韓国産の PuKw-22 の 1 検体で認められた他、上記の通り、genotype A が検出された 4 検体でマイナーピークとして検出された。

D. 考察

ITS2 領域の塩基配列解析の結果からは、今回

解析を行った試料は、全て日本薬局方が定める通り、*P. lobata* を基原としていると推定された。しかし、本研究では、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定しているため、多コピーからなる rDNA のマイナー配列を検出出来ていない可能性もある。このような事象は、他の研究において、自身が経験している。

一方、5S rDNA の IGS 領域の塩基配列長の違いに基づくジェノタイピング解析では、解析可能だった 23 検体より計 5 つの遺伝子型が見出された。各遺伝子型が見出された検体の産地分布を Fig. 4 に示した。本研究では、Sun らが、*P. thomsonii* 特異的遺伝子型として報告している genotype A を持つものが 4 検体で見出された。前述の通り、Sun らの報告は、検討検体数が不十分なため、今回の結果のみをもって、局方不適合である *P. thomsonii* の遺伝子を持つものが流通していると結論付けるのは拙速である。しかしながら、genotype A が見出された検体の産地は、3 検体が湖北省、1 検体が四川省であり、これらの地域は、ちょうど、*P. lobata* と *P. thomsonii* の分布域が重なる地点であることから、*P. thomsonii* と *P. lobata* の雑種が分布する可能性は、充分にある。*P. thomsonii* は、イソフラボン類の含量が低いことが知られている種であり、カッコンの品質確保の観点からも、genotype A を持つ検体の成分組成を調べるとともに、*P. thomsonii* 及び中国各地産の *P. lobata* について、より多くの試料を収集し、genotype A が *P. thomsonii* に特異的な遺伝子型であるのか、両種の 5S rDNA の IGS 領域の種内変異に関する情報を蓄積する必要がある。いずれの結論が得られたとしても、5S rDNA の IGS 領域のジェノタイピングは、カッコンの基原植物の系統解析に有用であると思われる。

E. 結論

国内市場に流通するカッコンについて、核 rDNA の ITS2 領域の塩基配列解析及び 5S rDNA の IGS 領域を利用したジェノタイピングを行った結果、前者の領域がカッコンの基原種鑑

別に有用であり、後者の手法が、基原植物の系統解析に有用であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況
なし

参考文献

- 1) Sun Y., Shaw P. C., Fung K. P., Molecular authentication of Radix Puerariae Lobatae and Radix Puerariae Thomsonii by ITS and 5S rRNA spacer sequencing, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 173-175 (2007).

Table 1 Details of the commercial Pueraria Roots used in this study.

Sample no.	Vouchor no.	Habitat	Collection year	Genotype
PuKw-1	NIB-0257	韩国	unknown	BX
PuKw-2	NIB-0413	河北	2010	BB
PuKw-3	NIB-0414	四川	2010	BB
PuKw-4	NIB-0454	安徽	2011	BC
PuKw-5	NIB-0534	湖北	2011	AB+(D)
PuKw-6	NIB-0535	韩国	2011	BC
PuKw-7	NIB-0536	湖北	2011	AX+(D)
PuKw-8	NIB-0537	湖北	2010	CC
PuKw-9	NIB-0538	湖北	2010	AB+(D)
PuKw-10	NIB-0539	四川	2008	BB
PuKw-11	NIB-0540	四川	2007	BB
PuKw-12	NIB-0541	韩国	2006	BC
PuKw-13	NIB-0542	四川	2005	BC
PuKw-14	NIB-0543	四川	2005	BB
PuKw-15	NIB-0544	四川	2005	AB+(D)
PuKw-16	NIB-0545	四川	2004	BC
PuKw-17	NIB-0546	四川	2002	BC
PuKw-18	NIB-0547	四川	2002	BX
PuKw-19	NIB-0548	安徽	2000	BC
PuKw-20	NIB-0549	四川	1998	解析不能
PuKw-21	NIB-0550	四川	1996	解析不能
PuKw-22	NIB-0551	韩国	1986	CD
PuKw-23	NIB-0552	湖北	2011	BC
PuKw-24	NIB-0634	四川	2011	CC
PuKw-25	NIB-0746	湖北	unknown	BB

Table 2 ITS2 sequences found in the commercial Pueraria Roots.

Sample no.	Aligned position		Sample no.	Aligned position	
	117	240		117	240
PuKw-1	C	T	PuKw-12	S	G
PuKw-2	S	K	PuKw-13	G	G
PuKw-3	S	K	PuKw-14	C	G
PuKw-4	C	K	PuKw-15	S	K
PuKw-5	S	K	PuKw-16	S	K
PuKw-6	C	K	PuKw-19	C	K
PuKw-7	C	K	PuKw-22	S	K
PuKw-8	C	K	PuKw-23	C	T
PuKw-9	S	G	PuKw-24	C	T
PuKw-10	S	K	PuKw-25	S	K
PuKw-11	S	G			

DQ302142 (P. lobata)	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A G A C G T C C C A C A C G A C G G C C	40
DQ302143 (P. lobata)	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A G A C G T C C C A C A C G A C G G C C	40
DQ302146 (P. thomsonii)	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A A A T G T C T C C G C G A T A G C C	40
DQ302149 (P. thomsonii)	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A A A T G T C T C C G C G A T A G C C	40
PuKw-1,23,24	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A G A C G T C C C A C A C G A C G G C C	40
PuKw-2,3,5,10,15,16,22,25	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A G A C G T C C C A C A C G A C G G C C	40
PuKw-4,6,7,8,19	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A G A C G T C C C A C A C G A C G G C C	40
PuKw-9,11,12	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A G A C G T C C C A C A C G A C G G C C	40
PuKw-13	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A G A C G T C C C A C A C G A C G G C C	40
PuKw-14	A T C G T T A C C C C A A C G C A A A C A G A C G T C C C A C A C G A C G G C C	40
DQ302142 (P. lobata)	G T T G C G T G G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C G A G C G G C G	80
DQ302143 (P. lobata)	G T T G C G T G G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C G A G C G G C G	80
DQ302146 (P. thomsonii)	G T T A C G T A G C G G G G T G C A C G T T G A C C T C C T A T G A G C A C A G	80
DQ302149 (P. thomsonii)	G T T A C G T A G C G G G G T G C A C G T T G A C C T C C T A T G A G C A C A G	80
PuKw-1,23,24	G T T G C G T G G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C G A G C G G C G	80
PuKw-2,3,5,10,15,16,22,25	G T T G C G T G G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C G A G C G G C G	80
PuKw-4,6,7,8,19	G T T G C G T G G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C G A G C G G C G	80
PuKw-9,11,12	G T T G C G T G G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C G A G C G G C G	80
PuKw-13	G T T G C G T G G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C G A G C G G C G	80
PuKw-14	G T T G C G T G G T A G G G T G C A C G C T G A C C T C C C G C G A G C G G C G	80
DQ302142 (P. lobata)	T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G C G G C C G A G C A C G	120
DQ302143 (P. lobata)	T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G C G G C C G A G C A C G	120
DQ302146 (P. thomsonii)	T C T C G T G G T T A G T T C A A A A T C G A G T T C G T G G C C A G G T A C G	120
DQ302149 (P. thomsonii)	C C T C G T G G T T A G T T C A A A A T C G A G T T C G C G G C C A G G T A C G	120
PuKw-1,23,24	T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G C G G C C G A G C A C G	120
PuKw-2,3,5,10,15,16,22,25	T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G C G G C C G A G S A C G	120
PuKw-4,6,7,8,19	T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G C G G C C G A G C A C G	120
PuKw-9,11,12	T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G C G G C C G A G S A C G	120
PuKw-13	T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G C G G C C G A G G A C G	120
PuKw-14	T C T C G C G G T T G G T T G A A A A T C G A G T T C G C G G C C G A G C A C G	120
DQ302142 (P. lobata)	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A G A C C A A T C	160
DQ302143 (P. lobata)	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A G A C C A A T C	160
DQ302146 (P. thomsonii)	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T T A G T A A T G C T C G A G A C C A A T C	160
DQ302149 (P. thomsonii)	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T T A G T A A T G C T C G A G A C C A A T C	160
PuKw-1,23,24	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A G A C C A A T C	160
PuKw-2,3,5,10,15,16,22,25	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A G A C C A A T C	160
PuKw-4,6,7,8,19	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A G A C C A A T C	160
PuKw-9,11,12	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A G A C C A A T C	160
PuKw-13	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A G A C C A A T C	160
PuKw-14	C C G T G A T A A A A T G G T G G A T G A G C A A C G C T C G A G A C C A A T C	160
DQ302142 (P. lobata)	A C G C G C T G C G A C T C G G T C T G C G A A G G A C T C C C T G A T T G A T	200
DQ302143 (P. lobata)	A C G C G C T G C G A C T C G G T C C G C G A A G G A C T C C C T G A T T G A T	200
DQ302146 (P. thomsonii)	A C G C A C C G C G A C T C G G T C A G T T C C G A A C T C C C T C A - - - -	195
DQ302149 (P. thomsonii)	A C G C A C C G C G A C T C G G T C A G T T C C G A A C T C C C T C A - - - -	195
PuKw-1,23,24	A C G C G C T G C G A C T C G G T C C G C G A A G G A C T C C C T G A T T G A T	200
PuKw-2,3,5,10,15,16,22,25	A C G C G C T G C G A C T C G G T C C G C G A A G G A C T C C C T G A T T G A T	200
PuKw-4,6,7,8,19	A C G C G C T G C G A C T C G G T C C G C G A A G G A C T C C C T G A T T G A T	200
PuKw-9,11,12	A C G C G C T G C G A C T C G G T C C G C G A A G G A C T C C C T G A T T G A T	200
PuKw-13	A C G C G C T G C G A C T C G G T C C G C G A A G G A C T C C C T G A T T G A T	200
PuKw-14	A C G C G C T G C G A C T C G G T C C G C G A A G G A C T C C C T G A T T G A T	200
DQ302142 (P. lobata)	G A C G A C C C T A C A G T G C G C C T C C T C T C C G G A G A C G C T C T C G	240
DQ302143 (P. lobata)	G A C G A C C C T A C A G T G C G C C T C C T C T C C G G A G A C G C T C T C G	240
DQ302146 (P. thomsonii)	- - C G A C C C T C - - - T G T G T C T C T T C T - - - G A G A C G C T T T C A	227
DQ302149 (P. thomsonii)	- - C G A C C C T C - - - T G T G T T T C T T C T - - - G A G A C G C T T T C A	227
PuKw-1,23,24	G A C G A C C C T A C A G T G C G C C T C C T C T C C G G A G A C G C T C T C G	240
PuKw-2,3,5,10,15,16,22,25	G A C G A C C C T A C A G T G C G C C T C C T C T C C G G A G A C G C T C T C K	240
PuKw-4,6,7,8,19	G A C G A C C C T A C A G T G C G C C T C C T C T C C G G A G A C G C T C T C K	240
PuKw-9,11,12	G A C G A C C C T A C A G T G C G C C T C C T C T C C G G A G A C G C T C T C G	240
PuKw-13	G A C G A C C C T A C A G T G C G C C T C C T C T C C G G A G A C G C T C T C G	240
PuKw-14	G A C G A C C C T A C A G T G C G C C T C C T C T C C G G A G A C G C T C T C G	240
DQ302142 (P. lobata)	A C	242
DQ302143 (P. lobata)	A C	242
DQ302146 (P. thomsonii)	A T	229
DQ302149 (P. thomsonii)	A T	229
PuKw-1,23,24	A C	242
PuKw-2,3,5,10,15,16,22,25	A C	242
PuKw-4,6,7,8,19	A C	242
PuKw-9,11,12	A C	242
PuKw-13	A C	242
PuKw-14	A C	242

Fig. 1 ITS2 sequence alignment for the commercial Pueraria Roots and the related plants