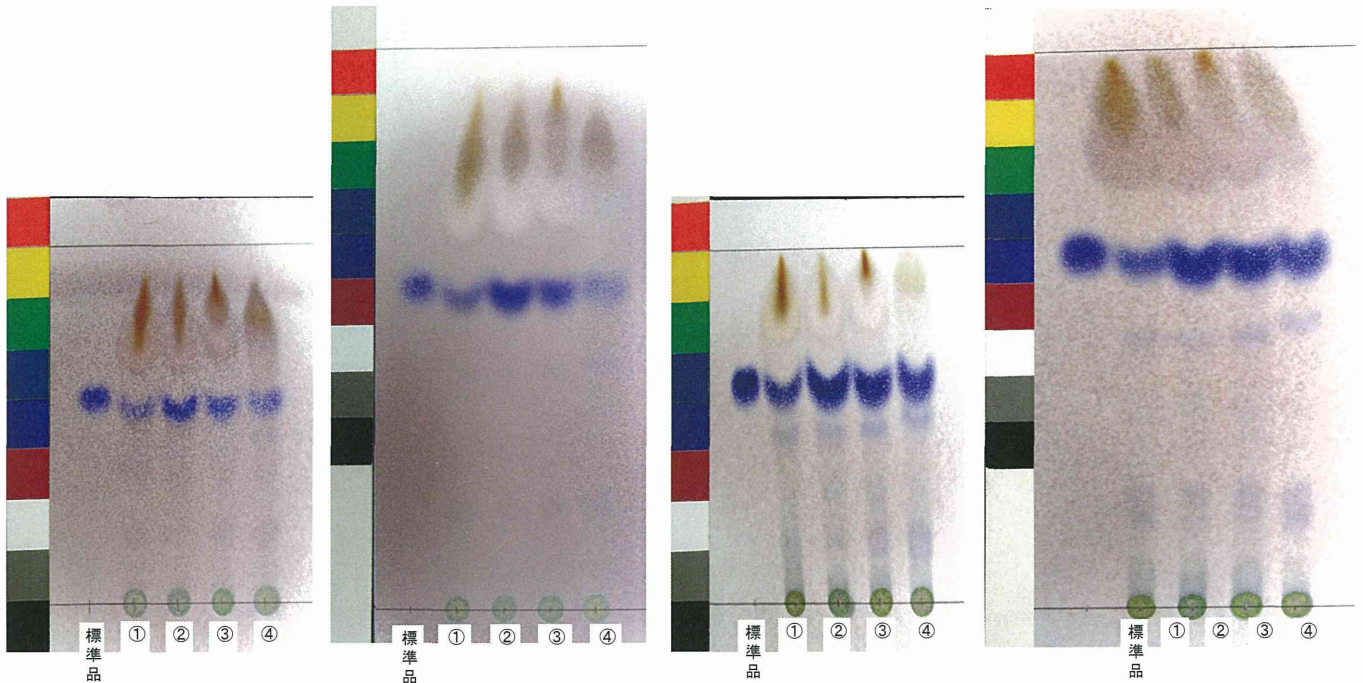


トウガラシの確認試験

展開溶媒:ジエチルエーテル/メタノール(19:1)

検出:2,6-ジブロモ-N-クロロ-1,4-ベンゾキノンモノイミン試液噴霧/アンモニアガス中に放置



写真① Merck製(7cm展開)  
Rf値:0.54(青色)  
展開時間:9分

写真② Merck製(10cm展開)  
Rf値:0.67(青色)  
展開時間:21分

写真③ Wako製(7cm展開)  
Rf値:0.60(青色)  
展開時間:6分

写真④ Wako製(10cm展開)  
Rf値:0.74(青色)  
展開時間:18分

標準品:(E)-カプサイシン  
① 中国(2009年2月入手)  
② 中国(2010年12月入手)

カプサイシン含量  
0.153%  
0.461%

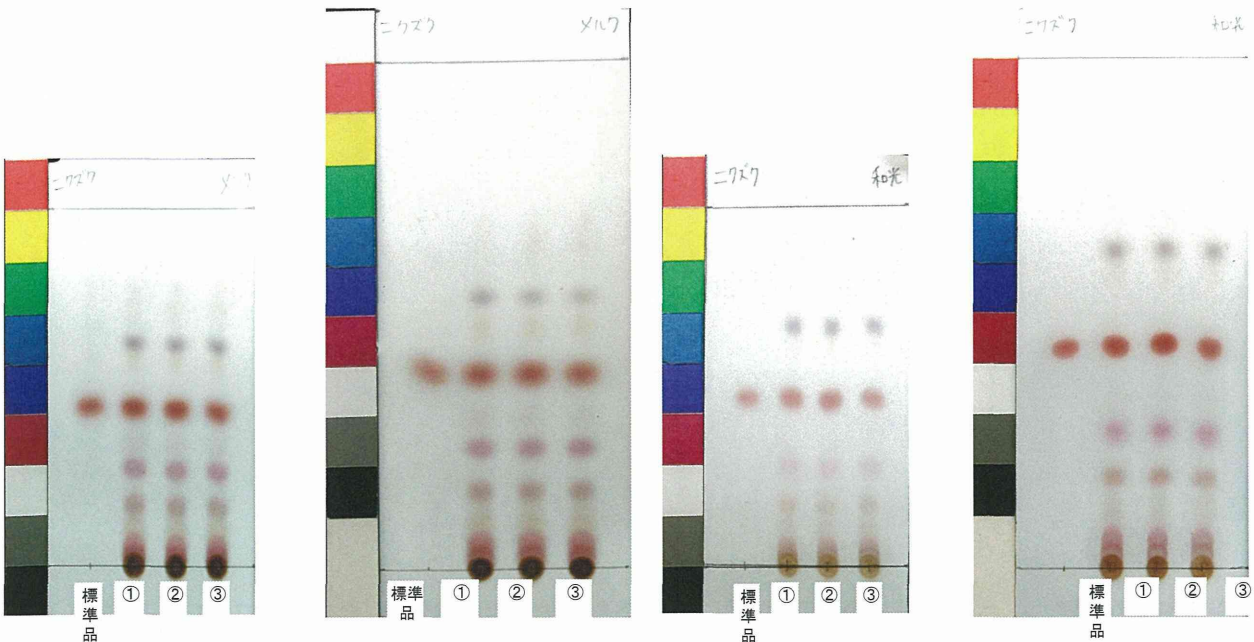
③ 中国(2006年3月入手)  
④ 中国(2001年4月入手)

カプサイシン含量  
0.554%  
0.262%

ニクズクの確認試験

展開溶媒:ヘキサン/アセトン(9:1),

検出:希硫酸噴霧/105°C5分間加熱



写真① Merck製(7cm展開)  
Rf値:0.44(赤紫色)  
展開時間:8分

写真② Merck製(10cm展開)  
Rf値:0.39(赤紫色)  
展開時間:14分

写真③ Wako製(7cm展開)  
Rf値:0.46(赤紫色)  
展開時間:6分

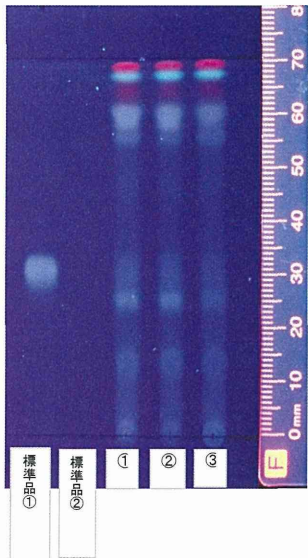
写真④ Wako製(10cm展開)  
Rf値:0.43(赤紫色)  
展開時間:10分

標準品:ミスチシン  
① インドネシア(2011年1月入手)  
② インドネシア(2007年4月入手)  
③ インドネシア(2006年12月入手)

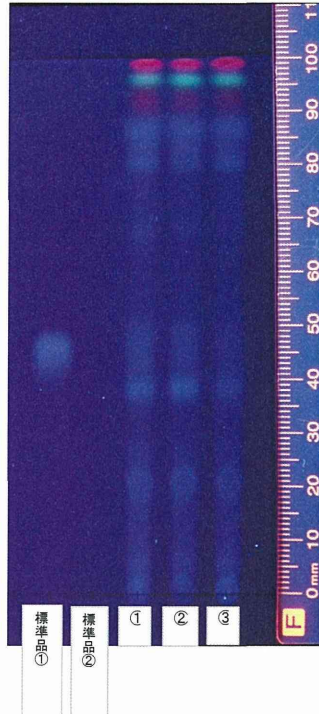
Fig. 14

ニンドウの確認試験

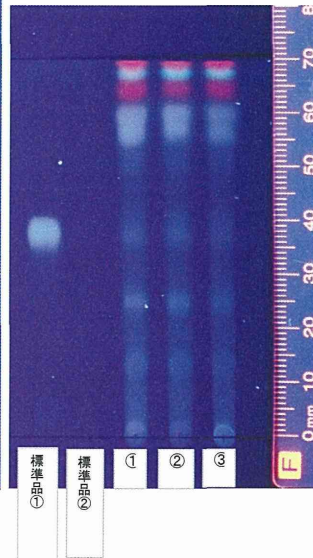
展開溶媒: 酢酸エチル/水/ギ酸 (6:1:1)  
 検出: 紫外線(主波長365nm)照射



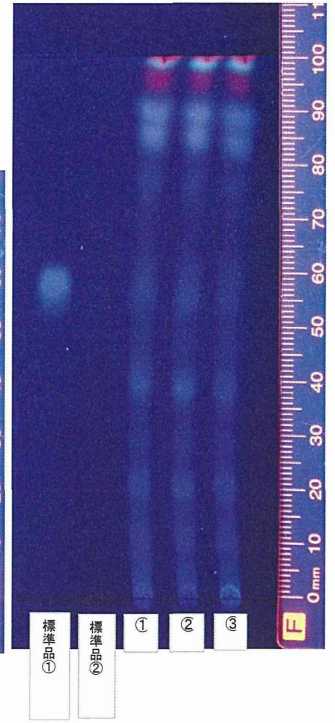
写真① Merck製(7cm展開)  
 Rf値:0.44(青白色の蛍光)  
 展開時間:22分



写真② Merck製(10cm展開)  
 Rf値:0.46(青白色の蛍光)  
 展開時間:44分

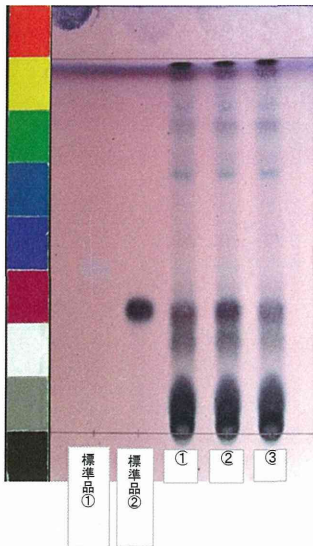


写真③ Wako製(7cm展開)  
 Rf値:0.54(青白色の蛍光)  
 展開時間:16分



写真④ Wako製(10cm展開)  
 Rf値:0.57(青白色の蛍光)  
 展開時間:37分

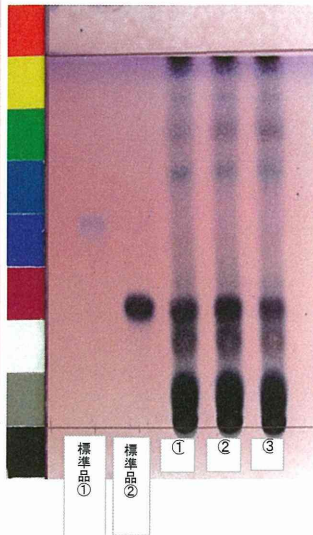
検出: 4-メキシベンズアルデヒド・硫酸試液/105°C5分



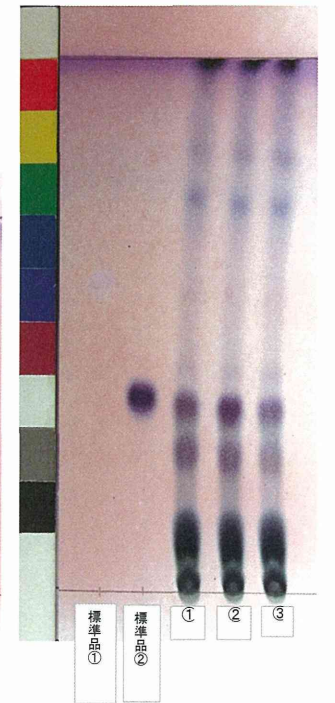
写真① Merck製(7cm展開)  
 Rf値:0.33(赤紫色)  
 展開時間:22分



写真② Merck製(10cm展開)  
 Rf値:0.35(赤紫色)  
 展開時間:44分



写真③ Wako製(7cm展開)  
 Rf値:0.33(赤紫色)  
 展開時間:16分



写真④ Wako製(10cm展開)  
 Rf値:0.35(赤紫色)  
 展開時間:37分

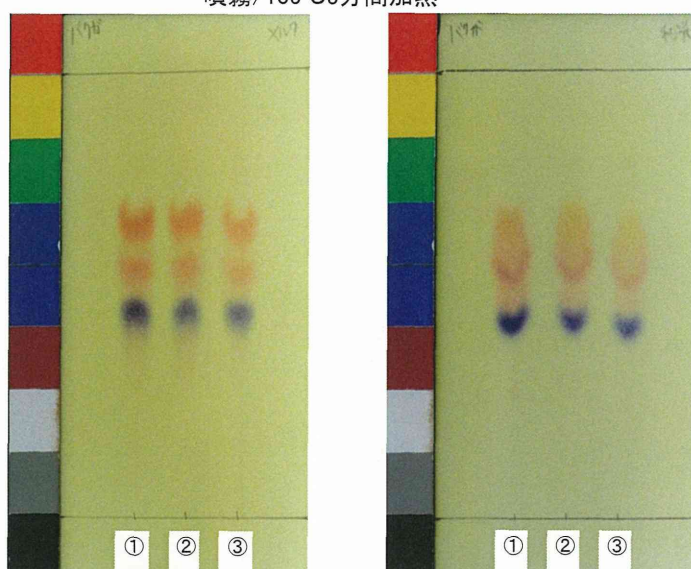
標準品①: クロロゲン酸  
 標準品②: ロガニン  
 ① 中国(2011年12月入手)  
 ② 中国(2010年06月入手)  
 ③ 中国(2009年05月入手)

Fig. 15

## バクガの確認試験

展開溶媒:メタノール/水/酢酸(100)(8:1:1)

検出:2,3-インドリンジオン0.1gをアセトン50mLに溶かした液を噴霧/105°C5分間加熱



写真① Merck製(7cm展開)

Rf値:0.46(青紫色)

展開時間:24分

① 中国(2012年3月入手)

② 中国(2010年12月入手)

写真② Wako製(7cm展開)

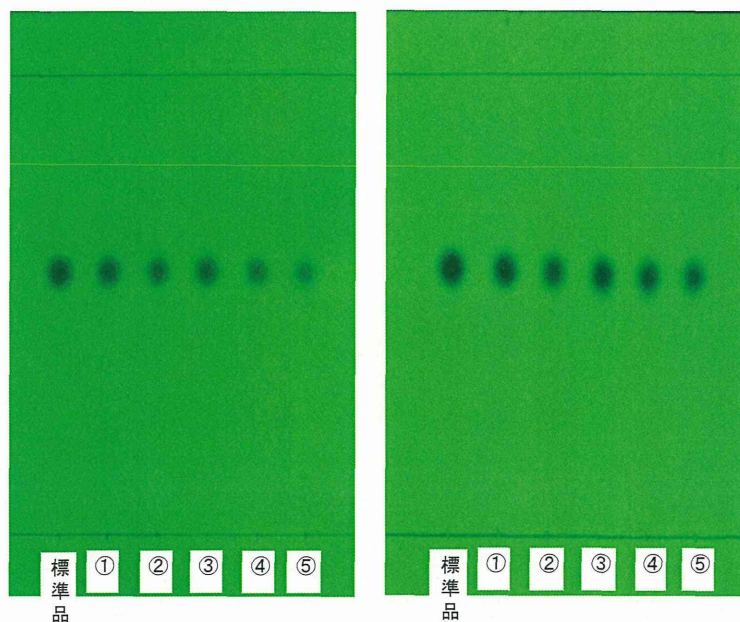
Rf値:0.44(青紫色)

展開時間:16分

③ 中国(2009年4月入手)

## ポタンピの確認試験

展開溶媒:酢酸エチル/ヘキサン(1:1), 紫外線(主波長254nm)照射



写真① Merck製(7cm展開)

Rf値:0.57

展開時間:9分

標準品:ペオノール

① 中国(2012年1月入手)

② 中国(2011年5月入手)

③ 中国(2010年5月入手)

写真② Wako製(7cm展開)

Rf値:0.57

展開時間:7分

④ 中国(2010年4月入手)

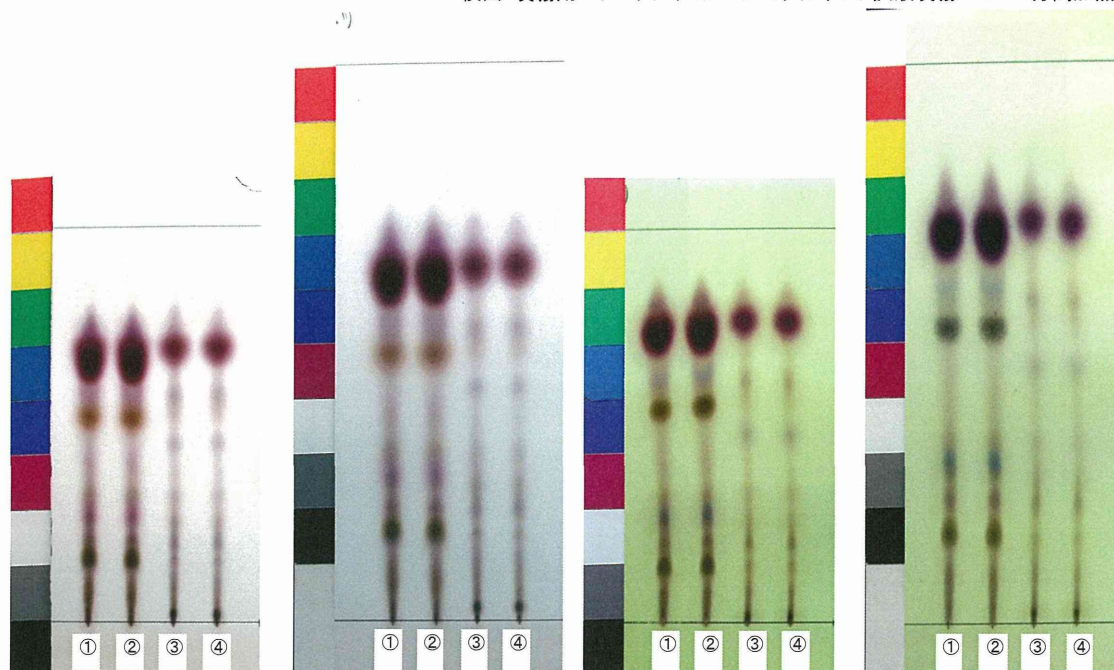
⑤ 中国(2009年9月入手)

# Fig. 16

## ピャクジュツの純度試験

展開溶媒：ヘキサン/アセトン(7:1)

検出：噴霧用4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液噴霧/100°C5分間加熱



写真① Merck製(7cm展開)  
Rf値：なし  
展開時間：8分

写真② Merck製(10cm展開)  
Rf値：なし  
展開時間：14分

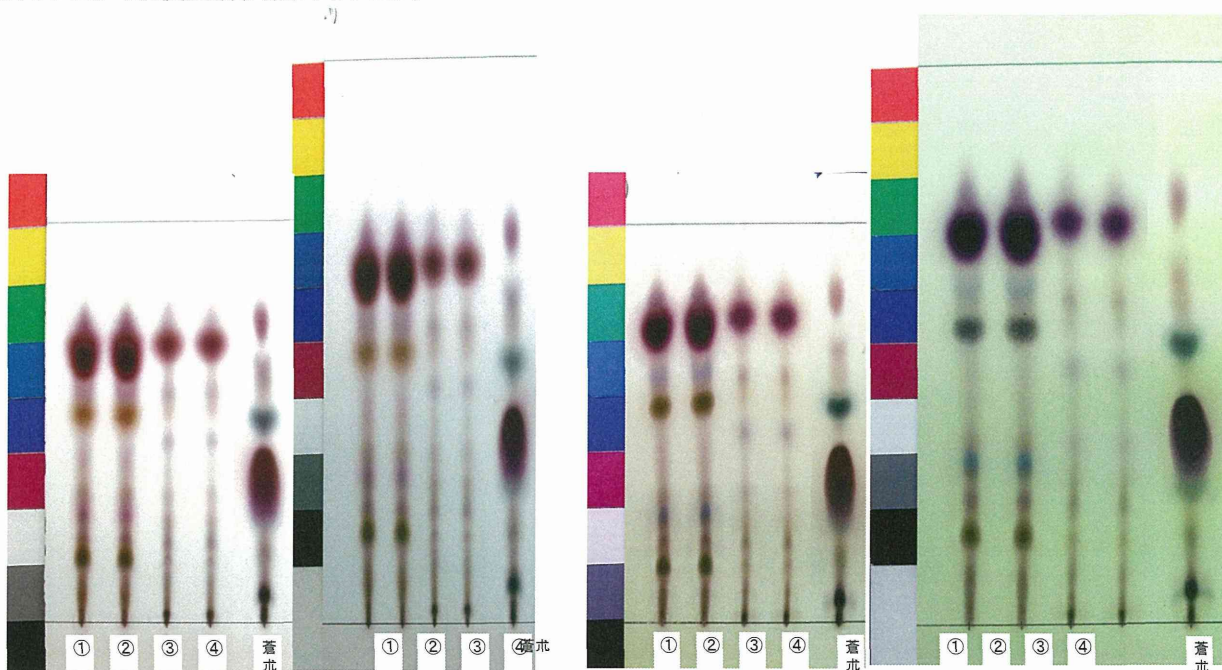
写真③ Wako製(7cm展開)  
Rf値：なし  
展開時間：6分

写真④ Wako製(10cm展開)  
Rf値：なし  
展開時間：10分

- ① 中国・ワピャクジュツ(2010年12月入手)
- ② 中国・ワピャクジュツ(2010年7月入手)
- ③ 中国・カラピャクジュツ(2011年4月入手)
- ④ 中国・カラピャクジュツ(2008年4月入手)

Rf値0.3~0.6に緑色~灰緑色のスポットを認めない。

## ピャクジュツの純度試験(対照：ソウジュツ)



写真① Merck製(7cm展開)  
Rf値：なし  
展開時間：8分

写真② Merck製(10cm展開)  
Rf値：なし  
展開時間：14分

写真③ Wako製(7cm展開)  
Rf値：なし  
展開時間：6分

写真④ Wako製(10cm展開)  
Rf値：なし  
展開時間：10分

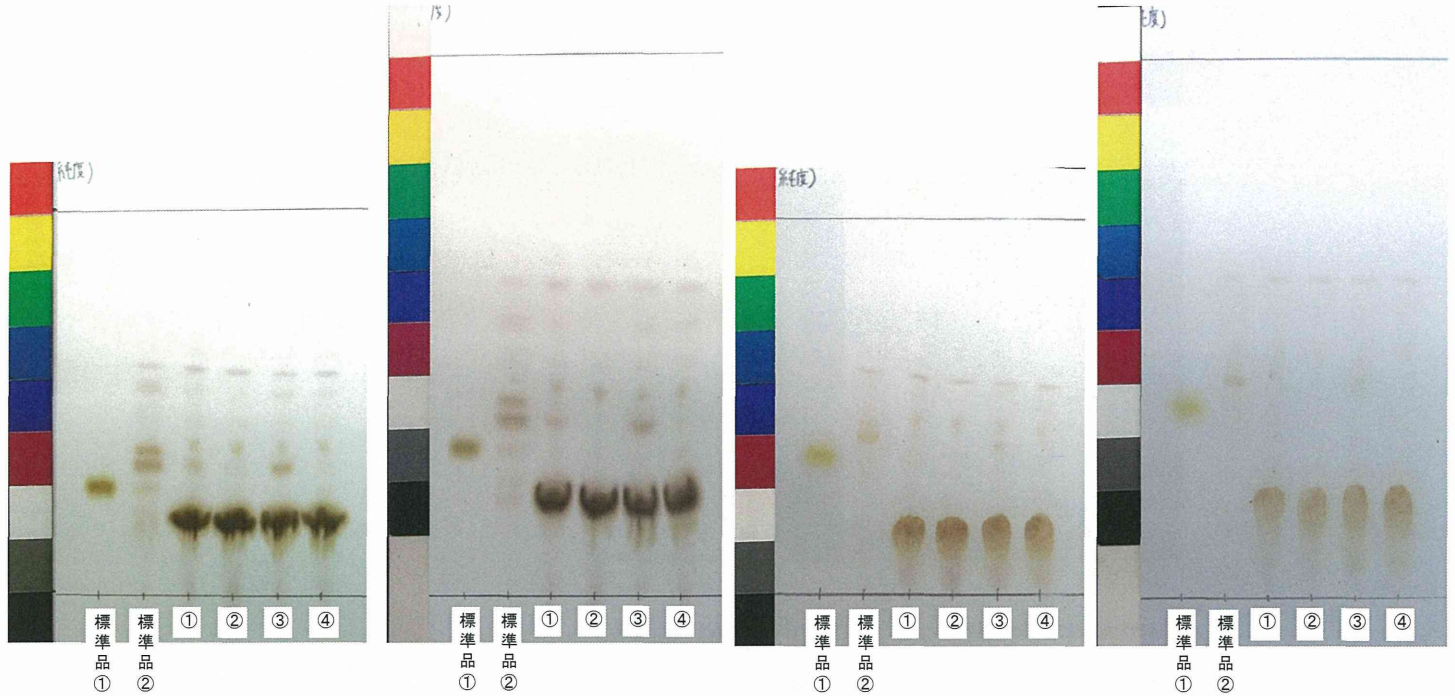
- ① 中国・ワピャクジュツ(2010年12月入手)
- ② 中国・ワピャクジュツ(2010年7月入手)
- ③ 中国・カラピャクジュツ(2011年4月入手)
- ④ 中国・カラピャクジュツ(2008年4月入手)
- 蒼朮：ソウジュツ・中国湖北(2011年12月入手)

Rf値0.3~0.6に緑色~灰緑色のスポットを認めない。

Fig. 17

ユウタンの純度試験

展開溶媒: 酢酸(100)/トルエン/水(10:10:1), 検出: 希硫酸噴霧/105°C10分間加熱



写真① Merck製(7cm展開)  
Rf値:なし  
展開時間:15分

標準品①:グリコール酸ナトリウム  
標準品②:ブタ胆汁末  
① サンプルA  
② サンプルB  
③ サンプルC  
④ サンプルD

写真② Merck製(10cm展開)  
Rf値:なし  
展開時間:27分

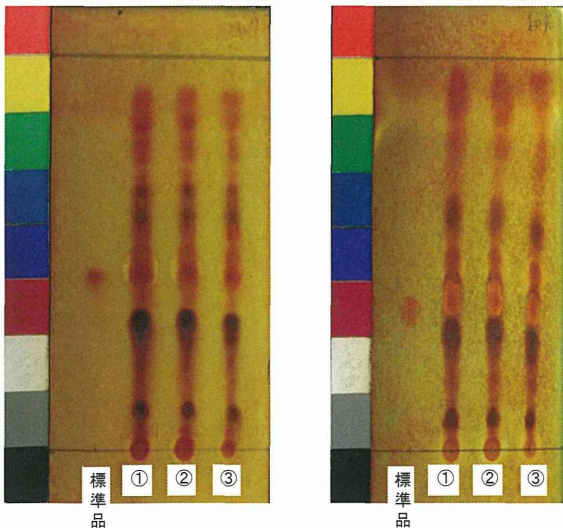
標準品①から得たグリコール酸のスポットに対応する位置にスポットを認めない。  
標準品②から得たブタ胆汁末のRf値0.3付近のスポットに対する位置に灰褐色~黒色のスポットを認めない。

写真③ Wako製(7cm展開)  
Rf値:なし  
展開時間:10分

写真④ Wako製(10cm展開)  
Rf値:なし  
展開時間:19分

ブシのTLC

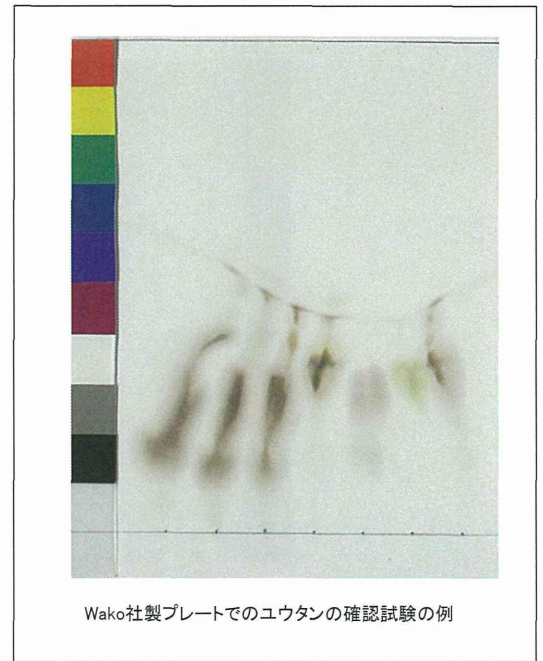
展開溶媒: 酢酸エチル/エタノール(99.5)/アンモニア水(28)(40:3:2)  
検出: 噴霧用ドラージェンドルフ試液噴霧/風乾/亜硝酸ナトリウム試液噴霧



写真① Merck製(7cm展開)  
Rf値:0.44(黄褐色)  
展開時間:10分

写真② Wako製(7cm展開)  
Rf値:0.39(黄褐色)  
展開時間:8分

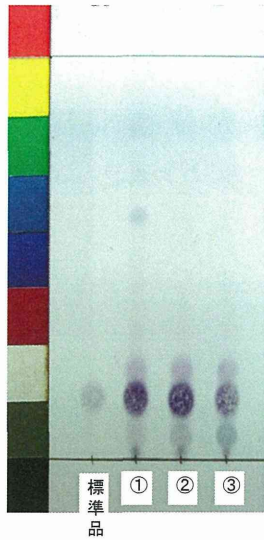
標準品:ベンゾイルメサコニン塩酸塩  
① 中国・四川(2010年12月入手)  
② 中国・四川(2010年12月入手)  
③ 中国・四川(2010年5月入手)



Wako社製プレートでのユウタンの確認試験の例

Fig. 18

ユウタンの確認試験案

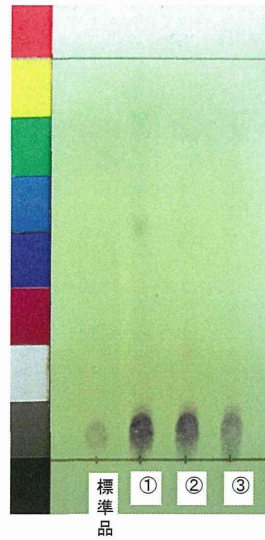


写真① Merck製(7cm展開)  
Rf値:0.16  
展開時間:12分

標準品:タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム  
① サンプルA  
② サンプルB  
③ サンプルC

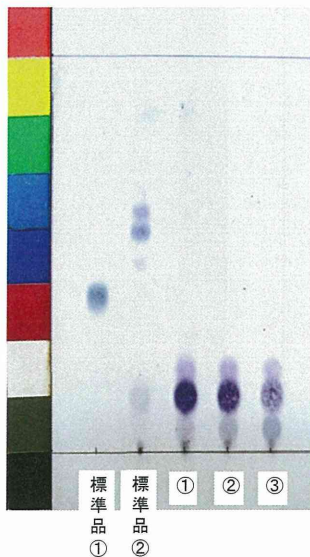
展開溶媒:酢酸エチル/メタノール/ギ酸(12:2:1)

検出:バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧/105°C10分間加熱



写真② Wako製(7cm展開)  
Rf値:0.07  
展開時間:9分

ユウタンの純度試験案

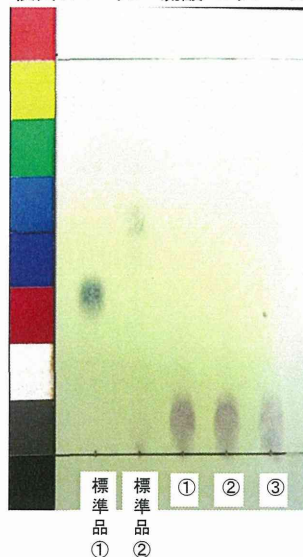


写真① Merck製(7cm展開)  
Rf値:標準品① 0.39,  
標準品② 0.55&0.61,試料 無し  
展開時間:12分

標準品①:グリココール酸ナトリウム  
標準品②:ブタ胆汁末  
① サンプルA  
② サンプルB  
③ サンプルC

展開溶媒:酢酸エチル/メタノール/ギ酸(12:2:1)

検出:バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧/105°C10分間加熱



写真② Wako製(7cm展開)  
Rf値:標準品① 0.40,  
標準品② 0.56&0.60,試料 無し  
展開時間:10分

標準品①から得た青紫色のスポット(Rf値0.4付近)と等しい位置に試料溶液ではスポットを認めない。

標準品②から得た紫色の近接する2つのスポット(Rf値0.6付近)の内、下のスポットと等しい位置に試料溶液ではスポットを認めない。

Fig. 19

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 遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究  
—漢方薬に使用される薬用植物の遺伝子情報の整備に関する研究—

研究分担者 富山大学 和漢医薬学総合研究所 教授 小松かつ子  
国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 部長 合田 幸広  
医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部  
主任研究員 河野 徳昭

研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長 丸山 卓郎  
京都大学 大学院薬学研究科 准教授 伊藤美千穂  
富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教 朱 姝  
東京生薬協会 学術委員会 山路 弘樹

11 種類の繁用生薬の遺伝子鑑別に関する情報を整備することを目的にして、現在の日本市場に流通している生薬市場品の遺伝子解析を行い、各生薬の基原種の同定に有用な遺伝子領域を次のように明らかにした；センキュウ：*trnK* 遺伝子、ボタンピ：ITS 領域、タクシャ：ITS 領域、ハンゲ：*trnL-trnF* IGS 領域及び ITS1 領域、カッコン：ITS2 領域及び 5S rDNA IGS 領域、ゴシツ：ITS1 領域、ゴシュユ：ITS 領域、ITS1 領域または ITS2 領域（局方収載基原種 3 種を他種から区別する）、チンピ：カルコン合成酵素をコードする遺伝子に可能性あり、キョウニン：*rpl16* intron 領域、ボウイ：ITS 領域、バクモンドウ：*rbcL* 遺伝子。なお、11 生薬の市場品の遺伝子解析結果から、タクシャ、ハンゲ及びカッコンについては、今後現地調査を含め、基原種の詳細な確認作業が必要であることが示唆された。

#### A. 研究目的

生薬の安全性と有効性を担保するために行われる品質評価では、第一に生薬の基原の同定が必要である。この同定を最も客観的に行なう方法が遺伝子解析である。本研究は、「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究」の一環として、漢方処方に配合される重要な生薬を順次取り上げ、それらの基原植物の遺伝子鑑別に関する情報を収集することにより、同定に有用な遺伝子領域を選択し、実際に現在の日本市場に流通し

ている生薬市場品に対して当該領域の遺伝子解析を行ない、有用性の検証を行なうとともに、市場品の基原と遺伝子型を明らかにすることを目的とする。

なお、本研究で収集した遺伝子鑑別に関する情報及び生薬市場品の遺伝子解析結果は、薬用植物総合情報データベースに構築する。

今年度は 11 種類の生薬、すなわち、センキュウ、ボタンピ、タクシャ、ハンゲ、カッコン、ゴシツ、ゴシュユ、チンピ、キョウニン、ボウイ、バクモンドウを対象にして、遺伝子情報の

収集と市場品の遺伝子解析研究を行なった。

本報告書では生薬ごとに研究の方法と結果を報告する。

## B. 研究方法

### 実験材料

本研究で使用した試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料の一部を譲渡されたものである。試料の詳細は、生薬ごとに記す。

## 1. センキュウ（小松、朱）

### A. 1. 研究目的

川芎は補血、強壯、鎮静、鎮痛薬として、貧血症、冷え性、月経不順、月経痛などに応用される。その基原として、日本では『日本薬局方』にセリ科のセンキュウ *Cnidium officinale* Makino の根茎が規定され、一方、中国では『中華人民共和国薬典』に同科の *Ligusticum chuanxiong* Hort. の根茎が規定されており、両国で原植物が異なっている。したがって、中国産川芎が輸入されることはほとんどなく、我が国では日本産川芎が専ら使用される。日本漢方生薬製剤協会による平成 20 年度の原料生薬使用量等調査報告書によると、川芎の国内使用量は 373,432 kg で 21 番目に多く、その内訳は日本産が 313,739 kg、中国産が 59,693 kg であり、中国で生産された *C. officinale* も輸入されているようである。

我々はこれまでに、日本産及び中国産川芎の原植物である *C. officinale* 及び *L. chuanxiong* の *trnK* 遺伝子の塩基配列の解析を行い、それらはともに 2569 塩基対で、上流から 767,924,964 番目の塩基が異なることを明らかにし報告した。これら 3 箇所の塩基配列は、*C. officinale* 及び日本産川芎では、thymine, cytosine, thymine (T, C, T) であるのに対し、*L. chuanxiong* 及び中国産川芎では、guanine, adenine, guanine (G, A, G) であった<sup>1)</sup>。したがって、3 箇所の塩基配列により、両者が同定できることを明らかにした。

今回、日本市場に流通するセンキュウの原植物を明らかにする目的で、同定に有用であった *trnK* 遺伝子の部分領域の解析を行った。

### B. 1. 1. 実験材料

センキュウ 9 市場品につき、各 1 検体を取り、試料とした (Table 1-1)。

### B. 1. 2. 実験方法

各試料をナイフで削り、約 100 mg を steel beads 数粒とともに 2 mL チューブに入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 1 時間冷凍した。TissueLyser (Qiagen, Germany) で 30/秒、2 分 30 秒間振動させ、試料を粉末にした。Steel beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 2  $\mu\text{L}$  を取り、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。得られた全 DNA を鋳型とし、PCR 法で葉緑体 DNA の *trnK* 遺伝子の部分領域を増幅した。プライマーは Chu-*trnK*493F と Chu-*trnK*1217R を使用した (Fig. 1-1)。PCR 反応には、KOD FX Neo DNA polymerase (東洋紡社) を用いた。反応条件は、ホットスタート  $94^{\circ}\text{C}$  2 分、続いて熱変性  $94^{\circ}\text{C}$  15 秒、アニーリング  $52^{\circ}\text{C}$  30 秒、伸長反応  $68^{\circ}\text{C}$  1 分の条件を 35 サイクル行い、最後に  $68^{\circ}\text{C}$  7 分で終了した。得られた PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動法で確認後、PCR 産物を精製し、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 (Applied Biosystems, U.S.A.) でシーケンシング反応を行い、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A.) で塩基配列を決定した。増幅及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置及び配列を Fig. 1-1 に示す。

### C. 1. 研究結果

9 市場品各 1 検体について、*trnK* 遺伝子の部分領域の塩基配列を解析し、これまでの当研究室の研究結果と比較した (Fig. 1-2)。9 市場品には 2 タイプの塩基配列が認められた。1 タイプ



(タイプI) は、当研究室が報告した *C. officinale* の配列 (Accession No. AB262551) と完全に一致した。その他の1タイプ (タイプII) は、タイプIの配列と2か所 (上流から767番目と964番目) で塩基配列の違いがあり、ともにTとGの混合塩基 (K) が認められた。924番目の塩基はTypeIと同じCであった。

9市場品のうち、4市場品はタイプIの配列を示し、5市場品 (NIB-026, 048, 064, 132, 159) はタイプIIの配列を示した。前者の原植物は *C. officinale* であると同定できた。

#### D. 1. 考察

これまで、*C. officinale* と *L. chuanxiong* は、*trnK* 遺伝子において、上流から767、924、964番目の塩基を調べることで鑑別できること (*C. officinale* : T, C, T ; *L. chuanxiong* : G, A, G) を報告してきたが、今回、明らかに *C. officinale* であると同定できる市場品の他に、3箇所の配列がK、C、K (タイプII) である市場品が約半数認められた。これら5市場品については、今後、クローニングを行い、混合配列の形成に関わる純系の配列を明らかにする予定である。また、市場品の産地は北海道であることから、*L. chuanxiong* の影響は考えがたく、市場品のみならず植物をも含めて、*C. officinale* の種内変異を検討する必要がある。

#### E. 1. 結論

センキュウの鑑別には、*trnK* 遺伝子の部分領域 (約400 bps) の解析が有用であった。9市場品のうち4市場品は *C. officinale* と相同の配列を示したが、他の5市場品は3箇所のマーカー配列の内2箇所で混合塩基が検出された。5市場品も *C. officinale* と判断されたが、さらなる種内変異の検討が必要であることが示された。

#### F. 1. 参考文献

1) Zhu S., Fushimi H., Han G., Tsuchida T., Uno T., Takano A., and Komatsu K.: Molecular identification

of “Chuanxiong” by nucleotide sequence and multiplex single base extension analysis on chloroplast *trnK* gene. *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 527-531, 2007.

## 2. ボタンピ (小松、朱)

### A. 2. 研究目的

牡丹皮はボタンの根を「芯抜き」したもので、『神農本草経』の中品に収載され、古来、中風、頭痛を治し、瘀血を散じ、血脈を順らす要薬とされる。鎮静、鎮痛、駆瘀血、排膿薬として、頭痛、腹痛、婦人科疾患、月経不順、月経困難など、血液の停滞する血行障害のあるものに応用する。その基原として、『第十六改正日本薬局方』に、ボタン科のボタン *Paeonia suffruticosa* Andrews (*Paeonia moutan* Sims) の根皮が規定されている。日本漢方生薬製剤協会による平成20年度の原料生薬使用量等調査報告書によると、国内使用量は285,726 kgで25番目に多く、その内訳は日本産が37 kg、中国産が285,689 kgである。

これまでに我々は、同属の *P. lactiflora* に由来する芍薬の遺伝子解析を行い、核DNAのITS領域が同定並びに種内多型の解析に有用であることを見出している。

今回、日本市場に流通するボタンピの基原種を明らかにする目的で、芍薬と同様にITS領域の解析を行った。

### B. 2. 1. 実験材料

ボタンピ20市場品につき、各1検体を取り、試料とした (Table 2-1)。また、参考とするため富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物資料館所蔵の生薬標本2点を加えた (Table 2-2)。

### B. 2. 2. 実験方法

試料の一部を削り、約100 mgをsteal beads数粒とともに2 ml チューブに入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$ で1時間冷凍した。Tissuelyser (Qiagen, Germany) で

30秒、2分30秒間振動させ、試料を粉末にした。Steal beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 2  $\mu$ L を取り、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。ITS1-5.8S-ITS2 の全領域を 2 分割し、ITS1 領域と 5.8S rRNA 遺伝子領域の一部はプライマーセット ITS-1F と In 18S-25S-3'R を用いて、また 5.8S rRNA 遺伝子領域の一部と ITS2 領域はプライマーセット In 18S-25S-5'F と 18S-25S-3'R を用いて、全 DNA を鋳型として PCR 法で増幅した。PCR 反応には、KOD-plus DNA polymerase (東洋紡社) を用いた。反応条件は、ホットスタート 94°C 5 分、続いて熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 52°C 30 秒、伸長反応 68°C 50 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 68°C 10 分で終了した。

得られた PCR 産物のうち 2  $\mu$ L について 1%アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した。その残りを Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社, USA) で精製し、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 (Applied Biosystems, U.S.A.) でシーケンシング反応を行った。反応条件は、ホットスタート 96°C 1 分、続いて熱変性 96°C 10 秒、アニーリング 50°C 5 秒、伸長反応 60°C 4 分の条件を 25 サイクル行った。反応終了後、BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) を用いて精製し、上澄み液を MicroAmp Optical 96Well Reaction Plate に移し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で、塩基配列を決定した。増幅及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置及び配列を Fig. 2-1 に示す。

Electropherogram では、同一箇所にも二重のピークが確認された。ノイズと区別するために、副ピークの高さ/(副ピークの高さ+主ピークの高さ) が 15%以上のものをヘテロ型 (混合塩基) と判断した。

## C. 2. 研究結果

ボタンピ 20 市場品のうち 15 市場品において、ITS 領域の塩基配列を決定できた。*P. suffruticosa* の ITS 領域の塩基配列は、ITS1 領域が 267 bp, 5.8S rRNA 遺伝子領域が 164 bp, ITS2 領域が 221 bp であった。これまでに GenBank に報告されている塩基配列 (Sang T.ら<sup>1)</sup>、Sun Y. L.<sup>2)</sup>らなど) と比較した結果、Table 2-3 に示すように、全く一致するものはなく、すべての市場品に混合塩基が認められた。一方、民族薬物資料館保有の生薬標本 2 点のうち韓国産の標本 (TMPW No. 2488) は、GenBank 登録の FJ599760 の配列と相同の配列を示し、純系であった。残りの中国安徽省産の標本は今回の市場品と同様に混合塩基が認められた。ホモロジー検索 (BLAST 検索) を行った結果、15 市場品のうち 12 市場品は GenBank に登録された *P. suffruticosa* の ITS 領域の塩基配列 (U27692,<sup>1)</sup> EU224272, FJ528284, FJ528285, JN980377, FJ599760, JN572149<sup>2)</sup>) と 99%以上の相同性を示した。残りの 3 市場品 (NIB-279, 286, 268) は 97%の相同性であった。

## D. 2. 考察

ホモロジー検索の結果、99%以上の相同性を示した 12 市場品は *P. suffruticosa* と同定できる。一方、97%の相同性を示した 3 市場品については判断に迷うところであるが、市場品の性状や、産地がボタンピの主産地である安徽省銅陵または安徽省であることを鑑み、*P. suffruticosa* であると判断した。

現在の中国産ボタンピ市場品は、ITS 領域において、比較的多くの混合塩基が認められ、基原種である薬用ボタンは、古来、交配が行われてきたことが示唆された。混合塩基の種類から、この成因の過程には、シャクヤク *P. lactiflora* が関与した可能性も考えられる。民族薬物資料館保有の韓国産牡丹皮はおそらく 1980 年代の入手品である。純系の塩基配列をもった検体は本品のみであり、その当時中国産の牡丹皮はどの

ような塩基配列を有するものであったのかに興味をもたれた。今後、日本に系統保存されている薬用のボタンを含め、検討する必要がある。

## E. 2. 結論

ボタンピ 20 市場品のうち 15 市場品で ITS 領域の塩基配列を決定でき、すべて *P. suffruticosa* であると判断した。そのうち、GenBank に登録された同種の ITS 領域の塩基配列と 97% の相同性を示した 3 市場品については、形状や産地を参考にした。中国で薬用とされるボタン *P. suffruticosa* の品種は交配により作られてきたことが示唆され、これが原因で ITS 配列の多型が顕著であったものと考えられる。

## F. 2. 参考文献

- 1) Sang T., Crawford D. J., Stuessy T. F.: Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6813-6817, 1995.
- 2) Sun Y. L., Hong S. K.: Genetic diversity and phylogenetics of genus “*Paeonia*” based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. *J. Plant Biotechnol.*, 38: 234-240, 2011.

## 3. タクシャ (小松、朱)

### A. 3. 研究目的

沢瀉は『神農本草経』の上品に収載され、利尿、止渴薬として、小便不利または頻数、めまい、口渇、胃内停水などの症状に用いる。その基原として『第十六改正日本薬局方』に、オモダカ科のサジオモダカ *Alisma orientale* Juzepczuk の塊茎で、通例、周皮を除いたものであると規定されている。本種のシノニムとして、*A. plantago-aquatica* L. subsp. *orientale* Samuelsson, *A. plantago-aquatica* L. var. *orientale* Samuelsson がある。これまでに Li X. らは核 ITS 領域の塩基配

列により中国産 *Alisma* 属植物 6 種が鑑別できると報告している<sup>1)</sup>。

そこで今回、日本市場に流通するタクシャの基原種を明らかにする目的で、ITS 領域の塩基配列を解析した。

なお、日本漢方生薬製剤協会による平成 20 年度の原料生薬使用量等調査報告書によると、タクシャの国内使用量は 358,951 kg で 22 番目に多く、すべて中国から輸入される。

### B. 3. 1. 実験材料

タクシャ 28 市場品につき、各 1 検体を取り、試料とした (Table 3-1)。また、参考とするため民族薬物資料館所蔵の生薬標本 1 点を加えた。

### B. 3. 2. 実験方法

#### 1.1) データベース登録遺伝子情報の検索

NCBI で“*Alisma*”をキーワードに検索を行い、*Alisma* 属植物の主に種間識別に関する登録遺伝子情報を抽出した。

#### 1.2) ITS 領域の塩基配列の解析

試料の一部を削り、約 100 mg を steal beads 数粒とともに 2 ml チューブに入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 1 時間冷凍した。TissueLyser (Qiagen, Germany) で 30/秒、2 分 30 秒間振動させ、試料を粉末にした。Steal beads を取り除き、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。その後、抽出液 2  $\mu\text{L}$  を取り、1% アガロースゲルで電気泳動を行い、得られた全 DNA の状態を確認した。ITS1-5.8S-ITS2 の全領域を 2 分割し、ITS1 領域と 5.8S rRNA 遺伝子領域の一部はプライマーセット ITS-1F と In 18S-25S-3'R を用いて、また 5.8S rRNA 遺伝子領域の一部と ITS2 領域はプライマーセット In 18S-25S-5'F と 18S-25S-3'R を用いて、全 DNA を鋳型として PCR 法で増幅した。PCR 反応には、KOD-FX NEO DNA polymerase (東洋紡社) を用いた。反応条件は、ホットスタート  $94^{\circ}\text{C}$  5 分、続いて熱変性  $94^{\circ}\text{C}$  30 秒、アニーリング  $52^{\circ}\text{C}$  30 秒、伸長反応  $68^{\circ}\text{C}$

50 秒の条件を 35 サイクル行い、最後に 68°C 10 分で終了した。

得られた PCR 産物のうち 2 µL について 1% アガロースゲル電気泳動を行い、増幅産物を確認した。その残りを Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社, USA) で精製し、Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit 3.1 (Applied Biosystems, U.S.A.) でシークエンシング反応を行った。反応条件は、ホットスタート 96°C 1 分、続いて熱変性 96°C 10 秒、アニーリング 50°C 5 秒、伸長反応 60°C 4 分の条件を 25 サイクル行った。反応終了後、BigDye X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) を用いて精製し、上澄み液を MicroAmp Optical 96Well Reaction Plate に移し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で、塩基配列を決定した。

増幅及びシークエンシング反応に使用したプライマーの位置及び配列はボタンピと同様 (Fig. 2-1)。

### C. 3. 研究結果

#### 1.1) データベース登録遺伝子情報の検索

NCBI 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 (Fig. 3-1, Table 3-2 ; 2012 年 11 月時点)。

*Alisma orientale* については 7 件の登録があり、核 ITS 領域が 6 件 (AY519469, DQ339080, DQ016540, DQ016541, AB685329, AM777848)、葉緑体 *trnL* 遺伝子が 1 件 (DQ354899) であった。また、*A. plantago-aquatica* については 91 件の登録があり、そのうち ITS 領域は 17 件、*trnL* 遺伝子は 4 件であった。その他、ヘラオモダカ *A. canaliculatum* が 11 件 (ITS 領域 2 件: DQ339081, DQ468388)、*A. gramineum* が 17 件、*A. lanceolatum* と *A. triviale* が各 10 件、*A. nanum* が 5 件、*A. juzepczukii*, *A. subcordatum*, *A. rariflorum* 及び *A. wahlenbergii* が各 2 件の登録があった。

#### 1.2) ITS 領域の塩基配列

Li ら<sup>1)</sup>の報告によれば、ITS 配列の上流から 37 番目及び 583 番目の塩基の差異により、*A. orientale* と *A. plantago-aquatica* は区別できる。*A. orientale* ではこれら 2 か所が Thymine (T) と Adenine (A) である (タイプ I) が、*A. plantago-aquatica* では Cytisine (C) と T である (タイプ II)。GenBank に登録されている 2 種の ITS 配列を比較すると、両種ともに種内多型があることがうかがえるが、多数の登録は Li らの報告と一致する (Table 3-3)。

今回解析したタクシャ 28 市場品のうち 19 市場品について、ITS 領域の全領域または部分領域の塩基配列を解析できた (一部の市場品では ITS1 領域のみ)。塩基配列には 2 タイプが認められ、2 市場品はタイプ I の配列、17 市場品はタイプ II の配列を示した。

Li らの報告を含め、GenBank の登録情報によれば、タイプ I の配列を示した江西省産の 2 市場品 (NIB-363, 364) は *A. orientale* であり、一方タイプ II の配列を示した 17 市場品は *A. plantago-aquatica* であるという結果であった。後者には四川省産タクシャ 14 市場品も含まれる。なお、参考のために検討した民族薬物資料館保有の四川省産タクシャ大阪市場品 (2008 年) はタイプ I の配列を示した。

### D. 3. 考察

GenBank に登録されている *A. orientale* のうち、タイプ I ではなくタイプ II の配列である DQ339080 は日本産の *A. orientale* を材料にしている。福田ら<sup>2)</sup>もタイプ II の配列を *A. orientale* の配列として報告している。また、*A. orientale* と *A. plantago-aquatica* は近縁で、花の大きさが区別点であるとされるが、差異が認められない系統があるとも報告している<sup>3)</sup>。一方、植物分類学では、*A. orientale* は *A. plantago-aquatica* L. subsp. *orientale* (Samuelsson) Samuelsson のシノニムであるとされている。適切な材料の同定とともに、*A. plantago-aquatica* と *A. plantago-aquatica* subsp. *orientale* の ITS 領域の種内多型について

は、今後検討を要する。

中国産のタクシャには、福建省や江西省を産地とする「建沢」と、四川省等を産地とする「川沢」がある。今回の市場品では、江西省産タクシャがタイプⅠ、福建省産タクシャがタイプⅡ、四川省産タクシャがタイプⅡの配列を示し、一方、資料館保有の四川省タクシャはタイプⅠの配列を示した。このように、今回の結果と建沢・川沢の別には関連が認められなかった。

### E.3. 結論

タクシャ 19 市場品の ITS 領域の塩基配列には 2 タイプが認められ、江西省産の 2 市場品はタイプⅠの配列、四川省産を含む 17 市場品はタイプⅡの配列を示した。GenBank の登録情報によれば、*A. orientale* はタイプⅠの配列、*A. plantago-aquatica* はタイプⅡの配列を示すことから、市場品の大半が *A. plantago-aquatica* であるという結果となり、定説と異なっていた。今後、植物学的に正しく同定された 2 種の多検体を用いて、ITS 領域の種内多型を検討することが不可欠である。

### F.3. 参考文献

- 1) Li X. X., Ding X. Y., Chu B. H., Ding G., Gu S., Qian L., Wang Y., Zhou Q.: Molecular authentication of *Alisma orientale* by PCR-RFLP and ARMS. *Planta Medica*, 73: 67-70, 2007.
- 2) 福田達男、伊吹直登、渡辺裕文、細川敬三、菱田敦之、柴田敏郎：タクシャの基原植物サジオモダカとその類縁植物について、日本生薬学会第 47 回年会（東京）講演要旨集、p.158 (2000).
- 3) 福田達男、石川寛、小林義典、石井邦雄、鈴木幸子、北川重美：タクシャの基原植物サジオモダカとその類縁植物の形態について、日本薬学会第 129 年会（京都）講演要旨集、2 号 p.157 (2009).

## 4. ハンゲ（合田、丸山）

### A.4. 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、カラスビシヤ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.4.1. 実験材料

本研究に使用された試料の詳細を Table 4-1 にまとめた。

#### B.4.2. 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  $\mu$ 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。

#### C.4. 研究結果

##### 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 4-2 及び Fig. 4-1 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 4-3 及び Fig. 4-2 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. 4. 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 4-2)。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 4-2) 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. 4. 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。

## 5. カッコン（合田、丸山）

#### A. 5. 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<sup>1)</sup>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. 5. 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 5-1 にまとめた。

#### B. 5. 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  $\mu$ 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) ITS2 領域の塩基配列解析

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 CAC AAT AC-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.5. 研究結果

### 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 5-2 及び Fig. 5-1 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. 5-1 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 領域のジェノタイプピング

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、ジェノタイプピング解析を行った。その結果を Table 5-1 に示すとともに、electropherogram を Fig. 5-2 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. 5-3 に示した。Fig. 5-2 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.5. 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プピング解析では、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. 5-4 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. 5. 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. 5. 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.

## 6. ゴシツ (河野)

### A. 6. 研究目的

生薬ゴシツ及びその基原植物を含む *Achyranthes* 属植物の遺伝子鑑別に関する情報について報告する。

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/zhongyaochai/> 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

### B. 6. 1. 実験材料

#### 1.1) 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 Table 6-1 のとおり。

#### 1.2) *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)。

#### 1.3) 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

研究中で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)。

## B.6.2. 研究方法

### 1.1) 生薬ゴシツの遺伝子鑑別に関する文献の収集

UBMED ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed))または、Google Scholar ([scholar.google.co.jp/](http://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。

### 1.2) 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。

### 2.1) 生薬ゴシツからのゲノム DNA 調製及び PCR 増幅

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。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50µL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、アニーリング 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。

### 2.1) 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

生薬からの 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。

### 3) 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 µL 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 µL 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 µL の AE バッファーで溶出し、その 1 µL を PCR に使用した。

#### 4) 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 1µl, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 µl each, genome DNA 1 µl (reaction volume: 50µl)

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* DH5α 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 12.5µl, primer sense & antisense (100 pmol) 0.25 µl each, suspend *E. coli* colony (reaction volume: 25 µl)

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。

#### 5) 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 と少々長いため、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'-AAAGATCTAGATTTTCGTA AACAACATAGAGGAAGAA-3'

B-primer: 5'-ATCTGCAGCATTTAAAAGGGTCT GAGGTTGAATCAT-3'

#### 6) 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'-GGAAGTAAAAG TCGTAACAAGG-3'