

ITS4(antisense-primer):5'-TCCTCCGCTTATTGAT  
ATGC-3'

#### 7) 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'-TTACGAGGAGCTCTAGGAA  
CTCTGAATAGTTGTTTG-3'  
atpA-B:5'-GCCATTACTTCATCAAGACCGTGA  
ATACGAGCAATGCC-3'

#### 8) 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'-ACTCGCACACACTCCCTTTC  
C-3'

atpHr:5'-GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT-3'

#### 9) 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)

### C. 6. 研究結果

#### 1.1) 文献・データベース調査結果

生薬の遺伝子鑑別全般 (文献 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 F.文献の項に記した。

#### 1.2) 遺伝情報検索結果

DDBJ において登録配列を検索し、遺伝子鑑別関連の登録データを抽出したものを Table 6-2 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。

#### 2) 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。

#### 3) 核リボソーマル 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つた。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。

#### 4) 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。

#### 5) 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。

#### D.6. 考察

ゴシツについては、核リボソーマル 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。

#### E.6. 結論

ゴシツについては、核リボソーマル 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。

#### F.6. 文献

1) Nakamura I., Kameya N., Kato Y., Yamanaka S., Jomori H., and Sato Y.: A Proposal for Identifying the Short ID Sequence Which Addresses the Plastid Subtype of Higher Plants. *Breeding Sci.*, 47: 385-388,

1997.

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

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

4) Ji Y. L.: [Review] DNA Molecular Marker and Its Applications in Medicinal Plants. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008-04, 2008.

DNA 分子マーカーと薬用植物への応用

5) Ming L.I., Cao H., But P. P. H., P. Shaw C.: [Review] Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *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

6) Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, et al.: Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*, 5(1): e8613, 2010.

DOI: 10.1371/journal.pone.0008613

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. 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)

7) Cuenoud P., Savolainen V., Lars W., Chatrou L. W., Powell M., Grayer R. J. and Chase M. W.: Molecular phylogenetics of *Caryophyllales* based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany*, 89: 132-144, 2002.

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

8) Hishida A. (National Inst. Health Sciences, JPN):

Development of health enhancing and prophylactic drugs. Differentiation of plants useful as galenicals by DNA sequence and SNPs. 若手研究者奨励研究総合報告書平成 13-15 年度, 83-87, 2004.

DNA 配列及び SNPs を用いた生薬として有用な植物の識別

(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)

9) Wang S. M., Liang S. W., Zhou K. Y., Liu Z. Q., Feng W. S., Wu M. X.: Ribosomal rDNA ITS sequence analysis of root of *Achyranthes bidentata*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 35: 559-562, 2004. (in Chinese) DOI: CNKI:SUN:ZCYO.0.2004-05-035

*Achyranthes bidentata* 根のリボソーマル DNA ITS 配列の解析

(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。

10) Lu K. T., Cheng H. Y., Lo C. F., Chang H. C., Lin J. H.: Discriminating between *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* in Chinese Medicine Preparations by Nested PCR and DNA Sequencing Methods. *Planta Med*, 73: 1322-1326, 2007. DOI: 10.1055/s-2007-990219

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

(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)

11) Zheng X. Z., Guo B. L., Yan Y. N.: Study on the genetic relationship between Chinese and Korean medicinal materials of niuxi by the method of RAPD. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 27: 421-423, 2002. PMID: 12774630 [Article in Chinese]

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

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

## 7. ゴシユユ (河野)

### A. 7. 研究目的

生薬ゴシユユ及びその基原植物を含む *Euodia* (*Evodia*, *Tetradium*) 属植物の遺伝子鑑別に関する情報について報告する。

生薬ゴシユユ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。」

### B. 7. 1. 実験材料

#### 1.1) 供試生薬試料

本研究に供した生薬ゴシユユの市場流通品モデル試料は Table 7-1 のとおり。

#### 1.2) *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ユユ-1♀ (g1)、同ホンゴシユユ-6 (g2)、同コホクゴシユユ-4 (g3)、同コホクゴシユユ-5 (g4)、同ゴシユユ-1 (g5)、同ゴシユユ-2 (g6)。

### B. 7. 2. 研究方法

1) 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。

2) 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)

### C. 7. 研究結果

1) 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 Table 7-2 にまとめた。

2) 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 (Figs. 7-1, 7-2)。

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 (Fig. 7-3)、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、生薬ゴシュ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 ruticarpum* 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。

#### D. 7. 考察

コホクゴシュユ (*Tetradium hupehensis*) は生薬ゴシュ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ュユ、ホンゴシュ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、コホクゴシュユと他の *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、遺伝子情報の整備により、付着している生物種の特定も可能になるとと思われる。

#### E. 7. 結論

ゴシュユについては、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、いずれも生薬ゴシュユの基原植物として規定されている *Tetradium ruticarpum* 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。

## 8. チンピ (河野)

#### A. 8. 研究目的

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。

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。」

### B.8.1. 実験材料

#### 1.1) 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 Table 8-1 のとおり。

#### 1.2) *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; : 茨城県久慈郡太子町 (121101 採集)

### B.8.2. 研究方法

#### 1) 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。

#### 2.1) 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。

#### 2.2) 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。

#### 2.3) 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 (Fig. 8-3) 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 Fig. 8-3 のとおりである。

#### 2.4) 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、Fig. 8-4 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.

2.5) 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、これを鋳型として、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。

2.6) 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. 8. 研究結果

1) 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

Fig. 8-1 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。

2) チンピモデル生薬 ITS 領域の PCR 増幅及び塩基配列解析

2-1) 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、Fig. 8-1)。

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 (Fig. 8-1)。

2-2) 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。

2-3) 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。

3) 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)。

4) 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 (Fig. 8-7)。

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 (Fig. 8-8)。(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.8. 考察

##### 1) 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。

##### 2) 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.8. 結論

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。

### 9. キョウニン (山路)

#### A.9. 研究目的

第十六改正日本薬局方(2011)にはキョウニン基原植物としてホンアンズ *Prunus armeniaca* Linné, アンズ *Prunus armeniaca* Linné var. *ansu* Maximowicz 又は *Prunus sibirica* Linné (*Rosaceae*)の種子と規定されている。「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、国内に流通する生薬キョウニンの遺伝子情報を整備することを目的に、収集された27サンプルについて調査した。キョウニンの遺伝子鑑別においては、Yamaji et al. (2009)が葉緑体DNA中の*rpl16* intron領域を比較することにより鑑別が可能であることが報告している<sup>1)</sup>。本研究でも同領域の調査を行い、同先行研究で示されたキョウニン基原種・近縁種の配列と比較して基原鑑別を行った。

#### B.9.1. 実験材料

キョウニン27サンプルを試料とした(Table 9-1)。

#### B.9.2. 実験方法

##### 1) DNAの抽出

各サンプルより1粒を選び、約200 µgを切り出してDNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて

そのプロトコルに従って DNA を抽出した。抽出した DNA は AE Buffer 200 $\mu$ l に溶解した。なお、DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen)を用いての DNA 抽出は核酸抽出精製装置 QIAcube (Qiagen) を使用し、プロトコルに従って行った。

DNA 抽出前の調査サンプルを Fig. 9-1 に示した。

なお、最初に選んだ 1 粒において PCR 増幅が見られなかったサンプルについては新たに 3 粒を選び、同様に解析を行った。

## 2) PCR

*rpl16* intron 領域の増幅に用いるプライマーは Nishizawa and Watano (2000) で発表された *rpl16*/F (5'-GTT TCT TCT CAT CCA GCT CC-3') および *rpl16*/R (5'-GAA AGA GTC AAT ATT CGC CC-3') を用いた<sup>2)</sup>。対象領域をサーマルサイクラ GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems) もしくは Tprofessional Thermocycler (Biometra) にて PCR 増幅した。反応液は 10 $\times$ Ex-Buffer (TaKaRa) 5  $\mu$ L, dNTP mix (TaKaRa) 5  $\mu$ L, forward primer (*rpl16*/F; 10pmol/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, reverse primer (*rpl16*/R; 10pmol/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, templateDNA 1.25  $\mu$ L, Ex-Taq (TaKaRa) 0.25  $\mu$ L, DMSO 5  $\mu$ L, D.D.W. 31.5  $\mu$ L, 反応サイクルは(94 $^{\circ}$ C, 1 min; 48 $^{\circ}$ C, 2 min; 72 $^{\circ}$ C, 3 min) $\times$  30 cycles, (72 $^{\circ}$ C, 7 min) $\times$  1 cycle とした。

上記プロトコルで PCR 増幅が見られなかったサンプルについては、本研究で新たに設計したより短いフラグメントが得られるスペシフィックプライマーを reverse primer として用いた (RPL16R-b : 5'-GAT TCA TTA TAA CGA TAA CG-3')。

## 3) 精製

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

## 4) DNA シーケンス

精製産物の塩基配列は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver.1.1 と Applied Biosystems<sup>®</sup> 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて決定した。シーケンスの際には PCR に用いたプライマーを使用し、両端より forward, reverse の両方を比較して配列を決定した。

## C.9. 研究結果

全てのサンプルで、*rpl16* intron 部分領域の塩基配列の決定に成功した。PCR 増幅で RPL16R-b を用いたサンプルで再試験した個体も合わせると、1 サンプルにつき調査した個体数は 1~3 個体となり、調査結果が同一の場合は、1 サンプルにつき 1 個体の結果のみを採用した。なお、NIB-0520 では 2 検体から結果が得られたが、互いに異なるジェノタイプが確認され、それぞれ *Prunus armeniaca* type1 と *P. sibirica* と相同のジェノタイプであった。つまり、1 サンプルの中に異なる基原種が混在していることを確認した。これら 2 個体の配列は NIB-0520-1, NIB-0520-2 と別々に記した (Fig. 9-2)。

それぞれのサンプルについて、先行研究<sup>1)</sup>で報告されている配列との類似性に基づき基原種の鑑定を試みたところ、調査したサンプルは 2 系統に分けられ、それぞれ *P. armeniaca* と *P. sibirica* と鑑定された (Table 9-1)。なお、先行研究<sup>1)</sup>においては同領域においてホンアンズ *Prunus armeniaca* とアンズ *Prunus armeniaca* var. *ansu* の区別が出来ないことが報告されており、本研究でも *P. armeniaca* と鑑定されたサンプルの変種レベルの鑑定は出来ないと判断した。

## D.9. 考察

本研究の結果から、国内に流通する生薬キョウニンには、*Prunus armeniaca* と *P. sibirica* に由来するものの両方があることが追認された。またこれ以外の種に由来するものは見出されな

った。

本研究では、先行研究<sup>1)</sup>で用いられた方法と新規に開発したプライマーを組み合わせることにより、収集された全27サンプルの解析に成功した。従って、本研究で用いた方法で葉緑体DNA中の*rpl16* intron 領域の塩基配列を調査することは、様々な生薬キョウニンの基原鑑別に有効といえる。

#### E.9. 結論

国内に流通する生薬キョウニンの遺伝子情報を整備することを目的に、収集された27サンプルの葉緑体DNA中の*rpl16* intron 領域の塩基配列を調査した。得られた配列と先行研究で得られた同領域におけるキョウニン基原種・近縁種の配列との類似性に基づき基原種の鑑定を試みたところ、調査したサンプルは2系統に分けられ、それぞれ *Prunus armeniaca* Linné と *Prunus sibirica* Linné (*Rosaceae*) と鑑定された。いずれも日局キョウニン収載種である。また、1ロットの中にこれら異なる基原種が混在していることも確認した。

#### F.9. 参考文献

1) Yamaji H., Kondo K., Miki E., Iketani H., Yamaguchi M. and Takeda O.: Discrimination of Xingren from seeds of *Prunus* sect. *Armeniaca* species (*Rosaceae*) by partial *rpl16* intron sequences of cpDNA, and the botanical origin of Xingrens in markets in Japan. *J. Jpn. Bot.*, 84: 85-91, 2009.

2) Nishizawa T. and Watano Y.: Primer pairs suitable for PCR-SSCP analysis of chloroplast DNA in angiosperms. *J. Phytogeogr. Taxon*, 48: 63-66, 2000.

### 10. ボウイ (山路)

#### A.10. 研究目的

第十六改正日本薬局方 (2011) にはボウイ (防已) の基原植物としてオオツヅラフジ *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehder et E.H.Wilson

(*Menispermaceae*) のみが収載されている。

*Sinomenium acutum* に属するツヅラフジ科に関しては、Hong et al. (2001)<sup>1)</sup>による核リボソームDNA中のITS領域塩基配列を用いた系統学的研究があり、同領域を用いることにより、オオツヅラフジと近縁種を区別できることが示されている<sup>1)</sup>。しかし同研究では1種につき1サンプルのみで解析を行っているため、変異サイトの安定性などは不明であった。Sano et al. (2010)<sup>2)</sup>は *S. acutum* の種内変異の幅が近縁種と明瞭に区別できる範囲にあるのか否かを検討し、DNA鑑別技術を確立するために、さらに多くの日本・中国のサンプルについて、同じくITS領域の調査を行った<sup>2)</sup>。その結果、*S. acutum* と近縁種の間には10サイト以上の安定した塩基置換があり、明瞭に区別されることが確認された。また、*S. acutum* 種内からは7サイトで種内変異が確認され、5つのジェノタイプ (J1, J2, C1, C2, C3) に分類された。このうち2ジェノタイプ (J1, J2) が日本に固有、3ジェノタイプ (C1, C2, C3) が中国に固有であり、日本と中国の *S. acutum* は互いに区別可能であることが示唆された。

本研究では、「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、国内に流通する生薬ボウイの遺伝子情報を整備することを目的に、収集された30サンプルについてITS領域の塩基配列を調査した。併せて先行研究で報告されている配列と比較して基原鑑別を行い、変異の調査を行うと共に、遺伝子鑑別技術の最適化と、その有効性の確認を行った。

#### B.10.1. 実験材料

ボウイ30サンプルを試料とした (Fig. 10-1, Table 10-1)。

#### B.10.2. 実験方法

##### 1) DNAの抽出

収集された30サンプルそれぞれから、約200 µgを採取し、DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAはAE Buffer 200 µLに溶解した。なお、DNeasy<sup>®</sup> Plant

Mini Kit (Qiagen)を用いての DNA 抽出は核酸抽出精製装置 QIAcube (Qiagen) を使用し、プロトコルに従って行った。

## 2) PCR

PCR 1 : ユニバーサルプライマーによる増幅  
ITS1 と ITS2 を別々に増幅した。使用機器はサーマルサイクラ GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems) もしくは Tprofessional Thermocycler (Biometra)である。使用するプライマーセットは White et al. (1990)で報告されているもので、ITS1 領域は forward primer: ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'), reverse primer: ITS2(5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'), ITS2 領域は forward primer: ITS3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'), reverse primer: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')である。

PCR に用いた反応液の組成は、10×Gene Taq Buffer (Nippon Gene) 5 μL, dNTP mix (Nippon Gene) (2.5mM) 4 μL, forward primer (10pmol/μL) 2.5 μL, reverse primer (10pmol/μL) 2.5 μL, template DNA 2.5 μL, Gene Taq (Nippon Gene) 0.25 μL, D.D.W.28.25 μL, DMSO 5 μL である。

PCR 反応サイクルは以下の通り。

(94°C, 4min) × 1 cycle, (95°C, 30sec; 70°C, 15sec; 72°C, 15sec) × 3 cycles, (95°C, 30sec; 66°C, 15sec; 72°C, 15sec) × 3 cycles, (95°C, 30sec; 62°C, 15sec; 72°C, 15sec) × 3 cycles, (95°C, 30sec; 58°C, 15sec; 72°C, 15sec) × 3 cycles, (95°C, 30sec; 54°C, 15sec; 72°C, 15sec) × 3 cycles, (95°C, 30sec; 48°C, 1.5min; 72°C, 2.5min) × 20 cycles, and (72°C, 7min.) × 1 cycle.

PCR2 : PCR1 で増幅が見られなかったか、混入した菌類由来の配列が決定されたサンプルについては、既知の *S. acutum*, Hong et al. (2001)<sup>1)</sup>及び Blast 解析で *S. acutum* に最も近縁であることが明らかとなっているコウモリカズラ *Menispermum dauricum* DC.の ITS 領域の配列を

参考とし、新たに設計した以下のプライマーを用いた。ITS1 領域は forward primer: BOUYI-ITS1-F2 (5'-CCT GCA AAG CAG AAT GAC CAG-3'), reverse primer: BOUYI-ITS1-R1 (5'-GCC GAG ATA TCC GTT GCC GAG-3'), ITS2 領域は forward primer: BOUYI-ITS2-F2 (5'-GGT GTG AAT TGC AGA ATC CCG-3'), reverse primer: BOUYI-ITS2- R2 (5'-CTG ACC TGG GGT CGC ATG G-3')である。

PCR に用いた反応液の組成は、10×Ex-Buffer (TaKaRa) 5 μL, dNTP mix (TaKaRa) 4 μL, forward primer (10pmol/μL) 2.5 μL, reverse primer (10pmol/μL) 2.5 μL, templateDNA 1.25 μL, Ex-Taq (TaKaRa) 0.25 μL, D.D.W. 29.5 μL, DMSO 5 μL とし、反応サイクルは(94°C, 1min; 45°C, 1min; 72°C, 2 min) × 45 cycles, (72°C, 7 min) × 1 cycle とした。

## 3) 精製

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

## 4) DNA シーケンス

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

## C.10. 研究結果

全てのサンプルで、核リボソーム DNA 中の ITS 全領域またはその一部の塩基配列の決定に成功した。塩基配列の詳細は Figs. 10-2, 10-3 に示す。

得られた配列は先行研究で示された5つのジェノタイプのいずれかと同一もしくはほぼ同一であり、*M. dauricum* とは18サイトで区別された。また、粉防己の近縁種 *Stephania succifera* H. S. Lo & Y. Tsoong (AY017403) との間には、アライメントが不能な程大きな違いが見られた。従って、調査した30サンプルは全て *S. acutum* を基原植物とすると鑑定される。

ジェノタイプ J1 は2サンプル、J2 は12サンプル、C1 は5サンプルで見られた。J1 と J2 で差異のあるサイトにおいて2種類の塩基を併せ持つジェノタイプ J1+J2 が10サンプルで見られたが、同ジェノタイプは本研究で新たに見出されたものである。なお、本研究では3サンプルより固有の不完全な塩基置換が見出されたが、固有のジェノタイプとは判断しなかった。

先行研究では、日本と中国の *S. acutum* は互いに区別可能であることが示唆されたが、今回日本産からもジェノタイプ C1 が3サンプルで見出された。従って、両国の *S. acutum* は同領域では区別できない。

#### D.10. 考察

本研究で調査した生薬ボウイ全30サンプルは第十六改正日本薬局方収載「ボウイ」の基原植物であるオオツヅラフジ *Sinomenium acutum* Rehder et Wilson (*Menispermaceae*) と鑑定され、その他の種を基原とするものは見られなかった。

また、本研究では、新規に開発したプライマーを用いることにより、収集された全30サンプルの解析に成功し、鑑別に必要な十分な情報を得ることが出来た。従って、本研究で用いた方法で核リボソーム DNA 中の ITS 領域の塩基配列を調査することは、様々な生薬ボウイの基原鑑別に有効といえる。

#### E.10. 結論

国内に流通する生薬ボウイ（防己）の遺伝子情報を整備することを目的に、収集された30サンプルの核リボソーム DNA 中の ITS 領域の

塩基配列を調査した。得られた配列と先行研究で報告されている日局ボウイ基原植物オオツヅラフジ *Sinomenium acutum*、近縁他種の配列とを比較して基原鑑定を試みたところ、調査した30サンプルは全て *S. acutum* であり、近縁他種と明瞭に区別された。また、全サンプルの解析に成功したことから、新たに設計したプライマーなど、本研究で開発した方法は、ボウイの遺伝子鑑別に有効であると考えられる。

#### F.10. 参考文献

- 1) Hong Y. P., Chen Z. D., and Lu A. M.: Phylogeny of the tribe *Menispermaceae* (*Menispermaceae*) reconstructed by ITS sequence data. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 39: 97-104, 2001.
- 2) Sano T., Matsumura I., Nakamura R., Yamaji H., Hashimoto K., Takeda O., Kiuchi F., Takeda T.: Genetic and chemical comparison of Boi (*Sinomeni Caulis et Rhizoma*) and Seifuto (*Caulis Sinomenii*). *J. Nat. Med.*, 64: 257-265, 2010.
- 3) White T. J., Bruns T., Lee S., and Taylor, J.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Rrotocols, A Guide to Methods and Applications* (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., and White T. J., Eds.), pp. 315 - 322. Academic Press, San Diego, 1990.

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 1) 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

なし

G 知的財産権の出願、登録状況  
なし

H 健康危険情報  
なし

## 11. バクモンドウ (伊藤)

### A.11. 研究目的

バクモンドウはジャノヒゲ (*Ophiopogon japonicus*) の根の膨大部を基原とする生薬で、麦門冬湯をはじめさまざまな漢方処方に配合される。基原植物のジャノヒゲに近縁な植物にヤブラン (*Liriope* sp.) があるが、このものは日本ではバクモンドウの基原としては認められていない。しかし、韓国や中国ではヤブラン属植物を基原とする生薬が流通しており、またジャノヒゲ属とヤブラン属の両者の根の膨大部の形態は非常に類似していることから、輸入されるバクモンドウにヤブラン属植物由来の素材が混入する可能性がある。そこで、ジャノヒゲとヤブランの根の膨大部を材料として、PCR と制限酵素処理を組み合わせた PCR-RFLP 法により両者を区別する方法を開発した。さらに、ジャノヒゲにヤブランが混入された際に、本方法によりどの程度まで検出可能であるかを検証した。

### B.11.1. 実験材料

本研究に使用した試料の詳細を Table 11-1 にまとめた。Table 11-1 の試料中、試料 No. 1 と No. 7 は中国にて採集された乾燥葉サンプル、No. 2 から No. 6 は京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園に植栽しているもの、あるいは日本各地から採集した各新鮮葉サンプルであり、試料 No. 8 から No. 27 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。

### B.11.2. 実験方法

### 2.1. DNA 抽出方法の検討

試料を剪定ばさみにより細切した後 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit により以下のように DNA を抽出した。葉、生薬とも 100 mg を用い、キットに付属のプロトコルを以下のように変更して利用した。

- 1) 液体窒素下でサンプルを粉砕する。
  - 2) 粉砕したサンプル 100 mg を 1.5 mL チューブに移し、AP1 400  $\mu$ L と RNaseA 4  $\mu$ L を加えよく攪拌する。
  - 3) 65°C で 10 分加温。加温中 2~3 度取り出して攪拌する。
  - 4) 15,000 rpm で 5 分遠心。
  - 5) 上清をとり、AP2 130  $\mu$ L を加え、氷上で 5 分間保持。
  - 6) 15,000 rpm で 5 分遠心し、上清を shredder column に入れ、15,000 rpm で 2 分遠心。
  - 7) 1.5 mL チューブに溶出画分を移し、AP3 225  $\mu$ L とエタノール 450  $\mu$ L を加え転倒混和。
  - 8) DNeasy column に 650  $\mu$ L の 7) を入れ、8,000 rpm で 1 分遠心し、溶出液を捨てる。
  - 9) 残りの 7) を同じ DNeasy column に入れ、8) を繰り返す (容量の都合で操作を 2 回に分けている)。
  - 10) 2 mL チューブにカラムを移し、エタノールで希釈した AW 500  $\mu$ L を入れ、8,000 rpm で 30 秒遠心し、溶出液を捨てる。
  - 11) 同じカラムにもう一度エタノールで希釈した AW 500  $\mu$ L を入れ、8,000 rpm で 30 秒遠心する。
  - 12) 溶出液を捨て、15,000 rpm で 5 分程度遠心、膜を乾燥させる。
  - 13) カラムを 1.5 mL チューブにつけかえ、50°C に温めた AE 100  $\mu$ L 注を膜上に滴下。5 分間保持した後、8,000 rpm で 1 分遠心。
  - 14) 13) を繰り返し、溶出画分を DNA サンプルとする。
- 尚、生薬サンプルについては DNA 抽出効率が悪いことを考慮し、DNA 濃度を上げるため、手順 13), 14) ともに AE 50  $\mu$ L とした。

## 2.2. PCR による *rbcL* 領域の増幅と制限酵素処理

抽出した DNA サンプルを用い、ITS 領域、および *rbcL* 領域を PCR により増幅した。

	[ $\mu$ L]
DNA template	3.0
10 $\times$ buffer	3.0
dNTPs	3.0
Af-2( $\rightarrow$ )	0.4
Ar-1( $\leftarrow$ )	0.4
BTaq	0.8
DMSO	0.4
DW	19.0
Total	30.0

(上記は *rbcL* 領域の場合)

※ただし、DNA template の量は 2) で得られた DNA サンプルの濃度により適宜調節した。

94°C	3:00	
↓		
94°C	0:30	} 40cycle
48°C	0:30	
72°C	0:40	
↓		
72°C	3:00	
4°C	99:99	

得られた PCR 増幅産物 30  $\mu$ L のうち 10  $\mu$ L を non-digest 対照試料として取り分けておき、残り 20  $\mu$ L を NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (TAKARA) を用いて精製し、これを制限酵素 *Hinc* II (NEB 社製) を用いて消化した。反応液の組成は PCR 産物 10  $\mu$ L、*Hinc* II 2.5 U とし、全量が 11.5  $\mu$ L となるように調製した。

## 2.3. ジャノヒゲ属試料とヤブラン属試料の混合

### 試料を用いた検出限界の検討

ジャノヒゲ属、ヤブラン属の塊茎をそれぞれ 4°C で 5 時間凍結し、-23°C で 24 時間凍結乾燥させたのち、乳鉢と乳棒ですりつぶして粉末とした。試料全体に対するヤブラン属植物試料の混合比率を 1, 10, 30, 50, 90, 99% とした混合試料を作成した。総量 80 mg の混合試料から DNA を抽出し、*rbcL* 部分配列を利用 PCR-RFLP 法を用いて、ジャノヒゲ属にヤブラン属が混入している場合の検出限界を検討した。

## C.11. 研究結果

### 1) 抽出 DNA の比較検討

新鮮葉および生薬から抽出した DNA をアガロース電気泳動に供し、質や量について比較検討した (Table 11-1)。

その結果、No.8 ~27 の生薬サンプルについてはかなり抽出効率が低く断片化が進んでいることが明らかとなったが、後に示す通りこれら DNA を鋳型とした PCR は可能であった。

### 2) PCR-RFLP 法の検討

#### 2-1) ITS 領域利用の検討

これまで明らかにされているジャノヒゲ属、ヤブラン属の ITS 領域配列情報から制限酵素による切断部位を予測し、PCR-RFLP 法を試みたが、PCR により増幅されたバンドの大きさが一様でなく、また制限酵素による処理でも予測通りに切断されなかった。そこで増幅断片のクローニングを行い、ジャノヒゲ属の 8 つ、ヤブラン属の 6 つのクローンについて配列を解析した (Fig.11-3)。得られた配列を比較すると、うち 1 つはジャノヒゲ属・ヤブラン属に共通の配列であったが、その他のクローンは同一植物体から得たものであっても大きさや配列は多様であり、相同性も非常に低いことがわかった。

次にジャノヒゲ属特異的プライマー対を 2 組設計し、PCR 増幅バンドの有無を観察することも試みたが、ジャノヒゲ属・ヤブラン属由来のどちらの試料においても、予測される大きさの

増幅バンドが観察され、ITS 領域を利用した鑑別は不可能であった。

## 2-2) *rbcL* 領域を利用した PCR-RFLP 法の検討

PCR により増幅された *rbcL* 部分配列の大きさは、GenBank の配列情報から予測された大きさの 460 bp にほぼ同様な大きさであった。制限酵素 *Hinc* II 処理を行った時、Fig.11-4 に示すようにジャノヒゲ属では DNA 断片は 460 bp のままであったが、ヤブラン属では 1 カ所が切断されて、2 本の断片が見られた。*rbcL* 部分配列において 266 番目の塩基に変異があり、ジャノヒゲ属では G、ヤブラン属では T となっているため、*Hinc* II 処理によってヤブラン属の配列のみが切断を受け、266 bp と 194 bp の断片になったものと考えられた。これは、以前に行われた、ジャノヒゲ属及びヤブラン属の *rbcL* 配列の多型の一部を配列解析によって比較した研究<sup>1)</sup>から予測される結果と一致している。この切断の有無は、新鮮葉と塊根のどちらにおいても観察された。したがって、塊根では葉緑体の存在量が葉に比べて少ないが、葉緑体 DNA の *rbcL* 部分配列を鑑別に利用することは可能であることが示された。

## 2-3) *rbcL* 領域を利用した PCR-RFLP 法を用いた新鮮葉試料および生薬試料についての検討

前述と同様の方法で、中国湖北省および四川省で栽培されているバクモンドウ様植物の地上部 2 検体 (試料 No. 1 湖北省産：地下部は中国国内流通品で現在日本には輸入されていない畑のもの；試料 No. 7 四川省産：中国国内でも流通するが、日本にも輸出されている可能性がある畑のもの)、花や果実の形態から基原の種が明らかとなっている新鮮葉試料 5 検体 (試料 No. 2～6) と、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにて収集された試料 20 検体 (試料 No. 8～27) について、基原の植物種の区別を試みた。結果を Fig. 11-5 および Fig. 11-6 に示す。

日本国内で流通しているバクモンドウ試料はすべて基原の植物種はジャノヒゲ属であると判別された。一方、中国で流通するバクモンドウ様生薬には、基原がジャノヒゲ属ではなく、おそらくヤブラン属であろうと判定されるものがあることが明らかとなった。

## 3) ジャノヒゲ属試料とヤブラン属試料の混合試料を用いた検出限界の検討

ジャノヒゲ属とヤブラン属のそれぞれの試料を粉末にしたものを混合した試料では、ジャノヒゲ属試料中のヤブラン属の割合が 1% の場合、ヤブラン属では切断されて表れる 2 本のバンド (266, 194 bp) を検出することは困難であったが、同割合が 30% 以上の場合には 2 本のバンドを検出することができた。またそれらはヤブラン属の混合割合が多くなるにつれ、よりはっきりと観察された (Fig. 11-7)。一方、10% 混合試料は、同じ実験条件下での検出は難しかったが、PCR のサイクル数を 50 回まで増やしたり、PCR の反応液量を 2 倍に増やして精製したりすることにより、バンドの検出が可能となった。このことから、本方法の検出限界は約 10% であるといえる。しかし、ヤブラン属の混合割合が 50% 以下の試料では、同じ混合試料を用いて繰り返し実験を行った場合、バンドが検出されにくい場合が認められた。本方法では制限酵素による処理を行い、分子量の小くなった DNA 断片を電気泳動により可視化するため、切断されるヤブラン属の *rbcL* 断片が少量で DNA 量が十分でない場合に検出が困難になる。このような不安定さを補い、より正確にヤブラン属の混入を検出するためには、PCR のサイクル数を増やしたり、PCR の反応液量を増やして精製したりするなどの最適化を行い、複数回の試験を行って判断する方がよいと考えられた。

## D.11. 考察

日本の市場品にヤブラン属由来の生薬が混入している可能性は現在のところ低いですが、本方法



を利用することにより、基原鑑別の正確性、すなわち麦門冬の品質の向上および安全性の確保に役立つものと考えられる。また現在、日米欧三薬局方調和検討会議 (PDG) により、薬局方の国際調和が進められており、特に生薬分野において三極の中では日本が先んじている。さらに伝統的に生薬を広く用いてきたアジア地域における生薬の調和活動も行われている中で、本方法は生薬基原の遺伝子による鑑別法の確立にむけての一例となりうるものである。

#### E.11. 結論

バクモンドウの核および葉緑体の遺伝子領域について検討した結果、日本薬局方に定められたバクモンドウの基原植物種である *Ophiopogon japonicus* について、塩基配列を利用した方法でそれ以外の種、特に、中国や韓国ではジャノヒゲ属植物とともに流通している生薬の基原種であるヤブラン属植物と区別するためには、*rbcL* の配列が適していると考えられた。また、この領域を使ったPCR-RFLP法を考案し、日本国内で使用されている生薬試料について本方法を適用したところ、いずれもジャノヒゲ属植物由来であることが確認された。

#### F.11. 参考文献

- 1) Shiba M., Yamaji H., Kondo K., Ichiki H., Sakakibara I., Terabayashi S., Amagaya S., Aburada M., Miyamoto K., *Natural Medicines*, 58(1), 15-21 (2004).

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 1) 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

なし

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

#### I. 健康危険情報

なし



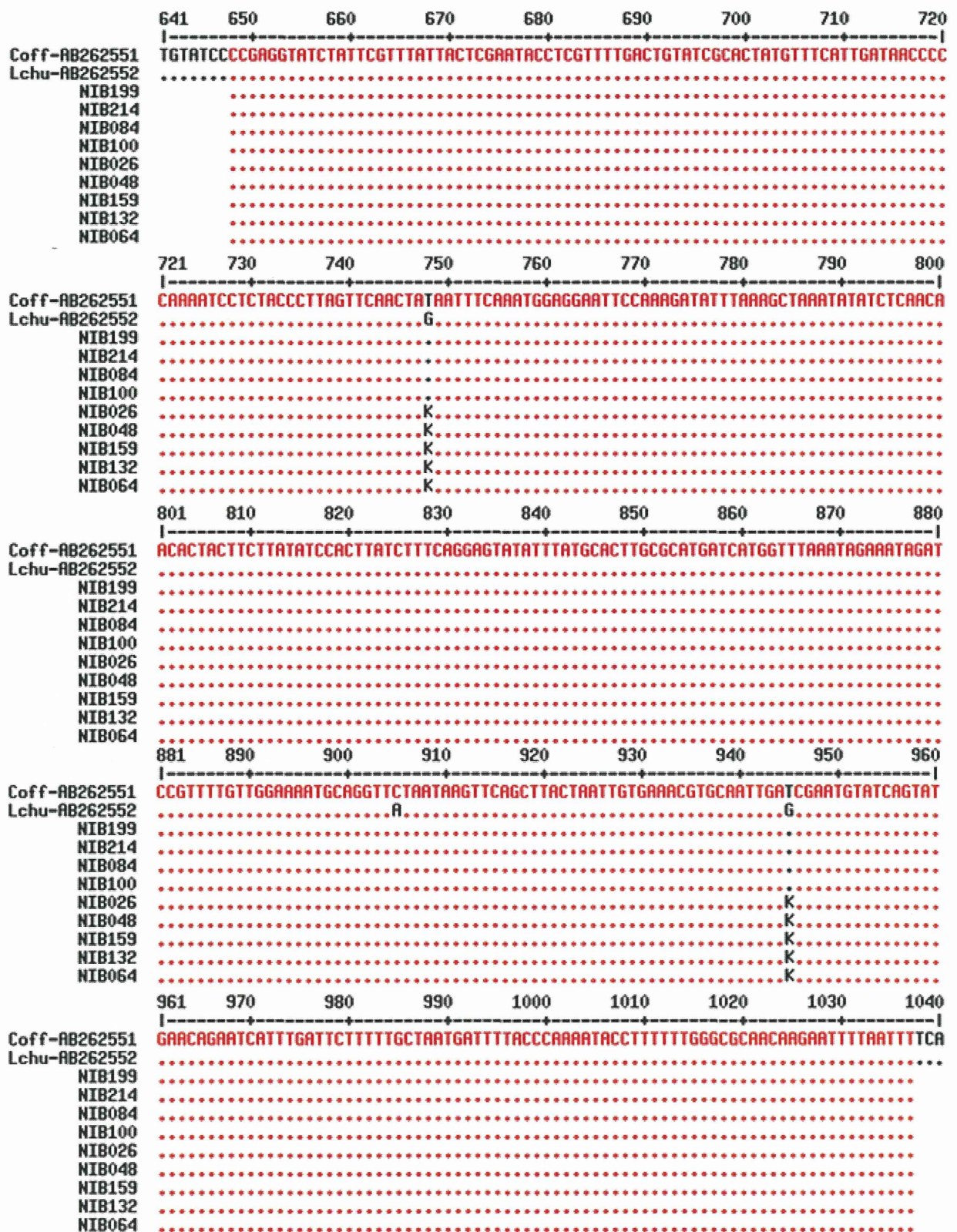


Fig. 1-2 *trnK* 遺伝子の部分配列の比較

Coff-AB262551: *Cnidium officinale* の塩基配列及び GenBank の Accession No.;

Lchu-AB262552: *Ligusticum chuanxiong* の塩基配列及び GenBank の Accession

No.)

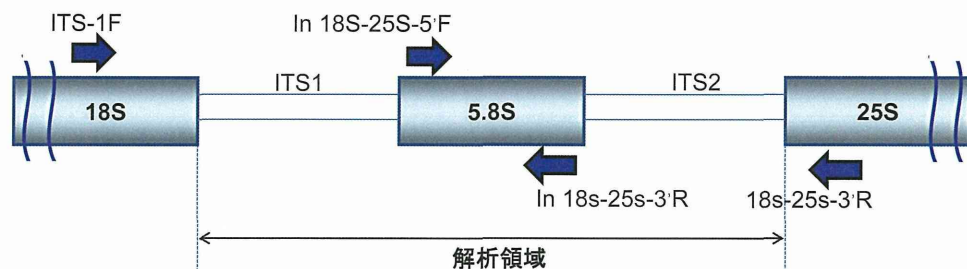
## 2. ボタンピ

Table 2-1 生薬「ボタンピ」の市場品と同定結果

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	備考(等級等)	同定結果
NIB-0275	ボタンピ	中国安徽省銅陵	生	2011年	1級107-42901	<i>Paeonia suffruticosa</i>
NIB-0276	ボタンピ	中国安徽省銅陵	生	2011年	2級107-42902	
NIB-0278	ボタンピ	中国安徽省銅陵	生	2010年	2級107-4034	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0279	ボタンピ	中国安徽省銅陵	皮去	2009年	107-3876	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0281	ボタンピ	中国安徽省銅陵	生	2009年	1級107-38071	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0282	ボタンピ	中国安徽省銅陵	生	2009年	2級107-38072	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0284	ボタンピ	中国安徽省銅陵	生	2008年	2級107-3724	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0286	ボタンピ	中国安徽省銅陵	皮去	2006年	2級107-3189	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0287	ボタンピ	中国安徽省銅陵	生	2006年	2級107-3157	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0438	ボタンピ	中国安徽省	生	2011年		
NIB-0434	ボタンピ	中国安徽省	原形	2010年	刮丹皮、1級	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0277	ボタンピ	中国安徽省	生	2011年	107-4193	
NIB-0280	ボタンピ	中国安徽省	生	2009年	107-3867	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0285	ボタンピ	中国安徽省	生	2008年	107-36511	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0268	ボタンピ	中国安徽省	刻み			<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0641	ボタンピ	中国安徽省	小口切	2011年		<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0283	ボタンピ	中国浙江省	皮去	2008年	107-3748	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0288	ボタンピ	中国浙江省	皮去	2006年	107-3036	
NIB-0417	ボタンピ	中国山東省	原形	2011年	連丹皮、特級	<i>P. suffruticosa</i>
NIB-0730	ボタンピ	中国山東省	原形			

Table 2-2 比較に用いたボタンピと同定結果

TMPW No.	生薬名	産地	形態	入手年月日	入手先	同定結果
2488	牡丹皮	韓国	原形			<i>P. suffruticosa</i>
15351	鳳丹皮	中国安徽省	刻み	1994.8.14	中国銅陵市長江医薬商店	<i>P. suffruticosa</i>



ITS region		
Primer	Sequence (5'→3')	Length (bp)
Forward Primer		
ITS-1F	TCC ACT GAA CCT TAT CAT TTA G	22
In 18S-25S-5'F	TCT CGC ATC GAT GAA GAA CG	20
Reverse Primer		
In 18S-25S-3'R	GAC TCG ATG GTT CAC GGG ATT CT	23
18S-25S-3'R	CCA TGC TTA AAC TCA GCG GGT	21

Fig. 2-1 ボタンピの ITS 領域の遺伝子解析  
 -PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置と塩基配列