

分担研究課題: コンピュータモデリングによる法規制薬物の代謝物予測に関する研究

分担研究者: 出水 庸介 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部第二室 室長

—コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝物予測に関する研究—

研究要旨: 乱用が懸念される違法ドラッグ(合成カンナビノイドなど)を迅速に規制するためには、その有害性を把握し評価することが重要である。本研究では、コンピュータモデリングによる合成カンナビノイドの代謝予測を行うことを目的とした。本年度は、カンナビノイドの特異的受容体であるカンナビノイド受容体(CB1受容体)の立体構造を化学計算により予測した。さらに、モデル構築したCB1受容体とCB1リガンド( $\Delta^8$ -THC, JWH-018)とのドッキングシミュレーションを行い、結合様式の解析を行った。

#### A. 研究目的

近年、カンナビノイド受容体(CB1受容体)に強い活性を示す合成カンナビノイド含有製品(違法ドラッグ, 脱法ハーブ)による健康被害が急増して深刻な社会問題となっている。乱用が懸念される違法ドラッグを迅速に規制するためには、その有害性を把握し評価することが重要である。しかしながら、規制化に伴い、従来流通していた化合物にはない新しいタイプの構造を有する活性未知の化合物が次々と出現し、分析鑑定現場を混乱させている。本研究では、これらの製品から単離・同定される新規カンナビノイド化合物とCB1受容体との結合様式をコンピュータモデリングにより予測し、さらにそれらの化合物代謝構造を予測することで、違法薬物の鑑別法におけるコンピュータシミュレーションの妥当性について検証することを目的とした。本年度は、カンナビノイドの特異的受容体であるCB1受容体の立体構造をホモロジーモデリングにより構築した。さらに、モデル構築したCB1とCB1リガンド( $\Delta^8$ -THC, JWH-018)とのドッキングシミュレーションを行い、結合様式の解析を行った。

#### B. 研究方法

##### (1) CB1受容体のホモロジーモデリング

CB1受容体の立体構造を化学計算により予測した。すなわち、すでにX線結晶構造が明らかとなっているGPCRであるロドプシン(PDB:1F88)をテンプレートとして[1], MOE(Molecular Operating Environment; CCG社)を用いてCB1のホモロジーモデル構築(力場; AMBER12:EHT)を行った。

##### (2) CB1受容体とリガンドとの結合様式解析

Site Finderを用いてモデル構築したCB1受容体のリガンド結合領域を検出し、CB1リガンド(JWH-018および $\Delta^8$ -THC)とのドッキングシミュレーション(力場; MMFF94X)を行うことで、CB1受容体に対するリガンドの結合様式の解析を行った。

#### C. 研究結果

##### (1) CB1受容体のホモロジーモデリング

CB1受容体のモデルを構築するために、CB1受容体のシークエンス(NCBI:NP\_001153731)とテンプレートとして用いたロドプシン(PDB:1F88)シ

ークエンス間のアラインメントを行った結果を Fig.1 に示す. ロドプシンと CB1 受容体のシーケンス間の相同性は約 19%であった. Fig.1 に示す赤いラインは膜貫通領域アノテーションを行ったヘリックス領域を示している. 続いて, アラインメントを行った配列を用いて CB1 受容体のモデリングを行った結果を Fig.2 に示す. モデル構築した CB1 受容体の構造はテンプレートとして用いたロドプシン構造と良い一致を示した.

#### (2)CB1 受容体とリガンドとの結合様式解析

(1)でモデル構築を行った CB1 受容体に対して, Site Finder を用いたリガンド結合領域の検出を行い(Fig.3a), 続いて CB1 リガンド(JWH-018 および  $\Delta^8$ -THC, Fig.3b)とのドッキングシミュレーションを行った. その結果, JWH-018,  $\Delta^8$ -THC 共に, 複数のコンフォメーションで CB1 受容体に結合することが示唆されたが, その中でも Fig.4, 5 に示した2種類の配座が安定構造として得られた.

#### D. 考察

ホモロジーモデル構築した CB1 受容体に対して, CB1 リガンドは複数のコンフォメーションで結合することが示唆された. これは, CB1 受容体のリガンド結合領域に広い疎水性空間が存在するためであると考えられる. その中でも安定構造として得られたのは, JWH-018 および  $\Delta^8$ -THC のアルキル基がタンパク質の外側に配置する配座 (Fig.4b, Fig.5b)と, タンパク質内部に埋もれる配座 (Fig.4d, Fig.5d)であった. これらの2種類の構造間にエネルギー差は殆ど見られなかった.

#### E. 結論

違法薬物の鑑別法におけるコンピュータシミュレーションの妥当性について検証することを目的し, 本年度は, CB1 受容体のホモロジーモデル構築, CB1 受容体と CB1 リガンド ( $\Delta^8$ -THC,

JWH-018)間のドッキングシミュレーションによる結合様式の解析を行った. その結果, CB1 受容体のリガンド結合領域は広い疎水性空間を持っているため, リガンドは複数のコンフォメーションで結合することが示唆された.

#### F. 参考文献

1. Montero, C., Campillo, N. E., Goya, P., Paez, J. A., *Eur. J. Med. Chem.*, **40**, 75-83 (2005).

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

#### H. 知的所有権の取得状況

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

CB1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55																																												
1F88:2	VPADQVN	ITEFYNK	LSBFK	ENEEN	IQCGEN	EMDI	ECF	MV	LN	NPSO	LAIAVLS	LTGTF																																											
CB1	64	69	74	79	84	89	94	99	104	109	114																																												
1F88:2	GFPIN	NFLT	LVTV	QHK	KLRT	PLN	YILL	NLAV	ADLF	FMV	FGG	FTTT	LYT	SLHG	YFV	FGPT																																							
CB1	123	128	133	138	143	148	153	158	163	168	173																																												
1F88:2	VFL	EK	LG	VTA	SFT	AS	VGS	LE	IT	A	DRY	IS	IHR	PL	AY	KR	I	TR	PK	AV	VA	E	GL	M	WT	I	A	I	V																										
CB1	182	187	192	197	202	207	212	217	222	227	232																																												
1F88:2	CA	AP	PL	V	G	W	S	R	Y	I	PE	G	M	Q	C	S	G	I	D	Y	T	P	H	E	E	T	N	N	E	S	F	V	I	M	F	V	V	H	F	I	I	P	L	I	V	I	F	F	C	Y	G	G			
CB1	241	246	251	256	261	266	271	276	281	286	291																																												
1F88:2	A	Y	M	I	L	W	K	A	H	S	H	A	V	R	M	I	Q	R	G	T	Q	K	S	I	I	H	T	S	E	D	G	K	V	Q	V	T	R	P	D	A	R	M	D	I	R	L	A	K	T	L	V	I	L	V	V
CB1	300	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350																																												
1F88:2	L	I	C	W	G	P	L	A	I	M	V	Y	D	V	F	G	K	M	N	K	L	I	K	T	V	F	A	F	C	S	M	L	G	L	N	S	T	V	N	P	I	I	A	L	R	S	K	D	L	R	H	A	F	R	S
CB1	359	364	369	374	379	384	389	394	399	404	409																																												
1F88:2	T	L	C	G	K	N	P	S	T	T	V	S	K	T	E	T	S	Q	V	A	P	A																																	
CB1	418	423	428	433	438	443	448	453	458	463	468																																												
1F88:2	E	A	L																																																				

Fig.1 CB1 受容体のシーケンスアラインメント

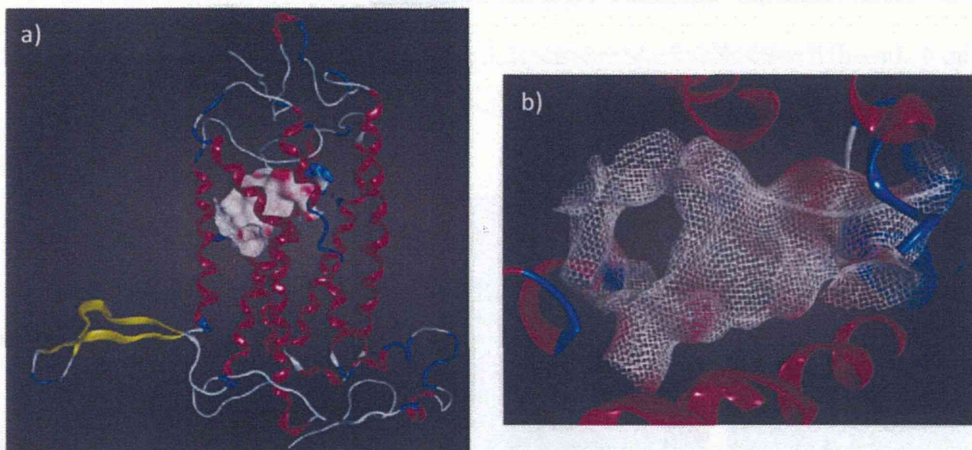


Fig.2 (a)CB1 受容体のホモロジーモデリング構造。(b)CB1 受容体のリガンド結合領域

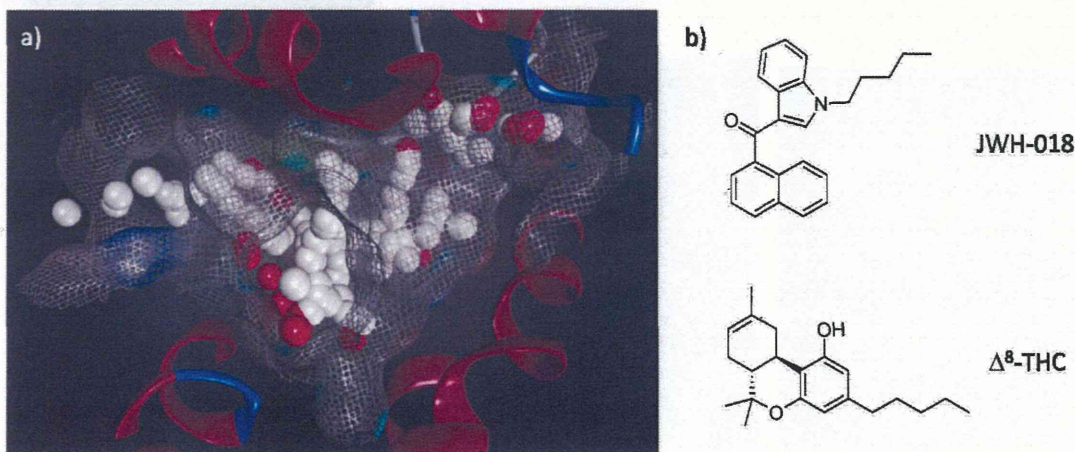


Fig. 3 (a)CB1 受容体リガンド結合領域(白球:疎水性空間, 赤球:親水性空間).  
(b)JWH-018 および Δ<sup>8</sup>-THC の化学構造式

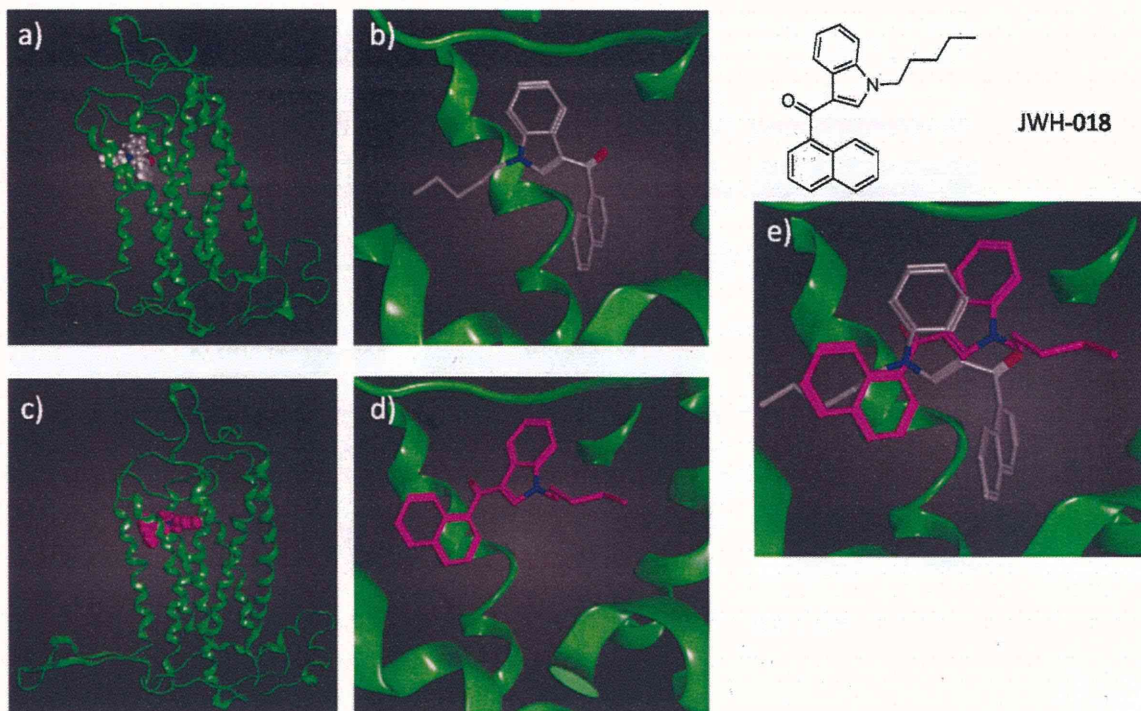


Fig. 4 (a—d)ドッキングシミュレーションによるCB1受容体とJWH-018の結合様式.  
 (e)JWH-018の2種類の配座(グレー, マゼンタ)の重ね合わせ図

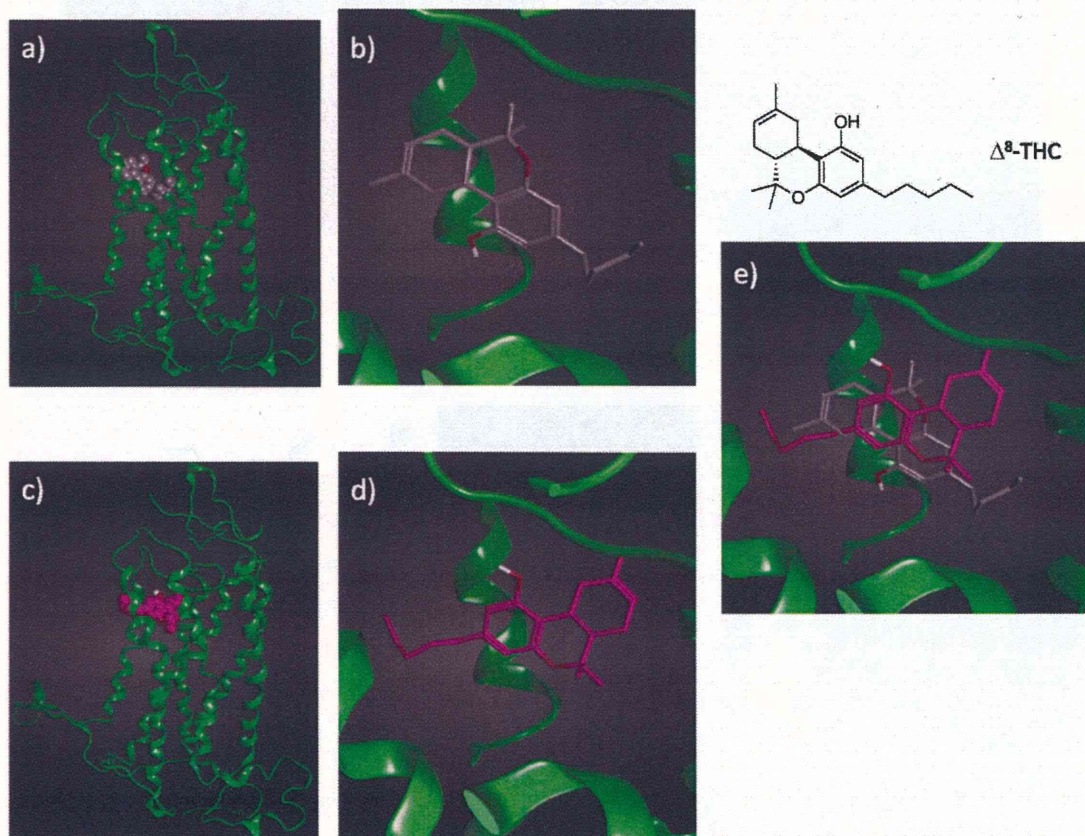


Fig. 5 (a—d)ドッキングシミュレーションによるCB1受容体と $\Delta^8$ -THCの結合様式.  
 (e) $\Delta^8$ -THC2種類の配座(グレー, マゼンタ)の重ね合わせ図

分担研究課題:DNAを用いた法規制植物の識別法に関する研究

分担研究者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

－法規制植物の LAMP 法を用いた簡易検出法の検討－

研究要旨:“脱法ハーブ”と称する違法ドラッグ製品中の植物片は一見では、その植物種を判定することができず、DNA 塩基配列の解析など手間と時間を要した。そこで膨大な“脱法ハーブ”製品の簡易スクリーニング法のひとつとして、*Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* 由来 DNA の Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)を用いた目視判定法を検討した。本実験系では電気泳動やシークエンサーなどの機器を使用せず、全工程 3 時間程度で検出が可能であることが示唆された。

研究協力者

内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部 主任研究官

河野 徳昭 (独)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

A. 研究目的

“脱法ハーブ”による事件や事故が連日報道されている。いわゆる“脱法ハーブ”は、植物片に覚せい剤や大麻成分に化学構造を似せて作られた物質などを添加<sup>1-3)</sup>し、販売されており、一見では、その植物片がどんな植物種であるのかわからない。一方で、平成 24 年度全薬物事犯における大麻草所持等の大麻事犯検挙人員の割合は約 12%と、覚せい剤事犯に次ぐ高い比率となっている<sup>4)</sup>。また、本研究機関の分析において、脱法ハーブ製品中に、数種の植物種と同時に、大麻由来 DNA を塩基配列解析によって検出している<sup>5)</sup>。大量に流通する違法薬物における植物片の分析・同定には信頼性と同時にスピードも重要である。

植物種特異的プライマーを用いた DNA による植物種同定法は、DNA の「抽出」、標的 DNA の

「増幅」、その「検出」、の大きく 3 つに分類される。一般的な手法として、「増幅」には PCR 法<sup>6)</sup>、「検出」には電気泳動法があるが、いずれも装置そのものの準備や設置場所の確保、試験全体の工程の多さ、煩雑さ、というものがある。

そこで、本研究では *Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* 各々の特異的 DNA 塩基配列中の 6 ヶ所をターゲットとして、プライマー 4 種 (PCR 法は通常 2 種)を設計し、等温 (PCR 法は温度変化が必要)での標的 DNA の「増幅」が可能である Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法<sup>7)</sup>を用い、「検出」は、反応溶液中の Hydroxynaphthol Blue (HNB)を用いた比色検出法<sup>8)</sup>を採用し、法規制植物の簡易検出法を検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料

(独)医薬基盤研究所・薬用植物資源研究センター筑波研究部から分譲された大麻種子(トチギシロ)およびケシ種子(トルコ)、違法ドラッグ製品(2013 年度分析品(植物片))<sup>5)</sup>を使用した。

## 2. 実験方法

### 2-1. DNA の抽出

1. 実験材料に示した各試料, 約 20 mg (乾燥植物片)(大麻種子は1粒)を液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen)により粉砕した. 粉砕後, Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega)内の溶出液に溶解し, Maxwell 16 (Promega)を用いDNAを抽出・精製した. 各300 µLを回収DNA溶液とした.

### 2-2. *Papaver somniferum thebaine 6-O-demethylase (T6ODM)*のクローニング

ケシ種子から得られた genome DNA を鋳型として, *thebaine 6-O-demethylase (T6ODM)*<sup>9)</sup> 全長のクローニングを行った. 各回収 DNA 溶液 1 µL を用い, *T6ODM* (Accession No. GQ500139)<sup>9)</sup> から作成した *T6ODM forward primer* (5'-ATGGAGAAAGCAAACTTATGAAGC-3') および *T6ODM reverse primer* (5'-CAAATCCTCATGGAGTCAAGAAATG-3') により PCR にて全長を増幅した. 全量 10 µL とし, Ex Taq (Takara) および Ampdirect plus (Shimadzu) により以下のプログラムで全長を取得した (95°C 180sec; 95°C 60sec, 56°C 30sec, 72°C 300sec, 30cycle; 72°C, 10min). アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後, ポリエチレングリコール沈殿により DNA 増幅断片を回収後, Mighty TA-cloning Kit (Takara) を用い, サブクローニング後, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い, 解析は ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI) を使用し塩基配列を決定した. 全長を決定するために内部シーケンスプライマーとして *T6ODM forward-2 primer* (5'-GTTCACTCTTCCACTCCATTTAAGG-3') および *T6ODM reverse-2 primer* (5'-GCTTCATTGGTGGATAGTGTA-3') を作成し, 用いた.

### 2-3. *Papaver somniferum* LAMP primer の作成 得られた塩基配列および既報の *T6ODM*

(Accession No. GQ500139)の配列アラインメント (Genetyx) を行い, 共通配列から PrimerExplorer V4 (<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) を用い検討した.

### 2-4. *Cannabis sativa* LAMP primer の作成

既報の *Cannabis sativa tetrahydrocannabinolic acid synthase (THCAS)* (Accession No. AB212830, AB212831, AB212832, AB212833, AB212836, AB212839, AB212840<sup>10)</sup>, JQ437489) および *Cannabis sativa cannabidiolic acid synthase homolog (CBDAS)* (Accession No. AB292683, AB292684)<sup>11)</sup> の共通配列についても上記と同様に検討した.

### 2-5. LAMP による検出

LoopampDNA 増幅試薬キット (EIKEN Chemical Co., Ltd.) を用い 63°C の等温条件下で 90 分反応, 全量 11 µL を基本条件として以下の組成で反応を行った. PCR チューブに, 2 x Reaction Mix 5 µL, primer (F primer (2.5 pmol), R primer (2.5 pmol), FI primer (20 pmol), RI primer (20 pmol)) 1 µL, *Bst* DNA polymerase 0.5 µL, Milli-Q 2.5 µL, 各 DNA 溶液 1 µL および Hydroxynaphthol Blue (HNB) (Dojindo) 水溶液 (20 mM) 1 µL を混合し, Mineral Oil (Sigma-Aldrich) を 1 滴添加した. 2%アガロースゲル電気泳動にて反応産物の確認を行った.

### 2-6. Real time PCR を用いた反応産物の確認

2-5 の反応条件において, HNB の代わりに Syber Green I (3,000 倍希釈) を 2.5 µL 加え, 各液量を 2.5 倍にし, 全量 27.5 µL にて Takara Smart Cycler II にて 63°C 等温下で 5 分間のインキュベート後, 120 sec (20 秒間モニタリング) /cycle として Syber Green によるインターカレーター法による反応測定を行った.

## C. 研究結果

### 1. LAMP プライマーの作成

図 1 に *Papaver somniferum T6DM* の部分配列およびプライマー設定位置を示す. プライマー

作成に用いた配列の相同性検索の結果は最も高いもので *Glycine max* codeine *O*-demethylase-like mRNA (Accession No. XM\_006579828) で 58%, Soybean clone JCVI-FLGm-6B4 unknown mRNA (Accession No. BT095096) で 57%であった。

図 2 に *Cannabis sativa* *THCAS/CBDAS* の部分配列およびプライマー設定位置を示す。プライマー作成に用いた配列相同性は最も高いもので *Citrus clementina* hypothetical protein mRNA (Accession No. XM\_006448789) の 73%, *Theobroma cacao* FAD-binding Berberine family protein mRNA (Accession No. XM\_007022975) で 71%であった。

プライマーの設計には①Tm 値, ②末端安定性, ③GC 含量, ④増幅長, ⑤二次構造非形成能<sup>12)</sup> および⑥配列特異性を検討し, PrimerExplorer V4 によって得られた候補プライマー配列から以下のプライマーを選択した。 *Papaver somniferum* 特異的 LAMP プライマー(PS primers):

PS-F primer

5'-GAATTGGCTAAACTCACGC-3',

PS-FI primer

5'-GCACCCATAGGCAACAAAAGGTTGCCG  
AAATTCCATCTCG-3',

PS-RI primer

TGATCATGAAACCATTCCTGTCACTATCCAA  
TTCTAACTTTCCGA-3',

PS-R primer

5'-CTGAAAAAACCCCATCTTTG-3' (図 1)。

*Cannabis sativa* 特異的 LAMP プライマー (CS primers): CS-F primer

5'-CATTGATGCACACTTAGTCAA-3',

CS-FI primer

5'-TCTCCTCCTCCACCACGTATAGGTTGATG  
G AAAAGTTCTAGATCG-3',

CS-RI primer

GGAATCATTGCAGCATGGAAAATCCATGTT  
CTTTTTAACACTGAA-3',

CS-R primer

5'-TGCCATTTGTTAAATAACTTGAC-3' (図 2)。

## 2. LAMP による検出

図 3 に本実験による検出結果を示す。図 3-1) は反応停止, 酵素失活(85°C, 5 min)後の可視光下での反応チューブを示す。A, B は CS Primers を用い, A にはケシ DNA, B には大麻 DNA を添加した。C, D は PS primers を用い, C には大麻 DNA, D にはケシ DNA を添加した。A と B, C と D で色の変化が見られた。これは, DNA の増幅(酵素反応)によって溶液中の HNB の色調が変化したものである。また, その反応溶液(-HNB)の電気泳動図(図 3-2))では, A, C ではバンドが確認されなかったが, B, D において様々なバンドサイズの反応産物が確認された。反応産物によって色調が変化すること, *Cannabis sativa*, *Papaver somniferum* に各々に特異的に反応していることが示唆された。

図 4 に, 平成 25 年度分析違法ドラッグ製品による分析結果を示す。製品はいずれも DNA 塩基配列解析の結果, *Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* は検出されず<sup>13)</sup>, 今回の LAMP による結果でも同様であった。1-3, 5-7 は色調に変化が見られず, ポジコンである, 4, 8 に色調の変化(DNA 検出)が見られた。また, これまでの違法ドラッグ製品の DNA 塩基配列解析において *Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* 由来 DNA が検出されないサンプルで HNB の色調が変化するものは見られていない (data not shown)。

## D. 考察

LAMP に用いた両プライマーセットは *Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* 由来 DNA に対して高い特異性を示した(図 3-1))。LAMP プライマーを用いた等温反応において, 様々なサイズの反応産物の形成が確認された(図 3-2))が, これは LAMP 法による反応の典型的な例<sup>12)</sup>であ

り、本実験においても明確に機能したことが示された。LAMPプライマーは標的DNAの塩基配列において4種のプライマーに対して相同性が必要であり、その配列が設計どおりに並ぶ必要<sup>12)</sup>があるため、原理的に極めて高い特異性を示すこととなる。また、今回は4種のプライマーで検討したが、更に、2種類のインナープライマー(ループプライマー)を設計することで、反応時間を1/3に短縮できるが<sup>12)</sup>、今回は初条件の検討と誤判定の回避を考え、4種のプライマーを用い実験を行った。しかしながら、反応溶液の調製、反応結果の判定までにはこれまでのPCR、電気泳動に比べて短時間での確認が可能であった。また、DNA溶液はPCR反応グレードのもので問題なく結果が得られた。通常のPCR反応でバンドが確認できるサンプルであればLAMPでも採用できることが示唆された。また、今回、電気泳動装置、蛍光検出器などを必要としない簡易な判定法としてHNB<sup>8)</sup>による目視判定を採用した(図5)。常法では、白濁検出法<sup>14)</sup>、DNA合成の際、dNTPsから遊離されるピロリン酸イオンとMg<sup>2+</sup>と結合し不溶性のピロリン酸マグネシウムが得られることで、白濁が確認できるが、今回の検討ではそのような現象は見られなかった。1つには今回、反応時間の短縮化が可能なループプライマーを用いなかったため、全体として増幅効率が低くなったことによると考えられる。また、蛍光指示薬を添加した蛍光検出法<sup>15)</sup>があるが、UVランプ等の検出器を必要とする点で簡易スクリーニングに不向きと考えた。今回検討したHNBは、アルカリ条件下で酵素反応の進行によるMg<sup>2+</sup>の減少によってHNBの可視光域の吸収極大が長波長側にシフトする(図5)ことで色調に変化が見られ目視での判定が可能となるものである。更に、本指示薬は酵素反応を阻害しない点で、反応前に反応溶液中への添加が可能であり、反応産物の取り扱いにおいて、反応指示薬を反応後に添加するなど、チューブのフタを開けることによるコンタミを防ぐことができる点も有効であった。また、反応溶液に

Mineral Oilを添加することで、反応産物の気散を防止し、より一層のコンタミの回避を図った。現在までにLAMP法そのものはウイルス<sup>16)</sup>、植物<sup>15)</sup>、動物<sup>14)</sup>など幅広くその検出法が応用されている。

図6. にリアルタイムPCRモニタリングによる増幅曲線を示した。これは、二本鎖DNAに挿入されることで蛍光を発する試薬(インターカレーター)を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出したもので、通常のPCRと同様の増幅曲線が得られた。このことは結果として、その増幅速度は基質である鋳型DNA濃度に依存することが考えられ、目視による判定のスピード(判定結果が得られるまでの反応時間)も鋳型DNAの量に依存することが示唆された。

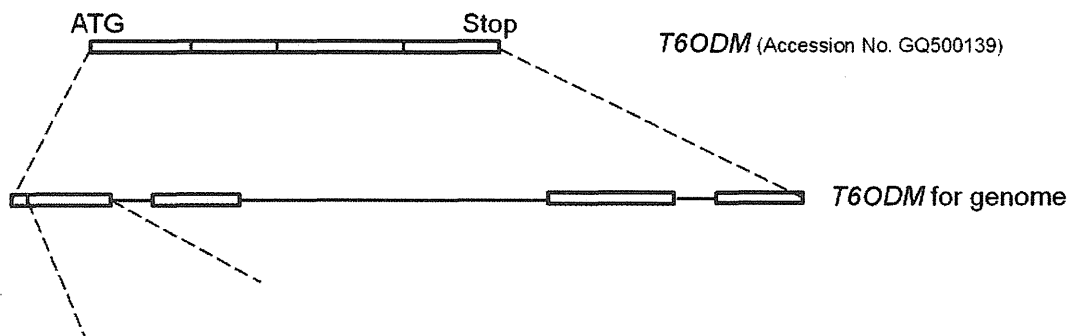
今回行ったLAMPによる一連の実験系は、DNAの抽出に1時間、調整、酵素反応に2時間と、全工程3時間程度で検出が可能であり、誤判定もすくないことから、大量生産される“脱法ハーブ”製品中の*Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* 植物体の混入の有無の簡易スクリーニング法として有効な手法であることが示唆された。今後は、時間短縮化のためのループプライマーの作成や、より詳細な条件検討を行う。

#### E. 参考文献

- 1) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Ogata, J., Goda, Y., *Forensic Sci. Int.*, **198**, 31-38 (2010).
- 2) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Toxicol.*, **29**, 25-37 (2011).
- 3) Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawamura, M., Goda, Y., *Forensic Sci. Int.*, **227**, 21-32 (2013).
- 4) 平成24年中の薬物・銃器情勢, 警察庁刑事局組織犯罪対策部薬物銃器対策課  
[http://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutujuuki/yakujuuu/yakujuuu1/h24\\_yakujuuu\\_jousei.pdf](http://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutujuuki/yakujuuu/yakujuuu1/h24_yakujuuu_jousei.pdf)



- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Sci. Int.*, **227**, 33-41 (2013).
- 6) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., *Science*, **230**, 1350-1354 (1985).
- 7) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., *Nucleic Acids Res.*, **28**, e63 (2000).
- 8) Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., Hanaki, K., *Short Technical Reports*, **46**, 167-172 (2009).
- 9) Hagel, J. M., Facchini, P. J., *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 273-275 (2010).
- 10) Kojoma, M., Seki, H., Yoshida, S., Muranaka, T., *Forensic Sci. Int.*, **159**, 132-140 (2006).
- 11) Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., Morimoto, S., *FEBS Lett.*, **581**, 2929-2934 (2007).
- 12) 牛久保宏, *ウイルス*, **54**, 107-112 (2004).
- 13) 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 分担研究報告書「違法ドラッグに関する分析情報の収集及び危害影響予測に関する研究」植物系違法ドラッグ製品の基原植物種の同定 緒方 潤
- 14) Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Sawai, K., Minamihashi, A., *J. Reprod. Dev.*, **59**, 321-326 (2013).
- 15) Sasaki, Y., Fujimoto, T., Aragane, M., Yasuda, I., Nagumo, S., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 887-891 (2009).
- 16) Fukuda, S., Takao, S., Kuwayama, M., Shimazu, Y., Miyazaki, K., *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 1376-1381 (2006).
- F. 健康危険情報  
なし。
- G. 研究発表  
(学会発表)  
緒方 潤, 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 袴塚高志, 法規制植物の LAMP を用いた簡易検出法の検討(日本薬学会第 134 年会, 平成 26 年 3 月)  
  
(論文)  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



(Sense 5' -) TGTTCAAGAA TTGGCTAAAC TCACGCTTGC CGAAATTCCA TCTCGATACG

(Antisense 3' -) acaagttctt aaccgatttg agtgcgaacg gctttaaggt agagctatgc

(1) **GAA TTGGCTAAAC TCACGCTTGC CGAAATTCCA TCTCG** (2)

(Sense 5' -) TATGCACCGA TGAAAACCTT TTGTTGCCTA TGGGTGCTTC TGTCAATAAT

(Antisense 3' -) atacgtggct acttttgga aacaacggat acccacgaag acagtattta

**ggaa aacaacggat acccacg** (3) **T**

(Sense 5' -) GATCATGAAA CCATTCCTGT CATCGATATA GAAAATTAT TATCTCCAGA

(Antisense 3' -) ctagtacttt ggtaaggaca gtagctatat cttttaaata atagaggtct

**GATCATGAAA CCATTCCTGT CA** (4)

(Sense 5' -) ACCCATAATC GGAAAGTTAG AATTGGATAG GCTTCATTCT GCTTGCAAAG

(Antisense 3' -) tgggtatttag cttttcaatc ttaacctatc cgaagtaaga cgaacgtttc

**ag cttttcaatc ttaacctatc** (5) **gtttc**

(Sense 5' -) AATGGGGTTT TTTTCAGGTA TATATGTCGT

(Antisense 3' -) ttacccccaaa aaaagtccat atatacagca

**ttacccccaaa aaaagtc** (6)

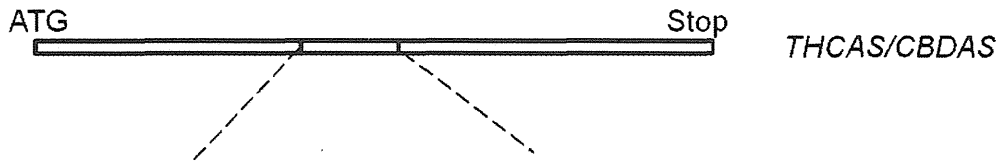
PS-F primer **GAATTGGCTA AACTCACGC** (1)

PS-FI primer **gcacccatag gcaacaaaag gTTGCCGAAA TTCCATCTCG** (3)+(2)

PS-RI primer **TGATCATGAA ACCATTCCTG TCActatcca attctaactt tccga** (4)+(5)

PS-R primer **ctgaaaaaaaa cccattctt tg** (6)

図1. *Papaver somniferum* T6DM の部分配列(センス鎖, アンチセンス鎖)および作成したプライマーの配列  
太字はプライマー配列, アンダーバーはアンチセンス鎖を示す.



(Sense 5' -) TCATTGATGC ACACTTAGTC AATGTTGATG GAAAAGTTCT AGATCGAAAA  
 (Antisense 3' -) agtaactacg tgtgaatcag ttacaactac cttttcaaga tctagctttt  
**(1) CATTGATGC ACACTTAGTC AA GTTGATG GAAAAGTTCT AGATCG (2)**

(Sense 5' -) TCCATGGGAG AAGATCTATT TTGGGCTATA CGTGGTGGAG GAGGAGAAAA  
 (Antisense 3' -) aggtaccctc ttctagataa aaccogatat gcaccacctc ctctctttt  
**gatat gcaccacctc ctctct (3)**

(Sense 5' -) CTTTGGAAATC ATTGCAGCAT GGAAAATCAA ACTTGTTGTT GTCCCATCAA  
 (Antisense 3' -) gaaaccttag taacgtcgta ctttttagtt tgaacaacaa cagggtagtt  
**GGAATC ATTGCAGCAT GGAAAAT (4)**

(Sense 5' -) AGGCTACTAT ATTCAGTGTT AAAAAGAACA TGGAGATACA TGGGCTTGTC  
 (Antisense 3' -) tccgatgata taagtcacaa tttttcttgt acctctatgt acccgaacag  
**aagtcacaa tttttcttgt acct (5) cag**

(Sense 5' -) AAGTTATTTA ACAAATGGCA AAATATTGCT  
 (Antisense 3' -) ttcaataaat tgtttacgt tttataacga  
**ttcaataaat tgtttacgt (6)**

CS-F primer **CATTGATGCA CACTTAGTCA A (1)**  
 CS-FI primer **tctctctctc caccacgtat agGTTGATGG AAAAGTTCTA GATCG (3)+(2)**  
 CS-RI primer **GGAATCATTG CAGCATGGAA AATtccatgt tctttttaac actgaa (4)+(5)**  
 CS-R primer **tgccatttgt taaataactt gac (6)**

図 2. *Cannabis sativa* THCAS/CBDAS の部分配列(センス鎖, アンチセンス鎖)および作成したプライマーの配列

太字はプライマー配列, アンダーバーはアンチセンス鎖を示す.

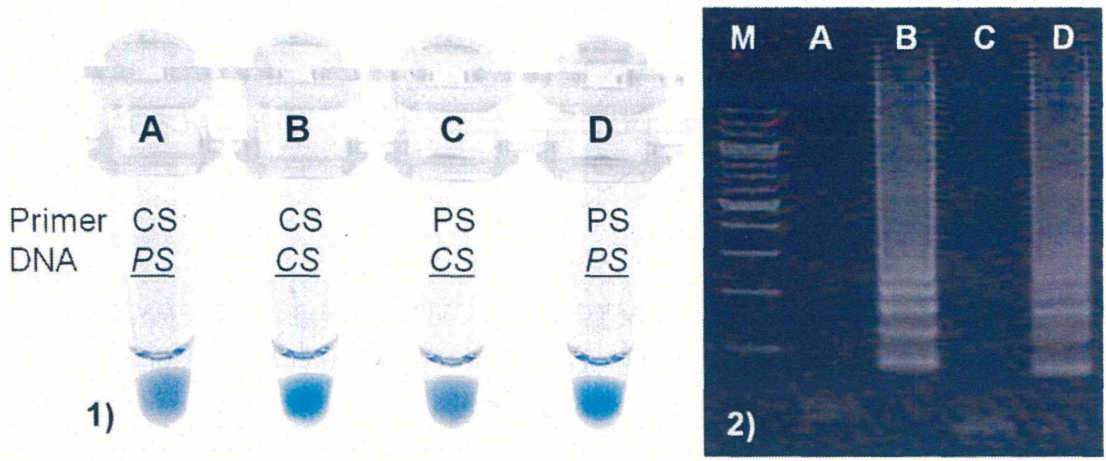


図 3. LAMP 比色検出法を用いた *Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* の検出 (1)), その LAMP を用いた電気泳動図 (2))

A. *Cannabis sativa* primer (CS)+ケシ DNA (PS), B. CS+大麻 DNA (CS), C. *Papaver somniferum* primer (PS)+CS , D. PS+PS , 2) の M は 200bp ラダーマーカー

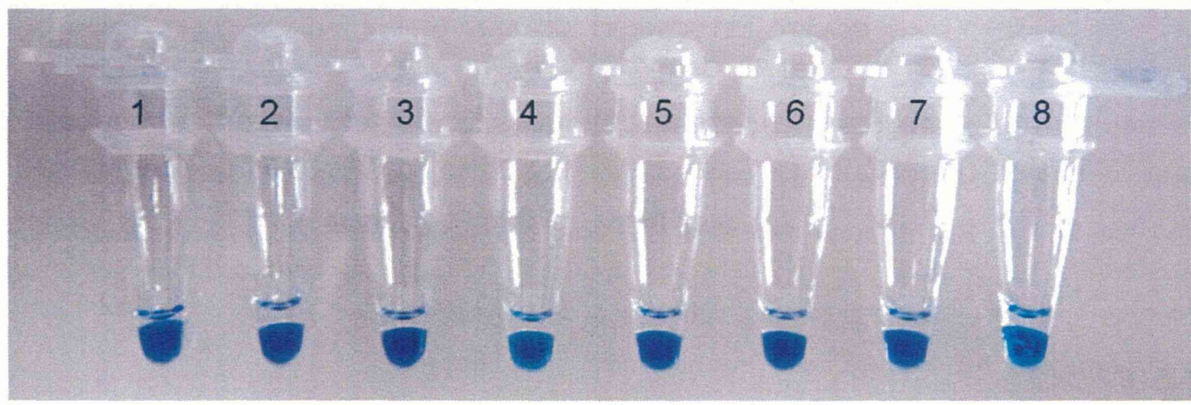


図 4. LAMP 法による違法ドラッグ製品における *Cannabis sativa* および *Papaver somniferum* の検出  
1-3, 5-7. 2013 年度分析違法ドラッグ製品, 4. *Cannabis sativa* (トチギシロ), 8. *Papaver somniferum* (トルコ)

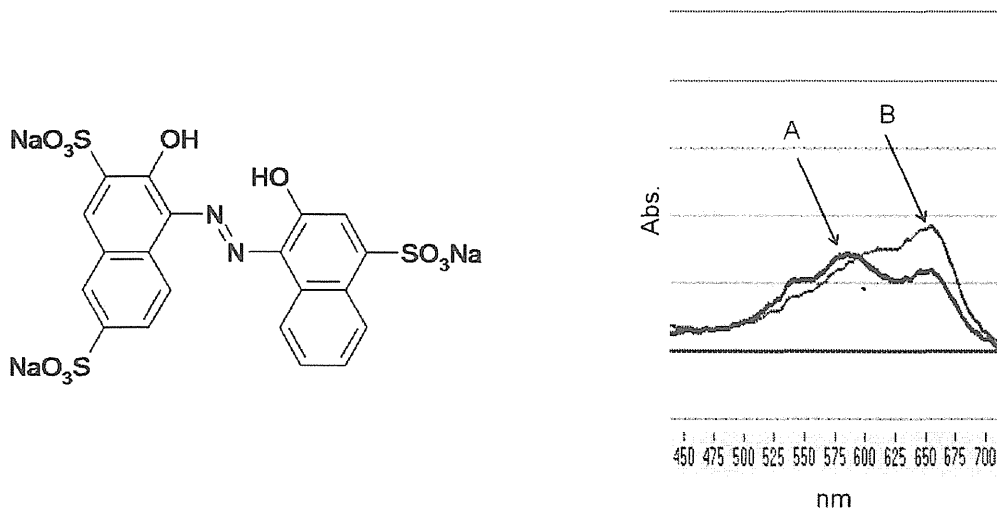


図 5. ヒドロキシナフトールブルー (HNB) とその溶液中のスペクトル変化  
 A; 酵素活性なし(例: 図 3-1) A), B; 酵素活性あり(例: 図 3-1) B)

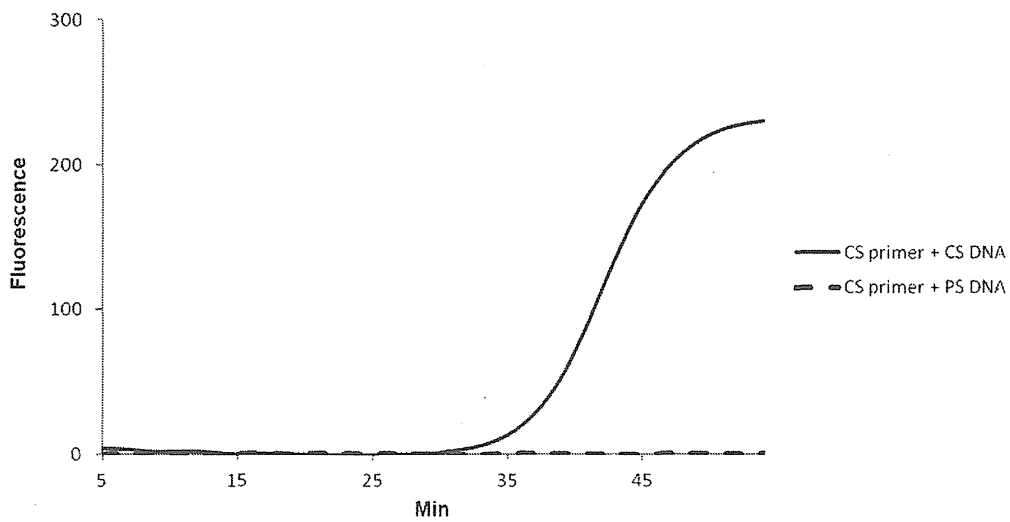


図 6. LAMP 反応における Syber Green を用いたリアルタイム PCR モニタリングによる増幅曲線

分担研究課題: DNAを用いた法規制植物の識別法に関する研究

分担研究者: 緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—大麻種子 1 粒からのマイクロサテライトマーカーを用いた識別法の検討—

研究要旨: アサ科アサ属の大麻 *Cannabis sativa* L. は世界中に多様な変異系統の存在が認められている。このような種内変異を DNA 塩基配列情報を用い明らかにすることは、摘発大麻の由来を解明する上で重要と考えられる。本研究では、国内の系統保存用に栽培されている大麻 2 種を用い、DNA 多型の多様性を調査した。その結果、各集団に多型の類似性がみられた。このことは栽培地域・環境などの特定に可能性を示唆するものであった。

A. 研究目的

アサ科アサ属アサ(以下、大麻)(*Cannabis sativa* L.)、大麻は大麻取締法において「大麻草およびその製品」と規定され、大麻種子そのものに規制はないが、大麻取扱者(大麻栽培および大麻研究の免許取得者)以外の栽培は法律によって規制されている。また、香辛料や鳥のエサなどの産業用の大麻種子は、加熱などによる発芽不能処理が義務付けられ輸入されており、発芽能力を有する大麻種子が一般に流通することがないよう管理されている。しかしながら、発芽能力を有する大麻種子が、海外やインターネットで売買されており、国内の大麻栽培事犯検挙数は、ここ数年減少傾向にあるものの平成 24 年 114 件という状況にある<sup>1)</sup>。不正に国内に流通する栽培用大麻種子、大麻草の来歴(産地、栽培(品種))の特定が可能になることは、どこから持ち込まれたものか、不正輸入品か否か等、新たな規制方法の確立につながる。

ゲノム DNA 上には、数塩基の短い繰り返し配列が散在し、その繰り返し回数には、高度な多型が存在している。この繰り返し配列をマイクロサテライト(Simple Sequence Repeat (SSR), Short Tandem Repeat (STR))と呼び、その繰り返し回数

は個体の固有値として利用可能であり、ヒトの DNA 型鑑定にも利用されている<sup>2)</sup>。

そこで、大麻種子 1 粒からの DNA 多型に基づいた鑑別法の確立を目的として大麻 DNA のマイクロサテライト(SSR, STR)マーカー<sup>3,4)</sup>による国内栽培種の大麻の多型を調査した。

B. 研究方法

1. 試料

関東信越厚生局麻薬取締部より分与された大麻種子海外市場製品(オランダ)、基盤研・薬植セ・筑波にて系統保存されているメキシコ産系統種子(M)および日本国内繊維用栽培種トチギシロ(T)種子を用いた。

2. 実験方法

各種子 1 粒を液体窒素で凍結させた後、MM-300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各種子は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 中の溶出液に溶解し、Maxwell 16 (Promega)を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液各 300  $\mu$ L 中の 1  $\mu$ L を PCR 反応に用いた。

実験に用いた既報のマーカー(プライマー)を表 1 に示す。反応溶液として、酵素には Ex Taq

Hot start version (Takara) 0.1  $\mu$ L, PCR 反応試薬には, Ampdirect plus (Shimadzu) 5  $\mu$ L, 蛍光 (FAM (青) or HEX (緑)) プライマー 2 pmol, M13(-21)連結プライマー 1 pmol, GTTT 連結プライマー 2.5 pmol, DNA 溶液 1  $\mu$ L とし, 全量 10  $\mu$ L で PCR 反応を行った (94°C 3min; 94°C 30sec, 54°C 30sec, 72°C 30sec, 25cycles + 94°C 30sec, 52°C 30sec, 72°C 30sec, 8cycles ).

反応溶液を Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific) にて 5 倍希釈し, その 1  $\mu$ L を Hi-Di 20  $\mu$ L + 500 ROX dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific) 0.5  $\mu$ L に添加, 95°C 3min 加熱後, 急冷し解析サンプルとした. ABI Prism 3100-Avant Genetics Analyzer (ABI) を使用し, GeneMapper v4.1 によるマイクロサテライト解析を行った.

### C. 研究結果

#### 1. マーカーを用いた PCR 反応

本実験の流れを図 1 に示す. 本実験の中心部分は PCR および電気泳動であり, 分子生物学実験の基本となる部分であるが, いくつか異なる点がある. まず, PCR では, 3 つのプライマーを添加し行った. Schuelke (2000) の方法に従い<sup>5)</sup>, あらかじめ SSR プライマーのひとつに M13(-21) プライマーの配列 (TGTA AACGACGGCCAGT) を付加させ作成し, 蛍光プライマーの配列を M13(-21) とすることで, SSR 領域が PCR 増幅された後に, 蛍光が付加する反応系を採用した. また, Taq 酵素による A 付加反応を確実なものにするために非蛍光プライマー側の 5' 端に GTTT を付加し反応を行った<sup>6)</sup>.

#### 2. SSR 解析

図 2. に実験の模式図を示す. ABI Prism 3100-Avant Genetics Analyzer を用い, キャピラリー電気泳動を行った. あらかじめ, 泳動サンプルに PCR 産物 (FAM (青) or HEX (緑)) とは異なる蛍光を有するサイズマーカー (35~500bp (13 種類, 本実験では ROX (赤) で標識) を添加し, 同時に泳動することでマーカーによって得られた PCR

産物のサイズを計測した. 図 3 に ANUCUS202 プライマーを用いた医薬基盤研・筑波の大麻トチギシロ種子 3 粒の各 SSR 分析結果を示す. 3 粒中 2 粒で al (allele; 対立遺伝子) 5 および al 8 を有するヘテロ接合体, al 5 のホモ接合体が 1 粒であった. また, 表 2 に各種マーカーを用いた筑波・トチギシロおよび筑波・メキシコ産系統, 各 3 粒の allele No. を示す. Allele No. は無作為に分析した大麻種子海外市場製品から検出された各マーカーの出現 allele を短いものから順にナンバリングした (図 3. クロマト中の灰色のバーが検出された allele 位置).

### D. 考察

DNA 塩基配列を基にした産地特定 (系統解析) のための大麻種子のマイクロサテライト解析を行った. 今回検討したマイクロサテライト領域は, STR (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeat) などとも呼ばれる領域で, ゲノム上に散在する遺伝子をコードしていない非コード領域において見られる繰り返し配列 (マイクロサテライト領域) で, 多型頻度が高く, 農作物の品種識別や, ヒトの DNA 型鑑定など幅広く利用されている<sup>2, 7)</sup>. その多型は共優性であり, 大麻 ( $2n=20(18+XY$  or  $XX)$ )<sup>8)</sup> では allele を両親から 1 ずつ受け取ることになる ( $2n$ ). これらのことから, 植物, 動物を含めて親子鑑別などにも利用されている<sup>2, 7)</sup>. また, 大麻に関しても, 海外で, 自国の大麻草そのものの遺伝資源的観点から, また, 法科学的観点からマイクロサテライトマーカーを用いた分析・識別法が検討されている<sup>8-14)</sup>.

今回, 日本国内で, 部分的に隔離栽培された系統保存用の大麻 2 種を用い, その遺伝的多様性を調査し, 日本国内自生種, 栽培種, 海外流入種の識別が可能かどうか予備試験的に調査した. 各集団内における多型の完全一致はみられなかった. この理由としてひとつには大麻の遺伝様式がある. 大麻は雌雄異株であり自家受精することはない (遺伝的コピーはつくらない) ため,

必ず、両親から異なる別々の遺伝子を受け継ぐことになる。この点は多様性が植物の中でも高いことが示唆される。一方で、集団ごとを比較すると多型に類似性もみられる。この点は、栽培地域の特定や地理的分類の指標にできることが示唆された。今後はより個体数を増やし、有効なマーカーの選抜および新規マーカーの作成を試みる。

#### E. 参考文献

- 1) 警察庁組織犯罪対策部薬物銃器対策課, 平成 24 年中の薬物・銃器情勢,  
[http://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutujoyuki/yakujyuu/yakujyuu1/h24\\_yakujyuu\\_jousei.pdf](http://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutujoyuki/yakujyuu/yakujyuu1/h24_yakujyuu_jousei.pdf)
- 2) 赤根敦“DNA 鑑定は万能か”DOJIN 選書, 化学同人 (2010)
- 3) Gilmore, S., Peakall, R. *Molecular Ecology Notes* 3, 105-107 (2003)
- 4) Alghanim, H. J., Almirall, J. R., *Anal Bioanal Chem.* 376, 1225-1233 (2003)
- 5) Schuelke, M., *Nature Biotechnology* 18, 233-234 (2001)
- 6) Traxler, B., Brem, G., Müller, M., Achmann, R., *Molecular Ecology* 9, 366-368 (2000)
- 7) (社)農林水産先端技術産業振興センター “植物の DNA 品種識別技術の開発状況調査報告書”平成 19 年 3 月
- 8) van Bakel, H., Stout, J. M., Cote, G. A., Tallon, C. M., Sharpe, A. G., Hughes, T. R., Page, J. E., *Genome Biology* 12, R102 (2011)
- 8) Shirley, N., Allgeier, L., Lanier, T., Coyle, H. M., *J Forensic Sci.* 58, 176-182 (2013)
- 9) Köhneman, S., Nedele, J., Schwotzer, D., Morzfeld, J., Pfeiffer, H., *Int J Legal Med.* 126, 601-606 (2012)
- 10) Mendoza, M. A., Mills, D. K., Lata, H., Chandra, S., ElSohly, M. A., Almirall, J. R., *Anal Bioanal Chem.* 393, 719-726 (2009)
- 11) Howard, C., Gilmore, S., Robertson, J., Peakall, R., *J Forensic Sci.*, 54, 556-563 (2009)

- 12) Howard, C., Gilmore, S., Robertson, J., Peakall, R., *J Forensic Sci.* 53, 1061-1067 (2008)
- 13) Hsieh, H. M., Hou, R. J., Tsai, L. C., Wei, C. S., Liu, S. W., Huang, L. H., Kuo, Y. C., Linacre, A., Lee, J. C., *Forensic Sci Int.* 131, 53-58 (2003)
- 14) Gilmore, S., Peakall, R., Robertson, J. *Forensic Sci Int.* 131, 65-74 (2003)

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

論文発表

なし。

学会発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



表 1. 分析に用いた各種大麻マイクロサテライトマーカー

Marker	Sequence	Repeat	allele bp range
ANUCS202F	TGTA AACGACGGCCAGAGGACCAATTTTGAATATGC	(GA) 20	168-206
ANUCS202R	GTTTAGAGAGGGAAGGGCTAACTA		
ANUCS204F	TGTA AACGACGGCCAGTGGAAAGATATGCAACTGGAG	(CT) 26	149-205
ANUCS204R	GTTTAACGAAGATAAGCACGAACA		
ANUCS206F	TGTA AACGACGGCCAGTCCAATAAGATTTCACAGTCG	(AT) 11	179-187
ANUCS206R	GTTTAACGGGTTCTTTGGGTATT		
ANUCS301F	TGTA AACGACGGCCAGTATATGGTTGAAATCCATTGC	(TTA) 15	230-282
ANUCS301R	GTTTAACAAAGTTTCGTGAGGGT		
ANUCS302F	TGTA AACGACGGCCAGTAAACATAAACACCAACAACCTGC	(CAA) 7 - (CAA) 4	162-195
ANUCS302R	GTTTATGGTTGATGTTTGTGATGGT		
ANUCS303F	TGTA AACGACGGCCAGTTAATCAACAATGACAATGGC	(GTG) 7	163-178
ANUCS303R	GTTTGATTAAGGTCCCTCGACGATA		
ANUCS304F	TGTA AACGACGGCCAGTCTTCACTCACCTCCTCTCT	(TCT) 8 (TCA) (TCT) 7	189-252
ANUCS304R	GTTTCTTTAAGCGGGACTCGT		
ANUCS305F	TGTA AACGACGGCCAGTAAAGTTGGTCTGAGAAGCAAT	(TGG) 10	163-184
ANUCS305R	GTTTCCTAGGAACCTTCGACAACA		
ANUCS307F	TGTA AACGACGGCCAGTGGCTGAGTAGTCTAAGCTTCC	(ACC) 6	127-130
ANUCS307R	GTTTGGACTAGCCACCATCAGG		
B01-CANN1F	TGTA AACGACGGCCAGTTGGAGTCAAATGAAAGGGAAC	(GAA) 13 (A) (GAA) 3	345-361
B01-CANN1R	GTTTCCATAGCATTATCCCACTCAAG		
B05-CANN1F	TGTA AACGACGGCCAGTTTGATGGTGGTGAAACGGC	(TTG) 9	257-266
B05-CANN1R	GTTTCCCAATCTCAATCTCAACCC		
C11-CANN1F	TGTA AACGACGGCCAGTGTGGTGGTGGATGATGATAATGG	(GAT) 8 (GGT) 7	172-197
C11-CANN1R	GTTTGAATTGGTTACGATGGCG		

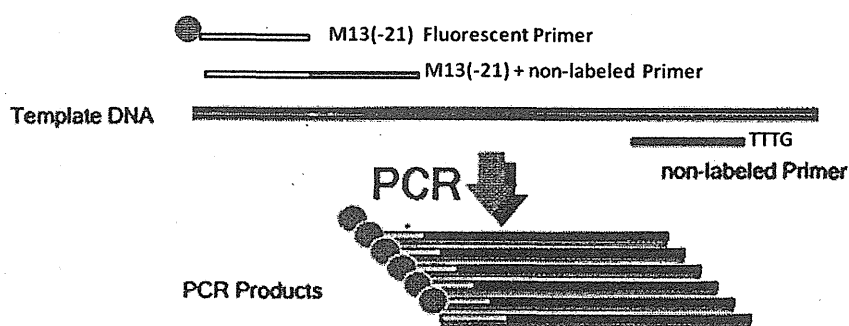


図 1. 蛍光プライマーによる PCR 産物の蛍光標識化  
(GeneMapper™ カスタマーレーニング資料を一部改変)

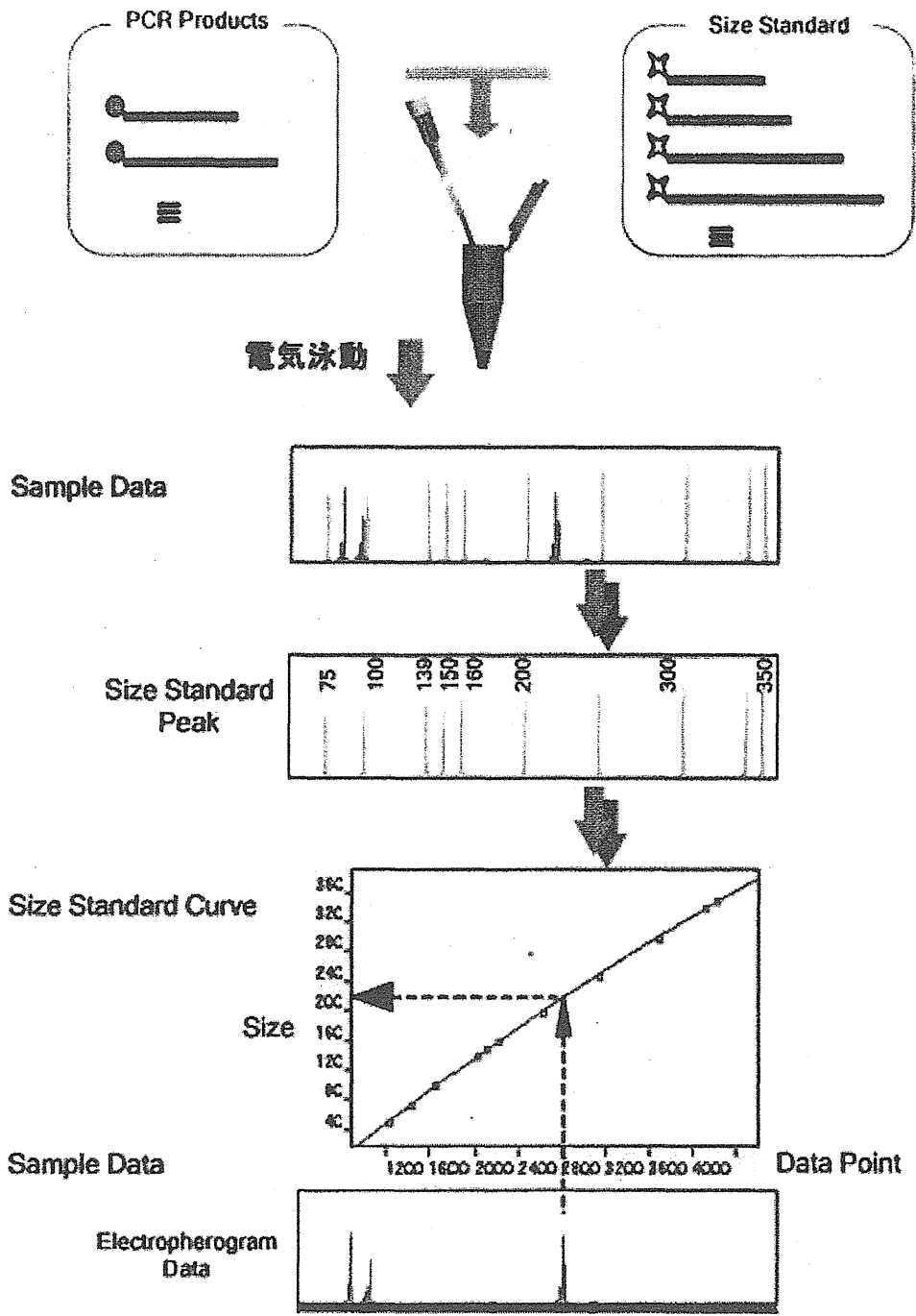


図2. ABI Prism 3100-Avant Genetics Analyzer を用いた PCR 産物のサイズ解析 (GeneMapper™ カスタマートレーニング資料を抜粋)

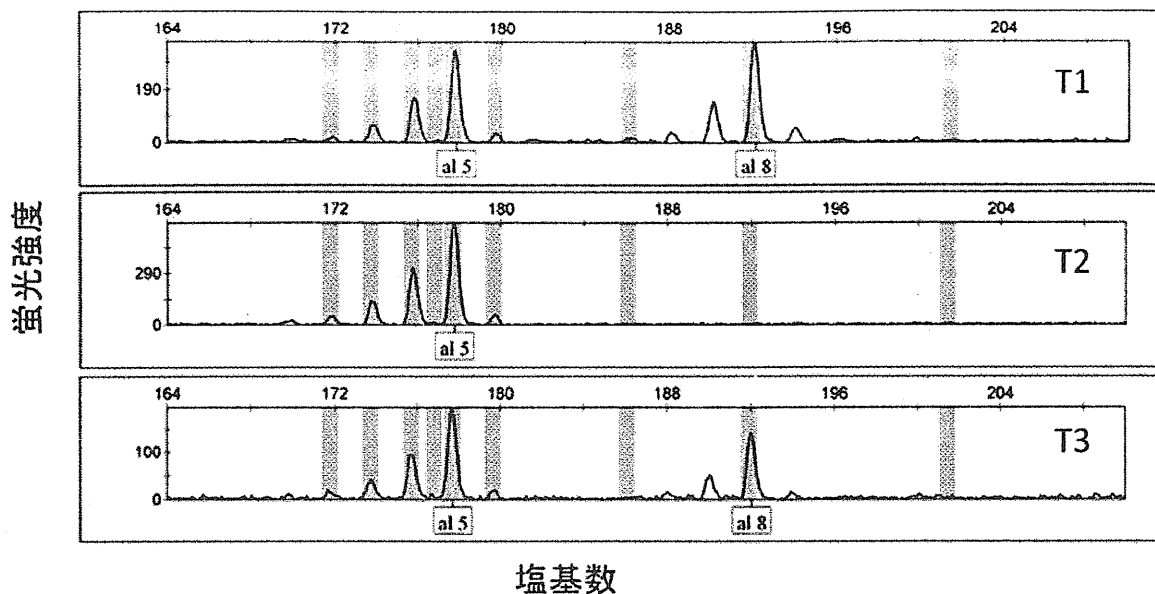


図 3. GeneMapper を用いたトチギシロ種 3 粒の ANUCUS202 マーカーで得られた多型のサイズ解析結果

al = allele 対立遺伝子

表 2. 各種マイクロサテライトマーカーを用いた大麻種子の DNA 多型 (allele No.)

種子 \ Marker	202	204	206	301	302	303	304	305	307	B01	B05	C11
T1	5 8	5	3	1	4	1 4	4	1	2	3 5	2	4
T2	5	5	2 3	1	1 4	3 4	4	1	2	5	2	2
T3	5 8	5	3	1	1 4	1 3	4	1	2	3 5	2	4
M1	2	1 7	1 3	4 6	2	1 2	2 7	1 4	2 3	1	3	2
M2	6	6	3 4	4	2 4	1 2	2 7	2 4	3	1	3	2
M3	1 2	7	3 4	3 4	2 4	2	2 7	2	2 3	1	3	2

分担研究報告書

分担研究課題: 遺伝子情報を利用したケシ属植物の鑑別に関する研究

分担研究者: 河野 徳昭 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

研究協力者: 吉松 嘉代 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター

筑波研究部 育種生理研究室長

研究要旨: 本研究においては、オニゲシを主な研究対象植物として、オリパビンに代表される、その生産するモルヒナンアルカロイド類の成分の分布並びに、生合成機構に関する情報を整備し、これらの成分の生合成に関わる酵素遺伝子群の各種性状の解明並びに、オニゲシと近縁のケシ属植物との遺伝子レベルでの簡便な鑑別法を確立することを目的とする。本年度は、オリパビンの生合成に関わる基盤情報を整備する上で重要となる、生合成酵素遺伝子群の網羅的な発現遺伝子情報を取得するため、オニゲシ、ケシ及び、アルカロイド生産能に変異を生じたこれらの植物間の交配種等を含む無菌培養物、合計9系統を材料として、次世代シーケンサーを用いた *de novo* トランスクリプトーム解析並びに、発現する全遺伝子の情報集積である EST (expressed sequence tag) ライブラリーの構築に着手した。これらのアヘンアルカロイド生産能の異なる植物試料群のトランスクリプトーム情報を用いて発現遺伝子群の比較解析を行うことにより、オリパビン等のアヘンアルカロイドの生合成制御に関する新たな知見が得られるものと期待される。

#### A. 研究目的

モルヒナンアルカロイドの一種であるオリパビンは、平成19年10月20日以降「麻薬及び向精神薬取締法」「麻薬、麻薬原料植物、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令」により、その所持、施用等が規制されることとなった。このオリパビンはケシ属植物の一種であるオニゲシのアルカロイド成分であるが、現在のところオニゲシは法規制の対象とはなっていない。

本研究においては、オニゲシを主な研究対象植物として、オリパビンに代表される、その生産するモルヒナンアルカロイド類の成分の分布並びに、生合成機構に関する情報を整備し、これらの成分の生合成に関わる酵素遺伝子群(ケシにおけるモルヒネの生合成経路を図1に示す)の各種

性状の解明並びに、オニゲシと近縁のケシ属植物との遺伝子レベルでの簡便な鑑別法を確立することを目的とする。

ケシはアヘン法により栽培が厳しく規制されており、その栽培研究は限られた研究施設でのみ実施可能である。薬用植物資源研究センター(以下、センター)では厳重な管理体制の下、ケシやハカマオニゲシをはじめとするモルヒナンアルカロイド生産植物の栽培研究を現在も実施中であり、また、将来的にオリパビンを含む植物そのものが法規制の対象となった場合においてもその栽培及び研究への使用に対応できることから、本研究をセンターで実施する意義は大きい。

本研究においては、オリパビン生産植物であ