

は、1 検体のみの解析に留まった。解析結果を Fig. 5-5, Table 5-3 にまとめた。解析可能だった 23 検体より、9 個の遺伝子型が認められた。この内、197-204 番目の塩基に欠失が見られた genotype 6 は全長 359 bp, 295-312 番目の塩基に挿入が見られた genotype 8 は全長 385 bp であり、その他はいずれも全長 367 bp であった。最も多くの検体が帰属された遺伝子型は genotype 2 であり、約半数の 11 検体がこの配列を示し、特にキク由来の試料である KiKw-2, 8, 10, 12 は、全てこの遺伝子型に帰属された。同一ロット内の 2 検体が、同じ遺伝子型を示したのは、KiKw-1, 2, 8, 10, 12 の 5 試料であった。Blast search program による相同性検索の結果、*C. boreale*, *C. vestitum*, *C. lavandulifolium*, *C. indicum*, *C. zawadskii*, *C. rhombifolium*, *C. x morifolium* として登録されている配列などと一致するかあるいは、非常に高い相同性を示した。ただし、塩基の挿入／欠失が見られた genotypes 6, 8 並びに、塩基の重複が見られた genotype 9 には、一致する配列は認められず、特に genotypes 6, 8 は、他の遺伝子型に比べ、相同性は低値に留まった。

D.5. 考察

市場に流通するキクカの ITS1 配列及び *trnH-psbA* IGS 配列を解析した結果、いずれの領域の配列においても、わずかな違いを持つ多くの遺伝子型が認められた。ITS1 配列と *trnH-psbA* IGS 配列との比較では、前者が、13 個の遺伝子型、後者が 9 個の遺伝子型であり、後者の配列のほうが、多様性がやや小さかった。同一ロット内の 2 検体で、同一の遺伝子型を示した試料は、ITS1 配列では、KiKw-2, 8, 10, *trnH-psbA* IGS 配列では、KiKw-1, 2, 8, 10, 12 であった。この内、KiKw-2, 8, 10, 12 は、いずれも性状からキク由来と判断された試料である。こ

のことは、キク由来の試料のほうが、シマカンギク由来のものに比べて、遺伝的背景が安定していることを示唆している。キク由来の試料で唯一、2 検体間での配列が異なっていた KiKw-12 の ITS1 配列においても、違いは、1 塩基のみであることも上記の考察を支持するものである。恐らくは、栽培により遺伝的多様性が小さくなっていることに起因すると想像された。

今回解析に用いた遺伝子領域による基原種鑑別については、多数の近縁植物の存在、倍数性、*Chrysanthemum x morifolium* の複雑な種分化の過程などの要因により、不可能であった。

E.5. 結論

市場に流通するキクカの遺伝子情報の整備を目的に、核 rDNA の ITS1 領域及び葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、栽培品が主であると思われるキク由来の試料において、遺伝的多様性が小さいことを示す結果を得たが、基原種鑑別法に繋がる情報は得られなかった。

F.5. 参考文献

- 1) Liu P.-L. *et al.*, Phylogeny of the genus *chrysanthemum* L.: evidence from single-copy nuclear gene and chloroplast DNA sequences. *PLoS ONE*, **7**: E48970 (2012).
- 2) Zhao H.-B *et al.*, Molecular phylogeny of *Chrysanthemum*, *Ajania* and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast *trnL-F* IGS sequences. *Plant Syst. Evol.*, **284**: 153-169 (2010).

6. キジツ (河野)

A.6. 研究目的

生薬キジツの基原植物についての、第十六改正日本薬局方(平成23年3月24日 厚生労働省告示第65号)の記述は下記のとおりである。

「枳実 Immature Orange AURANTII FRUCTUS IMMATURUS

本品はダイダイ *Citrus aurantium* Linné var. *daidai* Makino, *Citrus aurantium* Linné 又はナツミカン *Citrus natsudaikai* Hayata (*Rutaceae*) の未熟果実をそのまま又はそれを半分に横切したものである。」

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。

「ダイダイ *Citrus aurantium* Linné var. *daidai*

Makino =

Citrus aurantium L. var. *daidai* Makino

Citrus aurantium L. 'Daidai'

Citrus aurantium Linné =

Citrus aurantium L.

ナツミカン *Citrus natsudaikai* Hayata

ハッサク *Citrus aurantium* L. subsp. *hassaku*

(Tanaka) Hiroe

Citrus hassaku hort. ex Tanaka

B.6.1. 実験材料

生薬キジツの市場流通品モデル試料(20市場品、4参考試料)はTable 6-1のとおりである。NIB-0830については試料が少量であったため、遺伝子情報の取得には供試しなかった。

B.6.2. 実験方法

1) 遺伝子鑑別に用いる遺伝子領域の選定

Yamaji らの、核リボソーマル DNA ITS 領域の遺伝子多型の組成比較によるカンキツ類栽培種の起源の解明についての報告(文献1)¹⁾により、ITS1領域の多型情報(Table 6-2に抜粋)を用いることで鑑別対象種のカンキツ類を識別することが可能と

考えられたので、生薬キジツの遺伝子情報の収集対象領域として ITS1 領域を選択した。

2) ゲノム DNA 調製及び PCR 増幅

遺伝子解析用に提供されたキジツ各試料について、刻み試料の場合は、異なる刻み片1片を1検体とすることとして、1試料から無作為に2検体をサンプリングした。刻み以外の試料については、試料片1個から1検体を調製することとし、1試料から無作為に2検体をサンプリングした。なお、PCR増幅が不調な場合は、検体数を追加した。

DNA 調製には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用した。上記のように調製した生薬検体を個別に直径 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 50 µL の AE バッファーで溶出し、その 1 µL を PCR に使用した。

3) 核 DNA ITS 領域の増幅・塩基配列解析

以下に、KOD-plus (TOYOBO) を PCR 酵素に使用した ITS 領域 (ITS1-ITS2 または ITS1 のみ) の増幅～遺伝子解析の流れについて記す。

PCR reaction mixture: water 35 µL, KOD-plus Buffer 5 µL, dNTP mix 5 µL, MgSO₄ 2 µL, KOD-plus 1 µL, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 µL each, genome DNA 1 µL (reaction volume: 50 µL)
PCR condition: 94°C 2 min. - (94°C 15 sec. -

58°C 30 sec. - 68°C 90 sec.) x 35 - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

Primers: ITS5 (sense): 5'-GGA AGT AAA
AGT CGT AAC AAG G-3'

ITS-NIHS-rev (antisense): 5'-GTA GTC CCG
CCT GAC CTG-3'

ITS1-NIHS-rev (antisense): 5'-TAT CCG TTG
CCG AGA GTC-3'

PCR 産物は、アガロース電気泳動で増幅
パターンの解析を行った。

クローニングを行う場合は、PCR 増幅産
物を Wizard® SV Gel and PCR Cleanup
System (Promega) でゲル精製し、末端 A
付加ののち、T-vector にクローニングし、
各検体について 7~9 クローンの塩基配列
の解析を行った。

ダイレクトシーケンシングの場合は、
Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System
(Promega) を使用し、未反応のプライマー
及び、プライマーダイマー等のサイズのこ
さな非特異的増幅産物を除き、サイクル
シーケンシング反応の鋳型として用いた。
サイクルシーケンシング反応には BigDye
Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)
を用い、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。

分子系統樹解析は DDBJ が提供する
ClustalW (ver 2.1) で行い、系統樹描画に
は TreeView (Win32) ver. 1.6.6 ([http://
taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html](http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html)) を
使用した。

C.6. 研究結果

キジツモデル試料 21 試料、43 検体につ
いて ITS1 領域の塩基配列情報を取得した。
ダイレクトシーケンシングの結果のうち、基原

植物の鑑別に肝要と考えられる塩基につい
てまとめたものが Table 6-3 である。表の塩
基番号は Yamaji らの報告¹⁾の Fig. 1 に従い、
C. hassaku, *C. natsudaikai*, *C. aurantium*, *C.
sinensis*, *C. unshiu*, *C. reticulata* の鑑別に肝
要な変異点のみ抽出した。なお、これらの
変異点のみでは、植物種を一意的に特定す
ることはできず、例えば *C. aurantium* と *C.
neoaurantium* を区別することはできない。

これらの変異点について、Yamaji らの報
告する ITS 領域の変異点情報と比較し、こ
れらが一致したものについて、基原植物種
の判定結果を“judge”の欄に記した。

その結果、国内の四国産の試料のうち、
PCR 増幅産物が得られたものは *C. hassaku*
を基原とするものが多く、中国浙江省産の
試料は *C. aurantium* を基原とするものが
多数であることが明らかになった。

NIB-0813 (2 検体)、0814 (2 検体)、0827
(2 検体)、0829 (1 検体)、0833 (2 検体)
の 5 試料、9 検体については、Yamaji らの
分類表において一致する配列型がなかった
が、いずれも *C. natsudaikai*, *C. aurantium* と
高度に近縁な配列型を有することが確認さ
れた。なお、NIB-0817, NIB-0821 につい
ては今回適用したゲノム DNA 調製および
PCR の手法では、増幅産物を得ることがで
きなかった。

NIB-0815, NIB-0822, NIB-1122 の 3 試料に
ついては、ダイレクトシーケンス、クロー
ニング&シーケンシングの両手法を適用し
解析を行ったので、以下に詳細を記す。な
お、Yamaji らの報告するカンキツ類植物の
推定交配親の代表的リボタイプ 18 種と、今
回、上記 3 種についてクローニング&シー
ケンシングにより得られた ITS1 の配列型
について系統樹解析を行った結果及び、リ
ボタイプの出現頻度を Fig. 6-1 に示す。

[NIB-0815 (中国江西省産)]

NIB-0815 の検体#1 は、ダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類において一致する遺伝子型が存在しなかった。このサンプルについて、PCR 産物をクローニングしたのち塩基配列に供した結果、判明したリボタイプの構成は、Yamaji らの報告に当てはめると E (3 types) (MANDARIN), M (PUMMELO), N (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 6 タイプであり、これらにより生じると推定される混合塩基は Table 6-3 のようになった。

NIB-0815 の検体#2 は、ダイレクトシーケンスでは *C. sinensis* 型と判定された。このサンプルについて PCR 産物をクローニングしたのち塩基配列に供した結果のクローンの混合塩基パターンは Table 6-3 に示すように、ダイレクトシーケンスの結果と同様であった。クローニングにより判明したリボタイプの型は、E (2 types) (MANDARIN), J[PPWS (推定母種) 5], M (PUMMELO), N (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 6 タイプの混合であり、Yamaji らの報告する *C. sinensis* のリボタイプ (E, J, Q の 3 タイプの混合) と比較して複雑な構成であることが判明した。

[NIB-0822 (中国浙江省産)]

NIB-0822 の検体#1 はダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類の *C. aurantium* 型と判定された。この検体についてクローニング&シーケンシングに供したところ、リボタイプは E (MANDARIN), O (PUMMELO), P (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 4 タイプにより構成されることが明らかになり、これらのリボタイプから推定される ITS1 の混合塩基のパターンは Table 6-3 のようになった。Table 6-3 の 71 番目の塩基がダイレクトシーケンスでは T であったが、推定混合塩基では Y (T/C) となったが、これはリボタイプ Q

に由来するものである。

NIB-0822 の検体#2 はダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類の *C. aurantium* 型と判定された。

NIB-0822 の検体#3 は、クローニング&シーケンシングに供したところ、リボタイプは E (MANDARIN), N (PUMMELO), O (PUMMELO), P (PUMMELO), Q (PUMMELO) の 5 タイプにより構成されることが明らかになり、これらのリボタイプから推定される ITS1 の混合塩基のパターンは Table 6-3 のようになった。Table 6-3 の 71 番目の塩基がダイレクトシーケンスでは T であったが、推定混合塩基では Y (T/C) となったが、これはリボタイプ Q に由来するものである。Yamaji らの報告では、*C. aurantium* のリボタイプ構成は、E, O, P の 3 タイプであり、NIB-0822 は検体#1, #3 の両者とも、リボタイプ構成要素が多いことが明らかになった。

[NIB-1122 (中国浙江省産)]

NIB-1122 の検体#1 については、ダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類の *C. natsudaidai* 型と判定された。本検体についてクローニング&シーケンシングに供したところ、リボタイプは E (2 タイプ) (MANDARIN), N (3 タイプ) (PUMMELO), I[PPWS (推定母種) 4] の 6 タイプから構成されることが明らかになった。Yamaji らの柑橘類のリボタイプ構成解析によると、リボタイプ I を有すると報告されているものは *C. natsudaidai* (リボタイプ構成: F, I, N) のみであり、検体#1 は *C. natsudaidai* と近縁の植物を基原とすると推定される。

NIB-1122 の検体#2 については、ダイレクトシーケンスでは文献 1 のタイプ分類に一致する植物種がなかった。本検体についてクローニング&シーケンシングに供したところ、リボタイプは D (3 タイプ)

(MANDARIN), K[PPWS (推定母種) 5], M(2 タイプ) (PUMMELO), Q(PUMMELO) の 7 タイプから構成されることが明らかになった。

D.6. 考察

キジツモデル試料 NIB-0817, NIB-0821 については今回適用したゲノム DNA 調製および PCR の手法では、増幅産物が得られなかった。これは、両者の入手年がそれぞれ 2003 年及び 2006 年と古く、経年による核酸の分解が原因と推定される。陳旧品を良品とするキジツの遺伝子鑑別においては、今後、経年サンプルを材料とした場合の遺伝子鑑別手法の確立が課題と考えられる。

D 社からは参考品として、市場流通品ではない試料の提供を受けた。これらは ITS1 領域の解析の結果、NIB-0818 は *C. sinensis*、NIB-0820, NIB-0831, NIB-0832 の 3 試料は *C. unshiu* と判別され、本遺伝子領域がキジツの基原植物種推定に有用であることが示された。

E.6. 結論

キジツのモデル生薬の遺伝子鑑別対象領域の塩基配列解析を行った。

国内流通生薬モデル試料 21 試料、43 検体について、核リボソーム DNA ITS1 領域の解析を行ったところ、国内流通品のほぼすべてが *C. aurantium* または *C. hassaku* の ITS1 領域と同一もしくは非常に相同性の高い遺伝子型を有することが判明した。すなわち、国内に流通するキジツの多くは *C. aurantium*, *C. hassaku* 及びこれらの近縁種を基原とするものであることが明らかになった。

以上の塩基配列解析及び基原植物鑑別結果は、データベースの遺伝子鑑別情報のカテゴリーに収載される。

F.6. 参考文献

1) Yamaji H., Kondo K., Kuniga T., Nesumi H., Yoshida T., Hashimoto K., and Takeda O., Origin of Cultivated Citrus (*Rutaceae*) Documented by the Contents of Internal Transcribed Spacer Sequences (ITS) in Nuclear Ribosomal DNA. *J. Jpn. Bot.*, **88**: 222-238 (2013).

7. エンゴサク (河野)

A.7. 研究目的

生薬エンゴサクの基原植物についての、第十六改正日本薬局方（平成 23 年 3 月 24 日 厚生労働省告示第 65 号）の記述は下記のとおりである。

「延胡索 *Corydalis Tuber*

CORYDALIS TUBER

本品は *Corydalis turtschaninovii* Besser forma *yanhusuo* Y. H. Chou et C. C. Hsu (*Papaveraceae*) の塊茎である。」

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。

「*Corydalis turtschaninovii* Besser forma *yanhusuo* Y. H. Chou et C. C. Hsu
= *Corydalis turtschaninovii* Besser f. *yanhusuo* (W. T. Wang) Y. H. Chou & C. C. Hsu W. T. Wang

Corydalis yanhusuo」

B.7.1. 実験材料

生薬エンゴサクの市場流通品モデル試料（15 市場品）は Table 7-1 のとおりである。

B.7.2. 実験方法

1) 遺伝子情報収集対象領域の選定

エンゴサクの基原植物鑑別に用いる遺伝子領域の候補としては、核リボソーム DNA の ITS 領域が混合波形となり解析が困難で

あるという情報を富山大学小松かつ子教授より得たので、葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域を解析対象とした。

2) *Corydalis* 属植物葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域の遺伝子情報の取得および解析対象領域の決定

エンゴサクが含まれる *Corydalis* 属植物の葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域については国際遺伝子情報データベース (EMBL/GenBank/DDBJ) に収載された情報が、10 件 (Table 7-2) と限定的であったため、*Corydalis* 属植物の同領域の標準となる塩基配列情報を取得するため、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部において栽培維持されているエンゴサク 3 種、*Corydalis turtschaninovii* (エンゴサク、中国、15384)、*C. nakaii* (*C. ternata*) (コウライエンゴサク、韓国、6175)、*C. ambigua* (エゾエンゴサク、13195) を基準植物種とし、これらの植物の *trnL-trnF* 領域の遺伝子配列情報を後述の方法で解析した。得られた配列情報を精査し、生薬エンゴサクの遺伝子鑑別に使用する領域の絞込み (*trnL-intron* 領域に決定した) 及び、同領域の PCR 増幅に使用するプライマーデザインを行った。

3) エンゴサク植物体及び生薬エンゴサクからのゲノム DNA 調製及び PCR 増幅

エンゴサク植物体については、塊茎 1 個体を 1 検体として、各植物種より 2 検体のゲノム DNA 調製用試料を調製した。

エンゴサクの刻み試料については、異なる刻み片 1 片を 1 検体として、1 試料から無作為に 2 検体をサンプリングした。刻み以外の試料は、試料片 1 個から 1 検体を調製し、1 試料から無作為に 2 検体をサンプリングした。なお、PCR 増幅が不調な場合はそれぞれ検体数を追加した。

DNA 調製キットは DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を標準的に使用した。上記のように調製した塊茎または生薬片約 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 50 µL の AE バッファーで溶出し、その 1 µL を PCR に使用した。

葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域および *trnL-intron* 領域の PCR 増幅には基本的に KOD-plus を使用し、アニール 58°C、35 サイクルで行った。生薬由来のゲノム DNA を鋳型とする場合は必要に応じ 40 サイクルにサイクル数を増やし PCR を行った。

4) 葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域および *trnL-intron* の増幅・塩基配列解析

以下に、KOD-plus (TOYOBO) を PCR 酵素に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: water 35 µl, KOD-plus Buffer 5 µl, dNTP mix 5 µl, MgSO₄ 2 µl, KOD-plus 1 µl, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 µl each, genome DNA 1 µl (reaction volume: 50 µl)
PCR condition: 94°C 2 min. - (94°C 15 sec. - 58°C 30 sec. - 68°C 90 sec.) x 35 - 4°C ∞
Instrument: iCycler (BioRad)

また、使用した PCR プライマーの配列は下記のとおり。

[*trnL-trnF* 領域増幅用プライマーセット]

Primers: *trnL*-fwd:

5'-cgaaatcggtagacgctacg-3'

trnF-rev: 5'-atttgaactggtgacacgag-3'

[*trnL*-intron 領域増幅用プライマーセット]

Primers: *trnL*-fwd:

5'-cgaaatcggtagacgctacg-3'

trnL-intron-rev: 5'-ctgaattgtgggcatcgattc-3'

なお、*trnL*-*trnF* 領域増幅用プライマーは、Taberlet, P. *et al.* *Plant Mol. Biol.* **17**: 1105-1109 (1991) に記載されている primer c: *trnL*-fwd, primer f: *trnF*-rev にそれぞれ対応する。

得られた増幅産物はアガロース電気泳動で解析したのち、単一バンドの場合は Illustra ExoStar (GE ヘルスサイエンス) を用い未反応のプライマーを除去し、これを鋳型としてダイレクトシーケンシングを行った。非特異的な増幅産物が認められた場合は、標的領域の増幅産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル精製し、これを鋳型としてダイレクトシーケンシングを行った。

ダイレクトシーケンシングは、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。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。

C.7. 研究結果

1) エンゴサク植物体の *trnL*-*trnF* 領域の塩基配列解析及びモデル試料解析用プライマーのデザイン

Corydalis turtschaninovii (エンゴサク、中国)、*Corydalis nakaii* (*C. ternata*) (コウライエンゴサク、韓国)、*Corydalis ambigua* (エゾエンゴサク) の 3 種の *Corydalis* 属植物の *trnL*-*trnF* 領域の塩基配列を多重整列解析した結果を Fig. 7-1 に示す。この図に示すように、本領域は植物種間の多型に富み、と

くに前半の *trnL*-intron に対応する 301 bp の配列情報により生薬エンゴサクの基原植物種の鑑別が可能であることが判明した。そこで、この *trnL*-intron 領域について、3 植物種共に PCR 増幅が可能なプライマーとして、実験の項に記載の *trnL*-intron 増幅用プライマーを設計した。

2) エンゴサクモデル試料葉緑体 DNA *trnL*-*trnF* 領域の増幅・解析

エンゴサクモデル試料各検体 (Table 7-1) より DNeasy Plant Mini Kit を用い調製したゲノム DNA を鋳型として KOD-plus により *trnL*-intron 領域の増幅及び塩基配列の解析を行った。その結果、*trnL*-intron 領域の塩基配列は、いずれの生薬検体についても同一であり、これらは北海道研究部の *Corydalis turtschaninovii* (エンゴサク、中国) 由来のものと同一であった。すなわち、今回供試したエンゴサクモデル試料は、いずれも *Corydalis turtschaninovii* を基原とするものであることが確認された。

D.7. 考察

エンゴサクモデル試料のうち、入手年が 1987 年の試料については塩基配列解析に成功した検体が 4 検体中 1 検体のみであった。これは経年により核酸が分解されていたためと考えられる。2001 年以降の入手年の検体については、標的領域の PCR 増幅及び塩基配列解析においてとくに問題は生じなかった。

今回、北海道研究部保有の *Corydalis* 属植物 3 種の遺伝子情報を取得したが、国内に産するジロボウエンゴサク *Corydalis decumbens* やヤマエンゴサク *C. lineariloba* についても、遺伝子資源として興味が持たれる。

今後、ジロボウエンゴサクや、*Corydalis* 属植物の今回解析した系統以外の個体等の

遺伝子情報についても収集する必要があると考えられる。

E.7. 結論

エンゴサクのモデル生薬の遺伝子鑑別対象領域の塩基配列解析を行った。

国内流通生薬モデル試料 15 試料、38 検体について葉緑体 *trnL*-intron 領域の塩基配列情報 (301 bp) を解析・収集した。その結果、国内に流通するエンゴサクはいずれも *Corydalis turtschaninovii* を基原とするものと判断された。

以上の塩基配列解析及び基原植物鑑別結果は、データベースの遺伝子鑑別情報のカテゴリーに収載される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhu S., Yu X. L., Wu Y. Q., Shiraishi F.,

Kawahara N., and Komatsu K., Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived from *Paeonia lactiflora*. *J. Nat. Med.*, **69**: 35-45 (2015).

2. 学会発表

- 1) 丸山卓郎、河野徳昭、朱姝、小松かつ子、川原信夫、合田幸広、薬用植物総合情報データベースの構築-カッコンの遺伝子情報-、第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014 年 10 月、東京。
- 2) 河野徳昭、乾貴幸、吉松嘉代、川原信夫、薬用植物資源の遺伝子情報の基盤整備とその活用、第 43 回生薬分析シンポジウム、2014 年 11 月、大阪。

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

1. キョウカツ

Table 1-1 生薬「キョウカツ」市場品と同定結果

管理番号	生薬名	産地	形態	等級	入手年	同定結果
NIB-0836	キョウカツ	中国四川省	刻み		2011	<i>Notopterygium incisum</i>
NIB-0837	キョウカツ	中国四川省	原形			<i>N. incisum</i>
NIB-0838	キョウカツ	中国四川省	刻み		2012	/
NIB-0839	キョウカツ	中国四川省	原形	1 級	1989	<i>N. incisum</i>
NIB-0840	キョウカツ	中国四川省	原形	蚕	1991	<i>N. incisum</i>
NIB-0841	キョウカツ	中国四川省	原形	蚕 2 級	2003	/
NIB-0842	キョウカツ	中国四川省	原形	蚕 2 級	2006	/
NIB-0843	キョウカツ	中国四川省	原形	蚕	2011	<i>N. incisum</i>
NIB-0844	キョウカツ	中国四川省	原形	川羌活	2012	<i>N. incisum</i>
NIB-0845	キョウカツ	中国四川省	原形	川羌活	2012	/
TMPW No.28401	羌活	中国四川省理県	原形		2014/9/21	<i>N. incisum</i>

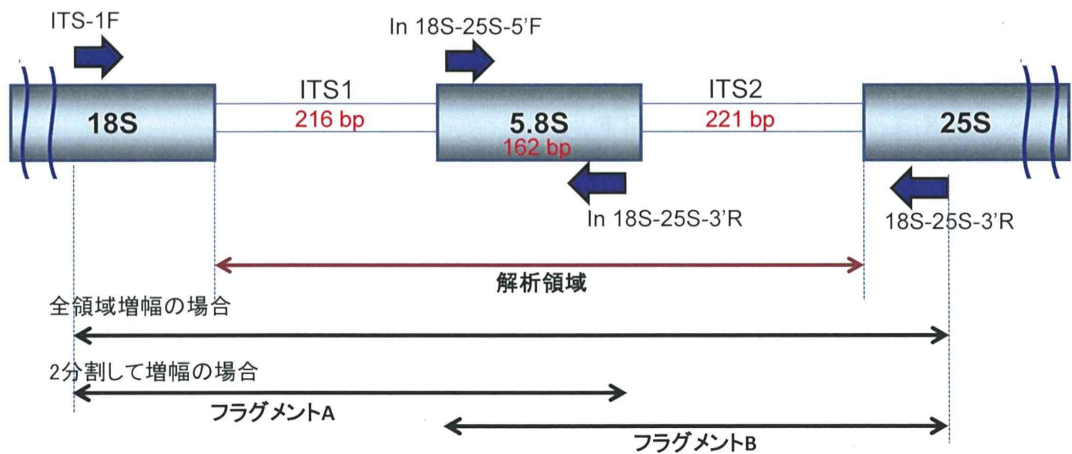


Fig. 1-1 キョウカツの ITS 領域の遺伝子解析
ーPCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置

Table 1-2 PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの塩基配列

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

植物種別内訳

Species	Count	中国植物名
<i>Notopterygium incisum</i>	11	羌活
<i>Notopterygium forbesii</i>	10	寬葉羌活
<i>Notopterygium franchetii</i>	7	瀾滄羌活

領域別内訳

領域	Count
ITS	11
ITS1	3
ITS2	9
<i>rpl</i> 16	1
<i>rps</i> 16	2
<i>mat</i> K	1
<i>psb</i> A- <i>trn</i> H	1

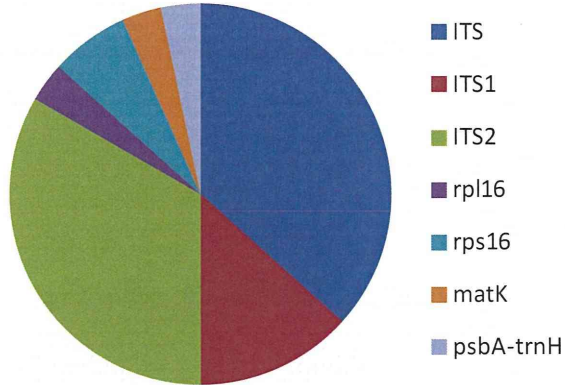


Fig. 1-2 INSD に登録されている *Notopterygium* 属植物 3 種の遺伝子鑑別関連の情報(1)

Table 1-3 INSD に登録されている *Notopterygium* 属植物 3 種の遺伝子鑑別関連の情報(2)

No.	Accession	Plant species	Region
1	DQ278168	<i>N. incisum</i>	ITS
2	GQ379335	<i>N. incisum</i>	ITS
3	EU236180	<i>N. incisum</i>	ITS
4	GU390407	<i>N. forbesii</i>	ITS
5	JF694086	<i>N. forbesii</i>	ITS
6	JF694085	<i>N. forbesii</i>	ITS
7	JQ936556	<i>N. forbesii</i>	ITS
8	JQ936555	<i>N. forbesii</i>	ITS
9	JQ936554	<i>N. forbesii</i>	ITS
10	JQ936553	<i>N. forbesii</i>	ITS
11	GQ379334	<i>N. franchetii</i>	ITS
12	U78412	<i>N. incisum</i>	ITS1
13	FJ385212	<i>N. incisum</i>	ITS1
14	AY038208	<i>N. forbesii</i>	ITS1
15	JF755946	<i>N. incisum</i>	ITS2
16	JF755945	<i>N. incisum</i>	ITS2
17	JF755942	<i>N. incisum</i>	ITS2
18	AY925166	<i>N. incisum</i>	ITS2
19	U78472	<i>N. incisum</i>	ITS2
20	AY038222	<i>N. forbesii</i>	ITS2
21	JF755947	<i>N. franchetii</i>	ITS2
22	JF755944	<i>N. franchetii</i>	ITS2
23	JF755943	<i>N. franchetii</i>	ITS2
24	FJ385115	<i>N. incisum</i>	<i>rpl</i> 16
25	GU395132	<i>N. forbesii</i>	<i>rps</i> 16
26	FJ986013	<i>N. franchetii</i>	<i>rps</i> 16
27	FJ986079	<i>N. franchetii</i>	<i>mat</i> K
28	GQ435312	<i>N. franchetii</i>	<i>psb</i> A- <i>trn</i> H

2. ケイガイ

Table 2-1 生薬「ケイガイ」市場品と同定結果

管理番号	生薬名	産地	形態	入手年	同定結果
NIB-0853	ケイガイ	中国河北省	刻み	2013	/
NIB-0854	ケイガイ	中国河北省	刻み	2011	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>
NIB-0855	ケイガイ	中国河北省	原形		<i>S. tenuifolia</i>
NIB-0856	ケイガイ	中国河北省	刻み	2012	<i>S. tenuifolia</i>
NIB-0857	ケイガイ	中国河北省	刻み	2007	<i>S. tenuifolia</i>
NIB-0858	ケイガイ	中国河北省	刻み	2009	<i>S. tenuifolia</i>
NIB-0859	ケイガイ	中国河北省	刻み	2010	<i>S. tenuifolia</i>
NIB-0860	ケイガイ	中国河北省	原形	2011	<i>S. tenuifolia</i>
NIB-0861	ケイガイ	中国河北省	刻み	2013	<i>S. tenuifolia</i>
NIB-1114	ケイガイ	中国河北省	刻み	2012	<i>S. tenuifolia</i>

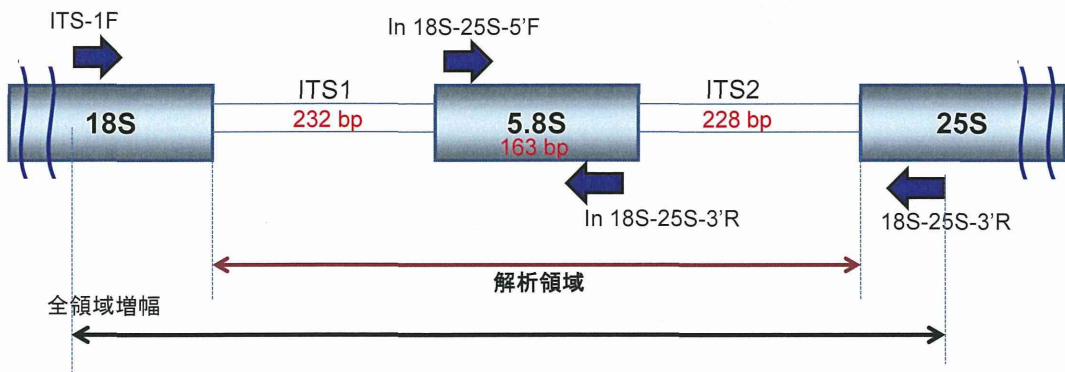


Fig. 2-1 ケイガイの ITS 領域の遺伝子解析
ーPCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの位置

Table 2-2 PCR 及びシーケンシング反応に使用したプライマーの塩基配列

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

*: Only for sequencing

領域別内訳

領域	Count
ITS	6
ITS2	5
<i>trn</i> L, <i>trn</i> L- <i>trn</i> F	3
<i>psb</i> A, <i>psb</i> A- <i>trn</i> H, <i>trn</i> H	1
<i>trn</i> H- <i>psb</i> A	1
external transcribed spacer	1
18S rRNA	1

植物種別内訳

Species	Count	中国植物名
<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	13	裂葉荊芥
<i>S. multifida</i>	5	多裂葉荊芥

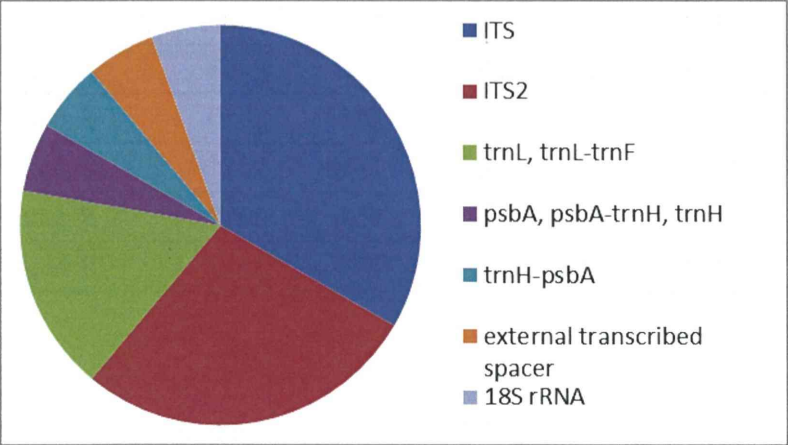


Fig. 2-2 INSD に登録されている *Schizonepeta* 属植物 2 種の遺伝子鑑別関連の情報(1)

Table 2-3 INSD に登録されている *Schizonepeta* 属植物 2 種の遺伝子鑑別関連の情報(2)

No.	Accession	Plant species	Region
1	DQ667313	<i>S. multifida</i>	ITS
2	JN802670	<i>S. tenuifolia</i>	ITS
3	EU383034	<i>S. tenuifolia</i>	ITS
4	KM051459	<i>S. tenuifolia</i>	ITS
5	AB557591	<i>S. tenuifolia</i>	ITS
6	EU591983	<i>S. tenuifolia</i>	ITS
7	KC573833	<i>S. tenuifolia</i>	ITS2
8	KC573832	<i>S. tenuifolia</i>	ITS2
9	KC573831	<i>S. tenuifolia</i>	ITS2
10	KC573830	<i>S. tenuifolia</i>	ITS2
11	HM595454	<i>S. tenuifolia</i>	ITS2
12	JF301400	<i>S. multifida</i>	<i>trn</i> L, <i>trn</i> L- <i>trn</i> F
13	DQ667500	<i>S. multifida</i>	<i>trn</i> L, <i>trn</i> L- <i>trn</i> F
14	EU186386	<i>S. tenuifolia</i>	<i>trn</i> L, <i>trn</i> L- <i>trn</i> F
15	DQ667400	<i>S. multifida</i>	<i>psb</i> A, <i>psb</i> A- <i>trn</i> H, <i>trn</i> H
16	JQ669213	<i>S. multifida</i>	external transcribed spacer
17	JN802671	<i>S. tenuifolia</i>	18S rRNA
18	AB728566	<i>S. tenuifolia</i>	<i>trn</i> H- <i>psb</i> A

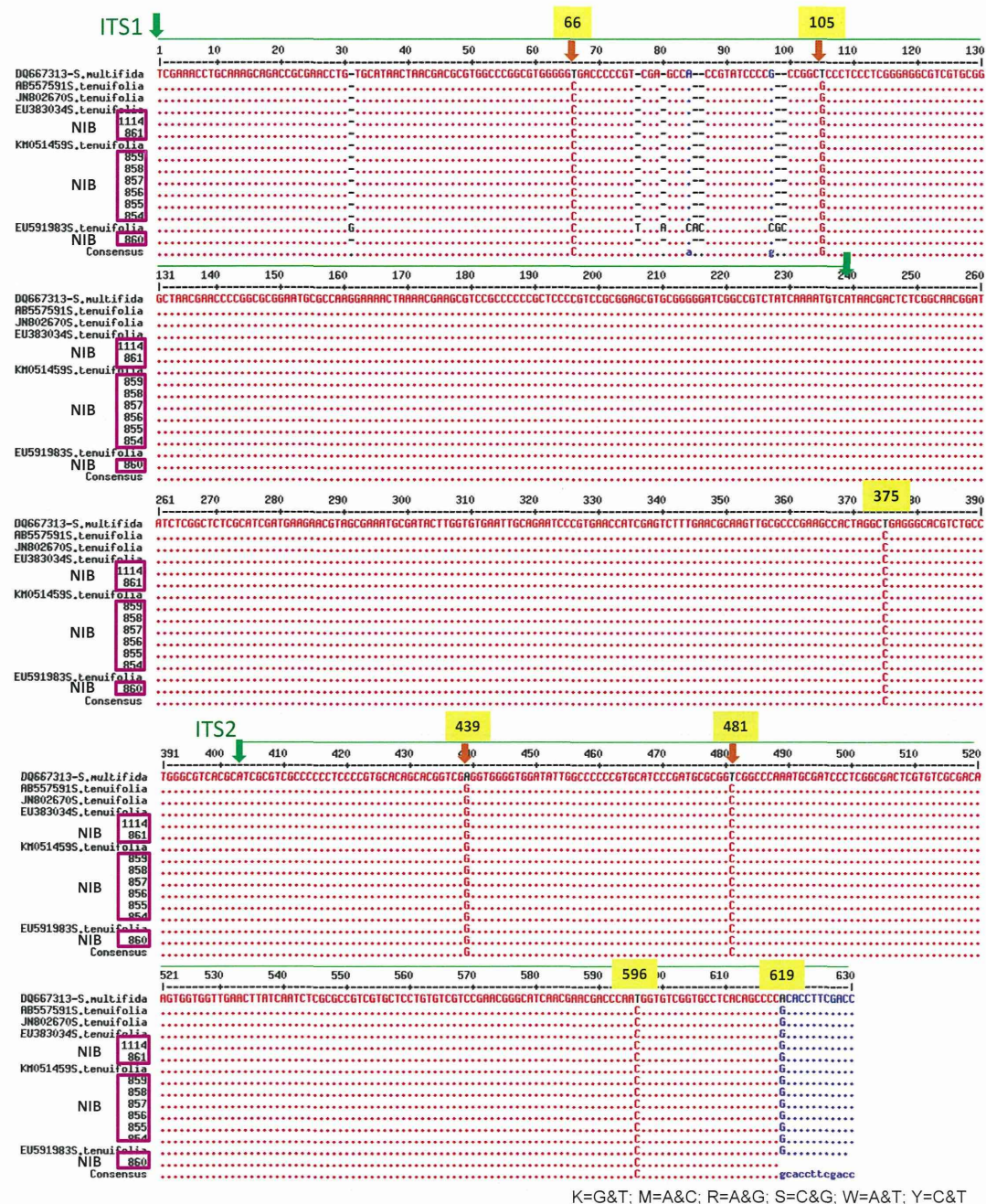


Fig. 2-3 ケイガイ市場品の ITS 領域の塩基配列と INSD に登録されている *Schizonepeta tenuifolia* 及び *S. multifida* の配列との比較

DQ667313 : Walker, J.B. and Sytsma, K.J. Department of Botany, University of Wisconsin - Madison, 132 Birge Hall, 430 Lincoln Drive, Madison, WI 53706, USA.

AB557591: Wu, Y., Zhu, S. and Komatsu, K. Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Department of Medicinal Resources; 2630 Sugitani, Toyama, Toyama 930-0194, Japan.

JN802670 : Liu, H., Gu, X. and Zhang, D. Medical School, HeBei North University, 14-Changqing Road, Zhangjiakou, HeBei Province 075000, China.

EU383034 : Yang, D.-C. Oriental Medicinal Material and Processing, Kyung Hee University, 1 Seocheon Dong Kiheung-gu, Yongin, Kyunggi-do 449-701, South Korea.

KM051459 : Jung, W., Ko, J., So, H., Kang, B., Seo, J., Yeo, J., Ham, S. and Cho, J. Medicinal Crops Seed Supply Center, Traditional of Korean Medicine, 288 Woodland-gil, Anyang-myeon, Jangheung-gun, Jeollanam-do 529-851, Republic of Korea

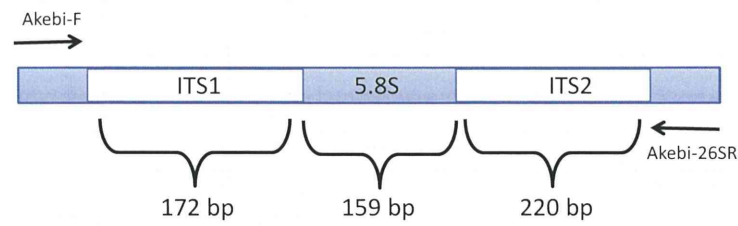
EU591983 : Xu, H., Wang, Z.T. and Hu,Z.B. Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicines of Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Road, Shanghai 201203, P.R. China

3. イレイセン

Table 3-1 生薬「イレイセン」市場品と同定結果

管理番号	生薬名	産地	形態	等級等	入手年	同定結果
NIB-0755	イレイセン	遼寧省	全形		2012.04	/
NIB-0756	イレイセン	遼寧省	原形	北		/
NIB-0757	イレイセン	黒竜江省	刻み		2012.12	<i>Clematis mandsurica</i>
NIB-0758	イレイセン	遼寧省	刻み		2012	<i>C. mandsurica</i>
NIB-0760	イレイセン	広西省	原形	参考	1997.07	/
NIB-0761	イレイセン	中国東北産	原形		1999.12	/
NIB-0762	イレイセン	内蒙古	原形		2000.07	/
NIB-0763	イレイセン	中国東北産	原形		2000.11	/
NIB-0764	イレイセン	中国東北産	原形		2002.03	/
NIB-0765	イレイセン	遼寧省	原形		2008.01	/
NIB-0767	イレイセン	遼寧省	原形		2009.09	/
NIB-0768	イレイセン	遼寧省	原形		2010.1	/
NIB-0769	イレイセン	遼寧省	原形		2013.04	/
NIB-0770	イレイセン	遼寧省	原形		2013.08	/
NIB-1126	イレイセン	遼寧省	刻み		2012	<i>C. mandsurica</i>

/: 解析結果なし



Forward primer: Akebi-F

Reverse primer: Akebi-265R

Fig. 3-1 イレイセンの ITS 領域の遺伝子解析

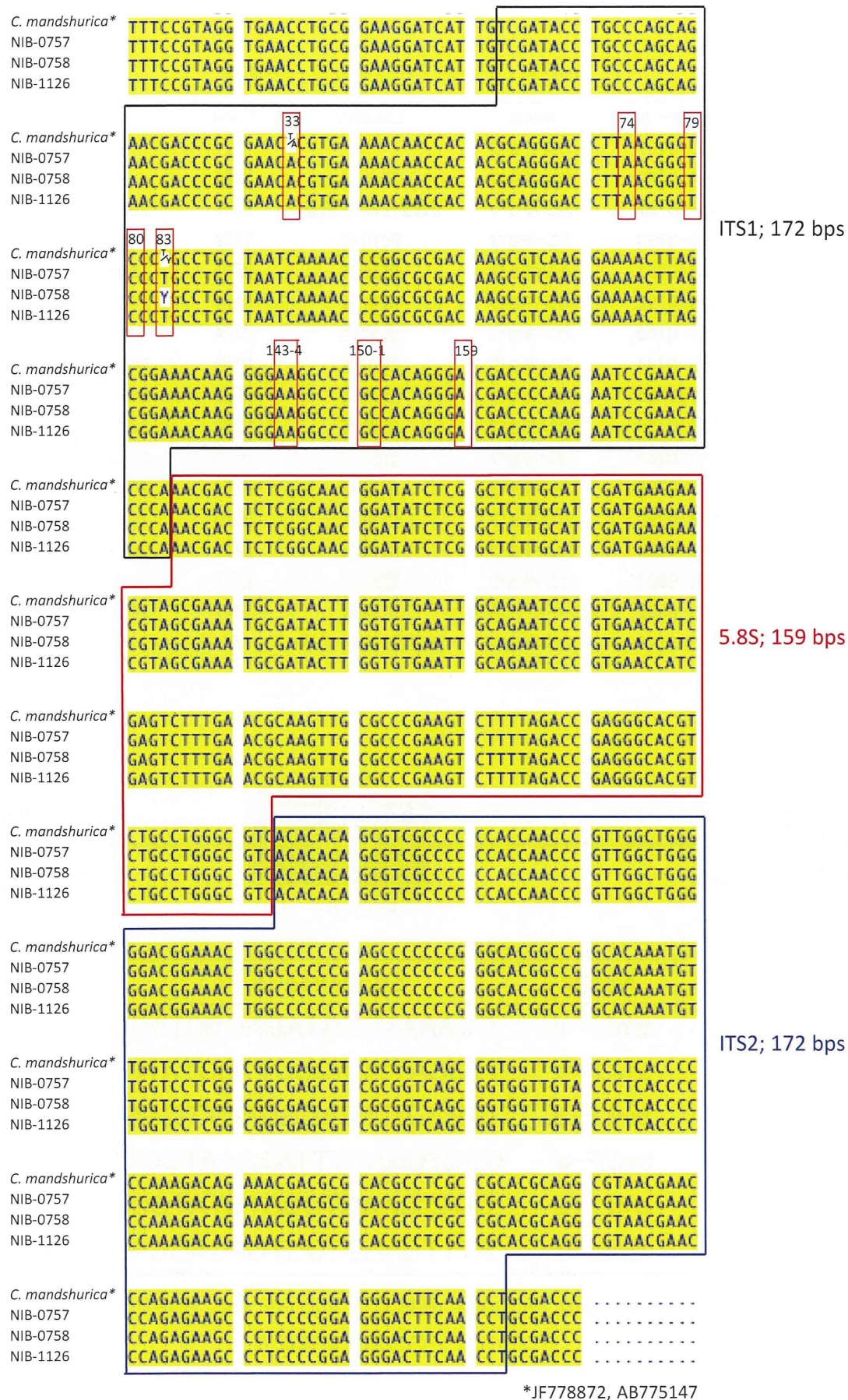


Fig. 3-2 イレイセン市場品の ITS 領域の塩基配列と INSD に登録されている *Clematis mandshurica* の配列との比較

4. カンキョウ

Table 4-1 生薬「カンキョウ」市場品

Sample no.	Vouchor no.	Name	Locality	Form	date	description
RgKw-1	NIB-0787	カンキョウ		生		16126
RgKw-2	NIB-0788	カンキョウ	広西省	原形		
RgKw-3	NIB-0789	カンキョウ	広西壮族自治区	刻み	2013.01	
RgKw-4	NIB-0790	カンキョウ	四川省	原形	1990頃	
RgKw-5	NIB-0791	カンキョウ	広東省	原形	1996.05	赤肉
RgKw-6	NIB-0792	カンキョウ	広東省	原形	2002.03	赤肉
RgKw-7	NIB-0793	カンキョウ	広東省	原形	2002.1	赤肉
RgKw-8	NIB-0794	カンキョウ	四川省	原形	2002.12	赤肉
RgKw-9	NIB-0795	カンキョウ	広東省	原形	2006.01	赤肉
RgKw-10	NIB-0796	カンキョウ	広東省	原形	2009.03	赤肉
RgKw-11	NIB-0797	カンキョウ	広東省	原形	2009.11	赤肉
RgKw-12	NIB-0798	カンキョウ	広東省	原形	2010.04	赤肉
RgKw-13	NIB-0799	カンキョウ	広東省	原形	2011.06	赤肉
RgKw-14	NIB-0800	カンキョウ	広東省	原形	2012.08	赤肉
RgKw-15	NIB-0801	カンキョウ	雲南省	刻み	2013	
RgKw-16	NIB-0802	カンキョウ(赤肉)	広西省	刻み	2013.01	
RgKw-17	NIB-1115	カンキョウ	広西壮族自治区	刻	2012	

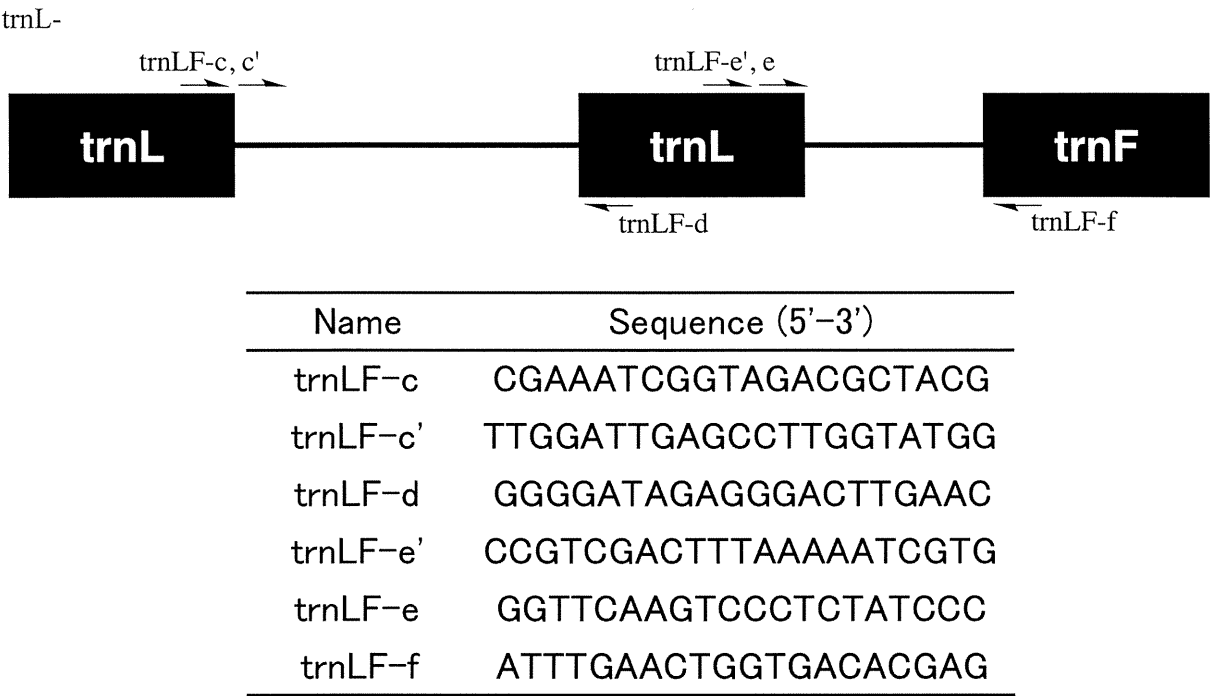


Fig. 4-1 カンキョウの *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の遺伝子解析
プライマーの位置と塩基配列

5. キクカ

Table 5-1 生薬「キクカ」市場品

Sample no.	Vouchor no.	Name	Locality	Form	Date	Description	頭花の性状から推定
KiKw-1	NIB-0803	キクカ	湖南省	原形			シマカンギク
KiKw-2	NIB-0804	キクカ	浙江省	刻み		K070066-2	キク
KiKw-3	NIB-0805	キクカ	広東省	原形	2010.02	甘	シマカンギク
KiKw-4	NIB-0806	キクカ	広東省	原形	2011.02	甘	シマカンギク
KiKw-5	NIB-0807	キクカ	広東省	原形	2012.05	甘	シマカンギク
KiKw-6	NIB-0808	キクカ	広東省	原形	2013.02	甘	シマカンギク
KiKw-7	NIB-0809	キクカ	河南省	原形	2013	漢菊花(野生品)	シマカンギク
KiKw-8	NIB-0810	キクカ	浙江省	刻み	2013	杭菊花(栽培品)	キク
KiKw-9	NIB-0811	キクカ(甘)	広東省	全形	2012.03		シマカンギク
KiKw-10	NIB-0812	キクカ(杭)	浙江省	全形	2012.06		キク
KiKw-11	NIB-1120	キクカ	安徽省	刻み	2012	甘	シマカンギク
KiKw-12	NIB-1121	キクカ	山西省	刻み	2012	杭	キク

Table 5-2 ITS1 領域における遺伝子型と塩基置換位置

genotype	sample	aligned position															Acc. No.
		14	34	52	64	83	100	101	106	107	109	113	119	128	138	140	
1	KiKw-1a	A	C	Y	A	C	G	C	R	C	C	T	C	T	R	T	
2	KiKw-1b	.	.	.	.	.	.	.	A	.	M	.	.	.	G	.	
3	KiKw-2a,b,8a,b,12a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	Y	.	.	.	
4	KiKw-3a	.	.	.	R	Y	.	.	A	S	.	.	.	.	.	.	
5	KiKw-3b	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	Y	.	.	.	.	
6	KiKw-4a,7b,9b,12b	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	Y	Y	.	.	.	
7	KiKw-4b	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	Y	Y	K	.	.	
8	KiKw-5a,6a	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	
9	KiKw-6b	.	.	.	.	.	.	M	A	.	.	.	.	.	.	.	
10	KiKw-9a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	S	.	.	.	
11	KiKw-10a,b	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	Y	.	.	.	
12	KiKw-11a	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	Y	.	.	Y	
13	KiKw-11b	.	.	.	.	Y	.	.	A	.	M	Y	.	.	.	.	
	<i>C. indicum</i> -a	A	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	EF577298
	<i>C. morifolium</i> -a	-	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	EF577310
	<i>C. morifolium</i> -b	-	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	EF577311
	<i>C. morifolium</i> -c	-	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	EF577312

Table 5-3 *trnH-psbA* 領域における遺伝子型と塩基置換位置

genotype	sample	aligned position										Acc. No.
		3	135	184	197-204	214	267	272	273	274	295-312	
1	KiKw-1a,b	C	T	T	GGTTTGTA	C	A	G	G	A	-	
2	KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	
3	KiKw-3a	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	
4	KiKw-4a,5a	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	
5	KiKw-4b,6a	.	.	C	.	.	.	T	.	C	.	
6	KiKw-6b	.	.	C	-	.	.	T	A	.	.	
7	KiKw-7b	T	.	C	.	.	.	T	.	.	.	
8	KiKw-9b,11b	.	G	C	.	.	.	T	.	C	TTGATTTCATAAATAAAT	
9	KiKw-11a	.	.	Y	.	.	.	K	.	.	.	
	<i>morifolium</i> -1, 2	.	.	C	.	T	T	T	.	.	.	JF940267-68
	<i>indicum</i> -1	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	JF940259
	<i>indicum</i> -2	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	JF940260
	<i>indicum</i> -3	.	.	C	.	.	T	T	.	C	.	JF940261
	<i>indicum</i> -4	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	JF940262



Fig. 5-1 キクカ市場品の写真

Scale span is 1 mm

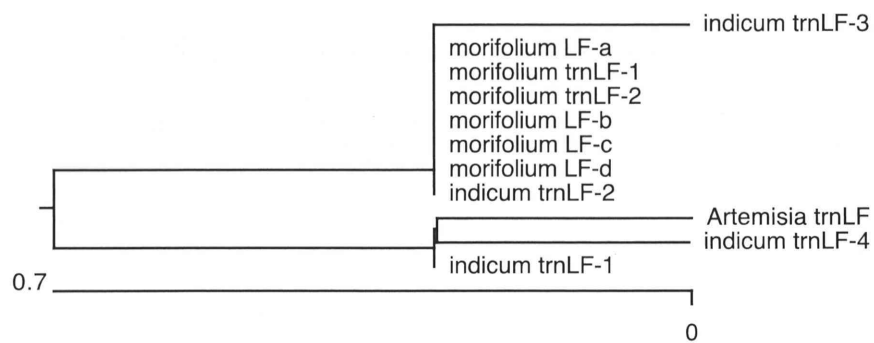


Fig. 5-2 INSD に登録されている *Chrysanthemum* 属植物の *trnL-trnF* 配列に基づいて NJ 法で構築した分子系統樹

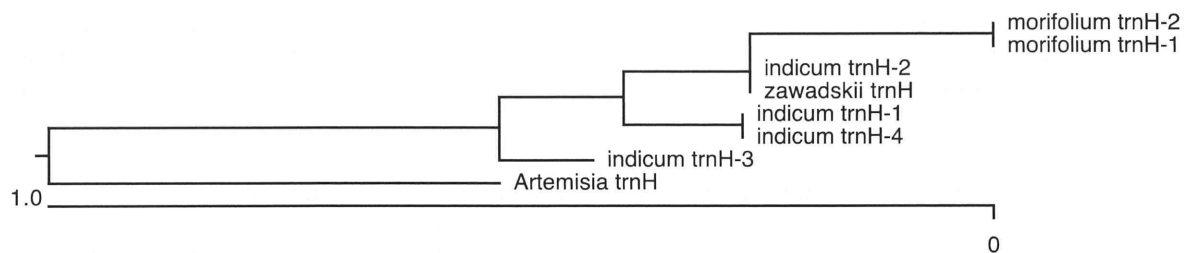


Fig. 5-3 INSD に登録されている *Chrysanthemum* 属植物の *trnH-psbA* 配列に基づいて NJ 法で構築した分子系統樹

KiKw-1a	T C G A A C C C T G C A A A G C A G A A C G A C C C G T G A A C A C G T A A A A	40
KiKw-1b	.	40
KiKw-2a ,b ,8a ,b ,12a	.	40
KiKw-3a	.	40
KiKw-3b	.	40
KiKw-4a ,7b ,9b ,12b	.	40
KiKw-4b	.	40
KiKw-5a ,6a	.	40
KiKw-6b	.	40
KiKw-9a	.	40
KiKw-10a ,b	.	40
KiKw-11a	.	40
KiKw-11b	.	40
indicum-a	.	40
morifolium-a	.	39
morifolium-b	.	39
morifolium-c	.	39
KiKw-1a	A C A A C C G A G T G Y T G A G A G G A C C A A G C T C C T G T T T G A T C C T	80
KiKw-1b	.	80
KiKw-2a ,b ,8a ,b ,12a	.	80
KiKw-3a	.	80
KiKw-3b	.	80
KiKw-4a ,7b ,9b ,12b	.	80
KiKw-4b	.	80
KiKw-5a ,6a	.	80
KiKw-6b	.	80
KiKw-9a	.	80
KiKw-10a ,b	.	80
KiKw-11a	.	80
KiKw-11b	.	80
indicum-a	.	80
morifolium-a	.	79
morifolium-b	.	79
morifolium-c	.	79
KiKw-1a	C T C G A C G C T T T G T C G A T G C G C A T T T R C T C G A G T C C T T T C G	120
KiKw-1b	.	120
KiKw-2a ,b ,8a ,b ,12a	.	120
KiKw-3a	.	120
KiKw-3b	.	120
KiKw-4a ,7b ,9b ,12b	.	120
KiKw-4b	.	120
KiKw-5a ,6a	.	120
KiKw-6b	.	120
KiKw-9a	.	120
KiKw-10a ,b	.	120
KiKw-11a	.	120
KiKw-11b	.	120
indicum-a	.	120
morifolium-a	.	119
morifolium-b	.	119
morifolium-c	.	119
KiKw-1a	G A C C T T G T G A A T G T G T C R T T G G C G C A T T A A C A A C C C C C G G	160
KiKw-1b	.	160
KiKw-2a ,b ,8a ,b ,12a	.	160
KiKw-3a	.	160
KiKw-3b	.	160
KiKw-4a ,7b ,9b ,12b	.	160
KiKw-4b	.	160
KiKw-5a ,6a	.	160
KiKw-6b	.	160
KiKw-9a	.	160
KiKw-10a ,b	.	160
KiKw-11a	.	160
KiKw-11b	.	160
indicum-a	.	160
morifolium-a	.	159
morifolium-b	.	159
morifolium-c	.	159

Fig. 5-4 キクカ市場品の ITS1 配列と INSD に登録されている *Chrysanthemum indicum* 及び *C. morifolium* の配列との比較