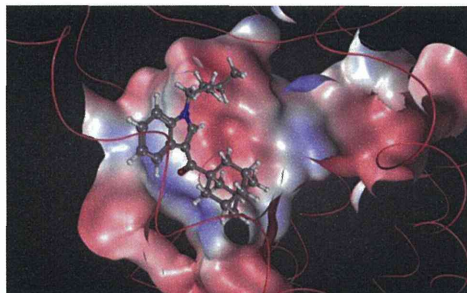
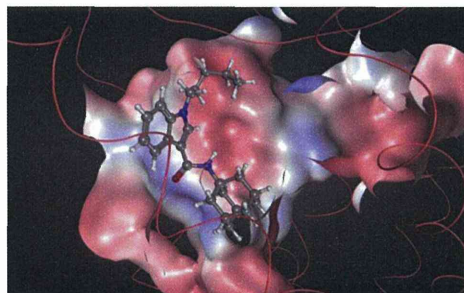


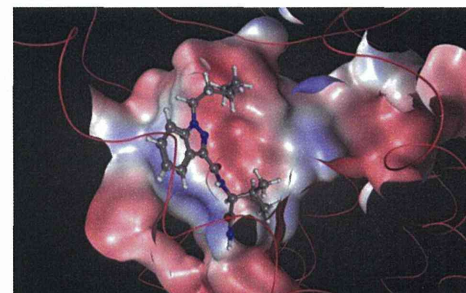
28



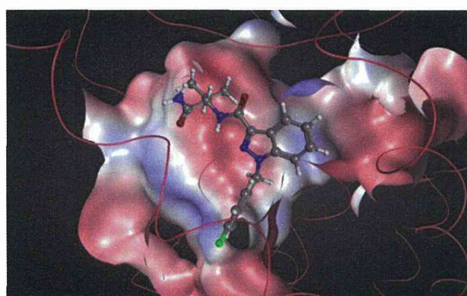
29



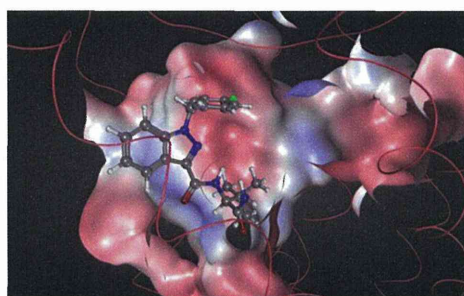
30



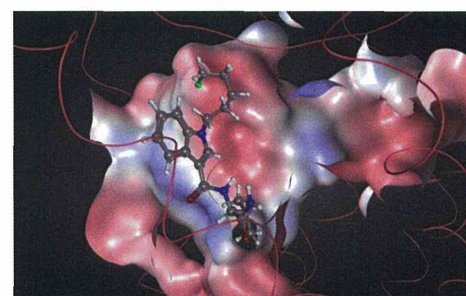
31



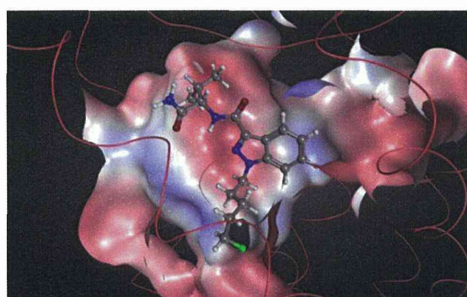
32



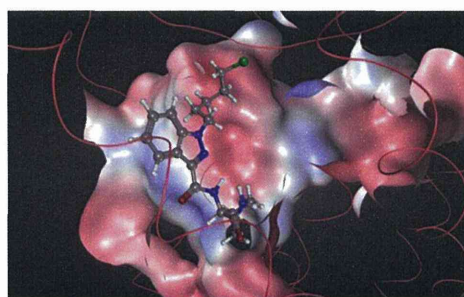
33



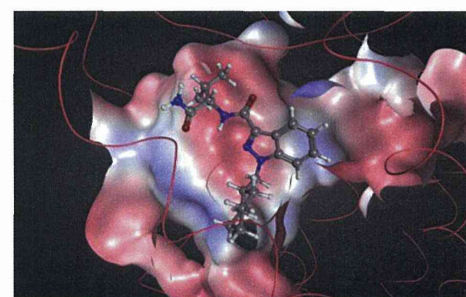
34

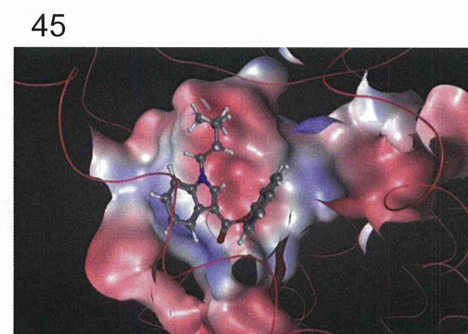
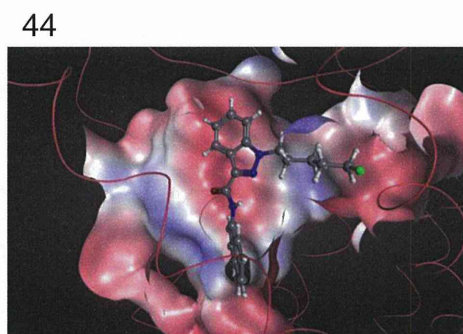
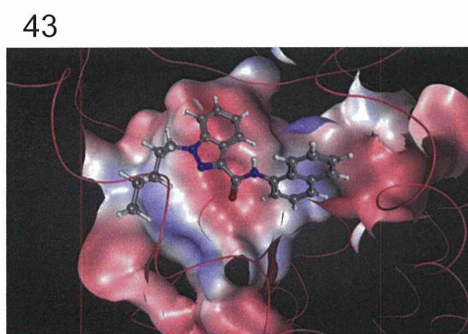
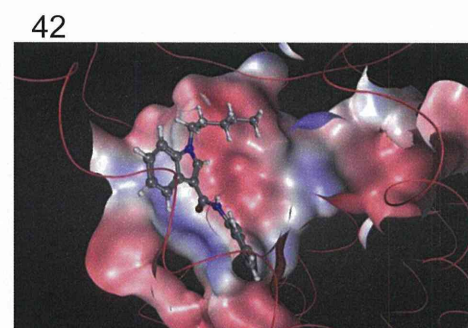
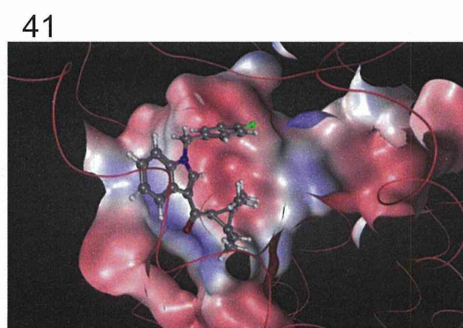
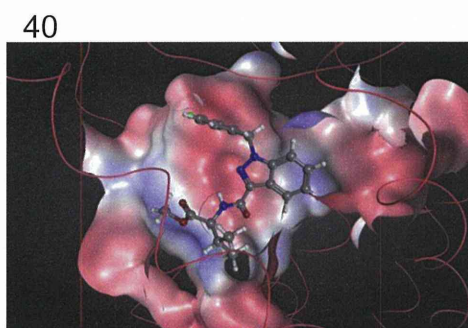
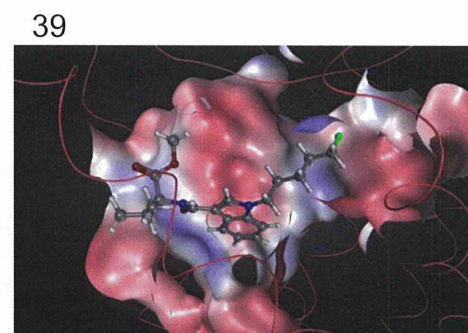
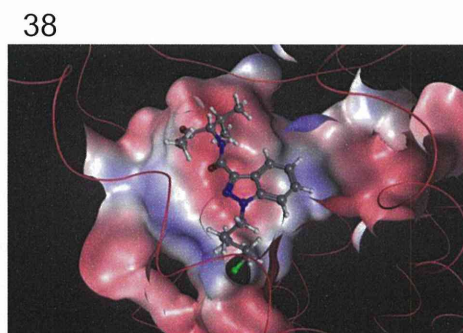
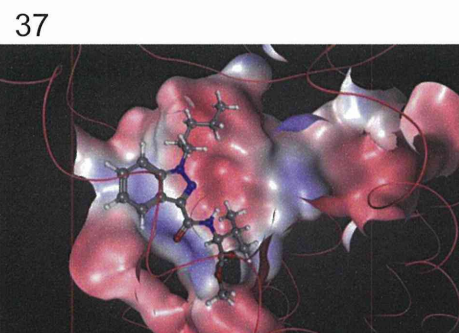


35

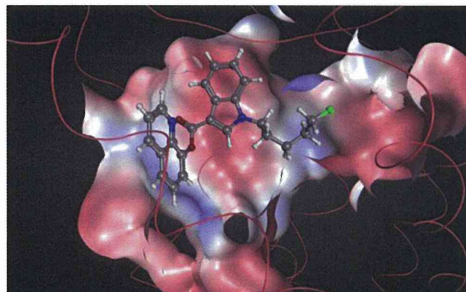


36

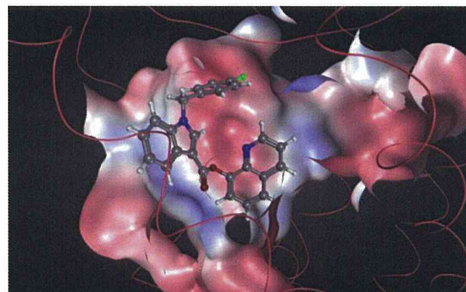




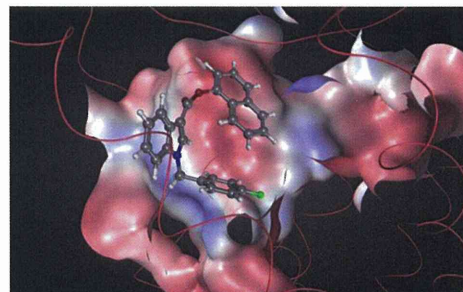
46



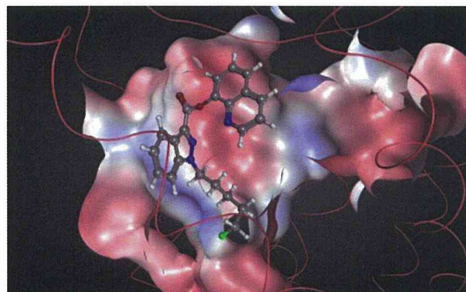
47



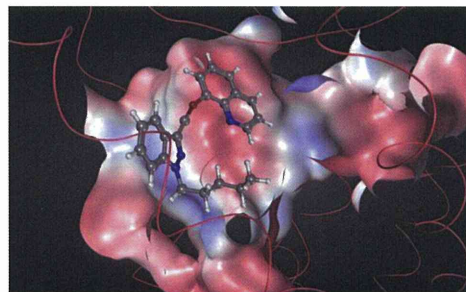
48



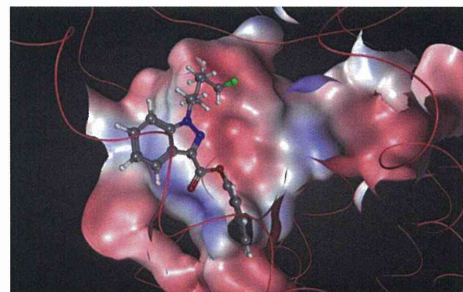
49



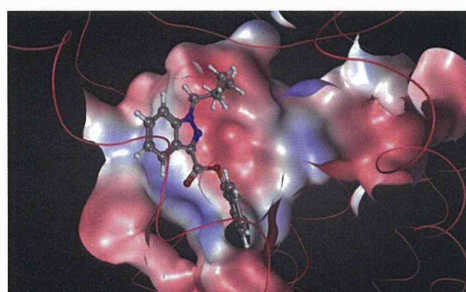
50



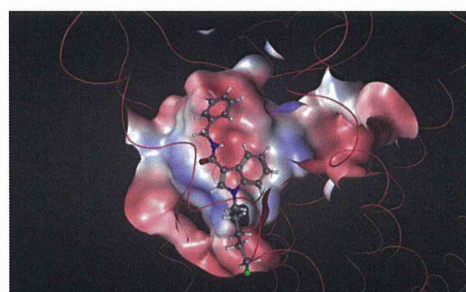
51



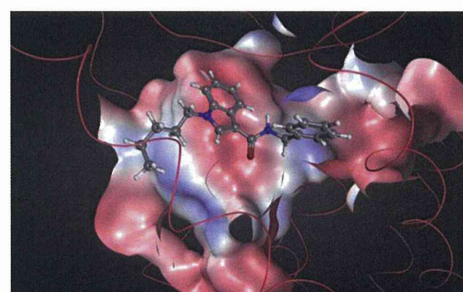
52



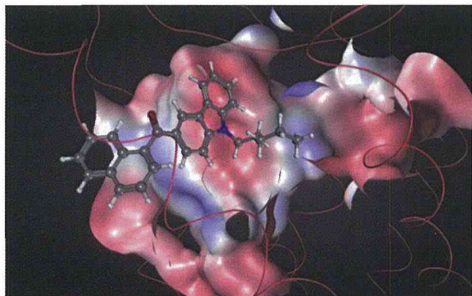
53



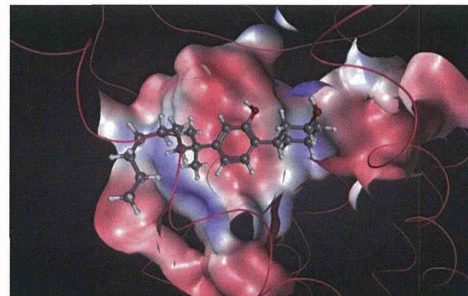
54



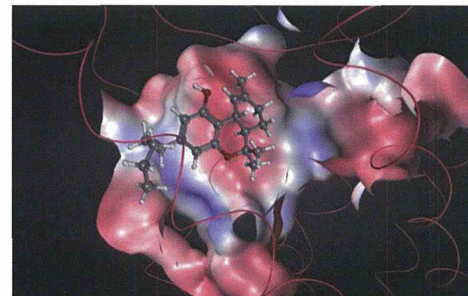
55



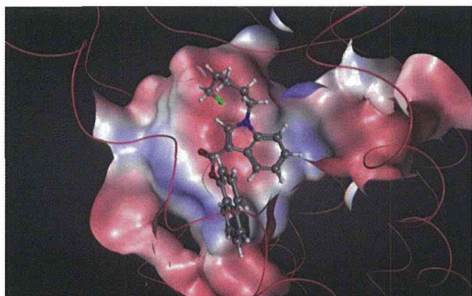
56



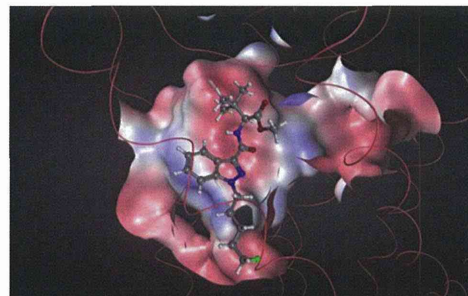
57



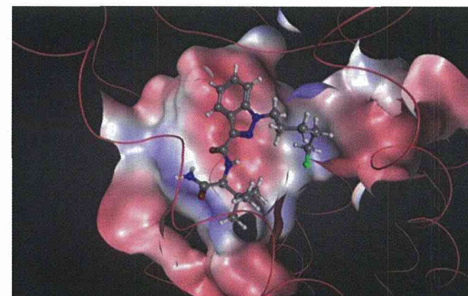
58



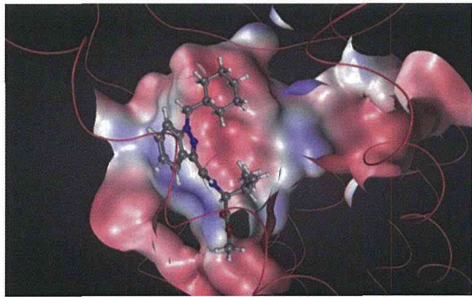
59



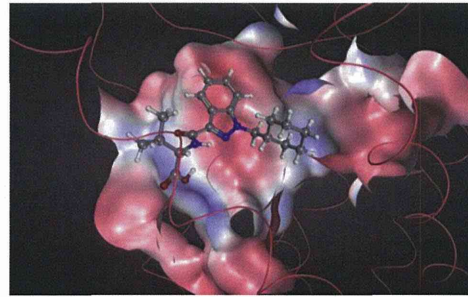
60



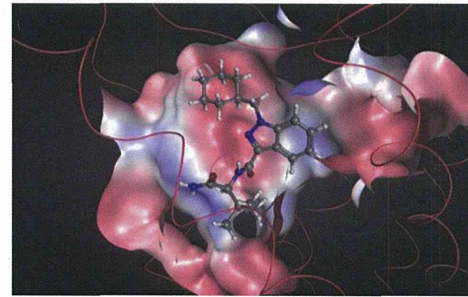
61



62



63



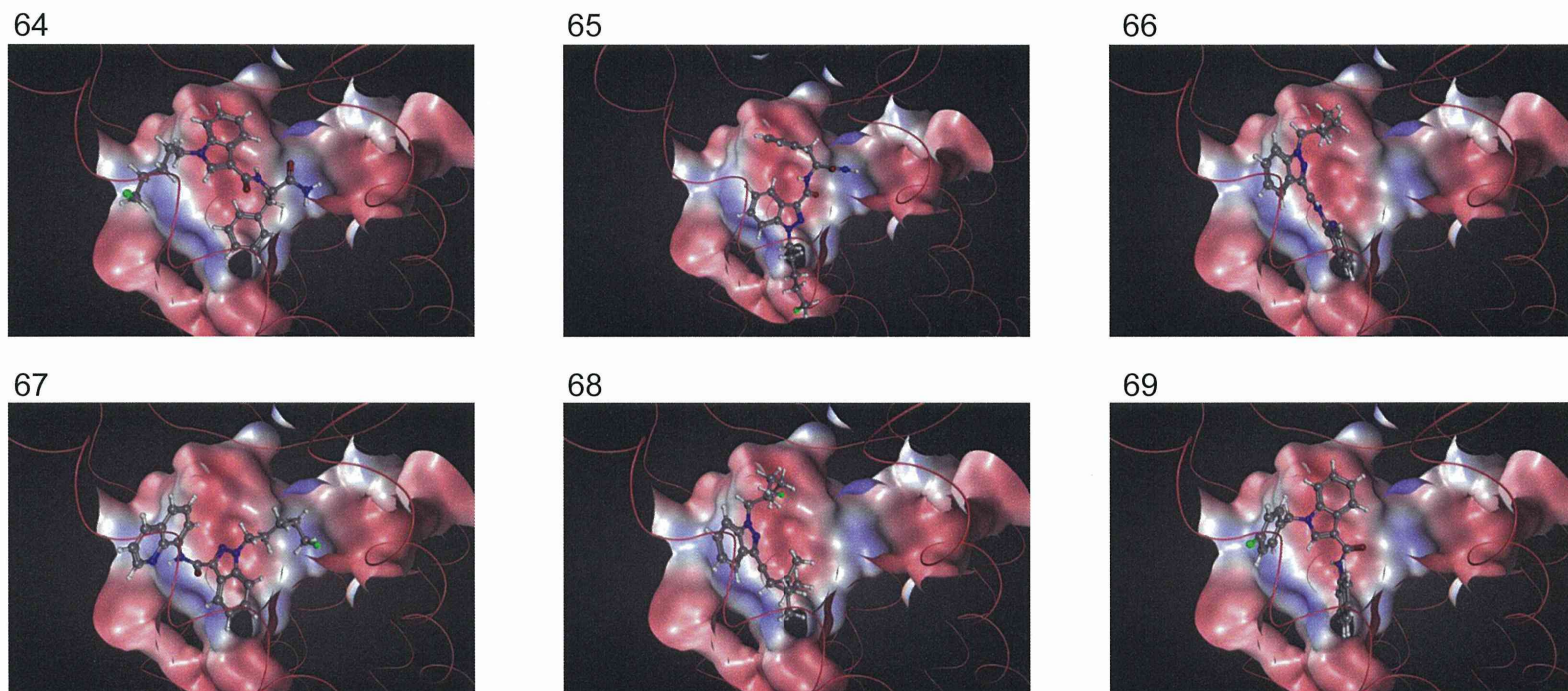


Fig. 4 各リガンドの最安定構造とCB1に対する結合様式.

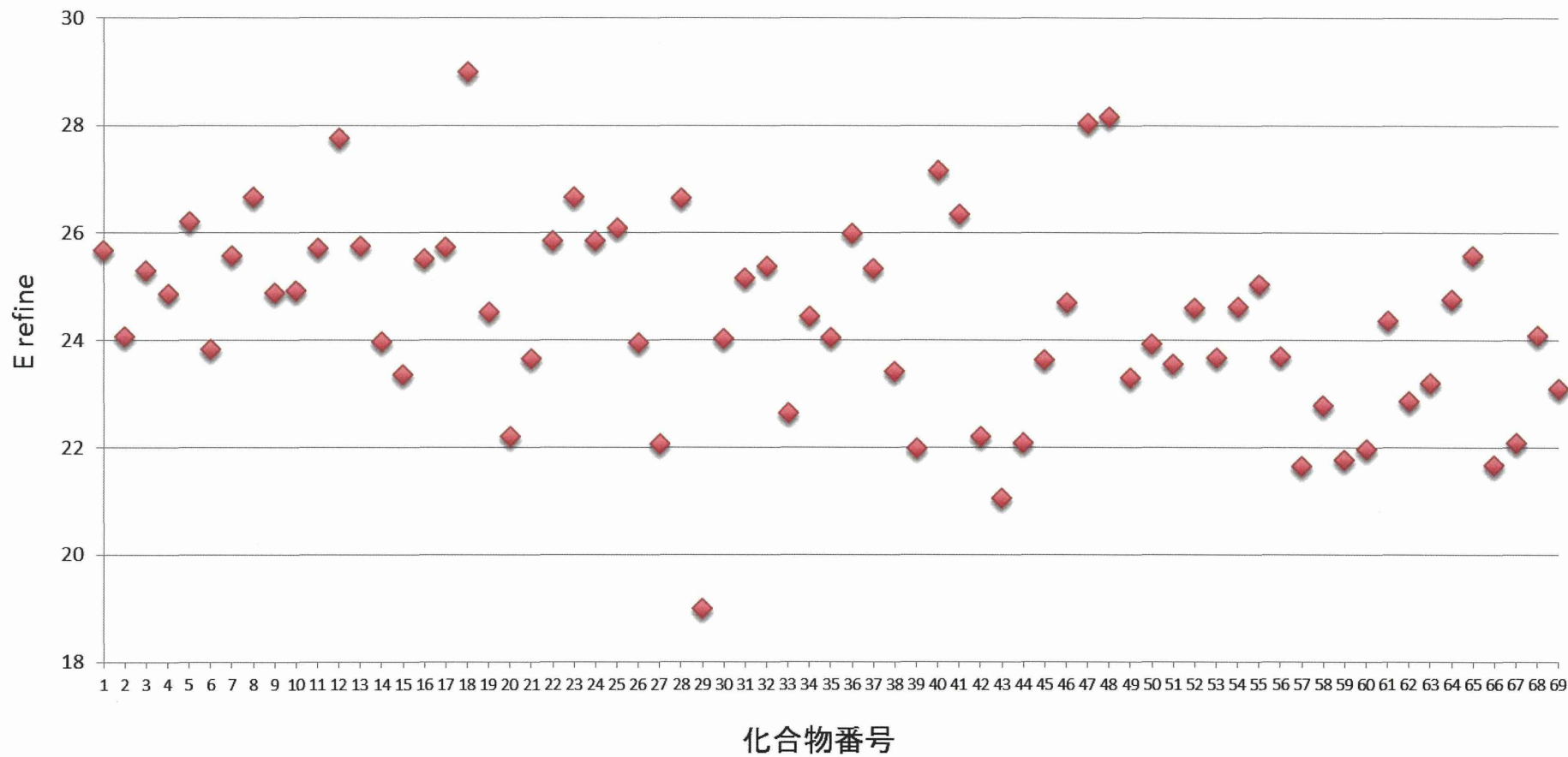


Fig. 5 各リガンドの最安定エネルギー.

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詳細検討－

研究要旨: “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, 法規制植物由来 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ケ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, 試料中 5%程度の植物片の含有があれば目視による判定は可能であり, 法規制植物由来 DNA 単独であれば 0.5 ng 程度で分析が可能であった. また, HNB に代わる指示薬としては BT も使用可能であることがわかり, 両指示薬を併用することにより誤判定回避が可能であると考えられた.

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¹⁻³⁾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はわからない. 一方で, 平成 25 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⁴⁾. 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⁵⁾. 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, 「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, *Cannabis sativa*, *Papaver somniferum* および *Salvia divinorum* 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⁶⁾を用い, 「検出」は, 反応溶液中の Hydroxynaphthol Blue (HNB) を用いた比色検出法⁷⁾を採用した法規制植物の簡易検出法を前回報告した⁸⁾. 今年度は精度向上を目的として, 検出試薬の検討, 異種植物 DNA 混合サンプルからの検出感度の検討, 各反応系濃度の検討などを行ったので報告する.

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“脱法ハーブ”製品 (平成 24 年度分析品)⁹⁾ から分離・同定したウスベニタチアオイ (マシュマロウ) の種子より発芽させた葉 (乾燥) を使用した.

2. 実験方法

2-1. DNA の抽出

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 200 μ L を回収 DNA 溶液とした.

2-2. 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 μ L 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 μ L, primer (F (2.5 pmol), R (2.5 pmol), FI (20 pmol), RI (20 pmol)) 1 μ L, *Bst* DNA polymerase 0.5 μ L, MilliQ 2.5 μ L, DNA 溶液 1 μ L および HNB (Dojindo) 水溶液 (2 mM) 1 μ L を混合し, Mineral Oil (Sigma-Aldrich) を 1 滴添加した. 目視判定および 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. 各法規制植物特異的プライマーは前回作製したものをを用いた⁸⁾.

2-3. 反応指示薬の検討

上記反応条件において, HNB の代わりに

XB-I

3-[3-(2,4-Dimethylphenylcarbonyl)-2-hydroxy naphthalen-1-ylazo]-4-hydroxybenzenesulfonic acid, sodium salt

XO

3,3'-Bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-*o*-cresolsulfonophthalein, disodium salt)

Chlorophosphonazo-III

2,7-Bis(4-chloro-2-phosphonophenylazo)-1,8-dihydroxy-3,6-naphthalenedisulfonic acid)

BT

2-Hydroxy-1-(1-hydroxy-2-naphthylazo)-6-nitro-

4-naphthalenesulfonic acid, sodium salt

を各水溶液 1 μ L 加え同条件下で反応測定を行った. 化合物の構造式は図 1 示す.

2-4. DNA 量における反応性の検討

検出限界の検討として, 異種植物混合試料からの DNA 抽出を行った. 抽出試料を 20 mg とし, 大麻およびウスベニタチアオイの植物片量を変え, 大麻混入率 100, 50, 25, 5, 2.5, 0.5, 0 (%) (大麻草/ウスベニタチアオイ 20/0, 10/10, 5/15, 1/19, 0.5/19.5, 0.5/19.9, 0/20 (mg)) と比率を変え, サンプルごとに DNA を抽出し, 目視判定検出限界を検討した. また, 試料中の DNA 濃度も検討した (ca. 50 ng ~ 0.6 ng).

C. 研究結果

1. LAMP による検出

図 2 に本実験による検出結果を示す. 反応停止, 酵素失活 (85°C, 5min) 後の可視光下での反応チューブを示す. 1, 2 は *Cannabis sativa* Primers を用い, 1 にはケシ DNA, 2 には大麻 DNA を添加した. 3, 4 は *Papaver somniferum* primers を用い, 3 には大麻 DNA, 4 にはケシ DNA を添加した. 5, 6 は *Salvia divinorum* Primers を用い, 5 には大麻 DNA, 6 にはサルビア・ディビノラム DNA を添加した. 1 と 2, 3 と 4, 5 と 6 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) の電気泳動図では, 1, 3, 5 ではバンドが確認されなかったが, 2, 4, 6 において複数の異なる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*, *Salvia divinorum* に各々に特異的に反応していることが示唆された⁸⁾.

2. 反応指示薬の検討

HNB に代わる指示薬の検討として, Chlorophosphonazo-III (C-III), BT, XO, XB-I の 4 種の比色試薬・金属指示薬を検討した. いずれ

も HNB の使用終濃度 200 μM を基準として濃度条件も検討した。図 3 に結果を示す。BT の 200 μM において淡紫色から淡青色への変化が目視で確認された(色の変化は研究担当者以外の第三者にも確認)。それ以外の試薬では変化が見られなかった。

3. DNA 量の検討

DNA 抽出試料中、大麻草混入率における精度判定として、脱法ハーブ製品に多く用いられているウスベニタチアオイの葉および、法規制植物大麻草の混合比率を変え、*Cannabis sativa* プライマーを用い、大麻草検出の目視判定による確認を行った。HNB および BT 試薬において抽出試料全体の 5% が大麻草由来植物片であれば判定が可能(色調に変化が見られた)であった(図 4)。各サンプルの回収 DNA 量は 26.4, 39.9, 38.9, 45.1, 50.5, 40.9, 38.2 (ng/ μL)であった。また、上記実験の大麻草含有量 100% から得られた DNA 溶液(26.4 ng/mL)を用い、TE での希釈系列における検出限界を測定した。その結果、0.6 ng まで色調に変化が見られた(図 5)。

D. 考察

各植物種特異的プライマー⁸⁾を用い、法規制植物の LAMP 法を用いた簡易分析法を検討した。

HNB に代わる反応指示薬として 4 種の比色試薬・金属指示薬を検討した。いずれの試薬も Mg イオンに感受性を示し、色調が変化する試薬であるが、測定 pH 領域、Mg イオン濃度に、本酵素反応の条件を満たす範囲内であるという制約があるため、すべての試薬で色調の変化が見られるという結果は得られなかった。一方で BT 試薬においては色調の変化を確認することが可能であった。しかしながら、酵素反応副産物である Mg イオン濃度に限界があるため、高濃度で BT 試薬(キレート滴定指示薬)を添加することができず、色調としては淡い(薄い)変化であった。HNB との比較では同濃度での発色能力は HNB の方が

優れており、目視確認でも容易であった。両試薬を併用することにより誤判定回避が可能と考えられた。

分析試料中の法規制植物含有量における分析能力の検討として、異種植物片混合サンプルを作製し、サンプルごとに DNA を抽出し検討を行った。その結果、試料中に 5% 程度の含有があれば分析可能であった。本実験の目的の 1 つは複数種の植物片が混入される、いわゆる“脱法ハーブ”製品中の法規制植物の検出であり、その簡易分析系として実用可能であることが示唆された。また、法規制植物単独であれば、0.5 ng 程度の DNA 量で判定が可能であり、大量の試料の簡易スクリーニングに用いる分析系として実用可能であると考えられた。

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 25 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
https://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutuujyuki/yakujyuu/yakujyuu1/h25_yakujyuu_jousei.pdf
- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Sci. Int.*, **227**, 33–41 (2013).
- 6) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., *Nucleic Acids Res.*, **28**, e63 (2000).
- 7) Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., Hanaki, K., *Short Technical Reports*, **46**, 167–172 (2009).
- 8) 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「乱用薬物の鑑別法に関する研究」法規制植物の LAMP 法を用いた簡易検出法の検討 緒方 潤

- 9) 平成 24 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

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

(学会発表)

なし.

(論文)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

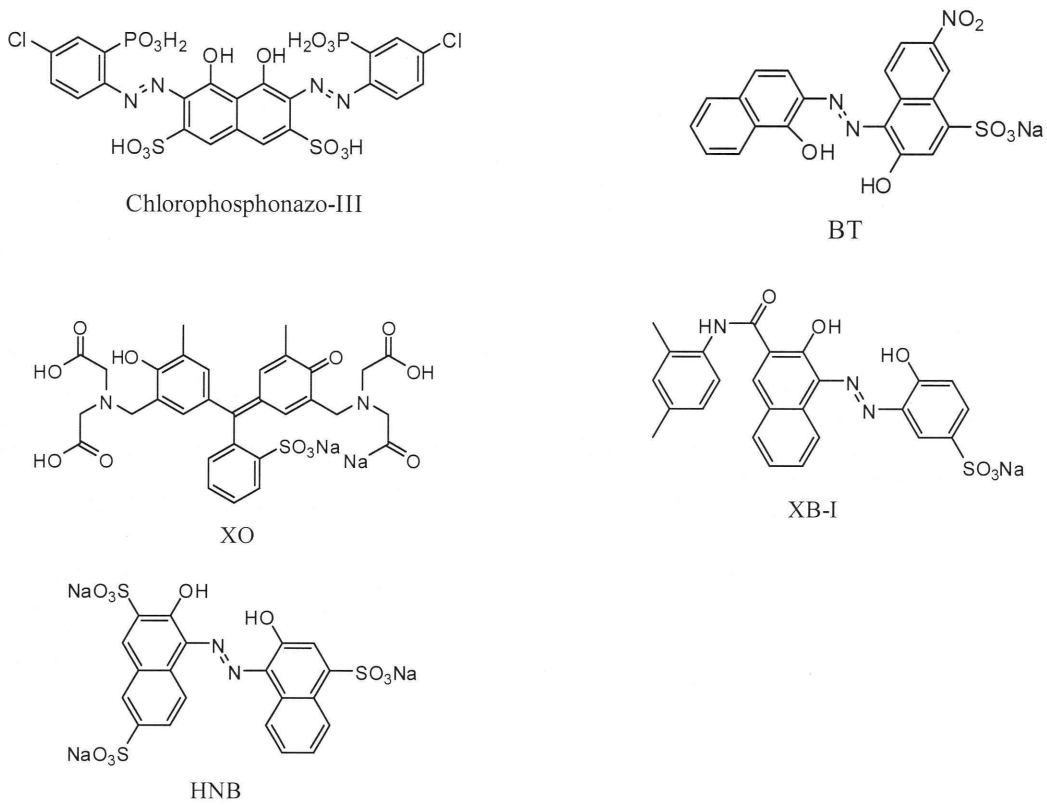


図 1. 本実験で使用した比色試薬・金属指示薬

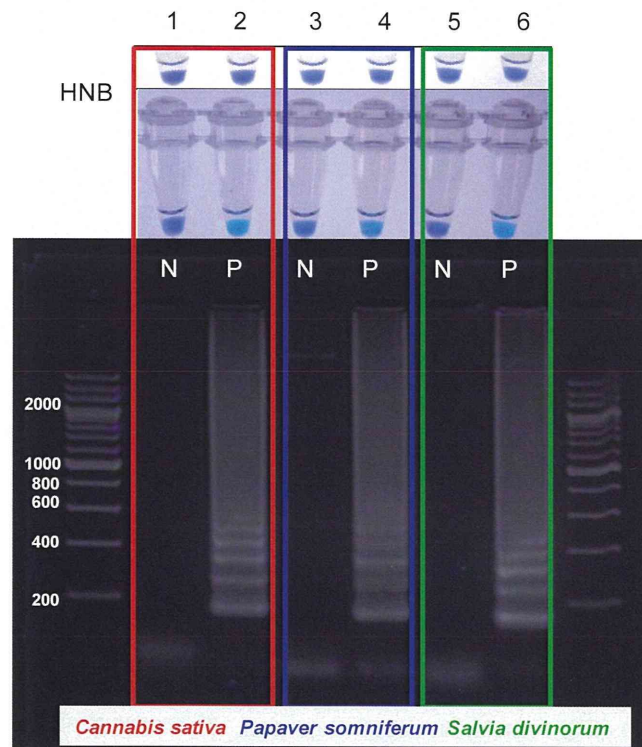


図 2. LAMP 法による法規制植物各特異的プライマーによる分析
HNB による比色法および電気泳動による結果 P; positive control, N; negative control

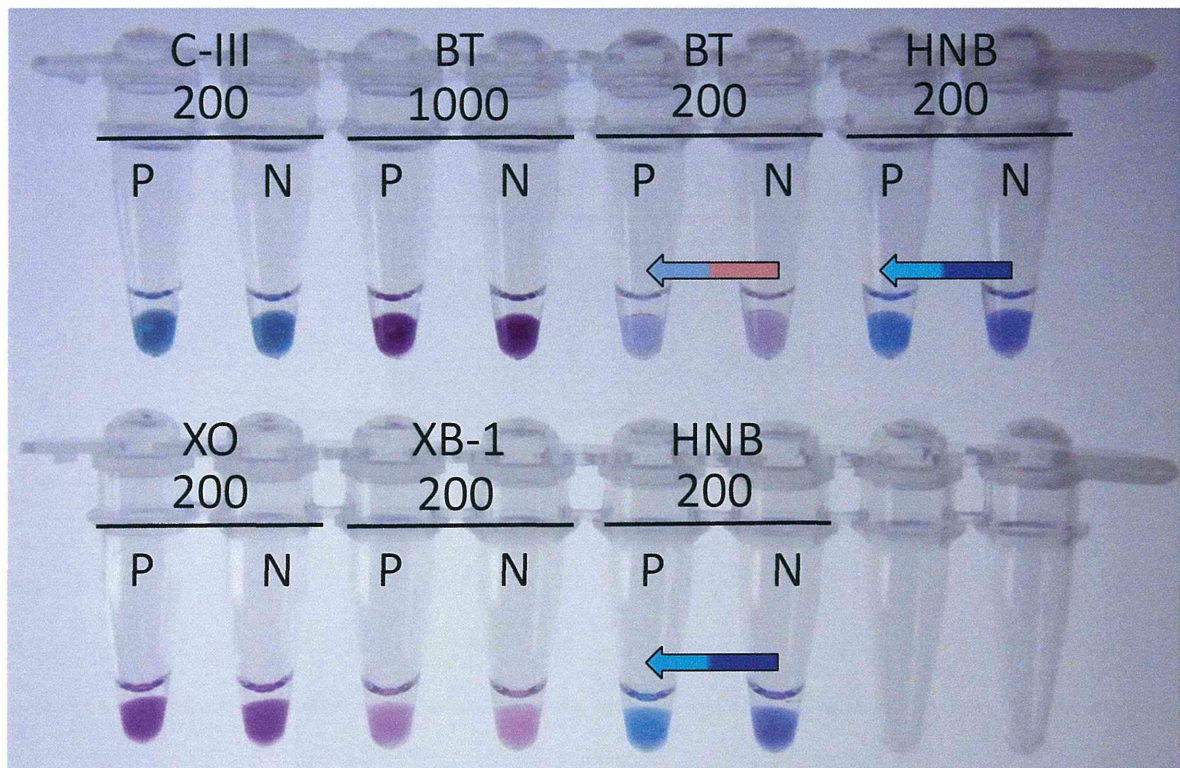
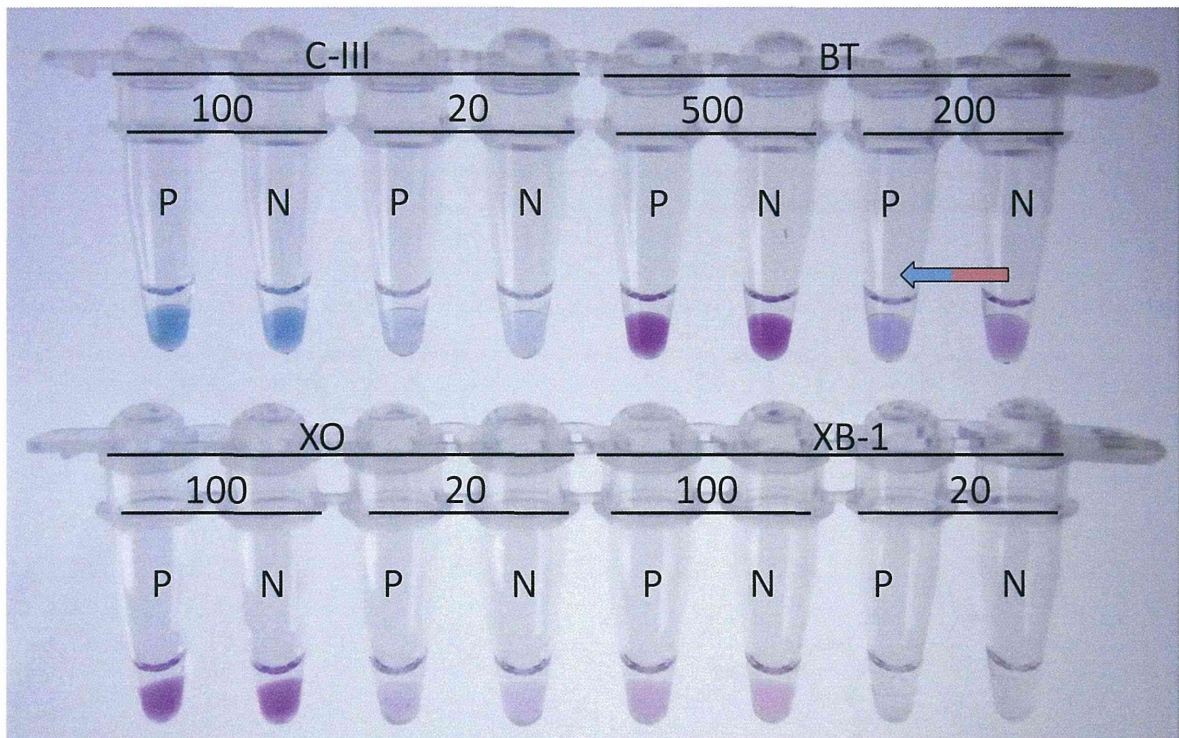


図 3. 各試薬における判定試験

P; positive control, N; negative control, 数字は終濃度(μM)

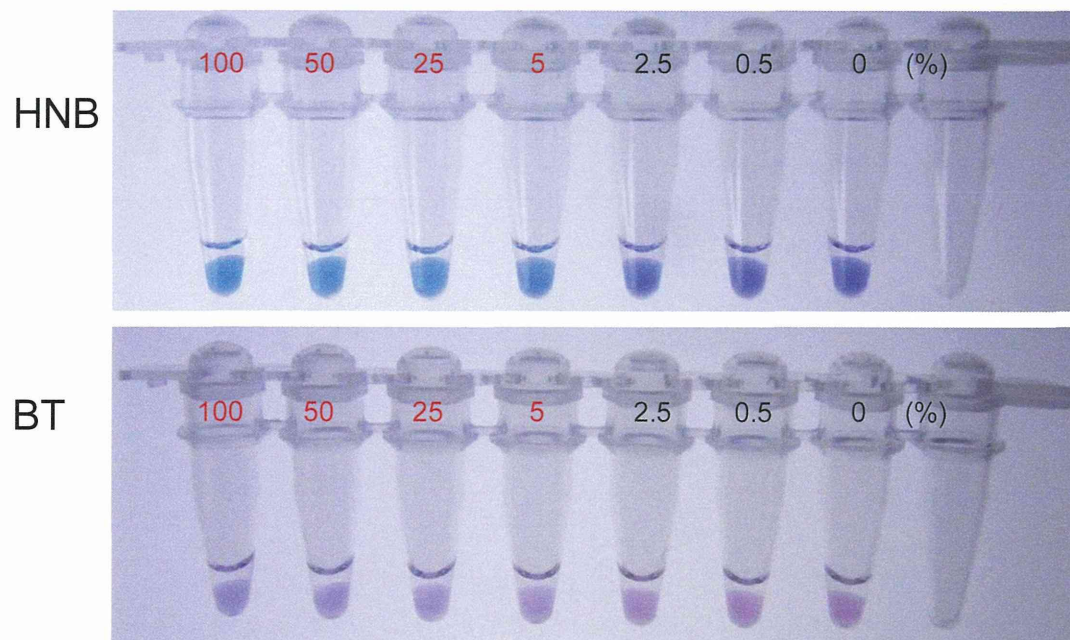


図 4. 大麻草含有量における LAMP 法を用いた判定
数字は試料中大麻草含有量(%)

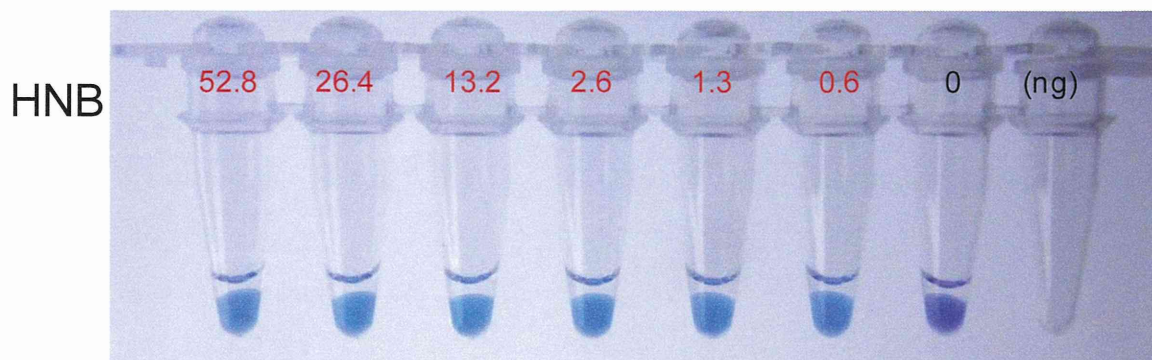


図 5. 大麻草由来 DNA 量における LAMP 法を用いた判定
数字は添加 DNA 量 (ng)

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(2)—

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. マイクロサテライトマーカー17種を用い, 大麻32種の遺伝子型判定(ジェノタイプング)を行った. 得られた遺伝子型を基に系統樹を作成し, 系統間の比較を行った結果, 系統識別に有効であることが示唆された.

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25年110件という状況にある¹⁾. 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²⁾.

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^{3,4)}による国内栽培種の大麻の多型を調査した. 今年度は, 分析サンプル数を増やすとともに, 新たなマーカーの開発を行い, そのジェノタイプング(遺伝子型判定)を行い, 系統識別の有効性を調査した.

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 16 種(異なる製品名)(CS), 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部にて系統保存されているメキシコ産系統種子(CSM)8 種および日本国内繊維用栽培種トチギシロ種子(CST)8 種を用いた.

2. 実験方法

2-1. DNA 抽出

各種子 1 粒を液体窒素で凍結させた後, MM-300 (Qiagen) により粉碎した. 粉碎した各種子は 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 μ L 中の 1 μ L を PCR 反応に用

いた。

2-1. SSR 分析

反応溶液として、酵素には Ex Taq Hot start version (Takara) 0.1 μ L, PCR 反応試薬には, Ampdirect plus (Shimadzu) 5 μ L, 蛍光 (FAM (青), HEX (緑) or TAMRA(黄))プライマー 2 pmol, M13 (-21) 連結⁵⁾マーカープライマー 1 pmol, GTTT 連結⁶⁾マーカープライマー 2.5 pmol, DNA 溶液 1 μ L とし, 全量 10 μ 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 10 倍希釈し, その 1 μ L を Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific) 20 μ L + 500 ROX dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific) 0.5 μ 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 SSR 解析を行った。

2-2. 4 塩基マーカーの作製⁷⁾

メキシコ産系統種子を無菌播種させ, 全草より CTAB 法によりゲノム DNA を抽出した。得られた DNA を制限酵素 (SspI, AluI, EcoRV, AfaI) で overnight 処理した。フェノール・クロロホルム抽出を行った。アダプターとして 48mer の 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3' および 8mer の 5'-ACCAGCCC-NH₂-3' をアニール後上記制限酵素処理した DNA 断片をライゲーションした。アダプター特異的プライマー

5'-CATCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

および 5'-TATAGGGCACGCGTGGT-3', 4 塩基リピート配列を含むプライマー ((GAAA)₆, (GTGA)₆, (GATA)₆, (ACAT)₆) を用い PCR により SSR 近傍領域の配列を取得した。続いて, 配列決定した領域から新たにプライマーを作成し, SSR を含む領域の配列を取得し, マーカーを作成した。また, 得られた配列は DNA データベース上の Whole genome sequences of Cannabis⁸⁾ と

相同性検索を行いマーカーとしての有用性を調査した。

2-3. 系統樹作成

GeneMapper v4.1 で得られたジェノタイプングデータを GENPOP (<http://genepop.curtin.edu.au/>) および POPTREE2 (<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~genomelb/takezaki/poptree2/index.html>) ソフトウェアにて NJ 法により系統樹を作成した。

C. 研究結果

1. マーカーの作製

これまでに報告されていない 4 塩基リピートマーカーの開発を行った。手法を図 1 に示す。また, 確立したマーカーを表 1 に示す。本研究では表 1 の 7 種のマーカー, および昨年度報告した 10 種の計 17 種のマーカーを使用した。

2. SSR 解析

表 2. に遺伝子型判定 (ジェノタイプング) 結果を示す。各マーカーで泳動後, GeneMapper v4.1. で得られたデータをタイプ分類した。ホモ型で検出された場合は 0a0a で, ヘテロ型で検出された場合は 0a0b とし示し, ナンバリングは検出された塩基数の短いものから 1, 2, 3... で示し, 1 タイプのホモ型であれば 0101, 1, 2 タイプのヘテロ型であれば 0102 と示した。もっとも多型性を示したのは 304 マーカーで, 12 タイプに分類された。市場品大麻 16 種の遺伝子型はすべて異なっていた。CSM および CST の各同一集団の遺伝子型の類似性が見られたが, ホモ化が進んでいるということはなかった。表 2 で得られたジェノタイプングデータを input file として POPTREE2 ソフトウェアにて NJ 法を用い遺伝子頻度を基に系統樹を作成した (図 2)。CSM および CST 集団がクラスターを形成した。CST 集団はそれ以外と最も外れた位置でクラスターを形成した。

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^{2, 10)}。

今回、海外で嗜好目的として販売されている大麻種子 16 種、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、系統識別の可能性を検討した。用いた 17 マーカーによる分析において 32 種すべてで同一の多型を示すものは見られなかった。これはマイクロサテライトマーカーの特性であり、その識別の有効性を示すものであった。また、同一集団内での多型の類似性も確認された。系統樹解析において、同一集団が明確にクラスターを形成したことは本法が系統識別に有効であることを強く示唆するものであった。また、CST 集団は無毒大麻と言われ、その生体内の二次代謝産物の成分も他の 24 種と異なる系統であった系統樹でも明確に離れた位置でクラスターを形成していることは大変興味深い。また、海外の無毒大麻として存在する大麻系統との多型性の異なりは今後検討する必要があると思われる。今後は、同一集団から派生した産地の違いや、サンプル数を増やしマーカーの選択、精度向上を行う必要がある。

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 25 年中の薬物・銃器情勢, https://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutujyuki/yakujyuu/yakujyuu1/h25_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) Lian, C., Hougetsu, T. *Molecular Ecology Resources* 2, 211-213 (2002)
- 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)
- 9) 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「乱用薬物の鑑別法に関する研究」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 緒方 潤
- 10) (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

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

なし。

学会発表

緒方 潤, 阿久津守, 河野徳昭, 吉松嘉代, 川原信夫, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志, 大麻の SSR マーカーによる系統識別(日本薬学会第 135 年会, 平成 27 年 3 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

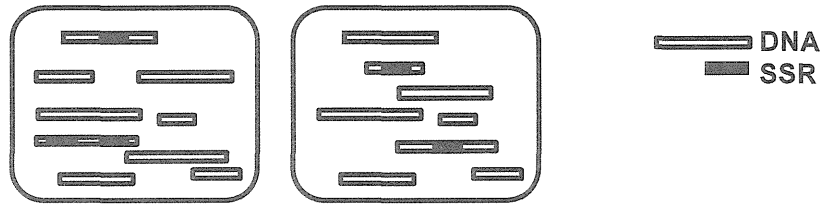


基盤研・筑波のメキシコ産系統種子を発芽させたもの
(全草)

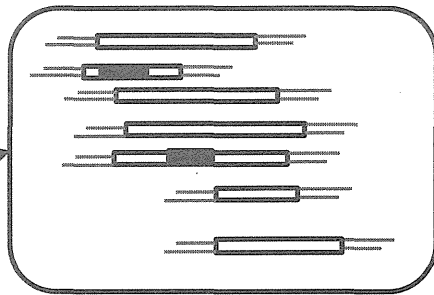
↓
DNAの抽出

↓
制限酵素処理

例: SspI (AATIATT), EcoRV (GATIATC)

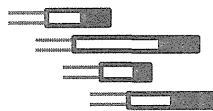


アダプターの結合



アダプターに結合するプライマーとSSRプライマーで PCR

SSRプライマーの例 GAAAGAAAGAAAGAAAGAAA
GATAGATAGATAGATAGATAGATA



□の塩基配列を決定して、決定した塩基配列からプライマーを作製して、
SSRを挟む逆側をPCRで取得



プライマーセット完成



図 1.4 塩基リピートマーカの作製 (dual-suppression PCR 法⁷⁾)

表 1. 今回作製したマイクロサテライトマーカー

| Marker | Sequence | Repeat |
|------------|---|----------|
| CANSTR403F | TGTA AACGACGGCCAGT <u>AAGAGCATTTTACAGAATGAATG</u> | (GAAA) n |
| CANSTR403R | <u>GTTTTCATTCTCATGAATATCCACAG</u> | |
| CANSTR404F | TGTA AACGACGGCCAGT <u>ATTATCTTTTCACCCACAGAC</u> | (GAAA) n |
| CANSTR404R | <u>GTTTAAACCAGTTGAGATTGACAGAGT</u> | |
| CANSTR405F | TGTA AACGACGGCCAGT <u>AGAGGAGAATCTCTTTGAAAAGC</u> | (GATA) n |
| CANSTR405R | <u>GTTTCCTATCAGACCAAAC TGATTTT</u> | |
| CANSTR406F | TGTA AACGACGGCCAGT <u>AGACTCAGAAAACCGTGTTCT</u> | (GATA) n |
| CANSTR406R | <u>GTTTAAATTGCAAAGGTGGCTAAAT</u> | |
| CANSTR407F | TGTA AACGACGGCCAGT <u>ATGAATGAATGAAACGGTAGC</u> | (GTGA) n |
| CANSTR407R | <u>GTTTTTTGACTTGAGAGAGTGAGAGAG</u> | |
| CANSTR408F | TGTA AACGACGGCCAGT <u>TCTTACATATCCCGCTCCTTT</u> | (GTGA) n |
| CANSTR408R | <u>GTTTAAAGTGAGAGTGGTGAAGAGTG</u> | |
| CANSTR417F | TGTA AACGACGGCCAGT <u>CTGACCAAATTCAAACAAAACC</u> | (ACAT) n |
| CANSTR417R | <u>GTTTGGTTTCTTGGGTCACTGGTAC</u> | |

表 2. マイクロサテライトマーカー 17 種による大麻種子 32 種のジェノタイプングデータ

| Marker Seed No. | 202 | 206 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | B01 | B05 | C11 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 417 |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| CS001 | 0708 | 0404 | 0303 | 0101 | 0202 | 0208 | 0404 | 0303 | 0304 | 0203 | 0404 | 0101 | 0304 | 0303 | 0505 | 0102 | 0101 |
| CS002 | 0708 | 0103 | 0303 | 0405 | 0202 | 0808 | 0404 | 0303 | 0404 | 0203 | 0404 | 0202 | 0707 | 0303 | 0304 | 0203 | 0101 |
| CS003 | 0708 | 0404 | 0303 | 0101 | 0202 | 1212 | 0404 | 0101 | 0404 | 0203 | 0404 | 0102 | 0304 | 0303 | 0405 | 0204 | 0101 |
| CS004 | 0808 | 0404 | 0303 | 0105 | 0202 | 1212 | 0404 | 0103 | 0304 | 0202 | 0404 | 0102 | 0304 | 0103 | 0204 | 0102 | 0101 |
| CS005 | 0110 | 0101 | 0405 | 0105 | 0404 | 0606 | 0101 | 0505 | 0203 | 0205 | 0304 | 0101 | 0304 | 0303 | 0105 | 0102 | 0101 |
| CS006 | 0303 | 0101 | 0606 | 0306 | 0202 | 0405 | 0104 | 0002 | 0203 | 0404 | 0202 | 0102 | 0506 | 0303 | 0204 | 0101 | 0101 |
| CS007 | 0306 | 0203 | 0408 | 0106 | 0506 | 0606 | 0404 | 0303 | 0304 | 0101 | 0404 | 0101 | 0103 | 0303 | 0105 | 0303 | 0101 |
| CS008 | 0707 | 0304 | 0303 | 0505 | 0202 | 0208 | 0404 | 0103 | 0404 | 0203 | 0404 | 0102 | 0404 | 0303 | 0405 | 0204 | 0101 |
| CS009 | 0809 | 0104 | 0305 | 0101 | 0102 | 0207 | 0104 | 0204 | 0304 | 0206 | 0404 | 0101 | 0204 | 0303 | 0505 | 0102 | 0101 |
| CS010 | 0110 | 0104 | 0405 | 0105 | 0004 | 0606 | 0001 | 0206 | 0203 | 0203 | 0404 | 0101 | 0103 | 0303 | 0105 | 0303 | 0101 |
| CS011 | 0707 | 0304 | 0303 | 0505 | 0202 | 0208 | 0404 | 0204 | 0404 | 0303 | 0404 | 0202 | 0304 | 0303 | 0404 | 0202 | 0101 |
| CS012 | 0707 | 0303 | 0707 | 0505 | 0004 | 1212 | 0104 | 0404 | 0404 | 0203 | 0404 | 0101 | 0304 | 0303 | 0304 | 0202 | 0101 |
| CS013 | 0507 | 0404 | 0404 | 0505 | 0103 | 1212 | 0505 | 0202 | 0303 | 0204 | 0304 | 0101 | 0204 | 0305 | 0202 | 0101 | 0104 |
| CS014 | 0404 | 0303 | 0303 | 0405 | 0204 | 1212 | 0404 | 0204 | 0404 | 0103 | 0404 | 0102 | 0304 | 0606 | 0404 | 0202 | 0101 |
| CS015 | 0407 | 0203 | 0303 | 0505 | 0204 | 0303 | 0404 | 0202 | 0303 | 0101 | 0104 | 0101 | 0404 | 0606 | 0203 | 0102 | 0101 |
| CS016 | 0307 | 0404 | 0707 | 0204 | 0203 | 1212 | 0104 | 0204 | 0404 | 0303 | 0404 | 0101 | 0304 | 0303 | 0204 | 0202 | 0101 |
| CSM01 | 0202 | 0101 | 0304 | 0202 | 0102 | 1011 | 0102 | 0202 | 0303 | 0202 | 0404 | 0102 | 0104 | 0305 | 0202 | 0101 | 0101 |
| CSM02 | 0102 | 0101 | 0304 | 0202 | 0101 | 0411 | 0102 | 0202 | 0303 | 0202 | 0404 | 0202 | 0104 | 0303 | 0303 | 0103 | 0101 |
| CSM03 | 0102 | 0104 | 0304 | 0205 | 0102 | 1011 | 0204 | 0202 | 0303 | 0205 | 0404 | 0102 | 0404 | 0505 | 0304 | 0101 | 0101 |
| CSM04 | 0202 | 0101 | 0304 | 0202 | 0101 | 1111 | 0102 | 0202 | 0303 | 0202 | 0304 | 0101 | 0404 | 0505 | 0203 | 0101 | 0202 |
| CSM05 | 0202 | 0104 | 0408 | 0202 | 0101 | 1111 | 0104 | 0202 | 0303 | 0202 | 0404 | 0101 | 0404 | 0505 | 0303 | 0101 | 0101 |
| CSM06 | 0202 | 0304 | 0304 | 0202 | 0101 | 0404 | 0102 | 0202 | 0303 | 0202 | 0304 | 0102 | 0104 | 0305 | 0203 | 0101 | 0101 |
| CSM07 | 0102 | 0104 | 0304 | 0202 | 0101 | 0411 | 0204 | 0202 | 0303 | 0202 | 0404 | 0101 | 0101 | 0305 | 0203 | 0103 | 0202 |
| CSM08 | 0202 | 0303 | 0404 | 0205 | 0101 | 1011 | 0202 | 0202 | 0303 | 0202 | 0404 | 0101 | 0104 | 0505 | 0203 | 0101 | 0101 |
| CST01 | 0404 | 0305 | 0104 | 0101 | 0103 | 0606 | 0101 | 0404 | 0202 | 0404 | 0505 | 0202 | 0404 | 0404 | 0303 | 0101 | 0101 |
| CST02 | 0404 | 0205 | 0407 | 0105 | 0102 | 0606 | 0505 | 0408 | 0202 | 0404 | 0505 | 0202 | 0204 | 0404 | 0203 | 0101 | 0103 |
| CST03 | 0404 | 0305 | 0107 | 0101 | 0103 | 0406 | 0101 | 0808 | 0202 | 0404 | 0505 | 0202 | 0204 | 0404 | 0202 | 0101 | 0101 |
| CST04 | 0408 | 0205 | 0407 | 0505 | 0204 | 0606 | 0505 | 0408 | 0202 | 0404 | 0505 | 0202 | 0204 | 0404 | 0202 | 0101 | 0103 |
| CST05 | 0404 | 0305 | 0104 | 0505 | 0102 | 0606 | 0101 | 0808 | 0202 | 0204 | 0505 | 0202 | 0202 | 0404 | 0202 | 0101 | 0101 |
| CST06 | 0408 | 0203 | 0104 | 0505 | 0304 | 0606 | 0104 | 0808 | 0202 | 0404 | 0505 | 0202 | 0404 | 0404 | 0202 | 0101 | 0303 |
| CST07 | 0404 | 0203 | 0104 | 0105 | 0101 | 0609 | 0104 | 0408 | 0202 | 0404 | 0505 | 0202 | 0404 | 0404 | 0202 | 0101 | 0103 |
| CST08 | 0808 | 0303 | 0707 | 0102 | 0101 | 0609 | 0101 | 0408 | 0202 | 0405 | 0505 | 0202 | 0404 | 0404 | 0203 | 0101 | 0103 |

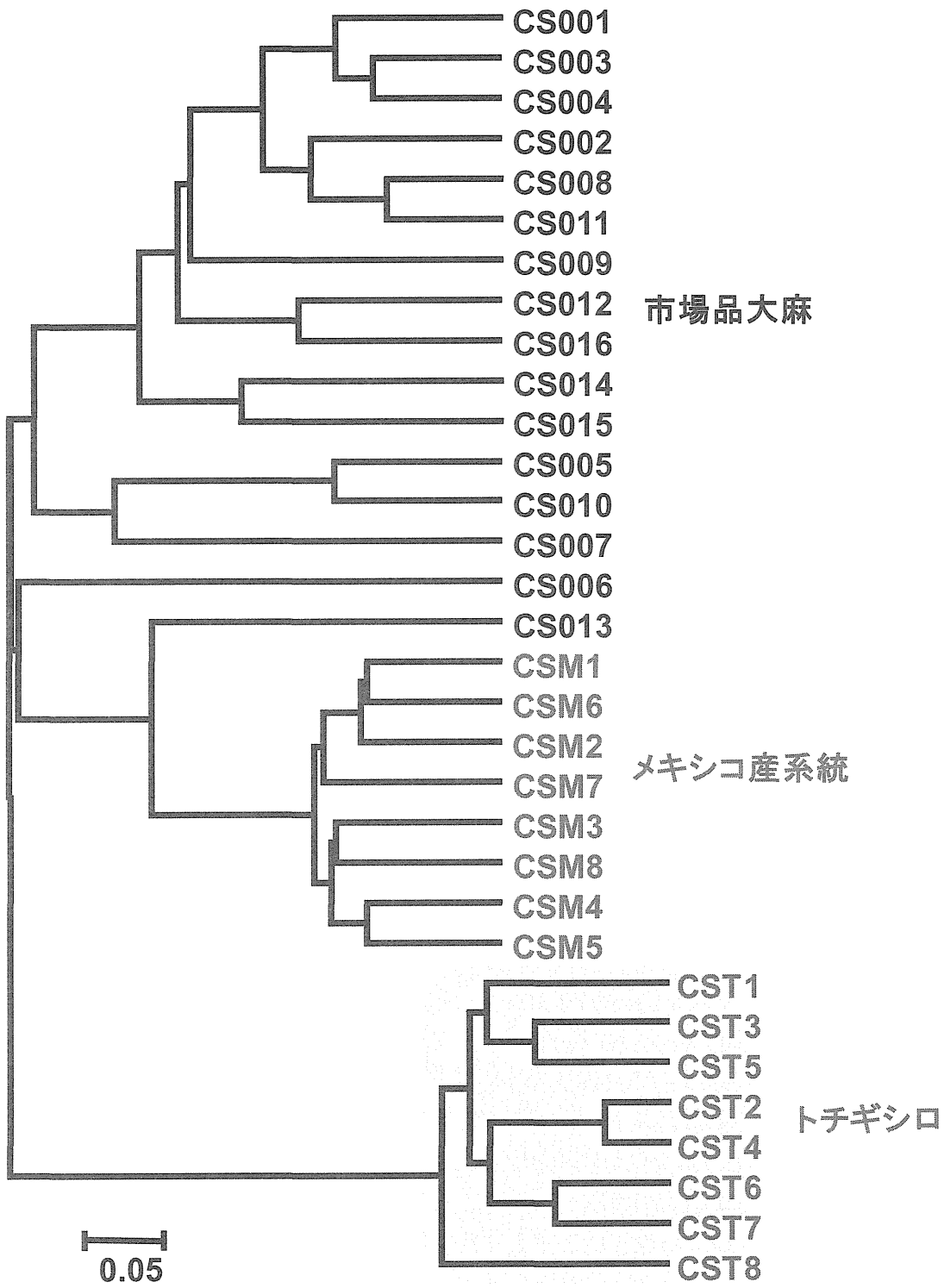


図 2. GENTREE を用いた大麻種子 32 種の NJ 法による系統樹

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
研究分担者: 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
—ケシ属植物の遺伝子鑑別法の開発に関する研究—

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、構築並びに解析を進めているケシ属植物の EST(expressed sequence tag)ライブラリーについて、既報のモルヒナンアルカロイド生合成経路の酵素群のうち、テバインからコデインまたはオリパビンを経てモルヒネへの変換に関わる酵素遺伝子に着目し、テバイン脱メチル化酵素(T6ODM)やコデイン脱メチル化酵素(CODM)に代表される 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase (DIOX)との相同性解析等により、オリパビンの生合成、とくにテバイン以降の変換に関わると推定される酵素遺伝子の配列 16 種を取得した。これらの遺伝子の発現量の推定値をオニゲシとケシの間で比較検討し、オニゲシにおいて発現量が高い遺伝子 4 種について特異的プライマーを設計し PCR 増幅を試みところ、3 遺伝子でオニゲシ特異的に増幅産物が得られた。これらのプライマーセットはオニゲシ他ケシ属植物の遺伝子鑑別に使用できる可能性が高い。

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。

ケシはあへん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