

2-3. LAMP による検出

LoopampDNA 増幅試薬キット(EIKEN Chemical Co., Ltd.)を用い 65°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 (2.5 pmol), R (2.5 pmol), FI (20 pmol), RI (20 pmol)) 1 µL, *Bst* DNA polymerase 0.5 µL, MilliQ 2.5 µL, 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。

C. 研究結果

1. LAMP プライマーの作成

図 1 - 3 にミナシビレタケの *EF1-alpha* gene, ITS-1, ITS-2 の部分配列をそれぞれ示す。プライマーの設計には Tm 値, 末端安定性, GC 含量, 増幅長, 二次構造非形成能⁸⁾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, 各々 1 種類を選び, 各プライマーセットを作成した(詳細は図 1-3 に示す)。

2. LAMP による検出

図 4 に本実験による検出結果を示す。図は反応停止後(85°C, 5min)の可視光下での反応チューブを示す。①シイタケ 10 mg, ②ブナシメジ 10 mg, ③エリンギ 10 mg, ④エノキタケ 10 mg, ⑤マイタケ 10 mg が青紫色を呈し, ⑥ミナシビレタケ 20 mg, ⑦ミナシビレタケ 10 mg, ⑧ミナシビレタケ 5 mg が青色を呈した。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。

D. 考察

Psilocybe cubensis は, モエギタケ科シビレタケ属の 1 種である。シビレタケ属といってもシビレタケ属すべての種がサイロシン・サイロシピンを含む種ではないが^{9, 10)}, 近年の分子系統解析では, 2 つのクレードに *Psilocybe* 属は bluing clade, non-bluing clade に枝分かれすることが示唆され

ている^{10, 11)}。そこで, 上記分類¹⁰⁾に利用された rDNA の ITS 領域 2 か所, 構造遺伝子 *EF1-alpha* 遺伝子の計 3 か所を標的 DNA として *Psilocybe cubensis* の簡易解析法を検討した。

LAMP に用いたプライマーは *Psilocybe cubensis* 由来 DNA に高い特異性を示した。LAMP プライマーは 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³⁾があるため, PCR 法に比べ原理的に極めて高い特異性を示すこととなる。また, 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。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った。

今回, 比較対象として用いたキノコはいずれも食用キノコであり, 子実体の形態・形状からの判断では当然, 誤判定は考えにくい, DNA 情報としての類似性を考慮して植物ではなくキノコを選択した。

今回, 標的 DNA 領域として ITS-1 を選択したが, BLAST 検索の結果, *Psilocybe cubensis* と配列類似性が 99% (2 塩基違い)と高い *Psilocybe montana* (AY129360)¹²⁾が存在する。本種は上記の non-bluing clade に属する非幻覚性のキノコである。現在本種は非幻覚性のキノコであり, *Deconica montana*と属名が変更されている種である。これは誤同定・誤使用による結果であることが考えられ, 新たに配列報告(HM035079, DQ494692¹¹⁾) (配列類似性 70%)がされており, non-bluing clade に属する *Psilocybe* 属が本研究における LAMP 法で検出されるとは考えづらいが, 今後はこの属(non-bluing)のキノコおよび配列類似性の高い bluing clade を対象に検討する必要がある。

一方, 子実体(キノコ)および菌糸(体)のいずれの形態であっても DNA さえ抽出可能であれば

分析可能であり、簡易分析法の手段のひとつとしてたいへん有効であると考えられた。

E. 参考文献

- 1) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Science International*, **227**, 33-41 (2013)
- 2) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., *Science*, **230**, 1350-1354 (1985)
- 3) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., *Nucleic Acids Res.*, **28**, e63 (2000)
- 4) Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., Hanaki, K., *Short Technical Reports*, **46**, 167-172 (2009)
- 5) 政令第 169 号(2002) “麻薬、向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令の一部を改正する政令” 平成 14 年 5 月 7 日
- 6) 平成 27 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)総括・分担研究報告書「乱用薬物の鑑別法に関する研究」—違法ドラッグ製品“菌床”の基原種同定— 緒方潤
- 7) 平成 27 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)総括・分担研究報告書「乱用薬物の鑑別法に関する研究」—“菌床”の培養と子実体の形成および Psilocybin, Psilocin の定量— 緒方潤
- 8) 牛久保宏, *ウイルス*, **54**, 107-112 (2004)
- 9) 今関六也, 本郷次雄 「原色日本菌類図鑑」, 大阪, 保育社, 1965
- 10) Moncalvo, J-M. *et al.*, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23**, 357-400 (2002)
- 11) Matheny P. B. *et al.*, *Mycologia*, **98**, 982-995 (2006)
- 12) Kimberly G. N., Barry J. S., *Forensic Science International*, **140**, 147-157 (2004)

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。

(Sense 5'-) GGGCATGTGC TCGCCCGTCA TCTTTATATT TCCACCTGTG CACTTTTTGT
(Antisense 3'-) cccgtacacg agcggggcagt agaaatataa aggtggacac gtgaaaaaca
(1) **CCCGTCA TCTTTATATT TCCACCTGTG CACTTTTTGT**

(Sense 5'-) AGATCATTGT TTTTGAAGC TGGATTGAAG TCAGAGATTA CTCTCTGATG
(Antisense 3'-) tctagtaaca aaaaccttcg acctaacttc agtctctaat gagagactac
AGATCA (2) **aat gagagactac**

(Sense 5'-) AATTGAAGGC TTTCTCAATG ATGGTCTACG TTTTCATATA CTCCAATGAA
(Antisense 3'-) ttaacttccg aaagagttac taccagatgc aaaagtatat gaggttactt
ttaacttccg a (3) **CAATG ATGGTCTACG TTTTCAT** (4)

(Sense 5'-) TGTAACAGAA TGTATCTATA TGGCCTTGTG CCTATAAAAC AATATAACAAC
(Antisense 3'-) acattgtcctt acatagatat accggaacac ggatattttg ttatatgttg
gaacac ggatattttg ttatatg (5)

(Sense 5'-) TTTCAGCAAC GGATCTCTTG GCTCTCGCAT
(Antisense 3'-) aaagtcggtg cctagagaaac cgagagcgta
aagtcggtg cctagagaa (6)

PC-I1-F prrimer **CCCGTCATCTTTATATTTCCAC** (1)

PC-I1-FI primer **agccttcaattcatcagagagtaa-CTGTGCACTTTTTGTAGATCA** (3) + (2)

PC-I1-RI primer **CAATGATGGTCTACGTTTTTCAT-gtatattgttttataggcacaag** (4) + (5)

PC-I1-R primer **aagagatccggttgctgaa** (6)

図2. *Psilocybe cubensis* ITS-1 の部分配列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, 括弧の数字はプライマー設定箇所. アンダーバーはアンチセンス鎖を示す.

(Sense 5'-) AGCATGCCTG TTTGAGTGTC ATTAAATTCT CAACCTTACC AGCTTTTGTT
(Antisense 3'-) tcgtacggac aaactcacag taatttaaga gttggaatgg tcgaaaacaa
(1) **TT**

(Sense 5'-) AGCTTGTGTA ATGGCTTGA CTTGGGGGTT TATTTTGCCG GCTTCTTACC
(Antisense 3'-) tcgaacacat taccgaacct gaacccccaa ataaaacggc cgaagaatgg
AGCTTGTGTA ATGGCTTGA CTTGGGGGTT TATTTTGC (2)

(Sense 5'-) AAGTCAGCTC CCCTTAAATG CATTAGCCGG CTGCCCCTG TGGACCGTCT
(Antisense 3'-) ttcagtcgag ggggaatttac gtaatcggcc gacgggacac acctggcaga
ag ggggaatttac gtaatcggc (3) **GCTG TGGACCGTCT**

(Sense 5'-) ATTGGTGTGA TAATTATCTA CGCCGTGGAT GTCTACTATT AATGGGTTGA
(Antisense 3'-) taaccacact attaatagat gcggcaccta cagatgataa ttaccaact
ATTGGT (4) (5) **ccta cagatgataa ttaccaac**

(Sense 5'-) AGCTGCTTCA AACCGTCTGT TACTCAGAC AATTAATGAC AATTTGACCT
(Antisense 3'-) tcgacgaagt ttggcagaca aatgagtctg ttaattactg ttaaactgga
gaagt ttggcagaca aatgag (6)

PC-I2-F prrimer **TTAGCTTGTGTAATGGCTTG** (1)

PC-I2-FI primer **cggtaatgcatttaagggga-GACTTGGGGGTTTATTTTGC** (3) + (2)

PC-I2-RI primer **GCTGTGGACCGTCTATTGGT-caaccattaatagtagacatcc** (4) + (5)

PC-I2-R primer **gagtaaacagacggtttgaag** (6)

図 3. *Psilocybe cubensis* ITS-2 の部分配列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, 括弧の数字はプライマー設定箇所. アンダーバーはアンチセンス鎖を示す.

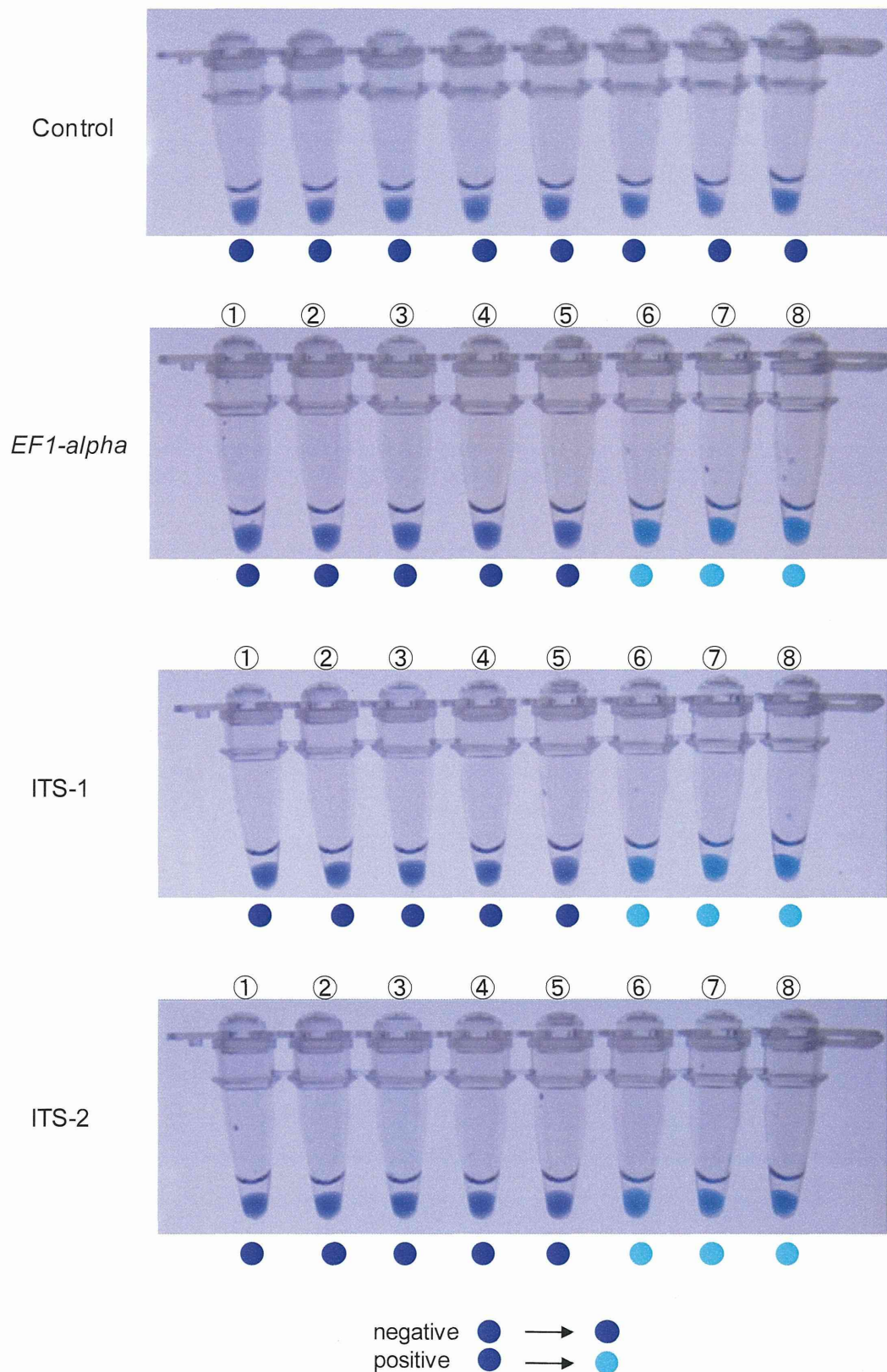


図4. LAMP 比色検出法を用いた *Psilocybe cubensis* の検出

最上段は反応前. ①シイタケ 10 mg, ②ブナシメジ 10 mg, ③エリンギ 10 mg, ④エノキタケ 10 mg, ⑤マイタケ 10 mg, および ⑥ミナシビレタケ 20 mg, ⑦ミナシビレタケ 10 mg, ⑧ミナシビレタケ 5 mg

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
研究分担者: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RAMS法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ことから、マイクロサテライト解析のひとつである RAMS (random amplified microsatellites) 法を検討した。DNA 塩基配列2領域で同一塩基配列を有する大麻系統内でも多型が確認され、異同識別法には利用可能であると示唆された。

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、近年減少傾向にあったが5年ぶりに増加した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今年度は、昨年度までの手法を変え、マイクロサテライトの電気泳動による多型解析のひとつであるRAMS (random amplified microsatellites)^{3,4)}法を検討した。

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、日本国内繊維用栽培種トチギシロ種子(CST)8種および筑波研究部より分与いただいた「大津市トチギシロ」(CSO)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 μL 中の1 μLをPCR反応に用

いた.

2-2. *trnH-psbA* および ITS 領域の解析

各回収 DNA 溶液を鋳型として葉緑体 DNA 上の *trnH-psbA*, 核ゲノム上の ITS 領域を, 各領域で植物において保存性の高い配列を基にして作成されたユニバーサルプライマーを用い⁵⁻⁷⁾, Ex Taq (Takara) および Ampdirect plus (Shimadzu) を使用し PCR 増幅を以下のプログラムで行った (95°C 180sec; 94°C 30sec, 54°C 30sec, 72°C 90sec, 35cycle; 72°C, 300sec). 1%アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認後, ダイレクトシーケンスを行った. Cycle Sequence 反応には, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い, 解析は ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (ABI) を使用した. 用いたプライマーを以下に示す.

trnH-psbA forward primer;

CGAAGCTCCATCTACAAATGG,

trnH-psbA reverse primer;

ACTGCCTTGATCCACTTGGC,

ITS forward primer;

CCTTATCATTAGAGGAAGGAG,

ITS reverse primer;

TCCTCCGCTTATTGATATGC

2-3. RAMS 法を用いた系統解析

メキシコ産系統種子 (CSM) 8 種, 日本国内繊維用栽培種トチギシロ種子 (CST) 8 種から得られた DNA をもとに, 今回作成した 6 種の RAMS プライマーを用い Ex Taq (Takara) および Ampdirect plus (Shimadzu) を使用し PCR 増幅を以下のプログラムで行った (95°C 180sec; 94°C 30sec, アニール温度 (°C) は以下に記載 30sec, 72°C 45sec, 35cycle; 72°C, 300sec). 1.8%アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認した. 以下に使用した RAMS プライマーを示す.

HBBB(GAAA)₅ アニール温度 50°C

DBVB(CATA)₅ アニール温度 45°C

BHD(AGC)₅ アニール温度 60°C

DHV(CGT)₅ アニール温度 60°C

VBD(TAC)₅ アニール温度 50°C

HBV(GAT)₅ アニール温度 60°C

電気泳動図における各泳動レーンの PCR 産物は, 同一個体の DNA サンプルから各プライマーを用い PCR を行った結果である.

C. 研究結果

1. *trnH-psbA* および ITS 領域の解析

大麻種子計 40 種より得られた両配列の解析結果より各々の配列に関してハプロタイプネットワークを作成した (図 1).

trnH-psbA では塩基配列は 4 タイプに分類され, CSM, CST, CSO の配列はそれぞれ一致していた.

ITS では塩基配列は 3 タイプに分類され, CSM, CST, CSO の配列はそれぞれ一致していた.

海外市場製品 (CS) は *trnH-psbA*, ITS でそれぞれ 3 タイプに分離された.

2. RAMS 解析

ITS, *trnH-psbA* 両領域において配列が一致した CSM 8 種および CST 8 種に関して RAMS 法を用いた多型解析を行った. 図 2 に各 RAMS プライマーを用い PCR を行った結果を示す (1.8%アガロースゲル).

HBBB(GAAA)₅ プライマーを用いた場合, CSM に 2 か所の多型が観察された. ITS, *trnH-psbA* 両塩基配列では同一のグループであったが, マイクロサテライト領域を用いることで更なるグループ分け, 異同識別が可能であった. 一方で, CST グループ 8 種では多型が確認されず, 本プライマーを用いることでの異同識別は不可能であった.

各プライマー間での多型出現差異を見てみると, HBBB(GAAA)₅ プライマーでは CSM の 4, 5 レーン間は同一多型を示していたが, DBVB(CATA)₅ プライマーでの CSM の 4, 5 レーン間は多型に差異が生じており, このことから更なる異同識別が可能であることが確認できた. BHD(AGC)₅ プライマ

一では CSM 間での多型は確認できなかった。また、HBV(GAT)₅プライマーにおける CSM 間では、大きな多型の変化は見られなかったが、約 300bp 付近のメインバンドにサイズ差が見られた。

全体的に CST 間では大きな多型が見られなかった。

D. 考察

DNA 塩基配列を基にした系統解析、異同識別のためのマイクロサテライト解析を行った。今回検討した RAMS (random amplified microsatellites) 法は、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)^{2, 8)}で、繰り返し配列の 5' 端を混合塩基とする縮重プライマーを作成し、マイクロサテライト領域を挟むかたちで PCR 産物が得られる手法である^{3, 4)}。今回作成したプライマーには植物種特異性はないが、逆に、様々な植物種の多型が確認できる点は、大麻草以外の麻薬原料植物種への利用も可能であると考えられ、大麻における可能性を検討した。

まず、植物種の同定・分類では塩基配列の解析が DNA バーコーディング法⁶⁾の普及とともに広く一般化されつつある。配列解析によって種が同定できると、その同一配列種における系統や産地、異同などの解析が必要となる。今回 RAMS 法に用いた大麻種子は系統保存された 2 系統で DNA 塩基配列 2 領域において配列が完全一致していた。その 2 系統において系統内で更なる分離が可能か検討した。

RAMS プライマー 6 種 (4 塩基リピート 2 種, 3 塩基リピート 4 種) を作成し 2 系統間での多型を確認した。目視によるバンドの確認でも明確に同一系統内での差異は確認されたため、十分に異同識別の指標と成り得ると考えられたが、明確に差異が確認できない系統も見られたため、さらなるプライマーの作成などの検討も必要であると考えられた。また、RAMS プライマーに蛍光色素を結合させた F-RAMS (Fluorescent-RAMS) 法⁹⁾があ

り、多型判定におけるバンドのある・なしの判定ではなく、バンドサイズの違いを解析する手法もあり、今回の結果でもバンドはあるがサイズが異なるという結果も見られたため、F-RAMS 法を用いることでより正確な多型解析が可能となると考えられた。

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 26 年中の薬物・銃器情勢, https://www.npa.go.jp/sosikihanzai/yakubutuujyuki/yakujyuu/yakujyuu1/h26_yakujyuu_jousei.pdf
- 2) 赤根敦“DNA 鑑定は万能か”DOJIN 選書, 化学同人 (2010)
- 3) Guarro, J. *et al.*, *Medical Mycology*, 43, 365-371 (2005)
- 4) Guo, L. D. *et al.*, *Fungal Diversity*, 16, 53-65 (2004)
- 5) Ogata, J., Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., *Forensic Science International*, 227, 33-41 (2013).
- 6) CBOL Plant Working Group, *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 12794 – 12797 (2009).
- 7) Jordan W. C., Courtney, M. W., Neigel, J. E., *Am. J. Bot.* 83, 430–439 (1996).
- 8) (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
- 9) Kallifatidis B. *et al.*, *Forensic Sci Int Genet.* 9, 25-32 (2014)

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.

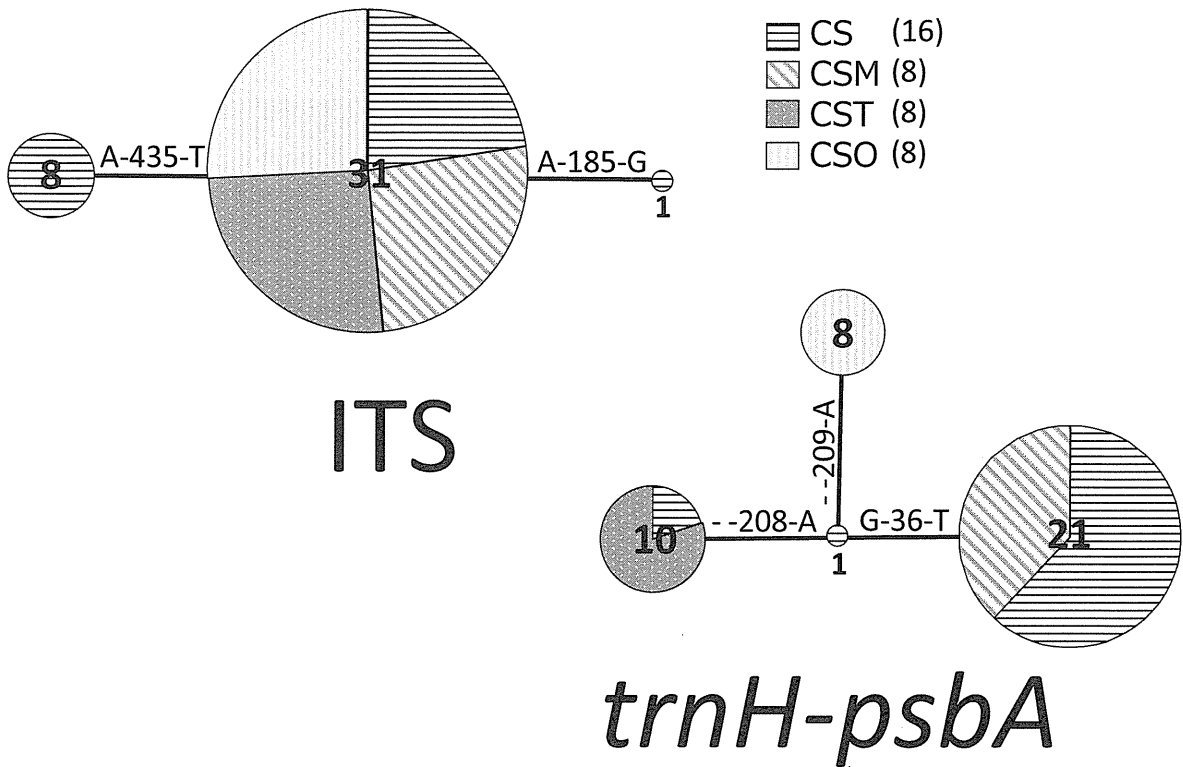


図 1. 分析大麻 40 種の ITS および *trnH-psbA* のハプロタイプネットワーク

円中の数字は解析サンプル数, A-435-T は分析 ITS 領域の 435 塩基目が左集団(8)では A, 右集団(31)では T を示す. 塩基の - は GAP を示す.

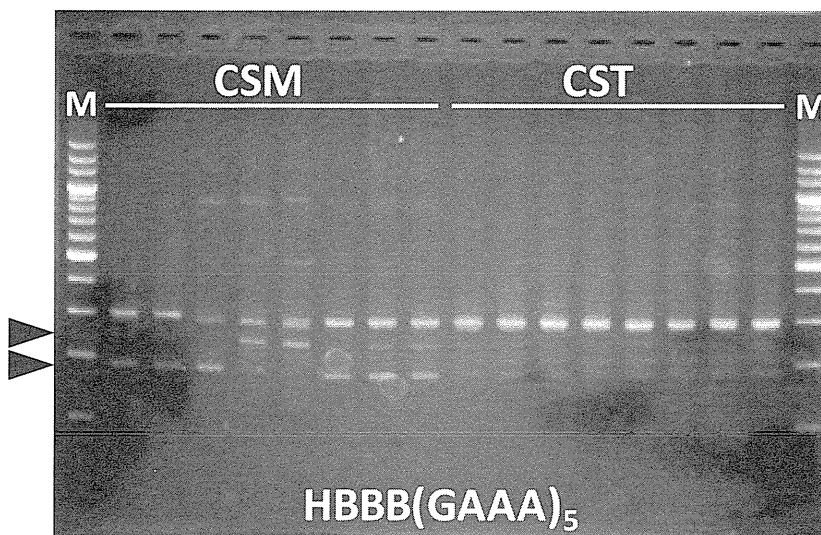


図 2. CSM 8 種, CST 8 種の各 RAMS プライマーによる PCR 産物の電気泳動図(1.8%アガロースゲル (TAE, EtBr 染色))

使用したプライマー配列は泳動図下に記載, M: 200bp ラダーマーカー, 矢頭は明確に多型が確認された位置. 全 6 泳動図において各レーンは同一サンプル DNA での解析結果を示す.

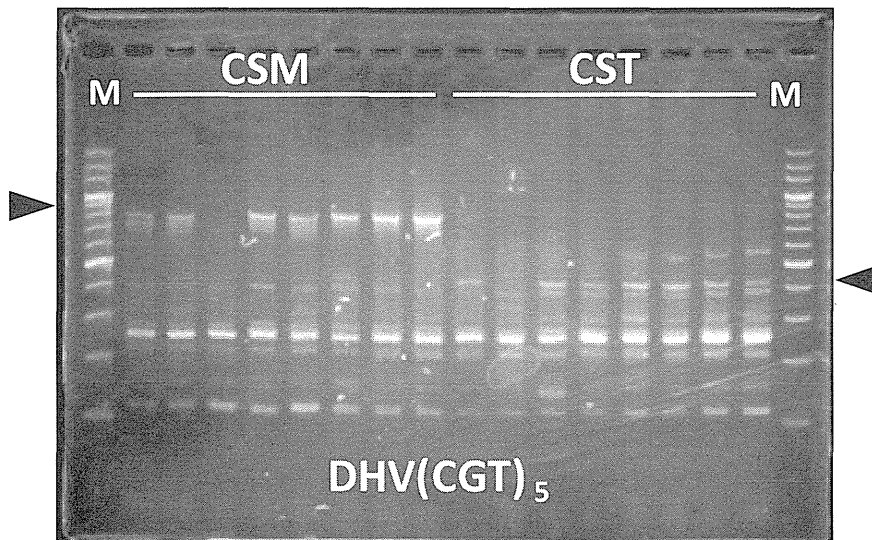
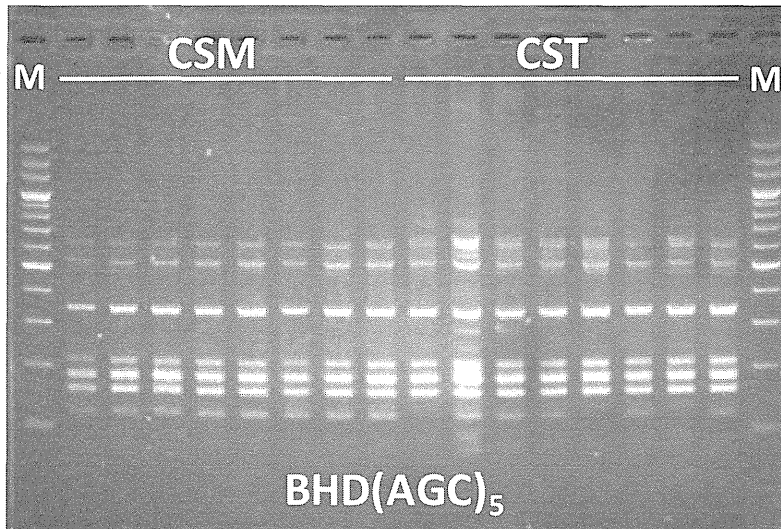
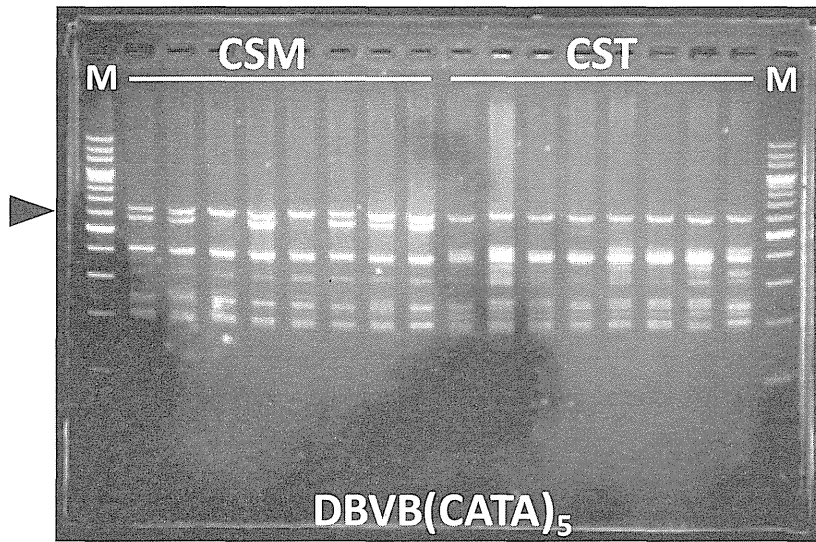


図2の続き.(その1)

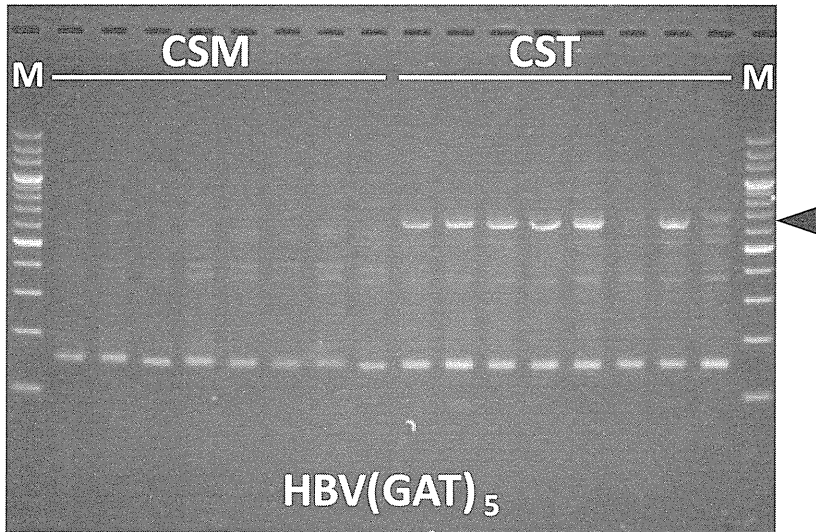
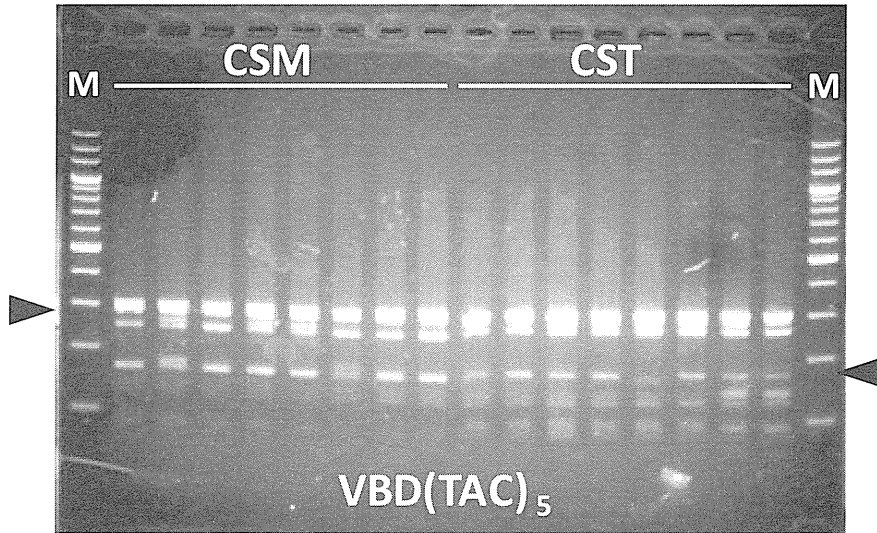


図 2 の続き.(その 2)

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・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター
筑波研究部 主任研究員

—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。昨年度までに、ケシ属植物のトランスクリプトーム解析によりオニゲシ特異的遺伝子 contig#1603 を取得し、本遺伝子配列を使用したオニゲシ特異的な遺伝子鑑別法の開発に成功した。本年度は contig#1603 の遺伝子配列情報を遺伝子鑑別等により発展的に使用するため、その全長 cDNA の分子クローニングを RACE 法により行った。その結果、1098 bp, 365 アミノ酸をコードすると推定される contig#1603 の全長 cDNA 配列の取得に成功した。本遺伝子は分子系統解析の結果、ケシ由来の機能未知酵素遺伝子 DIOX4 及び DIOX5 と高い相同性を示すことが判明した。得られた cDNA 配列情報は、これまでにオニゲシ特異的遺伝子候補として取得している遺伝子群とともに、鑑別対象植物のオリパビン生産能の有無の評価に使用できるものと考えられる。

研究協力者: 吉松 嘉代

医薬基盤・健康・栄養研究所 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

研究協力者: 乾 貴幸

医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部 特任研究員

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有する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るオニゲシだけではなく、オニゲシとケシ等のケシ属植物の交配種についても、研究材料としてモルヒナンアルカロイド生合成経路の酵素遺伝子群の解析を行い、オリパビンをはじめとするアヘンアルカロイドの生産制御に関する知見を得るアプローチが独創的であり、また特色である。

B. 研究方法

オニゲシ特異的な遺伝子鑑別法の評価（‘ハカマオニゲシ’ #188-00 #4 株の再解析）

昨年度、本研究の成果のひとつであるケシ属植物のトランスクリプトーム解析の結果から、オニゲシ特異的な *2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase (ODDs)* *1 酵素遺伝子の相同遺伝子 contig #1603 を見出し、その塩基配列情報を利用し、オニゲシ特異的な検知が可能な PCR 鑑別法を開発した。

薬用植物資源研究センター筑波研究部で保存栽培されている‘ハカマオニゲシ’ #188-00#4 株は、ハカマオニゲシの特徴を有しているが、昨年度の contig #1603 特異的プライマーを用いた PCR スクリーニングで positive となり、ハカマオニゲシの外観であるが contig #1603 遺伝子を有する奇異な株と判断されていた。そこで、今年度開花した同株について、葉より再度遺伝子を調製して PCR を行い再現性を確認した。

PCR の交叉反応性試験等に供試したオニゲシ、ケシ、ハカマオニゲシ等のケシ属植物は、センター筑波研究部において導入・保存・栽培されているものである。

ケシ属植物からのゲノム DNA の調製には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用した。新鮮葉約 100 mg を、2 ml 容チューブに、4.8 mm 径ステンレスボール 2 個及びキットの AP1 バッファー 500 μ l と共に入れ、破砕機 MS-100 (TOMY) で 4,500 rpm, 1 分間、2 回粉砕を行い、以後キットのプロトコルに従い調製した。最終溶出はキット添付

の AE buffer 100 μ l で行った。

PCR 条件は下記のとおりである。

[GoTaq Green Master Mix (Promega) を使用した交叉反応性試験]

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix (Promega) 3 μ l, sense & antisense primers (2.5 μ M) 1 μ l each, genome DNA 1 μ l (reaction volume: 6 μ l)

PCR condition: 94°C 5 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 1 min.) x 30 - 72°C 10 min. - 4°C ∞ , iCycler (BioRad)

得られた増幅産物はアガロース電気泳動で解析した。

*1: Hagel, J.M. and Facchini, P.J., Dioxygenases catalyze the *O*-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 273-275 (2010)

RACE 法によるオニゲシ高発現 ODDs 相同遺伝子 contig #1603 の分子クローニング

トランスクリプトーム解析により得られた contig #1603 の塩基長は 731 bp であり、データベースに登録されているケシ由来の ODDs 相同酵素遺伝子と比較すると、開始および終止コドンを含む、5' 及び 3' 両末端が欠損していると考えられた。そこで、contig #1603 の機能推定、機能解析等のため、全長 cDNA 配列の取得を行った。

Contig #1603 の塩基配列情報 (CORE と呼ぶ) をもとに特異的プライマーを設計し、CORE のほぼ全長、CORE から 3' 末端部、CORE から 5' 上流部のそれぞれの塩基配列情報を取得する 3' 及び 5' 末端部のクローニングには RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法を用いた (図 2)。

[CORE 領域の増幅]

昨年度はゲノム DNA の増幅を行うため、CORE の 3' 側約 230 bp に相当する短い領域のゲノム DNA (約 340 bp) の増幅を行ったが、今回、CORE のほぼ全長に相当する部分の cDNA の

PCR 増幅を行った。

薬用植物資源研究センター筑波研究部標本園オニゲシ(導入番号 13-95)の葉(中央部)より RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用い total RNA を調製した。得られた total RNA は TURBO DNA Free (Ambion 社)を用い DNase 処理をしたのち, oligo-d(T) primer (RACE32)を用い, Superscript III(Invitrogen)により 1 本鎖 cDNA (ss-cDNA)を逆転写合成した。

この ss-cDNA を鋳型として, contig #1603 遺伝子 'CORE' の増幅を行った。コントロールとしては, ケシの actin 遺伝子と相同性が高いことからオニゲシの actin 遺伝子と考えられる contig #481 及び #482 の配列情報をもとに, actin 増幅用プライマーを設計し, cDNA 合成の確認に用いた。増幅に用いたプライマーの位置は図 2 に示す。また塩基配列は表 1 に示すとおりである。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で解析した。特異的な増幅産物が得られた場合は, アガロースゲル電気泳動で分画ゲル精製したのち, T-vector にクローニングし, 塩基配列解析に供した。

[3'-RACE]

標本園オニゲシ(導入番号 13-95)の葉(中央部)より RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用い total RNA を調製した。得られた total RNA は TURBO DNA Free (Ambion 社)を用い DNase 処理をしたのち, oligo-d(T) primer (RACE32)を用い, Superscript III(Invitrogen)により 1 本鎖 cDNA (ss-cDNA)を逆転写合成した(図 2, 3)。

新規に 3'-RACE 用に設計した#1603 特異的プライマー(表 1)と, cDNA の逆転写合成に使用した RACE32 プライマーおよびこれに特異的にアニールする RACE17 プライマーを用い, 2 段階の nested-PCR を行った。

1st PCR の増幅産物は想定サイズ範囲に分画してゲル精製を行い, 2nd PCR の鋳型として用いた。2nd PCR の増幅産物はアガロースゲル電気泳動で分画・ゲル精製し, T-vector にクローニングしたのち, 各 8 クローンを塩基配列解析に供した。

[5'-RACE]

新規に 5'-RACE 用に設計した#1603 特異的プライマー(表 1)で逆転写合成し, poly(A)を付加した 1 本鎖 cDNA プール(図 2, 4)を鋳型として, #1603 特異的プライマーと RACE32 プライマーおよびこれに特異的にアニールする RACE17 プライマーを用い, 2 段階の nested-PCR を行った。1st PCR の増幅産物は 4 つのフラクションに分画しゲル精製を行い, 2nd PCR の鋳型として用いた。2nd PCR の増幅産物はアガロースゲル電気泳動で分画・ゲル精製し, T-vector にクローニングしたのち, 各 8 クローンを塩基配列解析に供した。

[Contig #1603 の全長 cDNA の PCR 増幅]

5'-RACE より得られた cDNA の N 末端側の塩基配列情報と, 3'-RACE より得られた C 末端側の情報より, 全長 cDNA 増幅用プライマーをセンス方向 2 本, アンチセンス方向 2 本それぞれ設計し, ss-cDNA プールを鋳型に PCR を行った(図 2)。PCR 増幅産物はアガロースゲル電気泳動で分画・ゲル精製し, T-vector にクローニングしたのち, 16 クローンを塩基配列解析に供した。得られた配列情報は, BLAST 解析(blastp 検索)及び分子系統解析に供した。分子系統解析には DDBJ が提供する ClustalW Ver.2.1 を使用した。

C. 研究結果

ハカマオニゲシ#188-00 #4 株における再解析

Contig #1603 に特異的な PCR プライマーを用いたオニゲシ特異的遺伝子鑑別法について, #188-00#4 株の今年度開花した同株を検体として, 葉より再度ゲノム DNA を調製し PCR を行い再現性を確認した。その結果, 今年度調製のゲノム DNA を鋳型とした PCR では陰性であった。この結果を受けて, さらに下記の実験を行った。

1. 昨年度の株の葉より調製したゲノム DNA を鋳型として PCR → 陽性
2. 昨年度の株の葉の残りより調製したゲノム DNA を鋳型として PCR → 陰性

以上より, 昨年度の#188-00#4 はゲノム DNA の

調製の過程でオニゲシ由来の遺伝子等の混入があったと判断された。すなわち、#188-00 #4 株は contig #1603 遺伝子陰性と結論された。この結果を含め、センター保有のケシ属植物との交叉確認試験の結果を図 5 のように更新した。

RACE 法によるオニゲシ高発現 ODDs 相同遺伝子 contig #1603 の分子クローニング

[‘CORE’領域の増幅]

まず、逆転写合成した ss-cDNA プールを鋳型として #1603-818S + #1603-1051A の組み合わせで PCR を行った場合は約 230 bp の増幅産物が得られた。また actin 遺伝子を増幅した場合も約 340 bp の増幅産物が得られ、cDNA の逆転写合成が正常に進んでいることが確認された(図 6)。次に、プライマーセット S1, S2 と A1, A2 それぞれの組み合わせで PCR を行った。その結果、プライマーセット S1+A1 及び、S2+A1 の組み合わせ時に増幅産物が得られた一方、A2 を antisense プライマーとした場合は増幅産物が得られなかった(図 7)。すなわち、A2 の設計に使用した contig #1603 の情報が実際の配列と異なる可能性がある。これらの塩基配列を解析した結果、プライマーセット S1+A1 及び、S2+A1 の増幅産物の塩基配列は major なタイプと minor なタイプに分かれ(図 8)、major なものが #1603 とほぼ一致するものであることが明らかになった。以上のように、contig #1603 がたしかにオニゲシ(13-95)において発現していることが確認された。

[3'-RACE]

3'-RACE の PCR 増幅産物のサイズは 500 bp 程度と予想されるが、1st PCR の結果、特異的バンドは認められなかった(図 9)。この PCR 産物の 10 µl をアガロースゲル電気泳動に供し、340 bp ~ 800 bp の部分のゲルを切り出し、WIZARD SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)で精製した(最終溶出 ~50 µl)。このうち 1 µl を 2nd PCR の鋳型として用いた。その結果 1st PCR の #1, #2 いずれのゲル精製物を鋳型とした場合にも同

じサイズ(約 0.5 kbp)の増幅産物が得られた(図 10)。この増幅産物をクローニングし、塩基配列を解析した。その結果、数塩基の変異点はあるが、解析した PCR 産物 #1 由来の 8 クローンはいずれも contig #1603 の 3' 下流側配列と考えられる塩基配列を有していた。PCR 産物 #2 由来のクローンは、一部のみが contig #1603 と相同な配列を有していた。

[5'-RACE]

5'-RACE の PCR 増幅産物のサイズは 500 bp 程度と予想されるが、1st PCR の結果、特異的バンドは認められなかった(図 11)。この PCR 産物の 10 µl をアガロースゲル電気泳動に供し、0.3 kbp ~ 1.7 kbp の部分のゲルを 4 つのフラクションに分けて切り出し、WIZARD SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)で精製した(最終溶出 ~50 µl)。このうち 1 µl を 2nd PCR の鋳型として用いた。

1st PCR の fraction #2, #3 のゲル精製物を鋳型とした PCR の結果、#2 では約 1.2 kbp、#3 の場合は約 0.5 kbp の増幅産物が得られた(図 12, 13)。これらをクローニングし、塩基配列を解析したところ、#3 を鋳型とした増幅産物が #1603 の 5' 領域であることが判明した。#3 由来の 8 クローンのうち、3 クローンは #1603 の 5' 領域と考えられる配列であり、これらは 2:1 の出現比率で 2 タイプに分かれた。

[Contig #1603 の全長 cDNA の PCR 増幅]

Contig #1603 の全長 cDNA 増幅用プライマーを用い、ss-cDNA プールを鋳型として PCR を行った結果、Lane #1, #2 ともに予想サイズの増幅産物が得られた(図 14)。この増幅産物をクローニングしたのち塩基配列を解析したところ、1098 塩基対、365 アミノ酸のコード領域を含む全長 cDNA の塩基配列情報が得られた。なお、得られた全長配列は 1 塩基の変異を有する 2 タイプに分かれ(アミノ酸配列では同一)、それぞれの出現比率は全 16 クローン中、8:8 であった。

Contig #1603 の分子系統解析

オニゲシ由来 contig #1603 の全長 cDNA 配列についてケシ由来 ODDs と分子系統解析を行ったところ、機能未同定の酵素遺伝子 *DIOX4* 及び *DIOX5* と近縁であることが判明した(図 15)。推定アミノ酸配列についてblastp 検索を行ったところ最も高いスコアを示したのは、ケシ由来 *DIOX5* であり 75%の同一性、86%の相同性を示した。次にスコアが高かったものは同 *DIOX4* で 72%の同一性、84%の相同性であった。なお、ケシの CODM(codeine *O*-demethylase)との同一性は 60%、相同性は 80%であった。これらの相同遺伝子とのアミノ酸レベルのアラインメントを図 16 に示す。本酵素(contig #1603 の全長 cDNA がコードするもの)がオニゲシにおいてテバインからオリパビンへの変換に関わるか否か、他の ODDs 候補と共に更なる検討が必要である。

D. 考察

今年度は、昨年オニゲシの EST ライブラリーより抽出された ODDs 相同遺伝子の contig に相当する cDNA の対象領域が、PCR により増幅されることを確認し、確かにオニゲシにおいて発現している遺伝子であることを確認した。また、その全長 cDNA のクローニングに成功し、ケシ由来の *DIOX4* 及び *DIOX5* と最も高い相同性を示すことを明らかにした。これらの機能は未同定であるが、contig #1603 の全長 cDNA がコードする酵素の機能解析を行うことにより、オニゲシにおけるオリパビン生合成経路の解明に関わる知見が得られると期待されるのみならず、ケシ植物体内における ODDs の生理機能の解析にも寄与すると考えられる。

E. 結論

本年度はオニゲシ特異的遺伝子 contig#1603 の遺伝子配列情報を、より発展的に使用するため、その全長 cDNA の分子クローニングを RACE 法により行った。その結果、1098 bp、365 アミノ酸を

コードすると推定される全長 cDNA 配列の取得に成功した。本遺伝子は、分子系統解析の結果、ケシ由来の機能未知酵素遺伝子 *DIOX4* 及び *DIOX5* と高い相同性を示すことが判明した。得られた cDNA 配列情報は、これまでにオニゲシ特異的遺伝子候補として取得している遺伝子群とともに、鑑別対象植物のオリパビン生産能の有無の評価に使用できるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. 河野徳昭, 内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 鈴木秀幸, 吉松嘉代, 川原信夫:ケシ属植物の網羅的な発現遺伝子情報を利用した鑑別法の開発, 日本生薬学会第 62 回年会, 岐阜(2015. 9)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

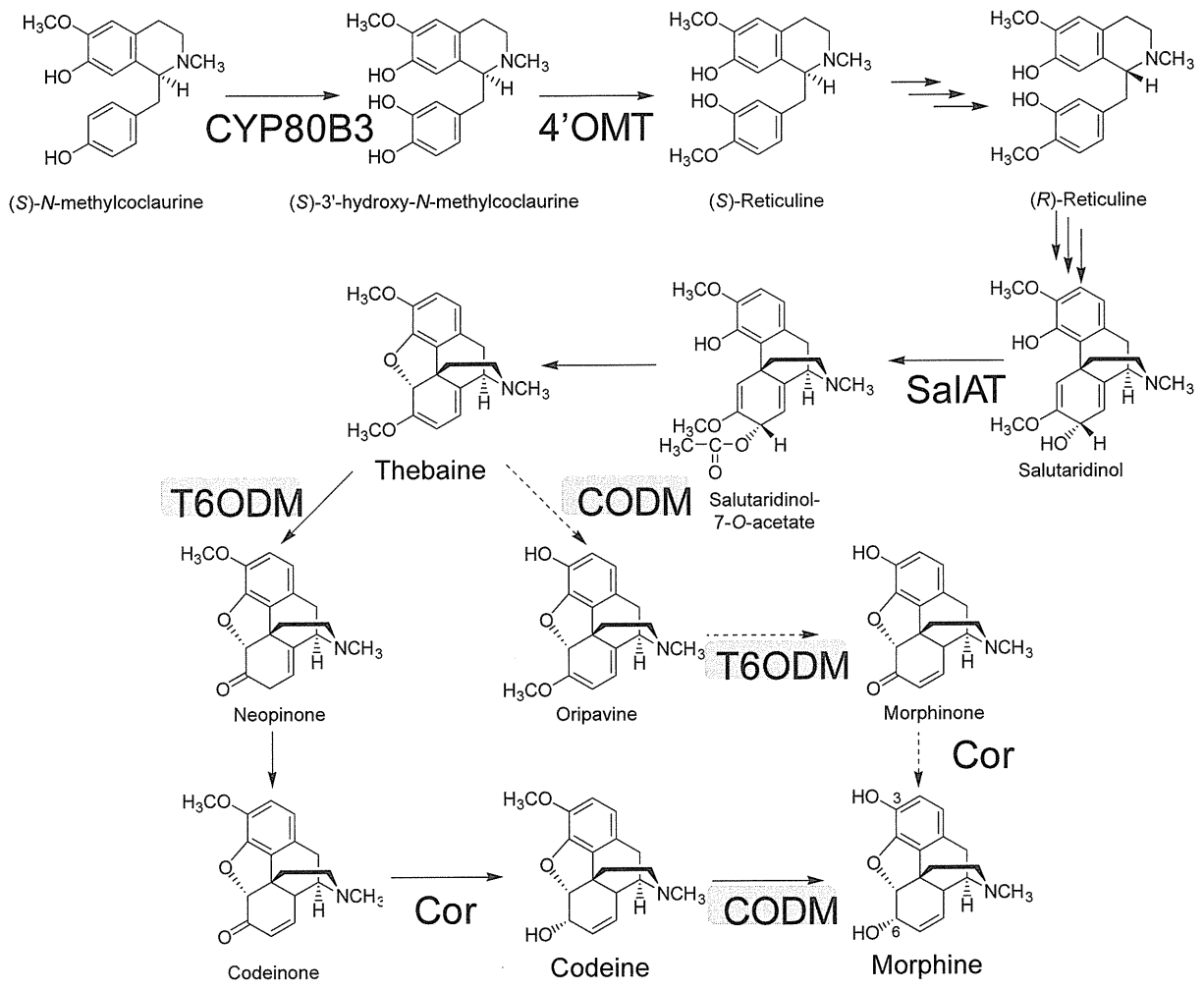
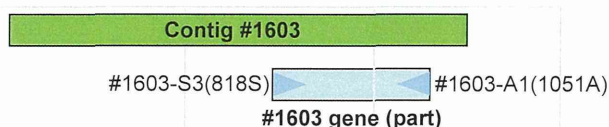


図1. ケシにおけるモルヒネの生合成経路 (S)-N-methylcoclaurine以降を示す
 (オリパビンを経る経路は国産の一貫種系統には存在しないとされる*2)

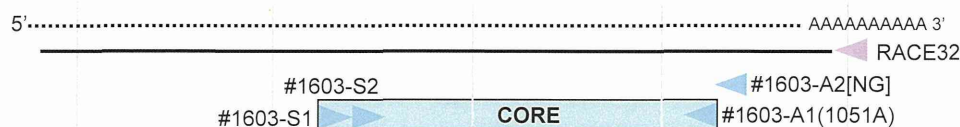
*2: Nielsen, B.; Røe, J.; Brochmann-Hanssen, E. Oripavine – A new opium alkaloid. *Planta Med.* **48**, 205-206(1983)

Molecular cloning of contig #1603 cDNA by RACE method

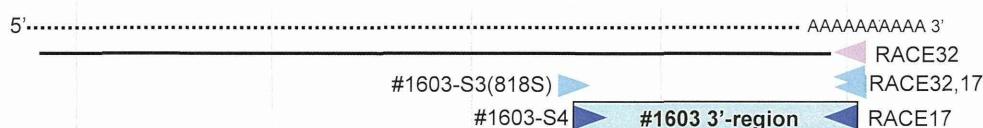
[Step 0] Amplification of contig #1603 genome DNA and cDNA (part)



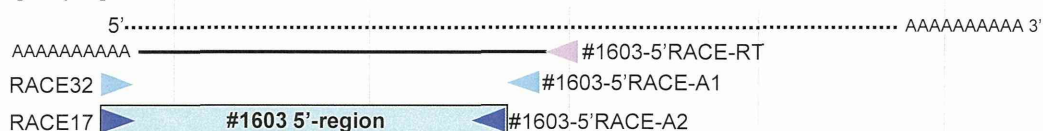
[Step 1] Amplification of contig #1603 'CORE' region



[Step 2] 3'RACE



[Step 3] 5'RACE



[Step 4] Full-length cDNA amplification

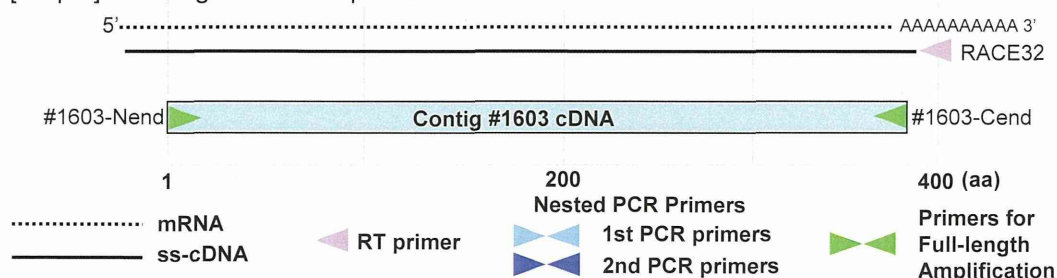


図2. Contig #1603 全長cDNAクローニングの概念図

表1. Contig #1603の全長cDNAクローニングに用いたプライマーの配列情報

Target	Primer ID	Primer sequence (5' to 3')	Orientation
RT	RACE32	gAC TCg AgT CgA CAT CgA TTT TTT TTT TTT TT	
RT	RACE17	gAC TCg AgT CgA CAT Cg	
CORE	1603-CORE-S1	atc ttt caa tgg ttg aga agc	sense
CORE	1603-CORE-S2	ttg gaa gaa aga agg aga tac	sense
3'RACE	#1603-818S(S3)	agt aga tgg att aga gat tcg	sense
3'RACE	1603-CORE-S4	gtg aac att gga gat act ttg	sense
CORE	#1603-1051A(A1)	tct ggt gtg atc atg ctg acc	antisense
CORE	1603-CORE-A2	aat ttc ttc ata tac tcc tcg	antisense
5'RACE	1603-RT	tg tat ggg aag agt gac cat c	antisense
5'RACE	1603-5'RACE-A1	tca agt ttt tga tct tcc gac	antisense
5'RACE	1603-5'RACE-A2	aat ttt gtc caa atc ctt ccg	antisense
Actin	Papaver-ACTV-F	CAC ACT gTg CCA ATC TAT gAg	sense
Actin	Papaver-ACTV-R	gaa ttg tag gta gtc tca tgg	antisense
Full	1603-full-N1	gta ttt tga aga ttc atg gag	sense
Full	1603-full-N2	ttg aag att cat gga gac acc	sense
Full	1603-full-C1	aca tca aat atg aga tat gcg	antisense
Full	1603-full-C2	tta ttt gtc ctt atc acc ttc	antisense