

令和元年度厚生労働行政推進調査事業費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業:H-29-医薬-指定-009)
分担研究報告書

分担研究課題：危険ドラッグ等の濫用防止のより効果的な普及啓発に関する研究
大麻草の成分分析，海外の規制情報の把握

研究分担者：花尻(木倉)瑠理 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

－大麻の分子生物学的手法を用いた近年の解析手法や分析事例－

研究協力者：緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

研究要旨：世界的に大麻を取り巻く環境はここ数年で大きく様変わりした。これまでの大麻研究は限られた分析・研究機関でのみ行われていたが，現在は，海外に多数の大麻を扱う会社が設立され，さまざまな大麻に関する研究・開発が行われている。そこで本研究では，これまでの大麻の分子生物学的手法を用いた近年の解析手法や分析事例について調査を行い，今後の大麻の研究開発に関する動向を理解するための情報収集をおこなった。DNAを用いた大麻の初期の分析研究は法科学分野による流通実態や異同識別法に関するマーカーの開発と，分類学分野の大麻分類に関する調査であった。次世代シーケンサーの出現により，現在は多数のマイクロサテライト，SNP マーカーが作成され，分析精度の向上がみられている。今後も多数のマーカーが作成され，より精度の高い分析手法の開発が見込まれている。また，未解明な部分の多い，大麻の雌雄性やカンナビノイドの生産・蓄積の場である毛状突起の細胞生物学的研究が進むことが期待されている。

A. 研究目的

大麻(アサ)の次世代シーケンサーを用いた全ゲノムの概要であるドラフトゲノム(534 Mb)解析，30,000 遺伝子におよぶトランスクリプトーム解析に関する報告が 2011 年になされた¹⁾。2019 年，遺伝子操作された酵母株が単糖であるガラクトースを添加し培養することで，アサの生産する主要カンナビノイドを合成することが報告された²⁾。同年，生物工学を用いた無細胞系でのカンナビノイド合成についても報告されている³⁾。世界的に大麻を取り巻く環境が大きく変化
する中で，大麻のゲノム編集技術や上記のカン

ナビノイド合成など生物工学的技術による生産を目指す企業が海外に存在している⁴⁾。分子生物学を用いた分析技術やマーカーの開発は，農学的，薬学的に利用される植物材料としての大麻の機能的・潜在的能力を明らかにし，法科学における流通実態，異同識別などを明確にすることができる。本研究では近年の分子生物学的分析手法を用いた大麻の分析事例や分析技術の動向を調査し，大麻分析に関する情報収集を行う。

B. 研究方法

情報検索ツールとして, PubMedを用い, 検索語として, *Cannabis sativa*, genome, DNA, marker 等を用いた。

C. 研究結果・考察

Hillig (2005)は, カンナビノイドについて調査した 157 の大麻サンプルのアロザイム変異分析を行った⁵⁾。サンプルの 17 遺伝子座の多型を評価し, 52 の対立遺伝子頻度に関して主成分分析 (PCA)を行った。PCA 散布図は, drug type と fiber type を別々のクラスターに分離したが, WLD (wide-leaflet drug) と NLD (narrow-leaflet drug) は重なり合った。

Gilmore *et al.* (2007)は, 葉緑体, ミトコンドリア DNA の多型遺伝子座について 76 の大麻集団を調べた⁶⁾。系統樹解析 (最節約法) において 3 つのクレードが得られた。クレード A は, 大部分の fiber type で構成された。クレード B は, アフガニスタン在来種とほとんどの drug type (交雑種と警察押収品) が含まれた。クレード C は古典的な“Sativa”で, インド, ネパール, タイ, ジャマイカ, メキシコ, アフリカの 12 の在来種であった。

Piluzza *et al.* (2013)は 19 系統の大麻を比較した。6 つの Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) プライマーが DNA 多型を検出し, 系統解析を行った⁷⁾。アフガニスタンとインド伝統系統は, 別々のクラスターに別れ, アフガニスタンは fiber type と同一クラスターであった。インド伝統系統のクラスターには Skunk (drug type strain) が含まれた。

Onofri *et al.* (2015)は THCAS 配列内の一塩基多型 (SNP) を検索した⁸⁾。彼らは fiber type, drug type 18 銘柄の中から, 9 種のユニークな THCAS 配列を検出した。1 つの配列はインド伝統系統によって共有され, 2 つの配列はアフガニスタン産に固有であった。

次世代シーケンサーの登場により, 大量の遺伝情報が報告されている。Van Bakel *et al.*

(2011)は, 全ゲノムショットガン (WGS) メソッドを使用し, Purple Kush (drug type Strain) と 2 つの fiber type 品種 Finola と USO-31 をシーケンスした¹⁾。同年, 他の 2 つの大麻ゲノム Chemdawg と LA Confidential (drug type strains) の配列決定も WGS メソッドで行われた⁹⁾。

Tejkalová (2015)は, 大麻ゲノムを使用して, SNP-calling とジェノタイピングを行った⁴⁾。“Sativa”の 44 サンプルと“Indica”の 77 サンプルの 57 SNP 位置に基づくハプロタイプを STRUCTURE (多座位の遺伝子型データを用いて集団の遺伝構造を調べるためのソフトウェア) で分析した。このソフトウェアは, 対立遺伝子頻度に基づき, 集団を分割する最適なクラスター数 (K) を特定する。1~9 の K 値をテストし, K = 2 (2 つの母集団) が最もよく適合したが, “Sativa”と “Indica”という識別とは一致しなかった。

Sawler *et al.* (2015)は, SNP の検出と fiber type と drug type のサンプルのジェノタイピングを行った。Genotyping by sequencing (GBS) 解析は, 14,031 個の SNP を特定した。SNPs バリエーションの PCA 解析では, 81 の drug type サンプルと 43 の fiber type サンプルを明確に分離した。“Sativa”と“Indica”のクラスターは部分的に重なり合った。fastSTRUCTURE (大量 SNP データ解析用 STRUCTURE) でも同様の結果が得られ, 124 個すべてのサンプルデータが K=2 で最もよく適合した。

大麻の DNA マーカーの開発における大きな推進力は, 法科学者らによる, いわゆる drug type, fiber type を区別するためのツールの必要性によってもたらされた。さらに, 違法薬物として大麻の流通・拡散経路を追跡することも法執行機関にとって重要な問題となる。初期の研究では, ゲノムDNAは, さまざまな植物材料の法科学的識別に役立つ配列のソースとして使用された。実際, 葉緑体 DNA の *tRNA* 遺伝子は, 大麻 DNA を識別するためのマーカーとして利

用された^{11,12)}. 大麻葉緑体全ゲノム配列の決定^{13,14)} は、今後も系統発生研究のためのマーカー源として葉緑体ゲノムのより広範な活用への道を開くと考えられる. 他の植物種からの大麻の識別に役立つマーカーとして、核 rDNA の ITS2 に焦点があてられた. これらの研究は、Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 解析法¹⁵⁾および PCR ベースでの解析法が開発された¹⁶⁾.

マイクロサテライト(ゲノム DNA 上に存在する反復配列で、特に数塩基の単位配列の繰り返しからなるもの)研究では、Hsieh et al. (2003)が、3~40 の反復単位のバリエーションを有する 6 bp の単純反復配列モチーフ(CACCAT)を分離した¹⁷⁾. 分析された遺伝子型は、1~4 個の対立遺伝子を含んでいた. 2003 年 Gilmore and Peakall は、5 つのマイクロサテライト遺伝子座を使用し、異なる起源の 9 種の drug type, 6 種の fiber type を含む 93 種の大麻のプロファイルを作成した¹⁸⁾. 79 の対立遺伝子が検出され、89 種に固有の多型が見られ、drug type 由来の 4 種は、5 つの遺伝子座で同一のホモ接合多型を共有した. マイクロサテライトデータに基づいた AMOVA (Analysis of Molecular Variance; 集団間の分化の大きさを分析)解析による遺伝的分散の割合は、個体間では 73%で、集団内では 21%, 集団間(drug type : fiber type)ではわずか 6%であった. この結果は、drug type と fiber type の境界が人工的であることを改めて示唆しており、大麻が単一種の非常に変化に富む属として説明する意見を強化している⁴⁾.

広範な GBS 解析に基づいて、14,031 の SNP が特定され、124 の大麻サンプル(drug / fiber types)を比較するために使用された¹⁰⁾. 結果は、カンナビノイドの種類と量の合成に直接関与する遺伝子だけではなく、大麻に 2 つの主要な遺伝子プールの存在、すなわち drug type と fiber type の間に、ゲノム全体の違いがあることを示し

た. しかし、著者は「drug type と fiber type は依然として遺伝的変異の共通プールを大部分共有している」と結論付け、さらに、drug type は、fiber type に比べヘテロ接合度が低く、それは人工的な選抜と近親交配によるものと示唆されると述べている.

大麻における雌雄同株に関する細胞遺伝学的研究では、典型的な二倍体染色体数 ($2n = 20$)を示すが、Y 染色体が存在せず X 染色体の 2 つのコピーが存在し¹⁹⁾、フローサイトメリーによる研究では、雌雄同株の fiber type は雌雄異株の雌株と同じ核型であった²⁰⁾. RAPD や AFLP などの多遺伝子座マーカーが解析されるなかで、雄株には常に見られるが、雌株や雌雄同株には存在しない多くの DNA 断片が報告された. RAPD 分析により得られた 729 bp の断片である MADC1 (*C. sativa*, Male-Associated DNA Sequence)とその隣接配列は、さまざまな植物や他の生物の LINE (long interspersed element) 様レトロトランスポゾンの逆転写酵素と相同な逆転写酵素をコードし、*in situ* 蛍光ハイブリダイゼーションにより、Y 染色体のテロメア領域への局在が確認された²¹⁾.

さらに RAPD 分析で同定された 390 bp の断片は、雌雄異株の雄株に関連する配列(MADC2)の存在を示した. マーカーは、他の植物に見られる反復配列、レトロトランスポゾン様配列との類似性は低く(50~60%), Y 染色体の非コーディング領域に属していると考えられている.

ただし、大麻の雌雄異株の雌株と、雌雄同株が同じ核型を示すことは、大麻における性決定が性染色体 X, Y による単純な性決定ではないことを示しており、QTL (Quantitative trait locus; 量的形質遺伝子座)解析が進められている²²⁾. 2 つの雌雄異株の F_1 と、雌雄同株の集団の QTL 解析により、雌雄同株の子孫の性発現に関連する 5 つの QTL が特定された. これらの

QTL のうち 2 つが性別遺伝子座領域に相同な領域にマッピングされるとし、X 性染色体上に雌雄同株を決定する形質の存在を示唆した。また、同定された QTL の一つは植物ホルモンの調節を決定する遺伝因子にリンクする可能性が示唆されている²²⁾。

大麻の 2 つの主要な合成酵素をコードする 2 つの遺伝子は、2000 年代に田浦のグループによって決定された。THCAS (Tetrahydrocannabinolic acid synthase) はイントロンを含まない 1635 bp の長さであり、CBDAS (Cannabidiolic acid synthase) と 84% の配列類似性を有していた^{23,24)}。THCAS および CBDAS の配列データに基づいた PCR マーカー (B1080/B1192) が開発された²⁵⁾。高上馬ら²⁶⁾は、CBDA / THCA 比が異なる 13 種類の大麻から THCAS 遺伝子の塩基配列を決定し、その塩基配列の違いから drug type を特徴付ける「drug type THCAS」を特定した。「Fiber type THCAS」は 1635 bp の長さの配列を有し、完全に翻訳可能で drug type THCAS と比較して膨大な数の SNP と、アミノ酸置換を特徴とする THCAS であるとした。Van Bakel *et al.* (2011) は、drug type から 3 つの異なる CBDAS 偽遺伝子を特定した。Fiber type の栽培品種 Finola から THCAS を検出したが、これは機能的に不完全であった¹⁾。

Weiblen *et al.* (2015) は 9 つの THCAS および CBDAS シーケンスを報告し、4 種のホモログが同時に存在することを明らかにし、THCAS と CBDAS が異なる遺伝子座でヘテロ接合性を示した証拠とした²⁷⁾。

異なる化学型の 18 系統の大麻から 9 種の THCAS と 12 種の CBDAS が得られ、花序で発現するこれら合成酵素は 1~5 種と植物体によって異なることが明らかとなった⁸⁾。これら合成酵素は多型性 (SNPs) が見られ、その結果が、各植物体のカンナビノイドの生産量 (効率) を左右すると示唆されるが、複数の配列の存在と発現

の違いは化学型特異的マーカーの開発がますます困難になることを示唆している。

D. 結論

農学や法科学に役立つ信頼性の高い DNA マーカーの開発は、遺伝子とその作用の基礎となる分子メカニズムの知識に基づく必要がある。大麻の遺伝子配列情報は順調に蓄積されており、多くの分析マーカーの開発につながっている。ただし、雌雄同株のような重要な特性は、生理学的、遺伝学的基礎がまだ十分に調査されていない。同様に、光周期条件への応答、毛状突起に関する研究および繊維品質など、産業用または医療用大麻にとって重要な特性は分子レベルではまだ十分に理解されていない。今後は、上記部分の研究の進展が期待される。

E. 参考文献

- 1) Van Bakel, H. *et al.*, *Genome Biol* 12, R102 (2011)
- 2) Luo, X. *et al.*, *Nature* 567:123-126 (2019)
- 3) Valliere, MA. *et al.*, *Nat commun* 24:2063 (2019)
- 4) Onofri, C., Mandolino, G., *In Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*, eds. Chandra, S., Lata, H., ElSohly, MA., Springer, 319-342 (2017)
- 5) Hillig, KW., *Genet Resour Crop Evol* 52:161-180 (2005)
- 6) Gilmore, S. *et al.*, *Forensic Sci Int* 172:179-190 (2007)
- 7) Piluzza, G. *et al.*, *Genet Resour Crop Evol* 60:2331-2342 (2013)
- 8) Onofri, C. *et al.*, *Phytochemistry* 116:57-68 (2015)
- 9) Medicinal Genomics Corporation (2015) *KannaPedia*.
www.medicinalgenomics.com/kannapedia/

- 10) Sawler, J. *et al.*, *PLoS ONE* 10: e0133292 (2015)
- 11) Linacre, A., Thorpe, J., *Forensic Sci Int* 91:71-76 (1998)
- 12) Wilkinson, M., Linacre, AM., *Sci Justice* 40:11-14 (2000)
- 13) Oh, H. *et al.*, *Mitochondrial DNA Part A* 27:2835-2837 (2016)
- 14) Vergara, D. *et al.*, *Mitochondrial DNA Part A* 27:3793-3794 (2016)
- 15) Siniscalco Gigliano, G. *Sci Justice* 38:225-230 (1998)
- 16) Siniscalco Gigliano, G. *et al.*, *Sci Justice* 37:171-174 (1997)
- 17) Hsieh, H-M. *et al.*, *Forensic Sci Int* 131:53-58 (2003)
- 18) Gilmore, S. *et al.*, *Forensic Sci Int* 131:65-74 (2003)
- 19) Faux, AM. *et al.*, *Euphytica* 196:183-197 (2014)
- 20) Razumova, OV. *et al.*, *Protoplasma* 253:895-901 (2016)
- 21) Sakamoto, K. *et al.*, *Plant Mol Biol* 44:723-732 (2000)
- 22) Faux, AM. *et al.*, *Euphytica* 209:357-376 (2016)
- 23) Sirikantaramas, S. *et al.*, *J Biol Chem* 279:39767-39774 (2004)
- 24) Taura, F. *et al.*, *FEBS Lett* 581:2929-2934 (2007)
- 25) Pacifico, D. *et al.*, *Mol Breed* 17:257-268 (2006)
- 26) Kojoma, M. *et al.*, *Forensic Sci Int* 159:132-140 (2006)
- 27) Weiblen, GD. *et al.*, *New Phytol* 208:1241-1250 (2015)

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし