

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06714

研究課題名(和文) グローバル社会に対応した医薬品・食品素材「ウコン属生薬」の多様性解析による標準化

研究課題名(英文) Comprehensive study on diversity of Curcuma drugs used as medicines / food supplements for standardization, responding to a global society

研究代表者

小松 かつ子 (Komatsu, Katsuko)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：50225570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アジア産Curcuma属植物12種についてクルクミノイド生合成に関する酵素遺伝子のイントロン長多型(ILP)及び葉緑体trnK遺伝子を解析し、各種に固有なILPパターンとtrnK塩基配列を見出し、これにより9カ国から入手したウコン属生薬が同定できることを明らかにした。さらにSPME-GC-MS分析を行い、生薬の精油成分組成は基原である植物種固有であり、産出地の違いによる影響は少ないことを示唆した。同時に各植物種間の類似性・相違性を明らかにした。3つの実験系を用いることにより基原植物の同定のみならず、交配種であれば両親の植物種を推定可能であることも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウコン属生薬は生薬配合製剤、保健機能食品などの素材として広く利用されているが、その資源は日本を含めたアジア各国の栽培種に依存している。同属植物は分類学上の混乱があり、それが生薬にも波及しているため、基原植物の学名が不確かで、成分的にも安定性を欠くものが流通している。本研究において、クルクミノイド生合成に関する酵素遺伝子のイントロン長多型、葉緑体trnK遺伝子配列の解析と精油成分の分析を行い、各生薬を標準化するための指標を示した。これら3方法を行うことにより、同属植物の分類並びに国際的な生薬の学名の整理に繋がることを期待される。また、品質が担保された生薬の供給にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Curcuma-related drugs and food supplements have been used worldwide. However, correct identification and quality assessment have not been conducted, because classification of some species is debated and nomenclature is inconsistent among countries. To elucidate molecular markers of Curcuma species in Asia and to solve the confusion on the botanical origin of crude drugs, molecular analysis based on the intron length polymorphism (ILP) in genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase and the trnK sequences was performed using plant specimens and crude drugs from 9 countries. Each specimen showed species-specific ILP patterns, and based on the ILP markers besides trnK sequences, the botanical origins of crude drugs were determined. Moreover, GC-MS analysis of the genetically-authenticated Curcuma rhizomes and crude drugs revealed their species-specific essential oil composition. By applying above three methods international standardization of Curcuma drugs could be expected.

研究分野：生薬学

キーワード：ウコン属生薬 成分 Curcuma 標準化 クルクミノイド生合成酵素遺伝子 ジケタイトCoA生合成酵素遺伝子 trnK遺伝子 精油

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では「健康寿命の延伸」の名のもと、国民にセルフメディケーションが促され、生薬配合剤、漢方製剤、保健機能食品などが広く使われるようになってきている。その代表的な素材の一つが *Curcuma* (ウコン) 属生薬である。世界的に繁用されるウコンは元より、中国・日本で医薬品とされるガジュツ、インドネシアのジャム生薬テムラワクなどがあり、これらに多彩な薬理作用が報告されて、生活習慣病の予防・治療などに重要な役割を果たしている。同属植物はアジアを中心に 10 数種が薬用に供されており、グローバル化した現在、原産地国が不明なまま同属生薬が広域に流通するようになった。しかし、*Curcuma* 属植物の学名は国際的な統一が未だ不十分であり、この事はアジア各国の生薬の基原の混乱をもたらしている。したがって、基原植物の学名が不確かで化学成分組成が不明確な同属生薬が医薬品や保健機能食品等の素材として使用された場合、疾病の治療効果や健康維持に悪影響を及ぼすことが懸念される。これまでの研究で、中国・日本産ウコン属生薬については、葉緑体 *trnK* 遺伝子等の解析により基原植物の同定を可能にし、精油成分の特徴も明らかにした。さらに、漢方概念の「瘀血」の治療に関連する血管作動性及び抗炎症作用について同属生薬間で比較し、日本産ガジュツ (*C. zedoaria*) に NO 依存性の血管弛緩作用を、中国四川省産ガジュツ (*C. phaeocaulis*) にハプトグロビンの増加抑制作用と COX-2 阻害活性などを見出し、COX-2 阻害活性成分としてセスキテルペノイドの *franodienone* を同定した。一方、アジアの同属生薬を対象にした場合、*trnK* 遺伝子の解析だけでは同定できず、生薬の基原は混沌としたままであった。そこで、同属植物の分類にクルクミノイド生合成に関与する酵素遺伝子のイントロン長多型解析を応用することとし、生薬に本法を適用するとともに、セスキテルペノイドを含む精油成分を分析した。

## 2. 研究の目的

(1) アジア産 *Curcuma* 属植物について、クルクミノイド生合成に関与する酵素遺伝子のイントロン長多型 (ILP) 及び葉緑体 *trnK* 遺伝子を解析することにより、各種を特徴付ける ILP パターンまたは遺伝子型を見出すとともに、植物分類学上の位置付けを明確にする。植物で見出された ILP パターンまたは遺伝子型が、アジア産ウコン属生薬の同定に応用可能であるかを明らかにする。さらに生薬の同定を確実にを行うため、同イントロン領域における各種固有の塩基配列を見出す。本研究を通して、アジア産ウコン属生薬の基原植物の学名の整理を行い、国際的な統一を図る契機とする。

(2) アジア産 *Curcuma* 属植物各種の根茎について、特徴的な精油成分組成・含量を明らかにする。遺伝子解析で基原を明らかにしたウコン属生薬が、基原植物と同様な成分組成であるかを調べた後、各生薬の類似性・相違性及び種の判別成分を明らかにする。これにより、アジア産ウコン属生薬を成分面からグループ化する。また、同一種における精油成分組成・含量の産地間差異を調べ、成分における環境要因を考察する。

以上、遺伝子解析による同定法及び成分組成による品質評価法を確立し、アジアにおけるウコン属生薬の標準化に寄与する。

## 3. 研究の方法

(1) 実験材料の収集と形態観察：医薬基盤健康栄養研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部、昭和薬科大学、東京薬科大学などの薬用植物園で系統保存されているアジア 7 カ国から導入した *Curcuma* 属植物の新鮮な葉と根茎を入手し、形態観察を行い、植物 51 検体を同定または推定した。これに富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物資料館保有の植物標本 7 検体を加えて植物材料とした。またこれまでに 7 カ国で収集したウコン属生薬 42 検体を材料とした。これらは現地調査及び各国の文献調査から基原植物を推定した。以上の植物及び生薬は *Curcuma* 属 12 種に帰属した。

(2) 遺伝子解析 1) クルクミノイド生合成に関与する酵素遺伝子のイントロン長多型 (ILP): クルクミノイドはジケタイド CoA 生合成酵素 (DCS) とクルクミノイド生合成酵素 (CURS) が関与して生合成される。また基質特異性の異なるアイソザイムが存在し、DCS をコードする遺伝子に 2 つ (*DCS1*, 2)、CURS をコードする遺伝子に 3 つ (*CURS1-3*) が報告されている。*DCS* と *CURS* には 3 つのイントロン領域 (*DCS* intron I, II; *CURS* intron) が存在することから、これらのイントロン領域を 3 対の蛍光標識したプライマーを用い、各検体 (全植物検体、全生薬検体) から抽出した DNA を鋳型として PCR 法で増幅した。PCR 産物を混合した後、キャピラリー電気泳動を行い、出現するフラグメントの長さを 36 個のサイズマーカーフラグメントと比較して決定した。検体毎に 3 イントロン領域におけるフラグメントの出現パターン (ILP パターン) を比較した。検体間の ILP パターンの類似度をソフトウェア PAST で計算し、ソフトウェア MEGA X を用いて NJ 法で樹状図を作成した。

2) 同イントロン領域の塩基配列: ILP パターンが異なる *Curcuma longa* の 2 検体、*C. aromatica*、*C. zedoaria*、*C. phaeocaulis* 及び *C. zanthorrhiza* 各 1 検体について 2 つのイントロン領域 (*DCS* intron I、*CURS* intron) を 2 対のプライマーを用いて PCR 法で増幅した後、それぞれ

- PCR 産物をサブクローニングし、各々のコロニーの塩基配列を決定した。これらの配列を、GenBank に登録されている *DCS1, 2* または *CURS1-3* の塩基配列と比較して、それぞれに帰属させた。その後、同じ遺伝子領域において *Curcuma* 属植物 6 検体の配列を相互に比較した。

3) 葉緑体 *trnK* 遺伝子の塩基配列：全植物検体及び全生薬検体について、5'側及び 3'側の *trnK* イントロン領域をそれぞれ PCR 法で増幅し、直接塩基配列を決定した。

(3) 精油成分分析：乾燥した根茎または生薬の粉末を低極性のファイバーを用いて固相マイクロ抽出し、その後 GC-MS に注入した。GC 部は、極性液相カラムを用い、カラム温度は 100 (1 分間) から 230 (2 分間) に毎分 5 で昇温した。MS 部は、イオン源の温度 250、イオン化電圧 70 eV、イオン化電流 60  $\mu$ A で測定した。GC-MS で得られた化合物の保持時間及び MS データを NIST ライブラリーと照合することにより化合物を同定した。また、これらのデータを用いて多変量解析 (PCA, OPLS-DA) を行い、植物間または生薬間の類似性・相違性及び種の判別成分を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) アジア産 *Curcuma* 属植物の形態：*Curcuma* 属の栽培植物 51 検体は、根茎の横断面の色、葉鞘の色、葉の上面の主脈部付近に現れる紫色の帯状斑の有無・位置・形状、葉の毛の有無、花序の位置と苞の色により同定または推定され、*C. longa* (L)、*C. aromatica* (JA)、*C. zedoaria* (Ze)、*C. phaeocalis* (P)、*C. aeruginosa* (Ae)、*C. wenyujin* (W)、*C. kwangsiensis* (K)、*C. zanthorrhiza* (Za)、*C. amada* (Am)、*C. manga* (M) 及び *C. petiolata* (Pe) を確認した。一方、生薬 42 検体の基原とされる植物には上記の種のほかに、*C. comosa* (C) (タイ生薬 Wan chak modluk) があつた。

(2) 遺伝子多型に基づく分類と生薬の同定：1) クルクミノイド生合成に關与する酵素遺伝子のイントロン長多型 (ILP)：アジア 9 カ国産の *Curcuma* 属 12 種に由来する植物及び生薬についてジケタイド CoA 生合成酵素遺伝子 (*DCS*) とクルクミノイド生合成酵素遺伝子 (*CURS*) のイントロン長多型の解析及び葉緑体 *trnK* 遺伝子の塩基配列の決定を行った。ILP パターンは各種固有であり、種内多型がほとんどない種 (JA, Ze, P, Ae, W, Za) と多型性がある種 (L, K, Am, M, C) が認められた。ILP パターンに基づいて構築した樹状図では Pe と C からなるクレード、L のクレード、その他の種からなるクレードに分かれ、後者はさらに 4 サブクレード (JA; Ze, Ae 及び P; W 及び K; Za, Am 及び M) に分かれた。L のクレードはさらに産地により 3 サブクレード (中国・日本産; タイ産; インド・インドネシア産) に分かれた。*trnK* イントロン配列には主に 7 タイプ { Ltk; Atk; Ptk; K(gl)Wtk; K(pl)Ztk(6A14T); K(pl)Ztk(7A15T); K(pl)Ztk(7A13T) } があつた。ウコン属生薬の解析結果を、植物の ILP パターン及び *trnK* 配列と比較して基原を検討した結果、文献記載と異なるものが存在し、タイ生薬 Wan narn kum とインド生薬 Kasturi manjal は Za であると同定し、タイ生薬 Kamin oi は K(pl)Ztk(7A13T) 配列を持つ種と L との交配種由来である可能性を示唆した。さらに日本産ガジュツはインドネシアやインドの *C. zedoaria* と関連性があることを示した。

2) 同イントロン領域の塩基配列：主要な 5 種 (L, JA, Ze, P, Za) を同定するための指標配列を見出す目的で、2 つのイントロン領域の PCR 産物のサブクローニングを行い、各々のコロニーの塩基配列を決定したところ、各検体に 31~38 種類の塩基配列が見出され、*DCS* intron 領域に 6~8 タイプ、*CURS* intron 領域に 8~11 タイプの配列が認められた。*DCS* の 2 遺伝子 (*DCS1, 2*)、*CURS* の 3 遺伝子 (*CURS1-3*) ごとに各検体の配列を比較した結果、相同性は 90% 以上で特徴的な配列は見出せなかった。一方、*DCS* または *CURS* の遺伝子間の相同性は 68~80% であつた。この解析結果により、塩基配列の長さにおける多型性は ILP パターンに反映されていることがわかつた。

(3) 精油成分の組成・含量による比較：遺伝子解析で同定した *Curcuma* 属 11 種の植物 50 検体の新鮮な根茎または生薬 20 余検体の GC-MS 分析により、約 60 種類の精油成分を同定した。*Curcuma* 属植物各種は特徴的な成分組成を示し、大きく 7 タイプ (L; Ze, P 及び Ae; Za; JA 及び W; K; Am 及び M; C) に分けられた。それぞれ bisabolane 型; curzerene 型; germacrane 型; guaiane 型; bisabolane 型; germacrane 型; curzerene 型; germacrane 型; curzerene 型; curzerene 型; germacrane 型; caryophyllane 型; santalene 型; bisabolane 型のセスキテルペノイドを含有した。なお、生合成酵素遺伝子の ILP パターンに多型性がある種では基本的組成は一致するものの変動が見られたが、原産地国による違いは少なかった。各タイプが示す成分パターンは、生合成酵素遺伝子の ILP パターン及び *trnK* 配列が一致する生薬であれば、植物とほぼ同様であつた。さらに、遺伝子解析で交配が示唆された生薬については、両親の植物種を反映したと思われる精油成分組成を示した。GC-MS データを用いた OPLS-DA 解析の結果、L、Za、JA が各々離れた 3 グループを形成し、それぞれ turmerone、xanthorrhizol、neocurdione などが区別に寄与した。また、P と Ae の類似性が示された。

以上、今回の実験系である、クルクミノイド生合成に關与する酵素遺伝子の ILP パターン、葉緑体 *trnK* 遺伝子の塩基配列、及び精油成分パターンから、両性遺伝の結果及び母系遺伝の結果を得ることができ、*Curcuma* 属植物及びウコン属生薬の同定のみならず、交配種であれば両親の植物種が推定可能となり、植物分類並びにアジアのウコン属生薬の学名の整理に有用であることが明らかになった。また、それらに含有される精油成分組成は遺伝的要因が強く影響する

ことも示唆された。本結果は、ウコン属生薬の標準化及びアジア産 *Curcuma* 属植物の学名の整理に寄与するものと考えらる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 劉 群棟, Zhu S., 三宅克典, 高野昭人, Viswanathan M.V., Mangestuti A., 小松かつ子
2. 発表標題 Identify Curcuma drugs from Asia using intron length polymorphism markers in genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 群棟, Zhu S., 林 茂樹, 三宅克典, 高野昭人, 中村憲夫, Viswanathan M.V., Mangestuti A., Sukrong S., 川原信夫, 小松かつ子
2. 発表標題 Discrimination of Curcuma species from Asia using intron length polymorphism markers in genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉 群棟, Zhu S., 林 茂樹, 川原信夫, 三宅克典, 高野昭人, Balachandran I., Mangestuti A., Viswanathan M.V., Sukrong S., 安食菜穂子, 飯田 修, 小松かつ子
2. 発表標題 Intraspecific polymorphism of Curcuma longa and C. phaeocaulis using ILP markers in DCS & CURS genes
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学和漢医薬学総合研究所資源開発分野資源科学領域  
<https://www.inm.u-toyama.ac.jp/research/pharmacognosy>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	當銘 一文  (Toume Kazufumi)  (80563981)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授   (13201)	
研究分担者	朱 シュウ  (Zhu Shu)  (20377360)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教   (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ミャンマー	Department of Traditional Medicine		