

令和元年6月21日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18896

研究課題名(和文) さく葉標本を利用した、薬用植物のDNA鑑別のためのプラットフォーム構築

研究課題名(英文) DNA identification of herbal plants using herbarium specimen

研究代表者

政田 さやか (Masada, Sayaka)

国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・主任研究官

研究者番号：50647097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Actaea属、Bupleurum属、Coptis属のさく葉標本からDNA情報を得て、GenBank登録配列との相同性解析、分子系統解析を行った。植物形態学の専門家が正しく同定した標本から得た配列は既記載の配列と良く一致した一方で、専門家の同定を經ていない標本は誤りが散見され、同時に、GenBankの登録配列の基原情報が誤っていると考えられる例もあった。本研究により正しく形態鑑別された標本約80検体の塩基配列が解読・登録され、生薬のDNA鑑別に有用な情報を提供することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生薬の品質評価では、昔ながらの官能試験や化学分析に加え、DNA情報を利用した原料植物の確認も行われている。DNA鑑別は、試料から得られた塩基配列と公共データベースに登録された植物の塩基配列の比較によって行われるが、登録された配列のものの植物は必ずしも正しいものばかりではなかった。本研究では、植物形態学の専門家が正しく同定した標本からDNAを得て、データベースに登録することにより、DNA鑑別時の「お手本」となる塩基配列の情報を提供した。生薬の品質評価がより正確かつスピーディーになることによって、安心安全な医薬品の安定的な供給が継続されることを期待する。

研究成果の概要(英文)：To develop a reasonable system of DNA identification of crude drugs, DNA sequences on ITS, rbcL, psbA-trnH were obtained from the herbal specimen of Actaea, Bupleurum and Coptis plants. Phylogenetic analyses revealed that the morphologically identified specimen were very useful to obtain the genuine DNA sequences of herbal plants. Approximately 80 sequences were submitted to GenBank and they would be useful as reference sequences for DNA identification of herbal plants.

研究分野：生薬学

キーワード：薬用植物 基原鑑別 さく葉標本

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

古来、人類は身近にある植物に薬効を見出し、経験則に基づき種を選別することで、医薬品に発展させてきた。現代でも「正しい基原の材料を使うこと」は、漢方薬や西洋ハーブ製剤などの天然物医薬品を有効かつ安全に使用するための大前提であり、品質保証の第一歩として基原鑑別は重要な役割を担っている。このことは、日本薬局方を含め世界中の国と地域の薬局方が天然物医薬品の基原を厳格に規定していることから明らかである。

我が国において漢方薬の原材料となる生薬の基原鑑別には、従来、形状・味・におい・手触りなど五感（五官）による鑑別が行われ、これに関わる経験知と観察記録が生薬学の根幹を成している。一方、分子生物学的技術の進歩と植物 DNA 情報の蓄積に伴い、植物学・生薬学的な専門知識や熟練を必要とせず、客観的な結果を得やすい DNA 鑑別法が開発、実用化されるようになってきた。具体的には、試料の DNA から得た塩基配列を問い合わせ配列 (query) として GenBank 等の公共データベースに照会し、ヒットした相同性の高い配列 (subject) の情報から、試料の生物種同定を行うアプローチが一般的である。このような状況の下、五官鑑別では同種とされてきた基原植物が、DNA 鑑別では異種と判断される例や、日本薬局方において法律で規定された生薬の基原植物の名称と、生物分類学における最新の学術的名称が一致しない例も出始めている。さらに、DNA 情報の公共データベースでは、データ量の急激な増加に伴い、偽遺伝子の取り違えや標本の鑑別ミスが散見され、情報の正確性に注意を促す声も上がってきている (Groenenberg *et al.*, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2011; Shen *et al.*, *PLoS One*, 2013)。すなわち、天然物医薬品の品質保証のためには、五官鑑別・形態鑑別と DNA 鑑別をブリッジングするための基礎的研究が必要であり、植物形態学的に正しく同定された基原植物と、その DNA 情報が対応したデータベースの拡充が求められている。

### 2. 研究の目的

生薬や天然物医薬品の基原鑑別では、表現型による鑑別と遺伝子型による鑑別による結果の差異、データベースに登録された遺伝子配列情報の不正確性が問題となっている。そこで本研究では、形態学的に正しく同定されたさく葉標本から DNA 情報を得てデータベースに登録することにより、信頼性の高い種同定のプラットフォームを提供し、形態鑑別と DNA 鑑別のブリッジングの基礎となる知見や国産生薬栽培に向けて有用な基礎データを得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料

DNA 抽出用試料として、高知県立牧野植物園より所蔵のさく葉標本の一部譲渡を受けた。内訳を表 1 に示す。

表 1 DNA 抽出試料

属	四国	日本	海外	総数
<i>Actaea</i> ( <i>Cimicifuga</i> )	70	44	30	144
<i>Bupleurum</i>	53*	27	21	114
<i>Coptis</i>	25**	65	0	90

\* 栽培品 12 検体を含む。 \*\* 栽培品 3 検体を含む。

#### (2) DNA 抽出法の検討

研究所所蔵の 3 種 (ヒキオコシ, イカリソウ, ニガキ) の植物標本 7 検体を対象として、Proteinase K 法、簡易抽出キット 4 製品 (Sigma-Aldrich 社 Extract-N-Amp™ PCR キット, カネカ社簡易 DNA 抽出キット, コスモバイオ社 DNAZOL® Direct, 関東化学社シカジーニアス® DNA 抽出試薬)、自動核酸抽出装置 2 製品 (Promega 社 Maxwell® 16, Qiagen 社 QIAcube) を用いて DNA を抽出し、DNA 量、PCR の成功率、操作性等を比較した。

#### (3) DNA 配列解読と相同性検索

Promega 社 Maxwell® 16 を用いて植物片から DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として至適条件下で PCR を行い、核 ITS 領域、葉緑体 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 各領域を増幅した。得られた PCR 産物を精製し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解読、決定した。得られた塩基配列を query として BLAST 検索を行い、相同性の高い配列を持つ種を確認し、標本の種と比較した。

なお、試料量に限りがあるため、DNA 抽出は 1 回のみ行い、複数回の PCR でも増幅産物が得られなかった検体については塩基配列を決定しなかった。

#### (4) 分子系統解析

MEGA-X を用い、ソフトウェアに実装された clustalW プログラムで配列のアライメントを行った後、近隣結合法、最尤法、最節約法による分子系統樹を作成した。植物種の学名および標準和名、は YList <<http://ylist.info/index.html>> および The Plant List <<http://www.theplantlist.org/>> で確認した。

### 4 . 研究成果

#### (1) DNA 抽出法の確立

さく葉標本試料を対象とした効率的な DNA 抽出手順を確立するため、汎用されている複数の DNA 抽出キットおよび装置を用いて DNA 抽出を試みた。

各キットの推奨する最大サンプル量からの DNA 抽出を試みた結果、自動装置を除く 5 種類の簡易抽出法では PCR 産物を得ることができなかった。そこで、サンプル量や PCR の鋳型の量を検討したが、いずれの方法、キットでも花以外の部位からの PCR 産物はほとんど得られなかった。この結果から、簡易抽出法は不適と判断し、さく葉標本試料の DNA 抽出には、2 種類の自動核酸抽出装置のうち、より操作手順の少ない Promega 社 Maxwell® 16 を用いることとした。

#### (2) *Actaea* 属

試料となるさく葉標本は、古いものでは 1930 年代に採取されたものから、最近ではアルコールによる液浸処理後に押し葉にされたものまで様々な状態であった。そのため、標本の状態による DNA 抽出率、PCR 成功率の違いに着目しながら *Actaea* 属 144 検体の DNA 抽出と PCR を実施した。その結果、1950 年代に採取された試料を含む 80 検体以上から DNA を得ることができた一方で、PCR の領域によっては増幅の成否に差が見られた。ITS 領域および *rbcL* 領域の分子系統解析の結果、既掲載の配列と四国および日本産の標本試料から得られた配列の基原種は良く一致した。他方、海外試料は相同性解析やクラスター解析においてラベルの種と異なる場合が多く、鑑別法や命名法の違いによるものと考えられた。*Actaea* 属標本の実験結果より、長期保管されたさく葉標本試料からの DNA 抽出が可能であり、かつ、得られる配列の正確性が確認でき、本実験手法が有用である可能性が強く示唆された。

#### (3) *Bupleurum* 属

日本薬局方において、生薬サイコの基原は「*Bupleurum falcatum* Linné (Umbelliferae) の根」と規定され、参考情報によると基原種は「*B. falcatum* L.(ミシマサイコ)」「*B. chinense* DC.」「*B. scorzonerifolium* Willd.」の 3 種とされている。このうち、「*B. falcatum* L.」は現在では日本の自生種を指す学名としては使われなくなっており、YList ではミシマサイコの標準和名は「*B. stenophyllum* (Nakai) Kitag.」とされている。同時に、*Bupleirum* 属の学名は変遷が激しく、同定者や同定期間にも注意が必要である。他方、サイコの DNA 鑑別では、核リボソーム DNA 中の ITS 領域が有効であることが報告され (Yang *et al.*, *Phytomrdicine*, 2007; Xie *et al.*, *Planta Med.*, 2009)、既に多くの配列情報が公共データベースに登録されていることから、本研究では同領域における塩基配列の取得を試みた。

ミシマサイコ (*B. stenophyllum* (Nakai) Kitag.) 25 検体のほか、ホタルサイコ (*B. longiradiatum* Turcz. var. *elatins* (Koso-Pol.) Kitag.), *B. candollei*, *B. microcephalum* 等 10 種 52 検体の配列情報が得られた。*Bupleurum* 属試料から抽出した DNA は degradation が早く、DNA 濃度の測定や PCR 反応液の調製中に分解が見られた。既掲載配列を加えた系統学的解析の結果、ミシマサイコは緊密なクラスターを形成し、栽培品 5 検体 [MBK0234246, MBK0230570, MBK0234247, MBK0234249, MBK0256206] も野生品と極めて良く似た配列を保持していることが明らかになった (図 1)。この結果は、国内栽培生薬の遺伝的背景を明らかにした重要な知見である。なお、専門家による形態鑑別を受けず採取者がミシマサイコと判断した 2 検体 [MBK0103725, MBK0234059] は、ヒロハミシマサイコ のクラスターに属し、相同性検索の結果からも、誤同定が強く示唆された。同様に、中国で採取、寄贈された MBK0247635 も誤同定品であると推定された。一方で、専門家が鑑別した 40 検体の塩基配列は既掲載配列と良く一致しており、植物形態学的に正しく同定されたさく葉標本を生薬の基原種鑑別の対照に用いる有用性が示された。

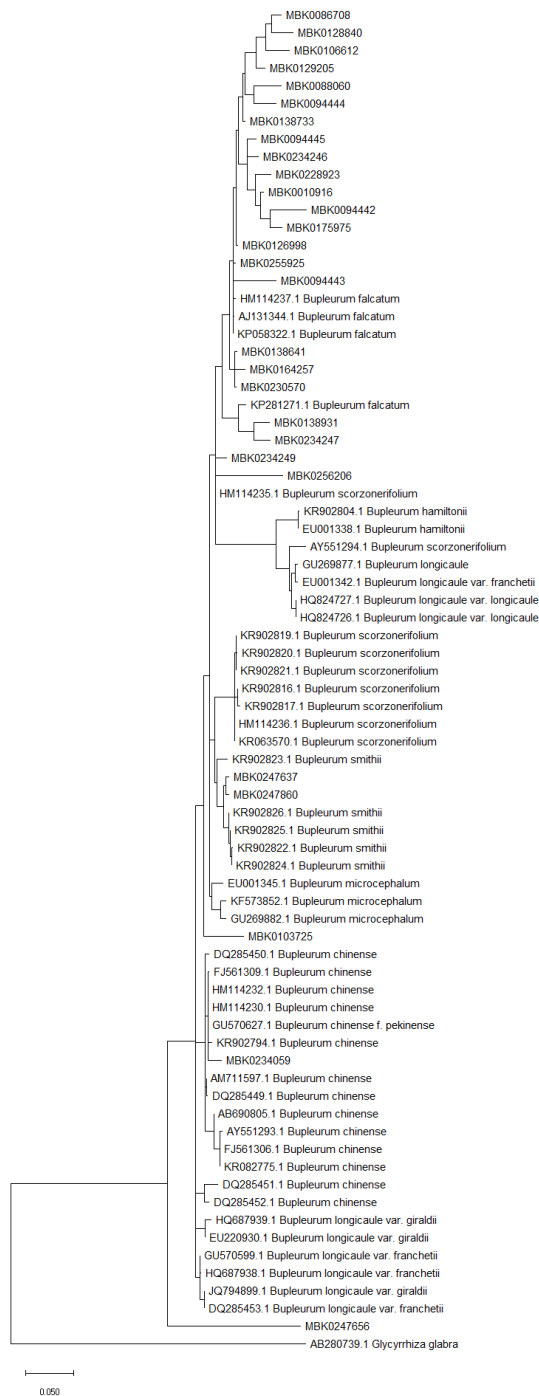


図 1 Bupleurum 属の ITS 領域の塩基配列を用いた最尤法による分子系統樹

#### (4) *Coptis* 属

日本薬局方において、生薬オウレンの基原は「*Coptis japonica* Makino, *Coptis chinensis* Franchet, *Coptis deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao 又は *Coptis teeta* Wallich (Ranunculaceae) の根をほとんど除いた根茎」と規定され、参考情報では基原種として「*C. japonica* (Thunb.) Makino (オウレン)」、「*C. japonica* (Thunb.) Makino var. *dissecta* (Yatabe) (セリバオウレン)」、「*C. japonica* (Thunb.) Makino var. *japonica* (キクバオウレン)」、「*C. japonica* (Thunb.) Makino var. *major* (Miq.) Satake (コセリバオウレン)」と「*C. chinensis* Franch.」、「*Coptis deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao」、「*C. teeta* Wall.」の 7 種が挙げられている。YList ではセリバオウレン = *C. japonica* (Thunb.) Makino var. *major* (Miq.) Satake [Syn: *C. japonica* (Thunb.) Makino var. *dissecta* (Yatabe)]、キクバオウレン = *C. japonica* (Thunb.) Makino var. *anemonifolia* (Siebold et Zucc.) H. Ohba、コセリバオウレン = *C. japonica* (Thunb.) Makino var. *japonica* とされており、*Coptis* 属植物の鑑別は、変種や品種レベルでの判断が重要である (表 2)。

*Coptis* 属 90 検体からの DNA 抽出率は低く、11 検体の ITS 領域と 15 検体の *rbcl* 領域の配列

しか得られなかった。系統学的解析では、ITS、*rbcL* いずれの領域でも「*C. japonica* var. *major*」 「*C. japonica* var. *japonica*」の既収載配列が混在したクラスターが複数形成され、変種の判別は不可能だった。前述の通り、*Coptis* 属植物の標準名と Synonym は非常に紛らわしく、既収載の「*C. japonica* var. *japonica*」が、コセリバオウレンの標準名を指すのかキクバオウレンの Synonym であるのか、「*C. japonica* var. *major*」が、セリバオウレンの標準名かコセリバオウレンの Synonym かは不明である。GenBank では標準名が登録され、Synonym で登録しても修正可能な使用となっているが、上記のようなケースは登録者が標準名を意識して選択しない限り、誤同定と見なされる結果になり得る。このような状況のもと、「*C. japonica* var. *japonica*」と「*C. japonica* var. *major*」が混在するクラスターに、「*C. japonica* (Thunb.) Makino var. *japonica*」の標本由来の配列が分類されれば、そのクラスターはコセリバオウレンの配列群である可能性が高くなることから、今回、専門家による厳密な鑑定を受けた標本の配列を解読し、公共データベースに登録することは、生薬学分野のみならず植物学や系統学分野にとっても有意義であると考えられた。今後、DNA 抽出率の改善を図り、基原の確かな多くの配列を解読、配列することが重要である。

表 2 YList\* に収載されている *Coptis* 属植物の学名と和名

学名 (Synonym をグレーで示す)	和名 (別名)
<i>C. chinensis</i> Franch.	トウオウレン (シナオウレン)
<i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino	オウレン
<i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>anemonifolia</i> (Siebold et Zucc.) H. Ohba	キクバオウレン
<i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>japonica</i> auct. non Makino	キクバオウレン (オウレン)
<i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>anemonifolia</i> (Siebold et Zucc.) H. Ohba f. <i>viridiflora</i> Honda ex Kadota	ミドリオウレン
<i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>japonica</i> <i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>major</i> (Miq.) Satake, excl. typo	コセリバオウレン
<i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>major</i> (Miq.) Satake <i>C. japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>dissecta</i> (Yatabe) Nakai ex Satake	セリバオウレン
<i>C. kitayamensis</i> Kadota	キタヤマオウレン
<i>C. lutescens</i> Tamura	ウスギオウレン
<i>C. minamitaniana</i> Kadota	ヒュウガオウレン
<i>C. morii</i> Hayata <i>C. quinquefolia</i> auct. non Miq.	ミンゲツオウレン
<i>C. quinquefolia</i> Miq.	バイカオウレン (ゴカヨウオウレン)
<i>C. quinquefolia</i> Miq. var. <i>shikokumontana</i> Kadota	シコクバイカオウレン
<i>C. quinquefolia</i> Miq. var. <i>shikokumontana</i> Kadota f. <i>plenisepala</i> Akasawa	ヤエノバイカオウレン
<i>C. ramosa</i> (Makino) Tamura <i>C. quinquefolia</i> Miq. var. <i>ramosa</i> (Makino) Ohwi <i>C. quinquefolia</i> Miq. var. <i>pedatoquinquefolia</i> Koidz.	オオゴカヨウオウレン
<i>C. trifolia</i> (L.) Salisb.	ミツバオウレン (カタバミオウレン)
<i>C. trifolia</i> (L.) Salisb. f. <i>plena</i> K.Imai	タマザキミツバオウレン
<i>C. trifolia</i> (L.) Salisb. f. <i>semiplena</i> (Miyabe et Tatew.) Okuyama	ヤエザキミツバオウレン
<i>C. trifoliolata</i> (Makino) Makino	ミツバノバイカオウレン (コシジオウレン)

\* 「米倉浩司・梶田忠 (2003-) 「BG Plants 和名 - 学名インデックス」(YList), <http://ylist.info>」

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 近藤未来, 政田さやか, 寺坂和祥, 牧野利明: モミジバダイオウ由来アントラキノン配糖化酵素候補遺伝子の単離と機能解析. 第 35 回日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会 (2017.8)
- (2) 政田さやか: 生薬の DNA 鑑別におけるさく葉標本の利用. 日本生薬学会第 66 回年会, (2019.9)(演題申込)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

GenBank への DNA 配列登録 78 件

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

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、研究者個人に帰属されます。