

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06716

研究課題名（和文）遺伝子解析を活用したサラシアの資源探索：中国産Salacia属の多様性解析

研究課題名（英文）Genetic analysis guided Salacia resource exploration: on the diversity of Salacia species in China

研究代表者

朱 シュウ (ZHU, Shu)

和歌山県立医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20377360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：中国南西部、南部におけるSalacia属植物についての現地調査を実施し、収集したサンプルについて遺伝子解析と成分分析を行った。核DNAのITS領域及び葉緑体のtrnK-rps16領域の塩基配列を解析・比較し、各種に特徴的な塩基配列が認められた。ITS配列に基づいて系統樹を構築した結果、中国産各種と東南・南アジア産同属植物の分子系統関係を明らかにした。機能食品の原料として主に利用されるSalacia属植物薬用種3種を簡便に同定できるPCR-RFLP法を確立した。日本市場に流通しているサラシア生薬は、主に*S. chinensis*、*S. reticulate*由来であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中国南西部および南部に分布するSalacia属植物の調査と共に遺伝子多型解析を行い、遺伝情報に基づき構築した分子系統関係をインデクスにすることで、分類学上の整理に有益な知見を与えた。サラシアの基原種の簡便な同定法を開発することにより、日本市場に流通するサラシア製品の正確な同定が可能となり、消費者の信頼性向上や品質管理の強化に寄与した。

研究成果の概要（英文）：Field investigations, together with genetic and chemical analyses on Salacia species distributed in China were conducted. The nucleotide sequences of the nuclear DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) region and the chloroplast trnK-rps16 Intergenic Spacer region were analyzed and compared, revealing characteristic sequences of the respective species. The nrDNA ITS sequences provided useful information to authenticate Salacia species and to elucidate the phylogenetic relationship within the Salacia genus. Genetic identification results revealed that *S. chinensis* and *S. reticulate* are the major sources of commercially available Salacia-products. Based on the ITS sequences, a convenient PCR-RFLP assay was established for the identification of the medicinally used Salacia species as well as their derived health food products.

研究分野：分子生薬学

キーワード：Salacia 資源調査 遺伝子解析 ITS塩基配列 分子系統関係 成分分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗糖尿病、抗肥満、肝保護作用があると報告され、機能性食品素材として注目されている「サラシア」は、Hippocrateaceae 科 *Salacia* 属植物の根や幹である。*Salacia* 属植物は、約 120 種があると言われ、スリランカ、インド、タイ、ベトナム、中国南部などの熱帯・亜熱帯アジア区域、アフリカやブラジルなど世界各地に広く分布している。本属数種の根や幹は伝統薬として、特にアーユルヴェーダ医学では糖尿病、痔疾、リウマチ、淋病、無月経、皮膚病などの治療に用いられてきた。近年、*S. reticulata* Wight、*S. oblonga* Wall.、*S. chinensis* L. (Syn. *S. prinoides* (Willd.) DC.) などの根や幹は、抗糖尿病、抗肥満、肝保護作用があると報告され、健康食品や機能性食品素材としての利用が増加している。これらの *Salacia* 属植物からは、salacinol、kotalanol、ponkoranol、salaprinol 及びそれらの脱 0-スルホン化合物である neosalacinol、neokotalanol、neoponkoranol、neosalaprinol などが特徴的な成分として報告されている。同属植物の内、*S. reticulata*、*S. oblonga*、*S. chinensis* などがサラシアの主な原料素材とされている。しかし、薬用部位は根や幹であるため、外部形態が非常に類似しており、基原種を同定することは大変困難である。また、現在の主産地であるスリランカやインドにおいて資源の減少に伴い、輸出規制が懸念されている。中国では 10 種の同属植物が分布しており、中で *S. prinoides*、*S. hainanensis* Chun et How、*S. amplifolia* Merr. のエタノールエキスは血糖値上昇抑制作用があることが既に報告されている。

2. 研究の目的

本研究はサラシアの新たな資源を探索することを目的とし、中国南西部、南部を中心に *Salacia* 属植物について現地調査し、同属植物・生薬の遺伝子多型解析、化学成分プロファイルの比較を行い、各種の遺伝的・成分組成的特性を明らかにする。日本市場品のサラシアと比較し、中国産 *Salacia* 属植物の有用性を明らかにし、また、遺伝子多型の解析結果に基づき、サラシアの基原種の簡便な同定法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 現地調査

中国南西部および南部の雲南省、海南省および広東省で、現地の研究者の協力を得ながら、*Salacia* 属植物の野生資源状況を調査し、植物材料・生薬材料を収集した。また、中国科学院昆明植物研究所や華南植物研究所などの標本館で保存されている植物標本を閲覧し、収集植物の同定に役立てた。

(2) 遺伝子解析および成分分析

植物の葉または生薬から DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA 抽出し、これを鋳型として核 DNA の Internal transcribed spacer (ITS) 領域及び葉緑体 trnK-rps16 Inter genetic spacer (IGS) 領域をそれぞれ PCR 法で増幅した。得られた PCR 産物を精製後、シークエンシング反応を行い、塩基配列を決定した。得られた両 DNA 領域の塩基配列の比較とともに、ITS の配列に基づいて分子系統樹を構築した。

各検体の粉末 100 mg を正確に量り取り、遠心チューブに入れ、水 5 ml を加えて、30 分間超音波抽出を行った。遠心分離後上澄みを DISMIC-13HP 0.2 μ m フィルターでろ過し、LC-MS 分析用試料とした。NMR による成分プロファイリングの検討では、各検体の粉末 100 mg を正確に量り取り、異なる抽出溶媒、測定溶媒による比較を行った後、抽出溶媒は水を使用し、凍結乾燥した水エキスを重メタノールで調製し、NMR 測定に供した。

(3) 簡便な同定法として PCR-RFLP 法を開発し、市場品の同定に応用

市場品サンプルから全 DNA 抽出し、これを鋳型として ITS1 領域用のプライマーペア ITS-1F と 5.8S-77R を用いて 380bp の断片を増幅し、ITS2 領域用のプライマーペア In-5.8S-5'F と 18S-25S-3'R を用いて 420bp の断片を増幅した。得られたそれぞれの PCR アンプリコンを制限酵素 Cac8I を用いて 37°C 4 時間で消化した。消化反応液を 4% アガロースゲルで電気泳動し、得られたフラグメントパターンを解析した。

4. 研究成果

(1) 中国における *Salacia* 属植物の資源調査および遺伝子解析・成分分析

中国南西部・南部各省にて *Salacia* 属植物の調査を行った結果、雲南省東南部および南部に 5 種、海南省に 3 種、広東省および広西自治区に各 1 種の自生状況を確認した。海南省に分布し

ている *S. chinensis*、*S. hainanensis* と広東省の *S. sessiliflora* については花の観測もできた。本属植物の分類・同定は難しく、花や果実の形態が重要であるが、それらに関する文献データの欠如や、調査時に花と果実の形態を確認できないものが多かった。雲南省東南部と南部に分布している数種については、外部形態的に文献データと一致しない点が多いため、中国産 *Salacia* 属植物における分類学上の整理の必要性が示唆された。

遺伝子解析の研究においては、収集した各種について核 DNA の ITS 領域及び葉緑体 DNA の trnK-rps16 IGS 領域の塩基配列を解析し、比較を行った。両領域において種内多型があったものの、各種に特徴的な塩基配列が認められた。*S. chinensis* については、中国、タイ、ミャンマーおよびインド産検体の核 ITS 領域及び葉緑体 trnK-rps16 領域の塩基配列を解析し、異なる産地による種内多型を明らかにした。また、これまでに解析した東南アジア各国産 *Salacia* 属植物数種および GenBank に登録されている同属植物の ITS 領域の塩基配列との比較を行い、系統樹を構築することにより、中国産 9 種と他の同属植物との分子系統関係を明らかにした。中国産 9 種は大きく 3 つのグループに分けられた。海南省産 *S. chinensis* は、インド、タイ産同種およびインド、スリランカ産 *S. reticulata* と同じクレードに属し、他の種と大別された。*S. chinensis* 以外の 8 種はさらに 2 グループに分けられ、中の 1 グループはインドおよびスリランカ産 *S. oblonga* と同じクレードに属した。広西自治区で入手した *Salacia* sp. は、*S. chinensis* - *S. reticulata* のクレードに属した。遺伝子解析により構築した分子系統関係をインデクスにすることで、分類学上の整理に有益な知見を与えた。

成分的研究においては、これまで *Salacia* 属特徴的な成分として報告されている salacinol (1)、kotalanol (2)、ponkoranol (3)、salaprinol (4) 及び脱スルホン化合物 neosalacinol (5)、neokotalanol (6)、neoponkoranol (7)、neosalaprinol (8) の 8 成分について既報の LC-MS 分析条件を用いて分析を行い、中国産 3 種について、含有される成分の種類及び部位別の含有成分の差異を確認できた。遺伝子解析により *S. chinensis* と同定された市販の健康食品 3 製品に 1、5~8 の 5 成分が検出された。NMR による成分プロファイリング分析方法を確立するため、異なる測定溶媒による成分プロファイリング、種間及び部位別の成分プロファイルの差異を比較した。1H NMR スペクトルにおいて、類似成分のシグナルの重なりにより明確な成分同定が困難であるため、2D NMR (2D 1H-13C HSQC スペクトル) を用いる解析方法の検討を行った。サンプル調製において、これまでサラシア属特徴的な成分として報告されているチオ糖類成分を多く抽出できることから抽出溶媒は水を用いた。NMR 測定の際、凍結乾燥した水エキスを重水素化溶媒で再溶解する必要があるため、重水と重メタノールを用いて比較した結果、チオ糖類成分のシグナルを観察される領域では両方とも類似したスペクトルが認められたが、それ以外の領域では重メタノールで調製したサンプルに多くのシグナルを検出できるため、NMR 測定溶媒を重メタノールに決定した。また、サラシア 4 種を用いて、異なるサンプル量と目的とする測定領域における 1H シグナルの積分値との相関範囲を検討し、サンプル調製法の最適化をした。

(2) 日本市場の流通「サラシア」生薬の遺伝子解析による同定と簡便な同定法の開発

日本市場に流通している「サラシア」生薬 (48 サンプル) を核 DNA の ITS および葉緑体 DNA の trnK-rps16 IGS 領域の塩基配列の解析に基づき同定した結果、主流品は *S. chinensis* と *S. reticulata* であり、*S. oblonga* を基原とするものは少なかったことを明らかにした。薬用される 3 種の *Salacia* 属植物の ITS 配列情報に基づいて、これらを迅速かつ正確な同定を実現するための簡便な PCR-RFLP アッセイを開発した。制限酵素 Cac8I により、それぞれの種の特定の ITS 配列を識別可能なフラグメントパターンに消化することができた。生薬や健康食品製品の場合、得られる DNA が断片化され、長い PCR 産物の増幅が困難であることを考慮し、ITS1 及び ITS2 領域を分けて短いフラグメントを増幅することにした。PCR 法で各々増幅した ITS1 及び ITS2 のフラグメントに制限酵素 Cac8I を用いる消化反応を行うことにより、各種に特異なフラグメントパターンが得られ、種を判別することが可能であった。オンラインストアで入手した「サラシア」、「サラシア茶」などの名称で市場に流通している健康食品について、確立した PCR-RFLP 法を適用したところ、正確に同定できた。それらのほとんどは *S. reticulata* または *S. oblonga* 由来と表示されているが、すべて *S. chinensis* 由来であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Q, Zhu S, Hayashi S, Iida O, Takano A, Miyake K, Sukrong S, Agil M, Balachandran I, Nakamura N, Kawahara N, Komatsu K.	4. 巻 76
2. 論文標題 Discrimination of Curcuma species from Asia using intron length polymorphism markers in genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nat Med.	6. 最初と最後の頁 69-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-021-01558-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Liu Q, Zhu S, Hayashi S, Anjiki N, Takano A, Kawahara N, Komatsu K.	4. 巻 76
2. 論文標題 Genetic analysis of Curcuma species from Asia based on intron regions of genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nat Med.	6. 最初と最後の頁 276-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-021-01563-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sone M, Zhu S, Cheng X, Ketphanh S, Swe S, Tun TL, Kawano N, Kawahara N, Komatsu K.	4. 巻 75
2. 論文標題 Genetic diversity of Amomum xanthioides and its related species from Southeast Asia and China.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Nat Med.	6. 最初と最後の頁 798-812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-021-01512-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Gu X., Zhu S., Du H., Bai C. H., Duan X. H., Li Y. M., Hu K. F.	4. 巻 176
2. 論文標題 Comprehensive multi-component analysis for authentication and differentiation of 6 Dendrobium species by 2D NMR-based metabolomic profiling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microchemical J.	6. 最初と最後の頁 107225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.microc.2022.107225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhu S., Liu Q.D., He J.Y., Nakajima N., Samarakoon S.P., Swe S., Zaw K., Komatsu K.	4. 巻 274
2. 論文標題 Genetic identification of medicinally used Salacia species by nrDNA ITS sequences and a PCR-RFLP assay for authentication of Salacia-related health foods	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Ethnopharmacol.	6. 最初と最後の頁 113909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2021.113909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Meng H. C., Zhu S., Fan Y. H., Ye R., Hattori M., Komatsu K., Ma C. M.	4. 巻 152
2. 論文標題 Discovery of prenylated dihydrostilbenes in Glycyrrhiza uralensis leaves by UHPLC-MS using neutral loss scan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ind. Crops Prod.	6. 最初と最後の頁 112557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.indcrop.2020.112557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura K., Zhu S., Komatsu K., Hattori M., Iwashima M.	4. 巻 86
2. 論文標題 Deglycosylation of isoflavone C-glycoside puerarin by combination of two recombinant bacterial enzymes and 3-oxo-glucose.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Appl Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 AEM.00607-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.00607-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhu S., Shirakawa A., Shi Y., Yu X., Tamura T., Shibahara N., Yoshimatsu K., Komatsu K.	4. 巻 72
2. 論文標題 Impact of different post-harvest processing methods on the chemical compositions of peony root.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Nat. Med.	6. 最初と最後の頁 757-767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1214-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura K., Zhu S., Komatsu K., Hattori M., Iwashima M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Expression and characterization of the human intestinal bacterial enzyme which cleaves the C-glycosidic bond in 3"-Oxo-puerarin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 417-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Katsuko Komatsu, Shu Zhu.
2. 発表標題 Strategy to expand domestic production of peony root based on comprehensive study on diversity of Paeonia lactiflora.
3. 学会等名 1st International Symposium on Kampo Medicine Organized by JSOM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 董 昱卓, 當銘一文, ZHU Shu, 田村 隆幸, 吉松嘉代, 小松かつ子
2. 発表標題 NMRデータに基づく芍薬の成分プロファイリングと多変量解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曽根美佳子, ZHU Shu, 成 暁, Ketphanh Sounthone, Swe Swe, Zaw Khin, 河野徳昭, 川原信夫, 小松かつ子
2. 発表標題 生薬シュクシャの基原植物の遺伝的多様性の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本祥雅, 劉 群棟, 當銘一文, Zhu S., 安食菜穂子, 河野徳昭, 川原信夫, 小松かつ子
2. 発表標題 ミャンマー産Salacia属植物の同定と グルコシダーゼ阻害活性
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
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 Indira, Agil Mangestuti, 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

1. 発表者名 董 昱卓, 當銘一文, Zhu S., 田村 隆幸, 吉松嘉代, 小松かつ子
2. 発表標題 NMRデータに基づく芍薬の成分プロファイリングと多変量解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曾根美佳子, Zhu S., 成 暁, Ketphanh Sounthone, Swe Swe, Zaw Khin, 河野徳昭, 川原信夫, 小松かつ子
2. 発表標題 生薬シュクシャの基原植物の遺伝的多様性の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 劉 群棟, Zhu S., 三宅克典, 高野昭人, Viswanathan MV, 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 クルクミノイド生合成酵素遺伝子のイントロン領域に基づくアジア産Curcuma属植物のフラグメント多型解析
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 Liu Q. D., Zhu S.,Katzuma K., Anjiki N., Kawahara N., Myint Y. Y., Komatsu K
2. 発表標題 Genetic analysis of Salacia plants collected in Myanmar
3. 学会等名 The 5th Toyama-Basel Joint symposium on Pharmaceutical research and drug development (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ZHU S.
2. 発表標題 遺伝的・成分的多様性の解析に基づく芍薬の資源探索と品質評価
3. 学会等名 第35回和漢医薬学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 群棟, ZHU S., 数馬恒平, 安食菜穂子, 川原信夫, Myint Yi Yi, 小松かつ子
2. 発表標題 Genetic analysis of Salacia plants collected in Myanmar
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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			
中国	成都中医薬大学			