Ephedra equisetina Bunge 及び近縁植物の種分類と多様性に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42234

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

氏　　名	安藤　広和
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	甲第4号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第 4 条第 1 項）
学位授与の題目	*Ephedra equisetina* Bunge 及び 近縁植物の種分類と多様性に関する研究
論 文 審 査 委 員	主査　佐々木　陽平
	副査　御影　雅幸
	副査　後藤(中川)　享子
	副査　山下　克美
	副査　鳥羽　陽

学位論文要旨

Abstract

The classification of *Ephedra* plants has long been a matter of debate, as *Ephedra* plants have few morphological characteristics to aid classification. In particular, the distinction between *E. equisetina* and *E. major* ssp. *procera* is uncertain. In general, *E. equisetina* is a medicinal species prescribed in JP16. However, *E. major* ssp. *procera* is not used as medicine in Japan. We intended to study the phylogenic relationship of *E. equisetina* and *E. major* ssp. *procera* by molecular analysis and the content of ephedrine alkaloid. In the molecular analysis, we investigated nuclear internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast *trn*K genes used frequently for phylogenic analysis of closely related taxa of plants. In the analysis focusing on Ephedrine alkaloid content, we quantified ephedrine alkaloids (Ephedrine (E), Pseudoephedrine (PE), Norephedrine (NE), Norpseudoephedrine (NPE) and Methylephedrine (ME)) by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Molecular analysis revealed that *E. equisetina* and *E. major* ssp. *procera* have a close relationship with differing matrilineage, and chemical analysis showed that they have the same characteristic which varied alkaloid composition ratio by collection site. In addition, *E. equisetina* and *E. major* ssp. *procera* contained no less than 0.7% of total alkaloids. Thus, we suggest that on the basis of molecular phylogeny that *E. major* ssp. *procera* should be treated as a synonym of *E. equisetina*. We concluded that *E. major* ssp. *procera* could be used to produce Ephedrae Herba.

【背景】

マオウ科（Ephedraceae）*Ephedra* 属植物は，ユーラシア大陸，アフリカ大陸北部，アメリカ大陸西部の乾燥地帯に約 50 種類自生する分類群で，中国には *Ephedra sinica* Stapf，*E. intermedia* Schrenk et C.A.Meyer, *E. equisetina* Bunge など 14 種の *Ephedra* 属植物が自生している．*Ephedra* 属植物は外部形態的な分類形質が少なく，種分類が困難な一群であるため，種の位置づけが常に議論されている．例えば，中国に自生する *E. sinica* と ヨーロッパからアジアにかけて広く分布する *E. distachya* L. は分類学的に意見が分かれていたが，Ni らによる分子生物学的研究により，これらは別種にするべきであると報告された．また，*E. sinica* と *E. dahurica* Turcz. との関係は Kakiuchi らによって同じ分類群であることが報告された．一方で，*E. equisetina* とユーラシア大陸西部に分布する *E. major* Host subsp. *procera* (C.A.Mey.) Bornm. においても形態学的特徴が類似しているため，分類群の区別は不確かで混乱している．中国植物誌の *E. equisetina* の項目には「本种的木质茎较高大，在外形上与树状麻黄 *E. procera* Fisch. et Mey. 及南欧麻黄 *E. nebrodensis* Tineo 极为相似，在分类工作中因之也常有合并、分开及误定的情况。」との記載があり，*E. major* ssp. *procera*（=*E. procera*）は *E. equisetina* のシノニムとして判断される場合がある．すなわち *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* 両分類群は，それぞれが形態的な多様性を示し，このことが種分類を困難にしている．

Ephedra 属植物の中には地上茎が薬用として使用可能なものがある．日本では，第十六改正日本薬局方（JP16）に，*Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A. Meyer, *E. equisetina* Bunge の 3 種に由来する生薬麻黄が収載されている．安定した品質のためには厳格な同定が要求されており，種分類は必要不可欠である．麻黄は，発汗，解熱，鎮咳などの目的で，葛根湯や麻黄湯などの漢方処方に配

合されている．また，特徴的な含有成分としてアルカロイドが知られており，エフェドリンをはじめ，プソイドエフェドリン，ノルエフェドリン，ノルプソイドエフェドリン，メチルエフェドリンなどがある．JP16 には総アルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリン）0.7%以上を含むと規定されている．麻黄の原植物は日本に自生していないため，資源は全て中国に依存している．しかし，中国では資源の保護，砂漠化防止のため，1999 年より未加工品の麻黄の輸出規制を行っている．その為，現在麻黄の供給は常に不安定な状態にある．このような状況から，新たな麻黄資源の確保が求められている．具体的な２つの選択肢は，①日本での原植物の栽培化，②中国以外の地域における代替種の開発，である．①について，栽培法が確立していない状況にある．②について，昭和 20-30 年代に中国からの輸入が途絶え，麻黄の供給が不安定になった．この際は，パキスタンやロシアなどから輸入されていた．すなわち②に関する検討の余地は大きく残されている．

本研究では，生薬麻黄の多方面にわたる供給地を確保することを目指し，*E. equisetina* 及び近縁植物の種分類と多様性を解明することを目的とした．JP16 には *E. sinica*，*E. intermedia*，*E. equisetina* の 3 種以外は認められない．しかし冒頭に記載のとおり種の位置づけが困難な *Ephedra* 属植物において，*E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* のように区別が確定していない種類がある．仮に両種が種として区別し得ない場合，*E. major* ssp. *procera* に由来する生薬も麻黄として利用できる可能性がある．実際，*E. equisetina* について，国際塩基配列データベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に複数の配列多型が登録されていること，形態的な変異を考慮すると種内で大きな多様性を有する分類群であることが推察されている．すなわち，*E. major* ssp. *procera* は *E. equisetina* の種内の多様性に含まれる可能性が充分にある．この場合、*E. major* ssp. *procera* はユーラシア大陸西部に広く分布することから，麻黄の資源供給地の選択肢が大きく広がることになる．

【実験材料】

実験材料は以下の通りである．

2002 年から 2012 年の間に中国およびモンゴルで採集した *E. equisetina* 57 検体（新疆ウイグル自治区ウイグル自治区 32 検体，河北省 4 検体，青海省 5 検体，甘粛省 2 検体，内蒙古自治区 11 検体，モンゴル 3 検体）

2012 年にトルコおよびフランスで採集した *E. major* ssp. *procera* 24 検体（Karadiken 1 検体, Kaiseri 4 検体，Kirikkale 6 検体，Cappadocia 10 検体，Ankara 2 検体，フランス 1 検体）

【方法】

・ DNA 解析

植物試料約 50 ~ 100 mg から 全 DNA を抽出し，PCR (polymerase chain reaction) 法により ITS 領域及び *trn* K 遺伝子を増幅した．塩基配列はジデオキシ法による直接塩基配列決定法によって決定した．

・ アルカロイド分析

植物標本から草質茎を採取し，乾燥後粉末にした．移動相で抽出した後メンブランフィルター（0.45 μm）で濾過し，試料溶液を調製した．HPLC 法により，エフェドリン（E），プソイドエフェドリン（PE），ノルエフェドリン（NE），ノルプソイドエフェドリン（NPE），メチルエフェドリン（ME）の含量をピーク面積から絶対検量線法で定量した．

【結果及び考察】

・DNA 解析

１．*E. equisetina* の多様性に関して

今回使用した 57 検体の *E. equisetina* の ITS1 領域の DNA 配列は，2 タイプ確認された．一つは塩基配列番号 774 番目の塩基から重複が始まる検体であり，もう一つは 809 番目から重複が始まる検体であった．すなわち，全ての検体で異なる塩基が重複した配列が認められた．このような異なる塩基の重複した配列は別種間の交雑による可能性が推測される．例えば，774 番目から重複が始まる検体は，*E. intermedia* 又は *E. sinica* との雑種と推測される検体であり，新疆ウイグル自治区で 1 検体，モンゴルで 1 検体認められた．新疆ウイグル自治区には *E. sinica* が自生していないため，中国新疆ウイグル自治区の 1 検体は *E. intermedia* との雑種である可能性が高いと考えられる．

trn K 遺伝子の DNA 配列は，全ての検体で一致した．*trn* K は葉緑体遺伝子であることから，ITS1 領域の解析で雑種と推定された検体の母系は，*E. equisetina* である事が明らかになった．また，DDBJ に登録されているモンゴル産 *E. equisetina*（AB453795）と比較すると 2 塩基の変異が認められた．

２．*E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* に関して

ITS1 領域の *E. major* ssp. *procera* と *E. equisetina* の DNA 配列を比較すると，*E. equisetina* に特有な異なる塩基の重複した配列（main peak, 2nd peak）のうち，どちらか一方の 809 番目のシトシンが欠損している事によって両種は区別が可能であった．しかし，両種の違いはこの 1 塩基のみであった．一方，*E. major* の基準亜種 *E. major* ssp. *major* (GU968557 アルジェリア産) と *E. major* ssp. *procera* を比較すると 71 塩基異なっていた． 以上，ITS1 領域を系統学的解析した結果，*E. major* ssp. *procera* は基準亜種の *E. major* ssp. *major* よりも *E. equisetina* と近縁関係にあることが明らかになった．

trn K 遺伝子の解析結果では *E. major* ssp. *procera* の種内に 10-11 塩基異なるジェノタイプ M-1, M-2 が認められた. M-1 は Kirikkale, Ankara の検体であり, M-2 は Karadiken, Kaiseri, Kirikkale, Cappadocia の検体であった. また, フランスで採集した *E. major* ssp. *procera* は M-2 に分類された．葉緑体 DNA は母性遺伝するため，*E. major* ssp. *procera* には少なくとも 2 系統の異なる母系が存在すると考えられる．また，フランス産 *E. major* ssp. *procera* が M-2 に分類された事から，地理的要因を考慮すると M-2 は地中海を中心とした種子散布によるクラスターである可能性が考えられる. 形態的に *E. major* ssp. *procera* と同定される分類群には，ITS1 領域の DNA 配列は一致するが，*trn* K 遺伝子が大きく異る，すなわち，母系が異なる 2 系統が存在することが明らかになった．

同一種内の異なる母系の存在は過去にも報告されている．Kitani らは，中国産 *E. intermedia* の DNA 配列を解析した結果，18S rRNA 遺伝子は一致するが，*trn* K 遺伝子の配列に 38 塩基の挿入欠損を認めたと報告している．また，*E. equisetina* にも母系由来である葉緑体 *chlB* 遺伝子に多型（Type E1, E2）が存在することが報告されている．このように同一種内でも母系の DNA 配列が異なっている例は多くある．

そこで，*E. major* ssp. *procera* のジェノタイプ M-1, M-2 と *E. equisetina* を比較すると，M-1 とは 10 塩基， M-2 とは 20-21 塩基の違いが認められた．

以上，ITS1 領域，*trn* K 遺伝子の DNA 配列を解析した結果と，形態的な相似性と合わせると，*E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* のジェノタイプ M-1, M-2 は，種として区別し得ないと判断できる．

・ アルカロイド分析

含有成分において，*E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* の草質茎（乾燥）は JP16 が規定する 0.7 %以上の総アルカロイドを含有していた．*E. equisetina* は JP16 収載品であり，*E. major* ssp. *procera* はトルコで地上茎をリウマチの疼痛に，果実を頭痛に使用されている．*E. major* ssp. *procera* の含有成分は JP16 の基準を満たしている為，日本での使用も今後検討する必要がある．

アルカロイド組成では，産地ごとに特徴が認められた．*E. equisetina* では新疆ウイグル自治区，河北省の検体では 5 種類のアルカロイドに対するエフェドリンの比率が 64%であるのに対して，青海省，甘粛省，内蒙古自治区，モンゴルでは 7~13%であった．Hong らは，アルカロイド組成によって *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* の 3 種を分類できると報告しているが，本研究での *E. equisetina* のエフェドリンの比率は，産地によって異なる結果となった．Hong らが使用した *E. equisetina* は新疆ウイグル自治区で採集したもののみであり，本研究での新疆ウイグル自治区における *E. equisetina* のエフェドリン割合も Hong らの結果と一致する．同様に，*E. major* ssp. *procera* では Kaiseri, Cappadocia の検体では，25~31%であるのに対して，Karadiken, Kirikkale, Ankara の検体では 0~1%であった．このように，両種は生育地によって生成するアルカロイドの比率が大きく異なることが明らかになった．アルカロイドの組成は遺伝的に支配されているため，*E. equisetina* 及び *E. major* ssp. *procera* は異なる遺伝背景を持った個体が各地域にクラスターを形成しているものと考えられる．なお，第一章で明らかになったジェノタイプとアルカロイドには相関は認められなかった．

アルカロイドの分析結果から，含有量および組成からも両分類群は区別できないことを支持する結果となった．

以上，本研究により *E. equisetina* 及び近縁植物の種分類と多様性を解明した．これにより，*E. major* ssp. *procera* の多様性は *E. equisetina* の種内における多様性に含まれることが明らかになった．すなわち *E. major* ssp. *procera* に由来する生薬も生薬麻黄として利用できる事を示した．*E. major* ssp. *procera* はヨーロッパ西部や，地中海の西側から中央アジアにかけて分布しているため，幅広い供給地が期待され，麻黄の安定供給につながると考えられる．

審査結果の要旨

漢方医療における重要生薬「麻黄（マオウ）」の資源は、その原植物である *Ephedra sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* が日本に自生しないため、全て中国からの輸入に依存している。本研究は中国以外からの供給地を確保することが可能か否か検討したものである。ユーラシア大陸西部に分布する *E. major* ssp. *procera* は *E. major* の亜種と位置付けられているが、形態学的特徴は *E. equisetina* に近く、分類学的な正確性が議論されている。*E. major* ssp. *procera* が *E. equisetina* と同種であることを示せば「麻黄」資源になり得る。

そこで発表者は特定 DNA 領域の配列とアルカロイド（エフェドリンおよびプソイドエフェドリン）の含量を比較した。核 ITS および葉緑体 *trn*K 領域を比較した結果、*E. equisetina* とされる分類群は雑種由来であり *E. major* ssp. *procera* と同じ配列を有することを明らかにした。アルカロイド含量および組成は変異幅が大きく両種を区別することはできなかった。これらの結果は *E. equisetina* の外部形態的な多様性を支持する結果であり、*E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* は種として区別できないことを明らかにした。

以上、本研究はこれまで未解決であった *E. equisetina* と *E. major* ssp. *procera* を中心に多様性を解明し種分類を明らかにすることで、生薬「麻黄」の中国以外の供給地を確保することが可能であることを示した。これらの成果は学術的な重要性に加え、日本の漢方医療における貢献も大きく、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。