

DNA分析による薬用植物の識別に関する研究

著者	松本 英樹
著者別名	Matsumoto, Hideki
雑誌名	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
巻	平成16年12月
ページ	15-19
発行年	2004-12-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/16595

氏名	松本英樹
生年月日	
本籍	佐賀県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第586号
学位授与の日付	平成15年3月31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	DNA分析による薬用植物の識別に関する研究
論文審査委員(主査)	辻 彰 (薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一 (医学部附属病院・教授) 御影 雅幸 (薬学部・教授) 太田 富久 (薬学部・教授) 垣内 信子 (薬学部・助教授)

学位論文要旨

Abstract

For contribution to uniform and improve quality of herbal crude drugs, DNA analysis for discrimination in medicinal plants was carried out.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis of chloroplast DNA was carried out on *B. falcatum* L. *sensu lato*. Eighty three site mutations were detected, and the parsimonious analysis was performed. The parsimonious trees indicated the following: (1) The Far Eastern plants made a monophyletic group, in which European plants were not contained. (2) The Japanese plants with the cytotypes $2n = 26$ and 32 , clustered into a single subgroup including Chinese plants with $2n = 26$ and *B. komarovianum* Lincz. (3) Apart from the above Japanese subgroup, Chinese *B. scorzonerifolium* Willd. formed the other single group. (4) Chinese *B. chinense* DC. were polyphyletic. These results suggested that Japanese *B. falcatum* L. *s. l.* had less relationship to European *B. falcatum* L. *sensu strict* than to the Far Eastern subtaxa such as Chinese *B. scorzonerifolium* and *B. chinense*. They also indicated that Japanese and Chinese *B. falcatum* L. *s. l.* with $2n = 26$ or 32 do not belong to the same subtaxon as *B. scorzonerifolium* Willd., and phylogenetically differ from those with $2n = 20$.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was performed on *Scutellaria baikalensis* and *Perilla frutescens*. Among 19 strains of *S. baikalensis*, 26 kinds of RAPD markers were detected by amplification with 21 primers. In addition, RAPD marker specific for KO1 strain was found. These results indicated that 18 out of 19 strains could be discriminated from each other by single primer or combination of 2 primers. Segregation of RAPD markers in self-fertilized generation of NI strain was examined. Eight RAPD markers

were detected in all plants of self-fertilized generation. This suggested that these primers were useful for selection marker. Among 10 strains of *P. frutescens*, 11 kinds of RAPD markers were detected by amplification with 9 primers. This result indicated that 8 out of 10 strains could be discriminated from each other by single primer or combination of 2 primers. Template DNAs extracted from dried leaves of *P. frutescens* were also amplified for RAPD analysis. RAPD patterns and polymorphisms in dried leaves were also detected in living leaves.

Template DNAs from transformed plants of *Atropa belladonna* were amplified with primers for T-DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR). The expected sizes of DNA fragments were detected and digested at expected positions in all transformed plants. These results suggested that both T_L-DNA and T_R-DNA were introduced into all transformed plants. On the other hands, amplified DNA fragments were not detected in non-transformed plants.

Consequently, it was suggested that these DNA analyses were useful for discrimination in medicinal plants. Also, discrimination in medicinal plants by DNA analysis would contribute to uniformity and improvement of quality in herbal crude drugs.

漢方・生薬製剤の品質は原料生薬の品質によって大きく左右されることから、優良で均一な生薬を安定的に確保することが重要な課題となっている。しかしながら、植物によっては外部形態が連続的変異を示し、近縁種との識別が困難な場合も多い。また、一部の種には僅かな変異を示す亜種・変種などが存在し、外部形態をもとにした識別を一層難しくしている。そのため、天然物には遺伝的に多様な植物が混在する可能性が高く、その結果、生薬の品質を均一に維持できず、品質劣化を招く恐れがある。

一方、DNA を用いた識別法は外部形態の場合とは異なり、環境条件などに左右されることがないので、非常に有効的な方法である。近年ではその技術進歩は目覚ましく、素早く DNA 分析を行う方法も考案され、植物を材料とした分野でも応用が進んでいる。そこで、生薬品質の均一化と向上に寄与することを企画して、DNA 分析法を用いて薬用植物の識別法を検討した。

1. 制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析を用いたミシマサイコ属植物 (*Bupleurum* 属) の系統分類法の検討

広義の *Bupleurum falcatum* L. は草本性の多年生植物であり、ヨーロッパから中央アジア、東アジアにかけて広く分布している。この種は外部形態に変異が大きいため、その分類学的な取扱いは研究者により異なることが知られている。そこで、広義 *B. falcatum* L. の 7 つの亜分類群 (1. 日本産 $2n = 20$ 、2. 同 $2n = 26$ 、3. 同 $2n = 32$ 、4. *B. scorzonerifolium*、5. *B. chinense*、6. *B. komarovianum*、7. 狭義のヨーロッパ産) を含む *Bupleurum* 属植物 65 個体の葉緑体 DNA を RFLP 分析した。その結果、83 個の制限酵素切断サイトに変異を検出し、葉緑体 DNA は 29 種のタイプに識別できることが判明した。このデータを用いて、最節約法により系統樹を作成したところ、6 種の最節約

系統樹が得られた。更に、これらの系統樹に対して、ブートストラップ検定を 1000 回反復し、50 % 合意系統樹 (50 % majority rule consensus tree) を作成した。

得られた系統樹には広義 *B. falcatum* L. の 6 種の亜分類群を含む、全ての極東アジアの *Bupleurum* 属植物が比較的高いブートストラップ信頼度 (78 %) で単系統群であることが示された。そして、この単系統群にはヨーロッパ産の狭義 *B. falcatum* L. (亜分類群 7) やヨーロッパ産の *Bupleurum* 属植物は含まれていなかった。この結果は日本産の広義 *B. falcatum* L. とヨーロッパ産の狭義 *B. falcatum* L. との類縁関係は、日本産の広義 *B. falcatum* L. と *B. scorzonrifolium* や *B. chinense* が含まれる極東アジアの *Bupleurum* 属植物との類縁関係ほど強くないことを示唆していた。

一方、6 種の亜分類群を含む極東アジアの *Bupleurum* 属植物が形成する単系統群中には、3 つのサブグループが認められた。ただし、いずれのサブグループの中にも多系統的に *B. chinense* (亜分類群 5) が含まれていた。最初のサブグループには $2n = 26$ (亜分類群 2) と $2n = 32$ (亜分類群 3) の全ての日本産植物が比較的高いブートストラップ信頼度 (86 %) で単系統群を形成した。また、このサブグループには $2n = 26$ の中国産植物と *B. komarovianum* (亜分類群 6) も全て含まれていた。ただし、このサブグループ内にこれら 3 種の亜分類群間の系統関係を明示するクラスタは見られなかった。

2 つ目のサブグループでは全ての *B. scorzonrifolium* (亜分類群 4) が比較的高いブートストラップ信頼度 (79 %) で単系統群を形成した。この結果は上述のサブグループとこのサブグループの植物がお互いに系統的に分化しており、日本産の $2n = 26$ 、32 及び中国産の $2n = 26$ は中国産の *B. scorzonrifolium* とは異なる分類群である可能性が高いと考えられた。最後のサブグループには 2 個体の *B. chinense* が含まれたが、低いブートストラップ信頼度 (57 %) であった。一方、日本産、中国産及び韓国産の $2n = 20$ (亜分類群 1) の植物やその他の極東アジアの *Bupleurum* 属植物について、クラスタの形成は認められなかった。

2. RAPD 法を用いたコガネバナ及びシソの系統識別法の検討

生薬「黄芩」の基原植物であるコガネバナ (*Scutellaria baicalensis*) 及び同「蘇葉」の基原植物であるシソ及びその近縁植物 (*Perilla frutescens*) を材料に RAPD 法 (random amplified polymorphic DNA) を用いて両植物の系統識別が可能であるかを検討した。60 種類の 10 塩基プライマーを用いて、19 系統のコガネバナ DNA を増幅させた。その結果、21 種類のプライマーにより 26 本の RAPD マーカーが検出された。

KO1 系統に関しては、OPA-02 プライマーで増幅される系統特有の RAPD マーカー (540 bp) が検出された。また、特有マーカーではないが、GR、KI、KY、NI、TS2、WG の 6 系統については 1 種類のプライマーにより他の系統との識別が可能であった。CU 系統を除く、残りの 11 系統については、2 種類のプライマーを併用することにより、識別が可能となった。CU 系統については 2 種類のプライマーの併用でも識別することはできなかった。

次に今回得られた RAPD マーカーが交配のマーカーとして使用できるか検討するため、NI 系統を自家受精させ、RAPD マーカーの分離を調べた。20 本の RAPD マーカーについて次世代でのマーカーの有無について調査したところ、8 本の RAPD マーカー (OPB-08 の 630 bp、OPB-17 の 1100 bp、OPC-09 の 1310 bp、OPC-13 の 570 bp、OPD-07 の 480 bp、OPD-12 の 1380 bp、OPD-15 の 600 bp、OPD-18 の 530 bp) が次世代の全ての個体に検出された。したがって、これら 8 本の RAPD マーカーはホモ接合体であり、交配マーカーとして利用可能であることが示唆された。

一方、親には見られたが、自殖個体の一部に見られない、いわゆる分離する RAPD マーカーが 7 本見られた (OPA-10 の 1010 bp、OPA-11 の 510 bp、OPB-05 の 1220 bp、OPC-08 の 370 bp、OPD-01 の 1930 bp、OPD-01 の 1530 bp、OPD-19 の 1710 bp)。これら 7 本の RAPD マーカーは親ではヘテロ接合体で存在し、次世代で分離したと考えられ、交配マーカーとして利用できないことが明らかとなった。

次にシソ及びその近縁植物についても、同様の研究を試みた。85 種類の 10 塩基プライマーを用いて、10 系統のシソ及びその近縁植物 DNA を増幅させた。その結果、9 種類のプライマーで 11 本の RAPD マーカーが検出された。T13、YRC、EGH の 3 系統については 1 種類のプライマーを用いることにより、他の系統との識別が可能であった。T1、T2、SRC、TGF、TGC の 5 系統については、2 種類のプライマーを併用することにより、他の系統との識別が可能であることが判明した。一方、AI 及び T20 系統については 2 種類のプライマーの併用でも識別することはできなかった。

次に乾燥させたシソの葉から抽出したゲノム DNA を鋳型として RAPD 法を用いて DNA の増幅を試みた。一部を除き、乾燥した植物試料でも生きた植物の場合とほぼ同じバンドパターンを得た。さらに RAPD マーカーについても 生きた植物の場合と同じ多型を示した。これにより、乾燥させた植物試料でも系統間の識別が可能であることが示唆された。

一方、一部の乾燥条件では RAPD 法を用いて DNA の増幅ができなかったため、鋳型として使う DNA を希釈する、あるいは BSA を添加する条件で DNA 増幅を試みた。その結果、これまで増幅できなかったサンプルで増幅が可能となり、増幅バンドのパターンや RAPD マーカーによる多型も生きた植物で得た結果と一致していた。これにより、本法を用いれば多くの植物で系統識別が可能であり、また生きた植物だけでなく乾燥させた植物試料でも系統識別が可能であることが示唆された。

3. PCR 法を用いたベラドンナ形質転換体の識別法の検討

土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* により外来 DNA が導入されたベラドンナ形質転換体を材料として、PCR (polymerase chain reaction) 法により外来 DNA を検出し、非形質転換体との識別が可能であるかを検討した。

毛状根あるいは再分化体の 5 クローンについて外来 DNA (T_L -DNA 及び T_R -DNA) に相補的なプライマーを用いて PCR 法で増幅させたところ、予想される 1541 bp あるいは 817 bp の DNA とほぼ同じ位置に増幅 DNA 断片を検出することができた。一方、

非形質転換体では DNA の増幅によるバンドを検出できなかった。

次に PCR 法で増幅された DNA 断片が T-DNA であるかを確認するため、増幅 DNA 断片を制限酵素で消化させた。毛状根 3 クローンにおいて、増幅 T_L-DNA 断片を *Eco* RV あるいは *Sca* I で消化させた結果、全てのクローンで予想される大きさの切断 DNA を検出することができた。また同様に増幅 T_R-DNA 断片を *Eco* RV あるいは *Sal* I で消化させた結果、予想される大きさの切断 DNA を検出することができた。したがって、全てのベラドンナ形質転換体クローンで増幅された DNA 断片は T-DNA である可能性が非常に高いと推察された。また、これにより供試したクローンは全て T_L-DNA 及び T_R-DNA の両者が導入された形質転換体である可能性が高いと考えられた。一方、非形質転換体では増幅された DNA 断片は検出されなかったため、本方法は形質転換体と非形質転換体とを識別できる非常に有効的な方法であることが示唆された。

以上、本研究において DNA 分析法を用いて薬用植物を識別することが可能であると示された。薬用植物の識別、即ち、生薬の基原植物の識別は、生薬品質の均一化と品質向上に貢献できるもの考える。

学位論文審査結果の要旨

漢方・生薬製剤の品質の向上と安定化を図るには、原料生薬の品質の向上と安定化が重要である。生薬品質を左右する要因は種々考えられ、その一因として、自然界には遺伝的に多様な植物が存在し、生薬の原植物として混在していることがあげられる。

本研究は、生薬品質の向上と安定化に寄与することを目的として、DNA 分析で得られる情報を生薬あるいは原料植物の品質評価基準として利用することを目的に種々分析法を検討し、以下の成果を得た。

1. ミシマサイコ *Bupleurum falcatum* L. は変異が大きく、研究者により分類学的な取扱いが異なる。
B.falcatum L. の 7 つの亜分類群に数種の同属植物を加えた 65 個体について、葉緑体 DNA を制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析した結果、葉緑体 DNA を 29 種類のタイプに識別し、日本産の 2n=26、32 及び中国産の 2n=26 の植物は、中国産の *B.scorzonerifolium* とは別の分類群である可能性を示すなど、分析結果から各地産の株の遺伝的類縁関係を明確にした。今後、薬効との相関を検討することにより、生薬「紫胡」としての優良品種特定の手段として利用可能であることを示唆した。
2. 各地で栽培される由来の異なるコガネバナ及びシソに関し、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法による分析を行い、2 種類のプライマーを併用することにより、それぞれ識別が可能であることを示した。また、新鮮材料のみならず生薬試料でも解析可能であることを示し、シソについては含有精油成分との相関を考察した。
3. Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により、*Agrobacterium rhizogenes* により外来 DNA が導入されたベラドンナ形質転換体と非形質転換体とを効果的に識別できることを示唆した。

以上、本研究は、3 種の DNA 分析法を目的に応じて使用することにより生薬分析に応用可能であることを示し、かつ DNA 分析から得られる情報が生薬品質の 1 指標となり得ることを示した点は、今後の生薬分析の発展に寄与するものであり、高く評価できる。よって、本論文は博士 (薬学) に値するものと判定された。