

氏名	北村 雅史
学位の種類	博士（創薬科学）
学位記番号	医薬保博甲第167
学位授与の日付	平成30年3月22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	薬用植物の多様性と品質管理に関する研究：黄連と大麻草について
論文審査委員	主査 佐々木 陽平 副査 御影 雅幸 副査 加藤 将夫 副査 鳥羽 陽 副査 猪部 学

学位論文要旨

To study diversity and quality control of medicinal plants and crude drugs, we performed loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for (1) variety identification of *Coptis japonica* and (2) species identification of *Cannabis sativa*. (1) We employed new genetic and morphological classification approaches to discriminate between two varieties of *C. japonica*. Based on the single-nucleotide polymorphism (SNP) of the tetrahydroberberine oxidase gene, we found conserved SNPs between the two varieties and were able to classify *C. japonica* into two varieties and crossbreeds. Furthermore, we introduced a new leaf type index based on the overall degree of leaflet dissection. Our new index was able to discriminate between the two varieties and their crossbreeds more accurately than the conventional discrimination method. Our genetic and morphological classification methods are useful to discriminate between the two varieties and their crossbreeds. (2) We developed a LAMP assay for the rapid identification of *C. sativa*. The LAMP reaction that targets the tetrahydrocannabinolic acid synthase gene showed high specificity to *C. sativa*. With a simplified DNA extraction method, the entire procedure from DNA extraction to detection required only 30 min. Our protocol shows promise for on-site application in various fields.

【序論】

薬用植物は一般に加工され生薬として漢方方剤に用いられる他、医薬品原料や食品など様々な目的で使用される。生薬は自然の産物に由来していることから、それらの品質には必然的にばらつきが生じる。薬用植物・生薬には医薬品原料として安定した品質が要求されるため、品質を評価し、把握することは重要な課題となっている。本研究では、薬用植物・生薬の多様性の解明及び品質管理法を開発する目的で原植物の同定・鑑別に視点をおき、組織学的手法と分子生物学的手法による原植物の多様性の解明、変種間の鑑別法を漢方生薬「黄連」を対象に、そして分子生物学的手法の発展型である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を「大麻草」を対象に実施した。

1. 漢方生薬「黄連」の品質に関する研究

【背景】

黄連 (*Coptidis Rhizoma*) は第 17 改正日本薬局方に「本品はオウレン *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、黄連解毒湯、三黄瀉心湯、半夏瀉心湯などの漢方処方に配合されている。この中で日本に自生する原植物は *Coptis japonica* のみであり、本種は葉の複葉の形態により 1 回 3 出複葉はキクバオウレン (*Coptis japonica* var. *anemonifolia*), 2 回 3 出複葉はセリバオウレン (*C. japonica* var. *major*), 3 回 3 出複葉はコセリバオウレン (*C. japonica* var. *japonica*) の 3 変種に分類される。現在、市場品として流通する日本産黄連はセリバオウレンを原植物としている。一方、キクバオウレンを原植物とした黄連は現在市場品として流通していないものの、オウレンの変種の多様性を理解することや品種選抜や品種改良を行う上でも貴重な植物資源である。北陸地方はキクバオウレンとセリバオウレンの 2 変種が自生する地域であり、現在自生するオウレンの葉の形態は地域・個体ごとに多様性が認められる。そのため、自生する個体の中には従来の手法により変種を鑑別できないものも存在する。

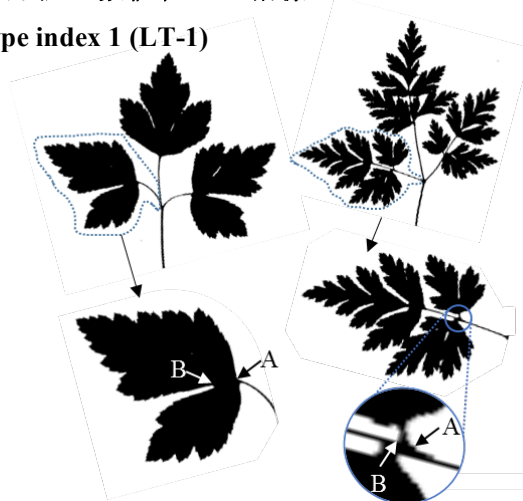
本研究では、キクバオウレンとセリバオウレン、さらには両変種の交雑種の鑑別法を確立することを目的に、北陸地方で採取した様々な葉の形態的特徴を有するオウレンを用いて、Single nucleotide polymorphism (SNP) 解析により 2 変種を分類し、外部形態による新指標を用いた鑑別法の開発とその適否を評価し、品質管理への応用を目指した。

【実験材料及び方法】

- ・北陸地方に自生するオウレンを 14 地点 (Lo1~Lo14) から 6~35 個体を 2016 年 6 月~9 月に採取した. またセリバオウレンの栽培系統として, 兵庫県丹波市及び福井県大野市において, いわゆる「丹波黄連」及び「越前黄連」の原植物をそれぞれ 13 個体ずつ 2017 年 10 月に採取した.
- ・各採取地点 4 個体及び大阪市場品の日本産黄連 1 試料の計 65 試料について Tetrahydroberberine oxidase (THBO) gene のダイレクトシーケンスを行った.
- ・1 個体あたり 1~3 枚の葉を採取し, 各葉の側小葉を小葉柄の基部から切り取り, 計 365 枚の側小葉について, 写真撮影により画像データを取得した. 画像データは ImageJ を用いて, 小葉の基部から葉縁の長さ, 表面積, 小葉と小葉柄の外周などを測定し, 外部形態指標である Leaf type index 1 (LT-1) 及び Leaf type index 2 (LT-2) を算出した.

従来の方法を数値化した指標

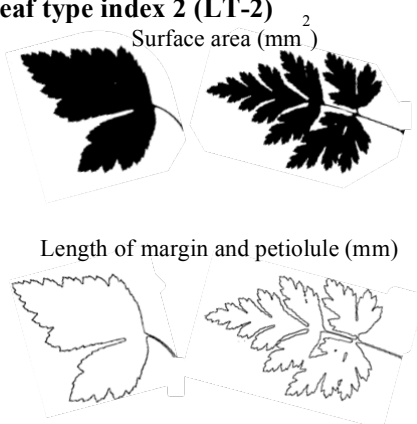
Leaf type index 1 (LT-1)



LT-1 (mm) = Length from A to B

今回新たに考案した指標

Leaf type index 2 (LT-2)



$$LT-2 = \frac{(\text{Length of margin and petiolule})^2}{\text{Surface area}}$$

【実験結果及び考察】

・日本産黄連の原植物の形態学的・遺伝学的多様性について

2 変種を鑑別するための DNA マーカーを探索するため, THBO gene のシーケンスを行った. THBO はベルベリン生合成経路の最終段階で機能し, 前駆体であるテトラヒドロベルベリンをベルベリンに変換する酸化酵素である. 国際塩基配列データベースに登録されていたセリバオウレンの培養細胞の THBO gene の配列データ (AB564543) を基に, アライメントを行った結果, 形態学的に鑑別されたキクバオウレン 1 個体 (LC269130), セリバオウレン 1 個体 (LC269150), 市場品の黄連 (LC269162) 及びセリバオウレンの培養細胞 (AB564543) の THBO gene の配列データの間で計 12 か所の SNP を認めた. また, キクバオウレン (LC269130) とセリバオウレン (LC269150, LC269162, AB564543) の配列データの間では, 計 9 か所 (塩基配列番号 338, 484, 957, 974, 1077, 1278, 1500, 1527, 1608) に SNP を認めた.

SNP analysis of THBO gene

Nucleotide position ^a [Accession No.]	194	246	338	484	775	957	974	1077	1278	1500	1527	1608
THBO gene [AB564543]	C	G	T	A	C	G	C	C	G	T	C	A
Cj-an (Lo6) [LC269130]	* ^b	A	A	C	*	A	G	T	A	C	T	G
Cj-ma (Lo11) [LC269150]	*	A	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*
Cj-ma (cp) [LC269162]	*/G	A	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*

^a Nucleotide position was based on GenBank Accession No. AB564543, ^b The same nucleotide with THBO gene registered as AB564543

次に、北陸地方で採取されたオウレンについて、集団間及び集団内の SNP 解析に基づく 2 変種の分類を行った。各採取地点の集団間の一塩基あたりの平均置換数 (Dxy) を算出した結果、大きく二つのグループ (グループ 1 : Lo1~Lo9, グループ 2 : Lo10~Lo13, 丹波, 大野) に分類することができた。この結果を基に採取地点ごとに Lo1~Lo9 をキクバオウレン, Lo10~Lo13 をセリバオウレンと変種を同定した。また, Lo14 で採取されたオウレンは 2 つのグループの間に位置し, 2 変種が混合した集団である可能性が示唆された。分類したキクバオウレン (Lo1~Lo9) とセリバオウレン (Lo10~Lo13, 丹波, 大野) のグループ間には, 保存された 4 か所の SNP (塩基配列番号 957, 1077, 1278, 1527) が認められ, 2 変種を鑑別する遺伝的マーカーとして有効であることを認めた。

・黄連原植物の新規鑑別法と品質管理への応用

キクバオウレンとセリバオウレンの形態学的な違いを評価するために、小葉の形態に基づいた外部形態指標 LT-1 及び LT-2 を導入した。各採取地点の LT-1 の平均値はキクバオウレンで 3.79~11.16 mm であり, セリバオウレンで 1.00~1.99 mm であった。採取地点ごとに十分なサンプル数を用いて LT-1 値もしくは LT-2 値を算出することで, 2 変種を集団として分類することが可能であった。次に LT-1 及び LT-2 の鑑別能力を評価するため, Receiver operating characteristics (ROC) 解析を行った。LT-1 及び LT-2 の AUC は 0.946, 0.979 であり, LT-2 の AUC が有意に LT-1 の AUC より高い数値を示した。

遺伝学的・形態学的手法に基づき, 2 変種が混生し, 交雑した変種 (以下, 交雑変種とする) が存在する地点 (Lo14) で採取された個体の解析を行った。SNP による分類を基に, LT-1 の平均値を算出した結果, キクバオウレンで 6.35 ± 0.56 mm, セリバオウレンで 1.47 ± 0.09 mm, 交雑変種で 1.63 ± 0.07 mm であった。一方, LT-2 の平均値はキクバオウレンで 115.47 ± 7.42 , セリバオウレンで 415.10 ± 47.00 , 交雑変種で 267.50 ± 15.18 とそれぞれ固有の値を示した。LT-2 を用いた場合, キクバオウレンとセリバオウレンの間, キクバオウレンと交雑変種の間で有意差が認められただけでなく, セリバオウレンと交雑変種の間でも有意差が認められた。

キクバオウレンとセリバオウレンを 2 変種の鑑別をより明確にする遺伝学的・形態学的な新たな指標を見出した本研究結果は, 日本産黄連原植物 (*C. japonica*) の多様性に係る品質管理に有効であると考えられる。

2. 大麻草の DNA に基づいた鑑別法

【背景】

大麻草 *Cannabis sativa* L. はアサ科の一年草で, 大麻草の所持や栽培は大麻取締法により厳しく制限されている。大麻草の特徴的な成分であるカンナビノイド類化合物の中で Tetrahydrocannabinol (THC) は強い幻覚作用を示すことが知られている。新鮮な大麻草の葉や花穂では, THC はカルボキシル基を有する Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) として存在している。大麻草は THCA を多く含有する drug-type 系統とほとんど含有しない fiber-type 系統の 2 系統に大別することができる。日本を含め大部分の国が大麻草自体を禁止しているが, 一部の国では THC の含有率により大麻草を区分している。カンナビノイド類化合物の生合成経路に関する研究が行われており, 2 系統間に, THCA synthase gene (THCAS gene) において 63 個の SNP が認められることが報告されている。一般的に, 大麻草の鑑別は理化学的検査と形態学的検査により行われる。一方, 特徴的な化学成分が少ない組織や形態学的に特徴がない植物試料において, 大麻草 DNA による鑑別が有効である。これまでも DNA による大麻草の種鑑別や系統鑑別法が数多く報告されているが, 実際に実務応用として用いるためには, 鑑別に係る機材や操作手順が簡便で迅速な手法が求められる。LAMP 法は等温で増幅反応が進行する核酸増幅手法であり, 簡便且つ迅速な検査法として様々な分野で応用されており, さらにオンサイト鑑別法としての潜在能力も有している。本論文では, THCAS gene を標的にした LAMP 法による迅速・簡便な大麻草系統鑑別及び大麻草種鑑別法の確立を目指した。

【実験材料及び方法】

・北陸大学より 2015 年栽培された drug-type 系統の大麻草の各組織（葉，花穂，茎，根）を 1 個体譲受した。drug-type 系統の 21 品種の大麻草の葉または果実は東京都健康安全研究センターより譲受した。栃木県農業試験場より fiber-type 系統の大麻草を譲受した。大麻樹脂 3 試料及び *Papaver somniferum* は科学警察研究所で保管されている試料を用いた。*Humulus lupulus*, *Morus australis*, *Humulus japonicus*, *Hibiscus cannabinus*, *Nicotiana tabacum* は金沢大学薬用植物園で栽培された試料を用いた。

・Drug type THCAS gene (AB212834) と Fiber-type THCAS gene (AB212830) の塩基配列についてアライメントを行い，2 系統間の多型領域及び共通領域を標的とした drug-type 鑑別 LAMP プライマーセット (Dt-LAMP set) 及び大麻草種鑑別 LAMP プライマーセット (Cs-LAMP set) を設計した。Dt-LAMP 及び Cs-LAMP set を用いて，大麻草から抽出した DNA を鋳型として 63°C，20 分の LAMP 反応を行った。簡易鑑別プロトコールでは，簡易 DNA 抽出を行い crude DNA を鋳型として LAMP 反応を行った。

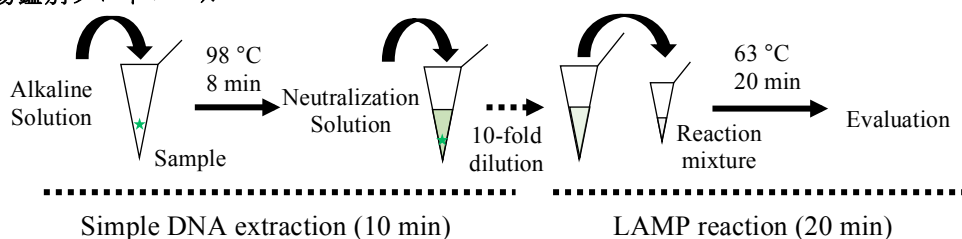
【実験結果及び考察】

・大麻草のオンサイト LAMP 法への応用

簡易 DNA 抽出した crude DNA を鋳型として LAMP 反応を行う簡易鑑別プロトコールを作成し，大麻草試料や陰性対照試料に対する反応性の検討を行った。大麻草の各組織 (drug-type 系統：葉，花穂，茎，根，果実，fiber-type 系統：果実)，大麻草樹脂 3 試料，近縁種である *Humulus lupulus* (葉)・*Morus australis* (葉)・*Humulus japonicus* (葉)，形態的に間違えやすい *Hibiscus cannabinus* (果実)，法科学の植物試料として想定される *Papaver somniferum* (抽出物)・*Nicotiana tabacum* (葉) から簡易 DNA 抽出を行い，crude DNA を鋳型として LAMP 反応を行った。Dt-LAMP set を用いた場合，drug-type 系統の一部の試料では偽陰性が見られたものの，葉や果実などの組織では再現性のある増幅が認められた。また，fiber-type 系統の試料や他の植物種試料に対して非特異的な増幅は認められなかった。Cs-LAMP set を用いた場合，大麻草由来のすべての試料に対して増幅が認められ，陰性対照に対して増幅が認められなかった。さらに，オンサイトによる鑑別を想定し，反応試薬に判定指示薬を予め反応溶液に加え，ポータブル装置を用いて反応を行った。LAMP 反応溶液の呈色による鑑別結果は蛍光検出による鑑別結果と同じであり，検出系や装置を変更しても正しく鑑別することができた。以上の結果より，本法はすべての工程が 30 分で完了する迅速・簡便な大麻草のオンサイト鑑別法として実務的な応用が可能であると考えられる。

Simple protocol for *C. sativa* identification.

簡易鑑別プロトコール



審査結果の要旨

生薬は天産物に由来するため、それらの品質は必然的にばらつきが生じる。薬用植物・生薬は医薬品原料として安定した品質が要求されるため品質の評価および把握は重要な課題である。本研究では漢方生薬「黄連」、および「大麻草」を対象に多様性の解明及び品質管理法の確立を目的にしている。【黄連】黄連は *Coptis* 属の根茎に由来する生薬である。北陸地方には *Coptis japonica* の2変種および中間の外部形態を示す個体が混生している。生合成酵素の一種である Tetrahydroberberine oxidase 遺伝子解析の結果、2変種それぞれに特異的な SNP を認めた。この SNP を元に中間系を2変種に同定するとともに交雑種の存在も明らかにし得た。さらにこれら交雑種を明確に鑑別可能な外部形態に基づく同定法の開発にも成功した。【大麻草】大麻草 *Cannabis sativa* はアサ科の一年草で、所持や栽培は大麻取締法で厳しく制限されている。迅速かつ簡便な大麻草の系統及び種鑑別法の確立を目指し、実務応用性に優れオンサイト鑑別法としての潜在能力も有する LAMP 法に着目した。THCA synthase gene の多型領域及び共通領域を標的とし、20分の反応時間で特異的な増幅を行うことが可能な LAMP プライマーセットの設計および条件設定に成功した。これらの成果は学術的な重要性に加え、日本の生薬学分野および法医学分野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。