

植物名	コガネバナ
ラテン名	Scutellaria baicalensis Georgi
科名	Labiatae
和科名	シソ科
一般名	コガネバナ
一般英名	Skullcap (Chinese skullcap)
品種等	栽培在来種
分類	多年生草本
画像	
形態的特徴	高さ25~60cm,主根はほぼ円すい形で外皮は褐色。茎はそう生し、方形で、基部は横に違い、上部は直立して分枝する。全体に短毛がまばらに生える。葉は深緑色で対生、ひ針形で長さ1.5~4.5cm,全縁。穂状花序を枝端につけ、一方に向いた紫色の唇形花を対生する。花冠は長さ約2.5cm。小堅果は黒色である、栽培種の根は直根性で細根は少ない。移植栽培では分枝根が多い。3年以上経年栽培した根部の肥大部分に、しばしば空洞が発生する。
生態的特徴	中国北部~東シベリア、朝鮮半島原産の多年生草本。花期は7~8月、果期は8~9月。耐寒性、耐暑性は比較的強く、耐湿性は弱い。開花は1年生株では7月中旬から、2年生以上の株では6月中旬から始まり、2箇月以上続く。開花・結実は穂状花序の下位から順次始まり、秋には花と果実が混在する。主な産地は、中国・山西省、山東省、河北省、黒龍江省、内蒙古である。
生育特性 +	
写真ライブラリー	写真ライブラリー
文献情報 +	
生薬名	オウゴン
組織培養物及び効率的増殖法	Scutellaria_baicalensis-Ref-1, Scutellaria_baicalensis-Ref-2 Scutellaria_baicalensis-Exp-1
植物体栽培及び植物の効率的生産法	栽培情報
さく葉標本情報	さく葉標本
トランスクリプトーム・ゲノミクス情報	トランスクリプトーム
稀少植物情報	

戻る

図 18. 薬用植物詳細情報画面

トランスクリプトーム・ゲノミクス情報がある場合、リンクを表示するようにした。

NIBIO 薬用植物総合情報データベース

文字サイズ変更 大 標準 小

トップ 総合検索 生薬検索 植物検索 化合物検索 モデル試料検索 データ一覧

☒ 稀少薬用植物情報一覧

リンクをクリックすると、詳細情報を表示します。

No.	種物名	ラテン名	野生・栽培の区別	薬用植物カテゴリー	標榜省RDBカテゴリー	地方版RDBカテゴリー	国際版RDB (IUCN, ワシントン条約) カテゴリー
1	キハナオウギ	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	栽培種				
2	キクバオウレン	<i>Coptis japonica</i> Makino var. <i>japonica</i> Satake	栽培				
3	アカメガシワ	<i>Mallotus japonicus</i> (Thunb.) Müll. Arg.					

戻る

免責事項・著作権について
Copyright © 2013 Research Center for Medicinal Plant Resources, Nibio All rights reserved.

図 19. 稀少薬用植物情報一覧画面

NIBIO 薬用植物総合情報データベース

文字サイズ変更 大 標準 小

トップ 総合検索 生薬検索 植物検索 化合物検索 モデル試料検索 データ一覧

☒ 生薬及び生薬関連製剤の国際標準化に関する情報一覧

リンクをクリックすると、詳細情報を表示します。

No.	会議・会合名	会議・会合の開始年 (年号)	開催回数 (通算回数)	主幹機関
1	Quality and safety of raw materials and traditional processing 原材料及び伝統的加工の品質及び安全性	1999	3	中国

戻る

免責事項・著作権について
Copyright © 2013 Research Center for Medicinal Plant Resources, Nibio All rights reserved.

図 20. 生薬及び生薬関連製剤の国際標準化に関する情報一覧画面

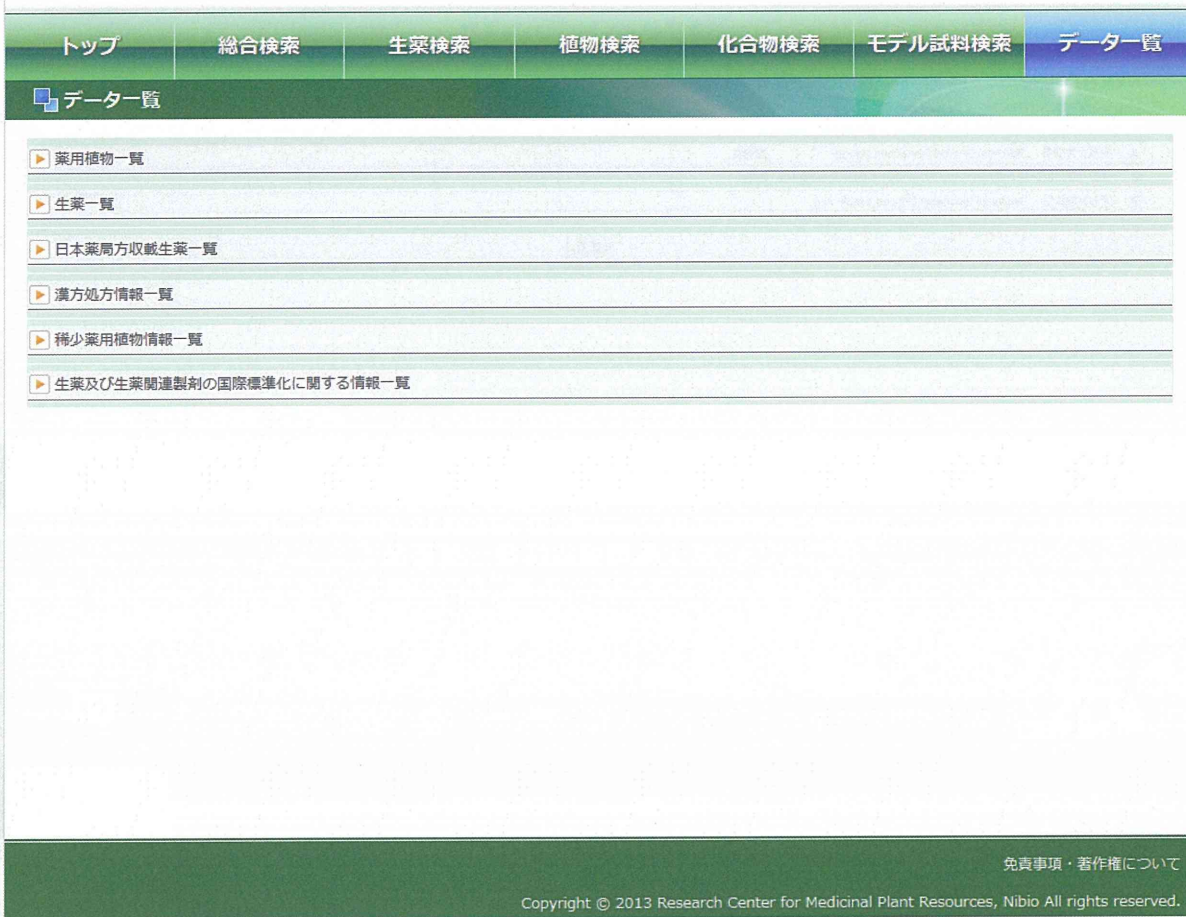


図 21. データ一覧画面

稀少薬用植物一覧、生薬及び生薬関連製剤の国際標準化に関する情報一覧を新設した。

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの拡充と
情報整備に関する研究（H25-創薬-指定-006）
分担研究報告書

分担研究課題 データベース構築及び遺伝子鑑別情報に関する研究
—生薬（サンショウ、チモ、サンヤク）の遺伝子情報について—

研究分担者 河野 徳昭 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
筑波研究部主任研究員

生薬サンショウ、チモ、サンヤクの3種の生薬について基原植物鑑別に関する情報の収集、
ならびに各生薬のモデル生薬の鑑別対象領域の塩基配列解析を行った。

サンショウについては、核リボソームDNA ITS領域(ITS1-ITS2)を解析対象とし、DDBJ
登録の*Zanthoxylum*属植物の同領域と分子系統樹解析を行った結果、いずれも*Z. piperitum*由
来の配列群と同じクレードに属することが明らかになった。すなわち、モデル生薬はいずれも
サンショウ*Z. piperitum*を基原とするものであることが確認された。

チモについては、葉緑体DNA *trnL-trnF*領域の解析を行った。PCR増幅産物が得られた検体
について塩基配列解析を行ったところ、いずれもハナスゲ*Anemarrhena asphodeloides*を基原
とするものであることが確認された。

サンヤクについては、葉緑体DNA *matK*領域の一部を解析対象としたところ、日本薬局方
で基原植物として規定されていない*Dioscorea*属植物由来の配列と一致する配列型を示す検体
があることが明らかになった。これは中国における山薬（サンヤク）の多様性を示すものと考
えられる。

以上の塩基配列解析及び基原植物鑑別結果は、データベースの遺伝子鑑別情報のカテゴリ
ーに収載される。

A. 研究目的

本研究においては、「薬用植物栽培並びに
関連産業振興を指向した薬用植物総合情報デ
ータベースの拡充と情報整備に関する研究」の
一環として、薬用植物資源の安定供給を志向し、
生薬情報の多様性の確認を目的として、生薬及
びそれらの基原植物の遺伝子鑑別法に関する
情報の収集ならびに、市場流通モデル試料の遺
伝子情報の集積により、生薬の遺伝子鑑別に関
する情報の整備を行う。

成分情報等生薬に関する多角的な情報とと
もに遺伝子鑑別法のデータベース化を行うこ
とは、国内に流通する生薬の安全性の確保なら
びに品質の向上に貢献するものと期待される。

本報告書では、生薬サンショウ、チモ、サ

ンヤクの遺伝子鑑別に関する情報について報
告する。

B. 研究方法

B-1. サンショウについて

生薬サンショウの基原植物についての、第十
六改正日本薬局方（平成23年3月24日 厚
生労働省告示第65号）の記述は下記のとおり
である。

「山椒 *Zanthoxylum* Fruit ZANTHOXYLI
FRUCTUS 本品はサンショウ *Zanthoxylum*
piperitum De Candolle (*Rutaceae*) の成熟した
果皮で、果皮から分離した種子をできるだけ
除いたものである。」

また、参考情報（日本薬局方の学名表記と分
類学的に用いられる学名表記）には、下記の記

述がある。

「サンショウ *Zanthoxylum piperitum* De Candolle = *Zanthoxylum piperitum* (L.) DC. アサクラザンショウ *Zanthoxylum piperitum* (L.) DC. f. *inerme* Makino」

生薬サンショウの遺伝子鑑別に関する論文情報の収集

PUBMED(www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)または、Google Scholar (scholar.google.co.jp/)で 'Zanthoxylum', 'genetic'等のキーワードで検索を行い、遺伝子鑑別関連の文献を抽出した。

供試生薬試料

本研究に供した生薬サンショウの市場流通品モデル試料は表1のとおり。なお、試料提供社が同一の試料については産地等で代表的なものを優先して処理し、産地等の重複する試料については解析を保留した。

生薬サンショウからのゲノム DNA 調製及び PCR 増幅

遺伝子解析用に提供された各検体より、果実2個（果皮のみ）を無作為に選び、それぞれ1個を検体#1, #2とした。

DNA 調製キットは DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を使用した。上記のように調製した生薬検体を個別に直径4.8 mmのステンレスボールと共に2 mL スクリューキャップチューブに入れ、液体窒素に5分間浸漬したのち、MS-100(TOMY)にセットし2,500 rpmで1分間破碎した。破碎粉末に1 mLのDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1 バッファー及び2 µLのRNase (キット添付のもの)を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノムDNA調製を行った。最終的にゲノムDNAは50 µLのAEバッファーで溶出し、その1 µLをPCRに使用した。

核 DNA ITS 領域の増幅・塩基配列解析

以下に、KOD-plus (TOYOBO)をPCR酵素に使用したITS領域(ITS1 - ITS2)の増幅～遺伝子

解析の流れについて記す。

PCR reaction mixture: KOD-plus 1µl, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 µl each, genome DNA 1 µl (reaction volume: 50 µl)

PCR condition: 94°C 2 min. - (94°C 15 sec. - 58°C 30 sec. - 68°C 90 sec.) x 35 - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

Primers: ITS5: 5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3'

ITS4: 5'-tcctccgcttattgatgc-3'

PCR 産物は、アガロース電気泳動で増幅パターン解析を行った。

クローニングを行う場合は、PCR 増幅産物を Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System (Promega)でゲル精製し、末端A付加ののち、T-vectorにクローニングし、各検体について8クロンの塩基配列の解析を行った。

ダイレクトシーケンシングの場合は、Wizard® SV Gel and PCR Cleanup System (Promega)を使用し、未反応のプライマー及び、プライマーダイマー等のサイズの小さな非特異的増幅産物を除き、サイクルシーケンシング反応の鋳型として用いた。

サイクルシーケンシング反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)を用い、塩基配列解析には ABI PRISM 3130-Avant DNA sequencer、80 cm キャピラリー、POP-7 ポリマー (ABI)を用い、データ解析には DNASIS-Mac v3.7 (Hitachi Software), Finch TV (Geospiza Inc.)を使用した。

B-2. チモについて

生薬チモの基原植物についての、第十六改正日本薬局方（平成23年3月24日 厚生労働省告示第65号）の記述は下記のとおりである。

「知母 *Anemarrhena Rhizome* ANEMARRHENAE RHIZOMA 本品はハナスゲ *Anemarrhena asphodeloides* Bunge (*Liliaceae*) の根茎である。」

生薬チモの遺伝子鑑別に関する論文情報の収集

PUBMED(www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)または、Google Scholar(scholar.google.co.jp/)で

'Anemarrhena', 'genetic'等のキーワードで検索を行い、遺伝子鑑別関連の文献を抽出した。

供試生薬試料

本研究に供した生薬チモの市場流通品モデル試料は表1のとおり。

生薬チモからのゲノムDNA調製及びPCR増幅

遺伝子解析用に提供された検体の試料片の形態に応じて、サンプリングする試料数を下記のとおり設定し、解析に供した。

1片のみのもの：1片の2ヶ所を清浄なメスで削り、2検体を調製した(2検体の由来は同一)。

2片のもの：各1片を清浄なメスで削り、1片から1検体、計2検体を調製した。

3片以上、または刻み片：各1片を清浄なメスで削り、1片から1検体、計3検体を調製した。

DNA調製キットはDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を標準的に使用した。上記のように調製した生薬片約20-50 mgを個別に直径4.8 mmのステンレスボールと共に2 mLスクリーキャップチューブに入れ、液体窒素に5分間浸漬したのち、MS-100(TOMY)にセットし2,500 rpmで1分間破碎した。破碎粉末に1 mLのDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1バッファ及び2 µLのRNase (キット添付のもの)を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノムDNA調製を行った。最終的にゲノムDNAは50 µLのAEバッファで溶出し、その1 µLをPCRに使用した。

葉緑体DNA *trnL-trnF* 領域のPCR増幅には基本的にKOD-plusを使用し、アニール58°C、35サイクルで行った。増幅効率の悪い検体についてはサイクル数を35サイクルに増加した。

PCRで *trnL-trnF* 領域が増幅されない試料についてはgenome DNA調製キットをDNeasyからBlood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic-tip 20/G (QIAGEN)に変更した。

さらに、KOD-plusで増幅が不調の検体については、KAPA3G Plant PCR Kit (日本ジェネテ

イクス) または Ampdirect Plus + Nova Taq (島津製作所) のPCR系による増幅を検討した。

経年サンプルからの Blood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic-tip 20/G (QIAGEN)を使用した genome DNA 調製

生薬チモからの genome DNA 調製の標準方法として使用している DNeasy で調製した genome DNA を鋳型としてPCRを行った場合、入手年の古い経年サンプルについては、いずれの増幅方法でも増幅産物が得られない傾向があった。

そこで、これらについては Blood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic-tip 20/G (QIAGEN)により genome DNA 調製を行い、調製DNAを鋳型とした各領域のPCR増幅を試みた。

ハナスゲ植物体からのゲノムDNA調製

植物体の葉、約100 mgを直径4.8 mmのステンレスボールと共に2 mLスクリーキャップチューブに入れ、液体窒素に5分間浸漬したのち、MS-100(TOMY)にセットし2,500 rpmで1分間破碎した。破碎粉末に1 mLのDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) AP1バッファ及び2 µLのRNase (キット添付のもの)を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノムDNA調製を行った。最終的にゲノムDNAは50 µLのAEバッファで溶出し、その1 µLをPCRに使用した。

葉緑体DNA *trnL-trnF* 領域の増幅・塩基配列解析

以下に、KOD-plus (TOYOBO)または、KAPA3G Plant PCR Kit (日本ジェネテイクス) をPCR酵素に使用した標準的な各遺伝子領域の増幅～遺伝子解析の流れについて記す。

[KOD-plusのPCR反応系]

PCR reaction mixture: water 35 µl, KOD-plus Buffer 5 µl, dNTP mix 5 µl, MgSO₄ 2 µl, KOD-plus 1 µl, primer sense & antisense (100 pmol) 0.5 µl each,

genome DNA 1 µl (reaction volume: 50 µl)
PCR condition: 94°C 2 min. - (94°C 15 sec. - 58°C
30 sec. - 68°C 90 sec.) x 35 - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

[KAPA3G Plant PCR Kit の PCR 反応系]

PCR reaction mixture: water 23.3 µl, KAPA3G
Plant PCR Buffer 25.0 µl, primer sense & antisense
(100 µM) 0.15 µl each, KAPA3G polymerase 0.4
µl,

genome DNA 1 µl (reaction volume: 50 µl)

PCR condition: 95°C 3 min. - (95°C 20 sec. - 58°C
15 sec. - 72°C 30 sec.) x 40 cycle - 72°C 30 sec. -
4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

Komatsu らにより登録されたチモ（ハナス
ゲ）由来 *trnL-trnF* 領域の DDBJ 塩基配列情報
(AB685323)に記載された同領域の PCR プライ
マーを PCR 増幅に使用した。配列は下記のと
おり。

Primers: *trnL*-fwd: 5'-cgaaatcggtagacgctacg-3'

trnF-rev: 5'-atttgaactggtgacacgag-3'

なお、これらのプライマー配列は、Taberlet, P.
et al. Plant Mol. Biol. **17**: 1105-1109 (1991)に記載
されている primer c: *trnL*-fwd、primer f: *trnF*-rev
にそれぞれ対応する。

得られた増幅産物はアガロース電気泳動で
解析したのち、標的領域の増幅産物を Wizard
SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用
いてゲル精製し、これを鋳型としてダイレクト
シーケンシングを行った。

ダイレクトシーケンシングは、標的領域の増
幅に用いたプライマーを用い、BigDye
Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)でシ
ーケンシングサイクル反応を行った。塩基配列
解析には ABI PRISM 3130-Avant DNA sequencer、
80 cm キャピラリー、POP-7 ポリマー(ABI)を用
い、データ解析には DNASIS-Mac v3.7 (Hitachi
Software), Finch TV (Geospiza Inc.)を使用した。

B-3. サンヤクについて

生薬サンヤクの基原植物についての、第十六
改正日本薬局方（平成23年3月24日 厚

生労働省告示第65号)の記述は下記のとおり
である。

「山薬 *Dioscorea Rhizome DIOSCOREAE*
RHIZOMA 本品はヤマノイモ *Dioscorea*
japonica Thunberg 又はナガイモ *Dioscorea*
batatas Decaisne (*Dioscoreaceae*)の周皮を除い
た根茎(担根体)である。」

また、参考情報（日本薬局方の学名表記と分
類学的に用いられる学名表記）には、下記の記
述がある。

「ヤマノイモ *Dioscorea japonica* Thunberg =
Dioscorea japonica Thunb.

ナガイモ *Dioscorea batatas* Decaisne = *Dioscorea*
batatas Decne.

Dioscorea opposita Thunb.]

なお、Ylistには下記の学名の登録がある。
Dioscorea polystachya Turcz. ナガイモ 標準
Dioscorea batatas Decne. ナガイモ synonym
Dioscorea opposita Thunb., nom. illeg. ナガイモ
synonym

生薬サンヤクの遺伝子鑑別に関する論文情報 の収集

PUBMED(www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)また
は、Google Scholar(scholar.google.co.jp/)
で'Dioscorea', 'genetic'等のキーワードで検索
を行い、遺伝子鑑別関連の文献を抽出した。

データベース登録遺伝子情報検索

DDBJで'Dioscorea' & 'DNA'等をキーワード
に検索を行い、生薬サンヤクの基原植物となる
植物種を中心に *Dioscorea* 属の主に植物種間識
別に関する登録遺伝子情報を抽出した。

供試生薬試料

本研究に供した生薬サンヤクの市場流通品
モデル試料は表1のとおり。

生薬サンヤクからのゲノムDNA調製及びPCR 増幅

遺伝子解析用に提供された検体の試料片の
形態に応じて、サンプリングする試料数を下記

のとおり設定し、解析に供した。

1 片のみのもの：1 片を清浄なメスで削り、2 検体を調製（2 検体の由来は同一）表皮があるものは表皮を含む）。

2 片のもの：各 1 片を清浄なメスで削り、1 片から 1 検体、計 2 検体を調製（表皮があるものは表皮を含む）。

3 片のもの：各 1 片を清浄なメスで削り、1 片から 1 検体、計 3 検体を調製（表皮があるものは表皮を含む）。

4 片のもの：3 片を選び、各 1 片を清浄なメスで削り、1 片から 1 検体、計 3 検体を調製（表皮があるものは表皮を含む）。

DNA 調製キットには Blood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic-tip 20/G (QIAGEN) を使用した。メスで削りとった生薬片約 10-50 mg を個別に直径 4.8 mm のステンレスボールと共に 2 mL スクリューキャップチューブに入れ、液体窒素に 5 分間浸漬したのち、MS-100(TOMY)にセットし 2,500 rpm で 1 分間破碎し、これを 2 回繰り返した。破碎粉末に 1 mL の上記キットの G2 バッファー及び 2 μ L の RNase(キット添付のもの)、100 μ L の Proteinase K を加え、以後、キットのプロトコルに準拠しゲノム DNA 調製を行った。最終的にゲノム DNA は 50°C に加温した 50 μ L の QF バッファーで溶出し、2-propanol 沈殿ののち 50 μ L の TE buffer に溶解し、その 1 μ L を PCR に使用した。

葉緑体 DNA *matK* 領域（部分）の増幅・解析

Sun らの報告する *matK* 領域による *Dioscorea* 属植物の種間鑑別法(ref. 11)に従い、*matK* 領域の部分配列の増幅を行い、増幅産物の塩基配列を解析する手法により各モデル試料の植物種の同定を試みた。標的領域の増幅に用いた特異的プライマー配列を下記に示す。

Primers: *matK*-MF: 5'-ATT TGC GAT CTA TTC ATT CAA T-3'

matK-MR: 5'-TGA GAT TCC GCA GGT CAT T-3'

また、PCR 酵素には KAPA3G Plant PCR Kit (日本ジェネティクス) を使用した。以下に、

matK 領域の増幅～遺伝子解析の流れについて記す。

PCR reaction mixture: water 23.3 μ L,

KAPA3G Plant PCR Buffer 25.0 μ L, primer sense & antisense (100 μ M) 0.15 μ L each,

KAPA3G polymerase 0.4 μ L, genome DNA 1 μ L (reaction volume: 50 μ L)

PCR condition: 95°C 3 min. -(95°C 20 sec. - 58°C 15 sec. - 72°C 30 sec.) x 40 cycle - 72°C 30 sec. - 4°C ∞

Instrument: iCycler (BioRad)

得られた増幅産物はアガロース電気泳動で解析し、単一バンドであることを確認したのち、ダイレクトシーケンシングに供した。

ダイレクトシーケンシングは、PCR 増幅産物を ExoStar (GE Healthcare) で処理したのち、標的領域の増幅に用いたプライマーを用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) でシーケンシングサイクル反応を行った。塩基配列解析には ABI PRISM 3130-Avant DNA sequencer, 80 cm キャピラリー、POP-7 ポリマー(ABI)を用い、データ解析には DNASIS-Mac v3.7 (Hitachi Software), Finch TV (Geospiza Inc.) を使用した。

C. 研究結果

C-1. サンショウについて

文献・データベース調査結果

サンショウの遺伝子鑑別に関する *Zanthoxylum* 属植物の遺伝子鑑別に関連する情報は文献の項に記した。

Ref. 1 に、生薬基原植物の遺伝子鑑別に用いられる核リボソーマル DNA (nrDNA) ITS 領域の種間多型によりサンショウとイヌザンショウの鑑別が可能との報告があったので、モデル試料について同領域の配列情報を取得し、解析することとした。

遺伝子情報検索結果

DDBJ において登録配列をキーワード”*zanthoxylum piperitum*”で検索した結果、2014 年 1 月時点で hit 数は 24 件で、その内訳

は、ITS: 18 件、*trnL-trnF*: 5 件、*rbcL*: 1 件であった。

一方“*Zanthoxylum schinifolium*” (イヌザンショウ) で検索した結果、hit 数は 88 件で、同様にその内訳は、ITS: 20 件、*trnL-trnF*: 4 件、*agpSA*: 20 件、*agpSB*: 6 件、*agpL*: 33 件、*GBSSI*: 5 件であった。

他の主要な *Zanthoxylum* 属の hit 数は以下のとおりであった。*Z. ailanthoides*: 500 件; *Z. schinifolium*: 88 件; *Z. monophyllum*: 26 件; *Z. nitidum*: 24 件; *Z. piperitum*: 24 件; *Z. armatum*: 14 件; *Z. bungeanum*: 14 件; *Z. simulans*: 14 件; *Z. capense*: 12 件; *Z. gillettii*: 12 件。

これらの遺伝子領域のうち、*Z. piperitum* と *Z. schinifolium* の両者において情報量が多い、ITS 領域を遺伝子鑑別の解析対象領域とした。

データベースに登録されているサンショウ属植物 ITS 領域の塩基配列の解析

データベース(DDBJ)において“*Zanthoxylum*”をキーワードとして検索を行い、hit した塩基配列のうち、核リボソーマル DNA (nrDNA) ITS(ITS1-ITS2)領域カバーしているものを選び、分子系統樹解析を行った。その結果、図 1 に示すように各配列は植物種別に独立したクレードを形成した。本領域はサンショウ属植物の遺伝子鑑別に有用と考えられる。

ITS 領域解析予備実験

サンショウモデル試料(NIB-247)より果皮 2 個を混合し、ゲノム DNA を調製し、ITS 領域の増幅、塩基配列解析を行った。その結果、PCR 増幅産物はシングルバンドであったが、ダイレクトシーケンスの波形に混合塩基が認められた。

そこで、同じ検体 (NIB-247) の 1 粒のみを試料(NIB-247-3, NIB-247-4)として同様に解析を行ったところ、2 粒を試料とした場合と同様の波形の混合が認められた。

なお、これらの増幅産物をそれぞれクローニングし、塩基配列を解析したところ、NIB-247-4 においては、単一なタイプの配列のみ得られた

(表 2)。この結果は、クローニングの場合は選択するコロニーによってすべての配列タイプが網羅されないことを示す。

サンショウ(NIB-247)において、塩基の混合は 1 検体 (1 個体) の植物において生じていることが明らかになったので、以後、各検体 1 個の果皮を検体としてゲノム DNA の調製、そして ITS 領域の解析を行うこととした。

サンショウモデル生薬 ITS 領域の PCR 増幅及び塩基配列解析

[PCR 増幅] 一部のサンプルを除き、通常の KOD-plus の反応条件で ITS1-ITS2 領域の増幅産物が得られたのでダイレクトシーケンシングに供した。一部、増幅産物が得られない、サイズが小さい、ITS 領域と思われるものの他にバンドを生じる等のサンプルについては、それぞれ試料の追加サンプリング、ゲノム DNA の調製、PCR を行った。

[塩基配列解析] ダイレクトシーケンシングで両鎖について解析を行ったところ、解析結果 (波形データ) は、下記の 3 タイプに分かれた。

- ①ノイズの少ない波形データが得られるもの、
- ②鋳型にバクテリア由来等の ITS 類似のものが混入していたため、波形が乱れ、塩基の決定ができないもの、そして③一部波形が乱れるが、両鎖のデータを合わせると塩基の決定は可能なもの、の 3 種である。②については、別途試料のサンプリングを行い、再度データの取得を行った。③については一部 ambiguous な箇所が残る場合もあったが、基原植物鑑別の目的は達せられると考えられる。

シーケンス波形データが得られたモデル試料各検体について、DDBJ に登録されている *Z. piperitum* 由来 ITS の塩基配列と比較したところ、韓国産の試料は *Z. piperitum* 由来の ITS 領域の塩基配列、GU434276 及び、HM851464 とほぼ同一であった。また、国産の試料は上記の GU434276 及び、HM851464 と、同じく *Z. piperitum* 由来の JN226788 配列との塩基の混合によると考えられる波形パターンを示した。これらの混合塩基のパターンは 2 種の *Z.*

piperitum の交配によるものと考えられ、やはり *Z. piperitum* を基原とするものであると判断された。

NIB-627 (#3, #4) においてはサンショウの ITS よりも小さい増幅産物のみが得られた。塩基配列解析の結果、真菌類 *Xeromyces bisporus* 由来 ITS と一致した。

以上の解析結果を表 3 にまとめた。

今回解析に供した優先度の高い試料のうち、NIB626, 627, 628 の増幅効率が悪い、または真菌由来の ITS が優先的に増幅される傾向が認められ、これらは、試料の入手年が供試サンプルの中でも、2002 年と古いことに原因があるものと考えられる。

[系統樹解析] サンショウモデル試料由来の塩基配列の一部について、サンショウ属植物 ITS 領域の塩基配列と共に分子系統樹解析を行ったところ、これらはサンショウと同じクレードに分類された (図 2) ことから、これらはいずれもサンショウ *Z. piperitum* を基原とするものであることが確認された。

C-2. チモについて

文献・データベース調査結果

チモの遺伝子鑑別に関連する文献情報は文献の項に記した。

遺伝子情報検索結果

DDBJ において登録配列を検索し、遺伝子鑑別関連の登録データを抽出したものを表 2 にまとめた。2014 年 1 月時点で、キーワード“*anemarrhena asphodeloides*” & “DNA”の hit 数は 113 件であり、そのうち 108 件が *A. asphodeloides* 由来の DNA 配列情報であった。

葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域の増幅・解析

各検体より DNeasy Plant Mini Kit を用い調製したゲノム DNA を鋳型として KOD-plus により *trnL-trnF* 領域を増幅した。その結果、入手年の新しい検体では増幅産物が得られたのに対し、古い検体では増幅産物が得られない傾向が認められた (表 2)。

そこで、入手年の古い検体を中心に、ゲノム DNA の調製を Blood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic-tip 20/G を使用した方法に変更、そして、PCR を KAPA3G Plant PCR Kit を使用した反応系へ変更し、増幅産物が得られるか試みた。

その結果、一部の検体については genomic-tip/ KAPA3G の組み合わせで増幅産物が高効率に得られるようになったが、最終的に、6 種のモデル試料についてはいずれの検体についても PCR 増幅産物を得ることができなかった。これらについては、増幅領域のサイズの縮小や、ゲノム調製法そのものの見直しが必要と考えられる (表 3)。

増幅産物が得られたものについては、ゲル精製したのち、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を解析した。その結果、いずれの検体由来の配列も DDBJ 登録配列と同一、もしくは高い相同性を示し、いずれもハナスゲを基原とすることが確認された (表 4)。

C-3. サンヤクについて

文献・データベース調査結果

サンヤクの遺伝子鑑別に関する *Dioscorea* 属植物の遺伝子鑑別に関連する情報は文献の項に記した。

遺伝子情報検索結果

DDBJ において登録配列を検索し、遺伝子鑑別関連の登録データを抽出したものを表 2 にまとめた。2014 年 1 月時点で、キーワード“*dioscorea*” & “DNA”の hit 数は 4000 件を超えていた。そのうち、“*Dioscorea japonica*”として登録されている DNA、71 配列の領域別の出現頻度は、*matK*:16, *rbcL*:16, *psbA-trnH*:12, *microsatellite*:10, *trnL-trnF*:5; *atpB*: 4, 18S *rRNA*:3, *others*:5 であった。

“*Dioscorea polystachya*” & “DNA”: 12 件 (= *Dioscorea batatas*)

“*Dioscorea japonica*” & “DNA”: 83 件, このうち “*Dioscorea japonica* var. *pilifera*” 12 件

その他、*Dioscorea* 属植物の DNA 配列登録件

数は下記のとおり。

D. abyssinica: 500 件; *D. rotundata*: 445 件; *D. praehensilis*: 292 件; *D. bulbifera*: 286 件; *D. alata*: 164 件; *D. cayenensis*: 153 件; *D. polystachya*: 144 件; *D. tokoro*: 132 件; *D. zingiberensis*: 93 件。

葉緑体 DNA *matK* 領域 (部分配列) の増幅・解析

各検体より Blood and Cell Culture DNA Mini Kit, Genomic-tip 20/G を用い調製したゲノム DNA を鋳型として KAPA3G Plant PCR Kit により *matK* 領域部分配列を増幅した。その結果、NIB-568 の 2 検体を除く、すべての検体についてシングルバンドの増幅産物が得られた。NIB-568 については 2 検体とも、増幅産物が得られなかったため、(同一の 1 試料片から) 2 検体を追加調製し、上記キットを用いてゲノム DNA 調製を行ったが、これを鋳型とした場合も増幅産物は得られなかった。

本領域 (部分配列) のプライマー領域を含む予想増幅サイズは 1,137 bp (*AB557667: Dioscorea japonica chloroplast matK gene for maturase K, partial cds.* の場合) と比較的長いものであったが、増幅されたものについては、すべてダイレクトシーケンシングにより解析が可能であった。

解析の結果、NIB-456(#1, #2)由来の配列は、*D. alata* 由来の葉緑体 DNA *matK* 領域 (アクセッション No. AB040208) と一致した。

また、NIB-567(#1, #2, #3, #4)の配列は、BLAST(blastn)検索すると、*D. exalata*、*D. persimilis* が上位にヒットし、本試料が日本薬局方の規定外の植物を基原としていることが示唆された。

上記の 2 種のモデル試料の他は、*D. polystachya* 由来の葉緑体 DNA *matK* 領域 (アクセッション No. AB557663 及び AB624369) と一致し、日本薬局方でサンヤクの基原植物として規定されているナガイモを基原とするものであることが確認された。

なお、NIB-568 は皮なしのチョーク状の生薬であったが、この検体より調製したゲノム DNA を鋳型とした PCR は、KAPA3G Plant PCR

Kit を用いても増幅産物が得られず、解析不能であった。

以上の結果を表 3 にまとめた。

D. 考察

D-1. サンショウについて

ITS 領域は植物種間のみならず、bacteria や fungus 等でも高度に保存されており、PCR で増幅する場合、両者に由来する増幅産物が同時に得られることが多い。サンショウの場合においても、NIB-627 (#3, #4)において真菌類 *Xeromyces bisporus* 由来 ITS が増幅された。植物由来の ITS 領域を選択的に増幅するため、植物の ITS に特異性の高いプライマーの使用について検討が必要である。

真菌類等の由来の増幅産物は、上述のように基原植物の ITS 領域の解析の障害となる場合が多いが、生薬のカビや雑菌などによる汚染を検知する手法として活用することもできると考えられ、遺伝子情報を整備することにより、付着している生物種の特定も可能になると思われる。

D-2. チモについて

生薬チモからのゲノム DNA 調製において、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を使用した場合、多くの入手年の古い経年サンプルにおいて、*trnL-trnF* 領域の PCR 増幅が困難であった。これらのサンプルについては、Genomic-tip 20/G (QIAGEN)を用いる DNA 調製法の適用も試みたが、ほとんどの場合、増幅産物が得られなかった。このような古い検体からの PCR の鋳型となる品質のゲノム DNA の調製法の確立が課題である。

また、今回解析対象とした *trnL-trnF* 領域の塩基長は約 750 bp であり、経年試料由来のゲノム DNA を鋳型とする場合、増幅産物が得られにくいと考えられる。そのため、より短く、かつ同種または同属の植物と遺伝子多形を含むような遺伝子領域について遺伝子鑑別への利用を検討する必要がある。

D-3. サンヤクについて

今回供試した生薬サンヤク市場流通品の一部において、近縁の *Dioscorea* 属植物由来ではあるが、日本薬局方の規定する基原植物由来ではないと推定される塩基配列解析結果が得られた。今回の解析結果からは、中国における山薬（サンヤク）の多様性が伺える。

E. 結論

本年度は、サンショウ、チモ、サンヤクの3種の生薬について基原植物鑑別に関する情報の収集、ならびに各生薬のモデル生薬の遺伝子鑑別対象領域の塩基配列解析を行った。

サンショウについては、核リボソームDNA ITS領域(ITS1-ITS2)の解析を行った。解析に供したモデル生薬のITS領域の配列について、DDBJ登録の *Zanthoxylum* 属植物の同領域と分子系統樹解析を行った結果、いずれも *Z. piperitum* 由来の配列群と同じクレードに属することが明らかになった。すなわち、モデル生薬はいずれもサンショウ *Z. piperitum* を基原とするものであることが確認された。また今回、ITS領域のPCR産物をダイレクトシーケンシングにより塩基配列を解析したが、国産の検体の多数においては複数の塩基ポジションで2種の塩基の混合塩基となっている傾向が認められた。その一方で、韓国産の検体では混合塩基とならない傾向が認められ、この結果は、日本のサンショウの由来を考察するうえで興味深い。

チモについては、葉緑体DNA *trnL-trnF* 領域の解析を行った。PCR増幅産物が得られた検体について塩基配列解析を行ったところ、いずれもハナスゲ *Anemarrhena asphodeloides* を基原とするものであることが確認された。なお、経年試料についてはPCR増幅産物を得ることができなかつたため、これらについては、引き続き、DNA調製法及び、標的配列の増幅法の検討が必要である。

サンヤクについては、葉緑体DNA *matK* 領域の一部を解析対象とした。対象領域をPCR増幅し、その塩基配列を解析したところ、DDBJ登録配列との比較により、一部、日本薬局方で基

原植物として規定されていない *Dioscorea* 属植物由来の配列と一致する配列型を示すものがあることが明らかになった。これは中国における山薬（サンヤク）の多様性を示すものと考えられる。

以上の塩基配列解析及び基原植物鑑別結果は、データベースの遺伝子鑑別情報のカテゴリに収載される。

F. 文献

(サンショウ関連の文献)

サンショウとイヌザンショウの遺伝子鑑別

Ref. 1) Sun, Y.-L., Park, W.-G., Kwon O.-W., and Hong, S.-K., The internal transcribed spacer rDNA specific markers for identification of *Zanthoxylum piperitum*, *African J. of Biotechnol.* **9**, 6027-6039 (2010)

概要：サンショウ (*Zanthoxylum piperitum*) とイヌザンショウ (*Zanthoxylum sichinifolium*) を鑑別するために、両植物の核リボソームDNA(nrDNA)のITS領域を解析し、イヌザンショウとは反応しない、サンショウ特異的なプライマーの設計を行った。

ITS領域によるカホクザンショウの鑑別

Ref. 2) Shen J, Ding XY, Zhang WM, Bao SL, Chang J, Tang F. [Authentication of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim population and adulterants by analysis of rDNA ITS sequences]. *Yao Xue Xue Bao.* 2005 Jan;**40**(1):80-6. [Article in Chinese]

カラスザンショウの遺伝子マーカー関連

Ref. 3) Kamiya K, Moritsuka E, Yoshida T, Yahara T, Tachida H. High population differentiation and unusual haplotype structure in a shade-intolerant pioneer tree species, *Zanthoxylum ailanthoides* (*Rutaceae*) revealed by analysis of DNA polymorphism at four nuclear loci. *Mol Ecol.* 2008 May;**17**(10):2329-38. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03756.x. Epub 2008 Apr 21. PubMed PMID: 18429965.

Ref. 4) Nagai H, Yoshida T, Kamiya K, Yahara T, Tachida H. Development and characterization of

microsatellite markers in *Zanthoxylum ailanthoides* (Rutaceae). *Mol Ecol Resour.* 2009 Mar;**9**(2): 667-9. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02507.x. Epub 2009 Jan 31. PubMed PMID: 21564723.
Ref. 5) Yoshida T, Nagai H, Yahara T, Tachida H. Genetic structure and putative selective sweep in the pioneer tree, *Zanthoxylum ailanthoides*. *J Plant Res.* 2010 Jul;**123**(4):607-16. doi: 10.1007/s10265-009-0287-8. Epub 2009 Dec 25. PubMed PMID: 20035437.

(チモ関連の文献)

Ref. 1) Jigden B, Wang H, Samdan N, Yang DC. Molecular identification of oriental medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge ('Jimo') by multiplex PCR. *Mol Biol Rep.* 2010 Feb;**37**(2):955-60. doi: 10.1007/s11033-009-9747-4. Epub 2009 Aug 18. PubMed PMID: 19688267.

(概要) 葉緑体DNA *trnL-trnF*領域の遺伝子多型(SNP)を利用した*Anemarrhena asphodeloides* 種内の韓国国内における産地の異なる個体の識別に関する研究。

(サンヤク関連の文献)

SSR, ISSR, Microsatellite

Ref. 1) Wellington F, Nascimento, Jucelene F, Rodrigues, Samantha Koehler, Paul Gepts, Elizabeth A. Veasey. Spatially structured genetic diversity of the Amerindian yam (*Dioscorea trifida* L.) assessed by SSR and ISSR markers in Southern Brazil

Genetic Resources and Crop Evolution, December 2013, Volume **60**, Issue 8, pp 2405-2420

Ref. 2) Yan QQ, Sun XQ, Guo JL, Hang YY, Li MM. Development of polymorphic microsatellite markers for *Dioscorea zingiberensis* and cross-amplification in other *Dioscorea* species. *Genet Mol Res.* 2013 Sep 19;**12**(3):3788-92. doi: 10.4238/2013. September.19.10. PubMed PMID: 24085440.

Ref. 3) Siqueira MV, Marconi TG, Bonatelli ML, Zucchi MI, Veasey EA. New microsatellite loci for

water yam (*Dioscorea alata*, *Dioscoreaceae*) and cross-amplification for other *Dioscorea* species. *Am J Bot.* 2011 Jun;**98**(6):e144-6. doi: 10.3732/ajb.1000513. Epub 2011 May 27. PubMed PMID: 21653503.

Ref. 4) Viruel J, Catalán P, Segarra-Moragues JG. New microsatellite loci in the dwarf yams *Dioscorea* group Epipetrum (*Dioscoreaceae*). *Am J Bot.* 2010 Nov;**97**(11):e121-3. doi: 10.3732/ajb.1000304. Epub 2010 Oct 8. PubMed PMID: 21616813.

Ref. 5) Arnau G, Nemorin A, Maledon E, Abraham K. Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L. (*Dioscoreaceae*) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. *Theor Appl Genet.* 2009 May;**118** (7):1239-49. doi: 10.1007/s00122-009-0977-6. Epub 2009 Mar 1. PubMed PMID: 19253018.

Ref. 6) Wu Z, Leng C, Tao Z, Wei Y, Jiang C. [Genetic diversity of *Dioscorea alata* based on ISSR analysis]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2009 Dec;**34**(23):3017-20. Chinese. PubMed PMID: 20222414.

Ref. 7) Bousalem M, Arnau G, Hochu I, Arnolin R, Viader V, Santoni S, David J. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the *Dioscoreae*. *Theor Appl Genet.* 2006 Aug;**113**(3):439-51. Epub 2006 Jun 15. PubMed PMID: 16775695.

Ref. 8) Zhou YQ, Jing JZ, Li ZY, Hao J, Jia JF, Zhang BH, Hao JG. [Genetic diversity of yam (*Dioscorea opposita* Thunb) detected by ISSR markers]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 2005 Aug;**38**(4):324-30. Chinese. PubMed PMID: 16231699.

Ref. 9) Chair H, Perrier X, Agbangla C, Marchand JL, Dainou O, Noyer JL. Use of cpSSRs for the characterisation of yam phylogeny in Benin. *Genome.* 2005 Aug; **48**(4):674-84. PubMed PMID: 16094435.

Ref. 10) Terauchi R, Konuma A. Microsatellite

polymorphism in *Dioscorea tokoro*, a wild yam species. *Genome*. 1994 Oct;**37**(5):794-801. PubMed PMID: 8001812.

matK region

Ref. 11) Sun XQ, Zhu YJ, Guo JL, Peng B, Bai MM, Hang YY. DNA barcoding the *Dioscorea* in China, a vital group in the evolution of monocotyledon: use of *matK* gene for species discrimination. *PLoS One*. 2012;**7**(2):e32057. doi: 10.1371/journal.pone.0032057. Epub 2012 Feb 20. PubMed PMID: 22363795; PubMed Central PMCID: PMC3282793.

ITS region

Ref. 12) Munirah S. *et al.* Internal Transcribed Spacer (ITS) as a Molecular Marker for Identification of *Dioscorea hispida* Dennst. (*Dioscoreaceae*). *J. Agrobiotech*. **3**, 47-55 (2012)

EST (Expressed Sequence Tag)

Ref. 13) Narina SS, Buyyarapu R, Kottapalli KR, Sartie AM, Ali MI, Robert A, Hodeba MJ, Sayre BL, Scheffler BE. Generation and analysis of expressed sequence tags (ESTs) for marker development in yam (*Dioscorea alata* L.). *BMC Genomics*. 2011 Feb 9;**12**:100. doi: 10.1186/1471-2164-12-100. PubMed PMID: 21303556; PubMed Central PMCID: PMC3047301.

AFLP, RAPD

Ref. 14) Li YH, Li XM. [Exploring genetic diversity in *Dioscorea zingiberensis* by amplified fragment length polymorphism molecular markers]. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao*. 2007 Aug;**33**(4):341-8. Chinese. PubMed PMID: 17675758.

Ref. 15) Dixit S, Mandal BB, Ahuja S, Srivastava PS. Genetic stability assessment of plants regenerated from cryopreserved embryogenic tissues of *Dioscorea bulbifera* L. Using RAPD,

biochemical and morphological analysis. *Cryo Letters*. 2003 Mar-Apr;**24**(2):77-84. PubMed PMID: 12819828.

Ref. 16) Mignouna D, Mank A, Ellis N, Van Den Bosch N, Asiedu R, Ng C, Peleman J. A genetic linkage map of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) based on AFLP markers. *Theor Appl Genet*. 2002 Oct;**105**(5):716-725. Epub 2002 Jun 19. PubMed PMID: 12582485.

Ref. 17) Mignouna D, Mank A, Ellis N, Van Den Bosch N, Asiedu R, Abang M, Peleman J. A genetic linkage map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. *Theor Appl Genet*. 2002 Oct;**105**(5):726-735. Epub 2002 Jun 14. PubMed PMID: 12582486.

Ref. 18) Innan H, Terauchi R, Kahl G, Tajima F. A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. *Genetics*. 1999 Mar;**151**(3):1157-64. PubMed PMID: 10049931; PubMed Central PMCID: PMC1460529.

Ref. 19) Ramser J, Weising K, Terauchi R, Kahl G, Lopez-Peralta C, Terhalle W. Molecular marker based taxonomy and phylogeny of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* - *D. cayenensis*). *Genome*. 1997 Dec;**40**(6):903-915. PubMed PMID: 18464876.

Ref. 20) Ramser J, Weising K, Kahl G, Lopez-Peralta C, Wetzler R. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. *Genome*. 1996 Feb;**39**(1):17-25. PubMed PMID: 18469875.

Chloroplast Genome Sequence

Ref. 21) Hansen DR, Dastidar SG, Cai Z, Penafior C, Kuehl JV, Boore JL, Jansen RK. Phylogenetic and evolutionary implications of complete chloroplast genome sequences of four early-diverging angiosperms: *Buxus* (*Buxaceae*), *Chloranthus* (*Chloranthaceae*), *Dioscorea* (*Dioscoreaceae*), and *Illicium* (*Schisandraceae*).

MolPhylogenet Evol. 2007 Nov;**45**(2):547-63.
Epub 2007 Jun 16. PubMed PMID: 17644003.

G. 研究発表

1. 学会発表

無し

Other Molecular markers

Ref. 22) Terauchi R, Terachi T, Miyashita NT.
DNA polymorphism at the *Pgi* locus of a wild yam,
Dioscorea tokoro. *Genetics*. 1997
Dec;**147**(4):1899-914. PubMed PMID: 9409845;
PubMed Central PMCID: PMC1208355.

2. 論文発表

無し

H. 知的財産権の出願，登録状況

無し

(図表) サンショウの部

表1. 生薬サンショウ 市場流通品モデル試料一覧

優先度	管理番号	ロット番号	モデル試料提供時形態	産地	等級等	提供施設	導入年月日	モデル試料入手年
A	NIB-0247	111	原形	日本		A社	20-Jul-11	2011
A	NIB-0274		刻み	奈良県、和歌山県		B社		
A	NIB-0429		原形	日本奈良県	朝倉	C社		2010
A	NIB-0457		生	日本		D社		2008
A	NIB-0595	53-10711	生	奈良県、和歌山県	朝倉	E社	23-Jan-12	2011
B	NIB-0596	53-10726	生	日本高知県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2011
B	NIB-0597	53-11112A	生	日本岐阜県	小粒青	E社	23-Jan-12	2011
C	NIB-0598	53-11112B	生	日本岐阜県	小粒混	E社	23-Jan-12	2011
C	NIB-0599	53-11112C	生	日本岐阜県	小粒赤	E社	23-Jan-12	2011
C	NIB-0600	53-11112D	生	日本岐阜県	小粒にぎり	E社	23-Jan-12	2011
B	NIB-0601	53-00726	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2010
C	NIB-0602	53-00726	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2010
C	NIB-0603	53-01015	生	日本岐阜県	小粒	E社	23-Jan-12	2010
C	NIB-0604	53-00720	生	奈良県、和歌山県	朝倉	E社	23-Jan-12	2010
C	NIB-0605	53-00727	生	日本高知県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2010
C	NIB-0606	53-90716	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2009
C	NIB-0607	53-90716	生	奈良県、和歌山県	ブドウ種抜	E社	23-Jan-12	2009
C	NIB-0608	53-90720	生	奈良県、和歌山県	朝倉	E社	23-Jan-12	2009
C	NIB-0609	53-91015	生	日本岐阜県	小粒	E社	23-Jan-12	2009
B	NIB-0610	53-36901	生	韓国		E社	23-Jan-12	2008
C	NIB-0611	53-80808	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2008
C	NIB-0613	53-80707	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2008
C	NIB-0614	53-80707	生	奈良県、和歌山県	朝倉	E社	23-Jan-12	2008
C	NIB-0615	53-80714	生	奈良県、和歌山県	朝倉	E社	23-Jan-12	2008
C	NIB-0616	53-81004	生	日本岐阜県	小粒青	E社	23-Jan-12	2008
B	NIB-0618	53-3459A	生	韓国	種抜	E社	23-Jan-12	2007
C	NIB-0619	53-60804	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2006
B	NIB-0620	53-32071	生	韓国		E社	23-Jan-12	2006
C	NIB-0621	53-50804	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2006
C	NIB-0622	53-51007	生	日本岐阜県	小粒青	E社	23-Jan-12	2005
C	NIB-0623	53-30730	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2003
C	NIB-0624		生	奈良県、和歌山県	朝倉	E社	23-Jan-12	2003
C	NIB-0625		生	奈良県、和歌山県	朝倉種抜	E社	23-Jan-12	2003
B	NIB-0626	53-2277	生	韓国		E社	23-Jan-12	2002
B	NIB-0627	53-2275	生	韓国		E社	23-Jan-12	2002
B	NIB-0628	53-2077	生	韓国		E社	23-Jan-12	2002
C	NIB-0629	53-00922	生	日本岐阜県	小粒青	E社	23-Jan-12	2000
C	NIB-0630	53-00922	生	日本岐阜県	小粒混	E社	23-Jan-12	2000
C	NIB-0631		生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	1997
A	NIB-0750		原形	日本		F社	27-Feb-12	
なし	NIB-0594	53-10802	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2011
なし	NIB-0612	53-80707	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2008
なし	NIB-0617	53-70803	生	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	23-Jan-12	2007
なし	NIB-0632		生	日本兵庫県	朝倉	E社	23-Jan-12	1996

図1. データベース(DDBJ)登録 *Zanthoxylum* 属植物由来ITS領域の分子系統樹

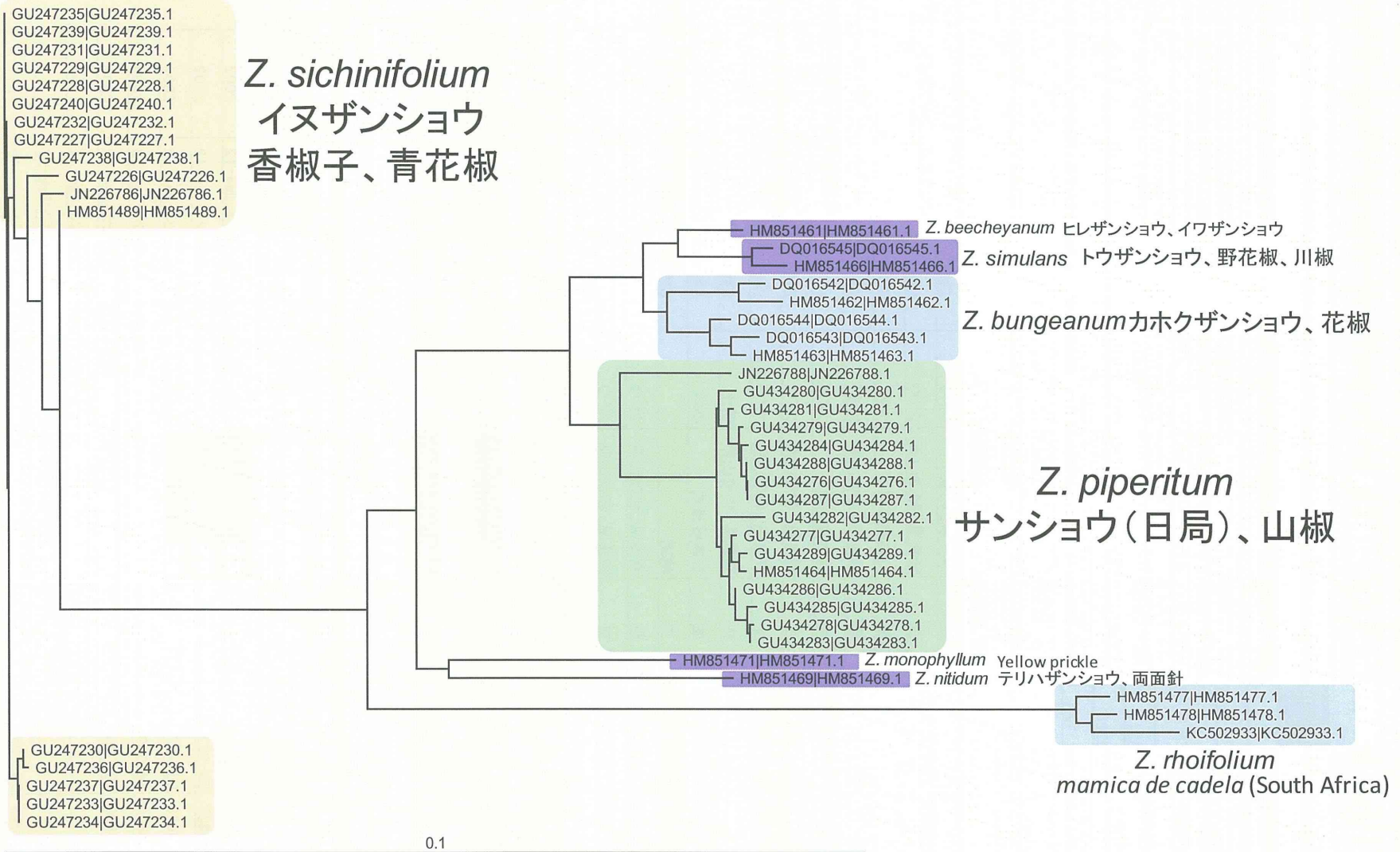


表2. モデル試料NIB-247のITS領域解析結果（予備実験）

NIB-247-3(1粒サンプル)に見られるITS領域のバリエーション													
Clone ID	102	112	113	114	143	170	185	261	85	240	562	622	654
247-3-1	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-3-2	T	T	T	G	T	T	C	C	T	G	G	C	C
247-3-3	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-3-4	T	T	T	G	T	T	C	C	T	G	G	C	C
247-3-5	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-3-6	C	C	G	T	T	T	C	C	T	G	G	C	C
247-3-7	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-3-8	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-3-direct	C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T>G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C

NIB-247-4(1粒サンプル)に見られるITS領域のバリエーション													
Clone ID	102	112	113	114	143	170	185	261	85	240	562	622	654
247-4-1	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-4-2	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-4-3	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-4-4	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-4-5	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-4-6	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-4-7	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-4-8	C	C	G	T	C	C	T	T	T	G	G	C	C
247-4-direct	C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T>G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C

塩基番号はITS5 primerの1塩基目を1番目とした

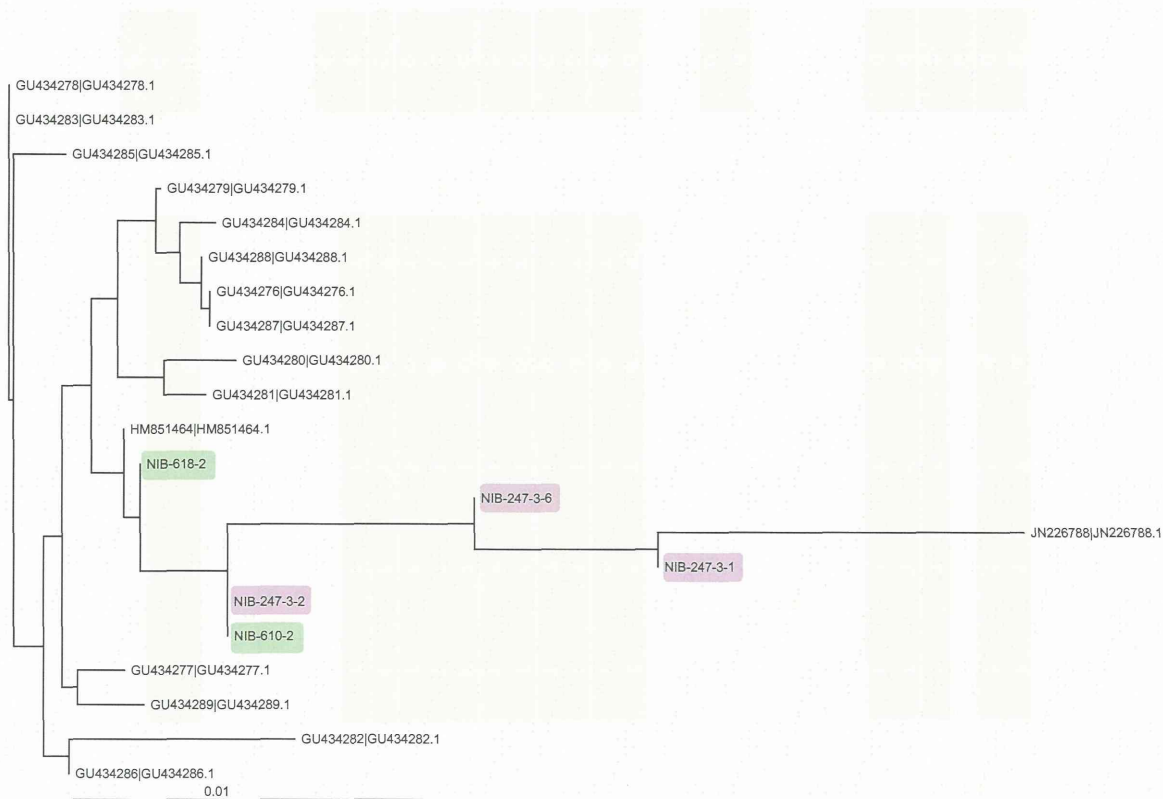


図2. モデル試料を含む、サンショウ(*Z. piperitum*)由来ITS領域の分子系統樹

NIB-610-2, NIB-618-2は韓国産の検体、NIB-247-3は国産の検体である。赤色で示すNIB-247由来の配列は、サンショウ1果実から得られた配列タイプ（3タイプ）である。

表3. 解析済みサンショウモデル試料のITS領域の主な変異点のまとめ

Sample ID	産地	等級等	提供施設	入手年	102	112	113	114	143	170	185	261	85	240	562	622	654
247-3	日本	A社	2011	C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T>G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C	
247-4				C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T>G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C	
274-1	奈良県、和歌山県	B社	2011	T	T	T	G	T	C	C	T/C(T>C)	T	G	G	C	C/T(C=T)	
274-2				T	T	T	G	T	C	C	T/C(T=C)	T	G	G	C	T/C(T>C)	
429-1	日本奈良県	朝倉	C社	2010	C/T(C=T)	T/C(T=C)	T/G(T=G)	G/T(G=T)	T/C(T=C)	C	C	T	T	A/G(A>G)	G	C	C/T(C=T)
429-2					T	T	T	G	T	C	C	T/C(T>C)	T	G	G	C	T/C(T=C)
457-1	日本	D社	2008	T	T	T	G	T	C/T(C=T)	C	C/T(C>T)	T/C(T>C)	G	G/A(G>A)	C	C	
457-2				T	T	T	G	T	C/T(C=T)	C	C/T(C>T)	T/C(T>C)	G	G/A(G>A)	C	C	
595-1	奈良県、和歌山県	朝倉	E社	2011	C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T>G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C
595-2					T/C(T=C)	T/C(T=C)	T/G(T=G)	G/T(G=T)	T/C(T=C)	C/T(C>T)	T/C(T=C)	T/C(T>>C)	T	G	G	C	C
596-1	日本高知県	ブドウ	E社	2011	C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T=G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C
596-2					C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T=G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C
597-1	日本岐阜県	小粒青	E社	2011	C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T=G)	C/T(C>T)	C	C	T/C(T>>C)	T	A/G(A>G)	G	C	C/T(C>T)
597-2					T/C(T>C)	T/C(T>C)	T/G(T>G)	G/T(G>T)	T/C(T>C)	C/T(C=T)	C	T/C(T>C)	T	G/A(G>A)	G	C	C/T(C>T)
601-1	奈良県、和歌山県	ブドウ	E社	2010	C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T=G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C
601-2					C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T=G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C
610-1	韓国	E社	2008	T	T	T	G	T	C	C	T/C(T>>C)	T	G	G	C	C	
610-2				T	T	T	G	T	C	C	C	T	G	G	C	C	
618-1	韓国	種抜	E社	2007	T	T	T	G	T	C	C	T/C(T>C)	T	G	G	T/C(T=C)	C
618-2					T	T	T	G	T	C	C	T	T	G	G	C	C
620-1	韓国	E社	2006	T	T	T	G	T	C	C	T	T	G	G	C	T/C(T>C)	
620-2				T	T	T	G	T	C	C	T	T	G	G	C	C	
626-1	韓国	E社	2002	T	T	T	G	T	C	C	T/C(T>C)	T	G/A(G>>A)	G	C/T(C>T)	T/C(T=C)	
626-3				T	T	T	G	T	C	C	T	T	G	G	C	T	
626-4				T	T	T	G	T	C	C	T/C(T>C)	T	G/A(G>>A)	G	C/T(C=T)	T/C(T=C)	
627-1(amb)				T	T	T	G	T	C	C	T	T	G	G	C	C	
628-5	韓国	E社	2002	T	T	T	G	T	C	C	T	T	G	G	C	C	
628-6				T/C(T>C)	T/C(T>C)	T/G(T=G)	G/T(G>T)	T/C(T>C)	C	C	T	T	G/A(G>A)	G	C	C	
750-1	日本	F社	2011	C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T=G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C	
750-2				C/T(C>T)	C/T(C>T)	G/T(G>T)	T/G(T=G)	C/T(C>T)	C/T(C>T)	T/C(T>C)	T/C(T>C)	T	G	G	C	C	
Accession					102	112	113	114	143	170	185	261	85	240	562	622	654
GU434276	<i>Zanthoxylum piperitum</i> , Korean group, CDGN1				T	T	T	G	T	C	C	N	T	G	G	N	N
HM851464	<i>Zanthoxylum piperitum</i> , Korean group, PIPE				T	T	T	G	T	C	C	T	T	G	G	C	C
JN226788	<i>Zanthoxylum piperitum</i> , Jeju Island				C	C	G	T	C	C	C	T	T	A	G	C	C

塩基番号はITS5 primerの1塩基目を1番目とした

(図表) チモの部

表1. 生薬チモ 市場流通品モデル試料一覧

管理番号	モデル試料提供時形態	産地	等級等	提供施設	導入年月日	モデル試料入手年
NIB-0259	刻み	中国河北省		A社		
NIB-0410	原形	中国内蒙古自治区	野生	B社		2009
NIB-0411	原形	中国河北省		B社		2011
NIB-0453	生	中国河北省		C社		2004
NIB-0523	生	中国河北省		D社	13-Jan-12	2011
NIB-0524	生	中国河北省	毛	D社	13-Jan-12	2011
NIB-0525	生	中国河北省		D社	13-Jan-12	2010
NIB-0526	生	中国河北省		D社	13-Jan-12	2010
NIB-0527	生	中国河北省		D社	13-Jan-12	2009
NIB-0528	生	中国河北省	毛	D社	13-Jan-12	2006
NIB-0529	生	中国河北省		D社	13-Jan-12	2005
NIB-0530	生	中国河北省	光1級	D社	13-Jan-12	2005
NIB-0531	生	中国河北省	光1級	D社	13-Jan-12	2003
NIB-0532	生	中国河北省	光1級	D社	13-Jan-12	2002
NIB-0533	生	中国河北省	毛	D社	13-Jan-12	1995
NIB-0745	原形	中国河北省		E社	27-Feb-12	

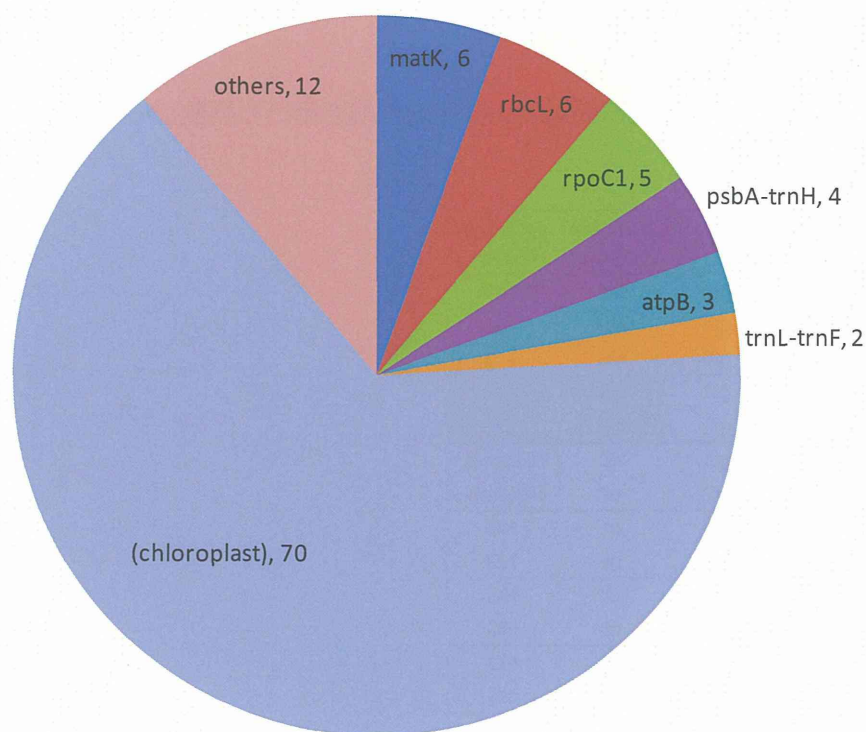


図1. *Anemarrhena asphodeloides*由来DDBJ登録配列の領域別登録数 (総数108件)