

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-175044  
(P2007-175044A)

(43) 公開日 平成19年7月12日(2007.7.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 3 書面 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2005-381374 (P2005-381374)	(71) 出願人	504224153 国立大学法人 宮崎大学 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
(22) 出願日	平成17年12月28日 (2005.12.28)	(71) 出願人	305062653 WHR株式会社 渡邊商会 宮崎県西都市大字山田1489番地38
		(74) 代理人	240000039 弁護士 弁護士法人 衛藤法律特許事務所
		(72) 発明者	長友 由隆 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 国立大学法人 宮崎大学内
		(72) 発明者	佐伯 雄一 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 国立大学法人 宮崎大学内

最終頁に続く

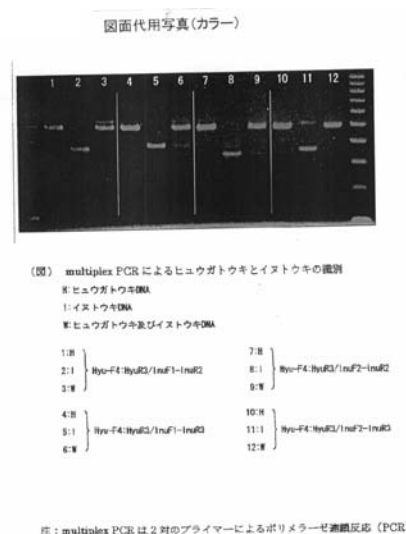
(54) 【発明の名称】 DNA多型解析法によるヒュウガトウキの迅速識別キット及び迅速識別方法

(57) 【要約】

【課題】 利用価値の高いヒュウガトウキを、簡便な方法で迅速に検知するヒュウガトウキの迅速識別キットを提供する。

【解決手段】 トウキ類のDNAについてPCR法を用いてDNA多型を比較し、ヒュウガトウキに特有のDNAマーカーを特定し、その特定したDNAマーカーを増幅するプライマーを設計し得られたプライマーを用いてサンプルDNAからDNAマーカーを直接増幅し、その増幅産物を電気泳動させ特有のバンドの有無からヒュウガトウキの識別する。DNAマーカーを増幅する設計したプライマーと、PCR試薬とでヒュウガトウキの識別用キットが構成される。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被識別体であるトウキを抽出して得られた DNA から、該トウキ特有の DNA マーカーを特定して設計し、得られたプライマーセットと、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 用試薬とからなるヒュウガトウキの迅速識別キット。

**【請求項 2】**

前記プライマーセットは、配列番号 3 で表されるプライマーと、配列番号 4 で表されるプライマーの組合せからなるプライマーのセット、及び配列番号 5 または配列番号 6 で表されるプライマーと、配列番号 7 または配列番号 8 で表されるプライマーの何れかの組合せからなるプライマーセットで構成されることを特徴とする請求項 1 記載のヒュウガトウキの迅速識別キット。 10

**【請求項 3】**

請求項 1 乃至 2 に記載の識別キットを用い、非識別体であるトウキをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅産物を検出することにより識別を行なうことを特徴とするヒュウガトウキの迅速識別方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、セリ科の多年生草本植物であるヒュウガトウキを、簡便な方法で迅速に識別する識別キット及び識別方法に関するものである。 20

**【背景技術】****【0002】**

ヒュウガトウキ (*Angelica furcicajuga* Kitagawa) は宮崎県下にのみ自生するセリ科の多年生草本植物で、日本薬局方の生薬「トウキ」に該当する。古来ヒュウガトウキはトウキの中でも薬効が高く評価されているが、地域的には交雑もあり、種が多岐にわたっているため市場ではトウキの選別がされずヒュウガトウキはトウキとして扱われされている。

**【0003】**

従来、これらトウキの識別方法としては、植物体 (茎葉) の形質 (外観) に基づく識別法が採られていたが、確実性に欠けるという欠点があった。また識別を行なうためには高度な植物分類学的知識や経験を必要としたが、利用価値の高い部位である根に関しては全く識別ができないという欠点を有していた。 30

**【0004】**

植物の品種識別法として、DNA 塩基配列の差異を検出する方法が開発され、例えば RAPD 法、CAPS 法、RFLP 法等があるが、ヒュウガトウキと他のトウキとを迅速に識別できる識別キットはいまだ開示されていない。

**【0005】**

そこで、本発明者らは PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いた系統解析によるヒュウガトウキの系統分類を行ない分子生物学的観点から他のトウキとの系統分類を行なった (非特許文献 1 参照。 )。 40

**【0006】**

【非特許文献 1】熊本 典晃ら 6 名、「ヒュウガトウキとイヌトウキの DNA 多型解析による系統分類」、日本土壤肥料学会九州支部秋季例会予講集、平成 17 年 9 月、p 6 4

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0007】**

上記非特許文献において、PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic) 法を用いて得られた多型バンドから系統樹を作成したところ、特定領域においてヒュウガトウキと他のトウキとが異なるバンドパ 50

ターンを示すことを見出した。

【0008】

そこで本発明者らは、ヒュウガトウキと他のトウキの特定領域において多型解析を行い鋭意研究の結果、当該特定領域の塩基配列から各トウキの特異的なプライマーセットを設計し、該プライマーセットを用いヒュウガトウキと他のトウキとを迅速識別できる識別キットとこの識別キットを用いたヒュウガトウキの迅速識別方法を提供するにいたった。

【課題を解決するための手段】

【0009】

このため本発明は、被識別体であるトウキより抽出して得られたDNAから、該トウキ特有のDNAマーカーを特定して設計し、得られたプライマーセットと、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用試薬とからなるヒュウガトウキの迅速識別キットであることを第1の特徴とする。

10

【0010】

また、前記プライマーセットは、配列番号3で表されるプライマーと、配列番号4で表されるプライマーの組合せからなるプライマーのセット、及び配列番号5または配列番号6で表されるプライマーと、配列番号7または配列番号8で表されるプライマーの何れかの組合せからなるプライマーセットで構成されることを第2の特徴とする。

【0011】

そして、請求項1乃至2に記載の識別キットを用い、非識別体であるトウキをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅産物を検出することにより識別を行なうことを第3の特徴とする。

20

【0012】

尚、プライマーの設計の際に特定した領域としては、18S-26SrDNAITS領域が望ましく、該領域のDNAをサブクロニングしサイクルシーケンスを行なうことによって識別対象であるトウキ特有の塩基配列を見出し、プライマーを設計する。

【0013】

そして、ヒュウガトウキを識別する際には、未確認のトウキサンプルから抽出したDNAを、前記設計したプライマーセットとPCR試薬からなるプライマーキットによりPCR増幅を行ない、電気泳動によりヒュウガトウキ特有のバンドパターンの有無を確認する。

30

【発明の効果】

【0014】

本発明に係るヒュウガトウキの迅速識別キット及び識別法によれば、DNA多型分析によって薬効の高いヒュウガトウキを確実に識別できると共に、生薬市場での差別化がはかれ品質保証となるという優れた効果を有する。

【0015】

また、トウキ特有の塩基配列から各トウキ識別用のプライマーセットを設計することによって、当該トウキの識別が迅速にできるプライマーキットを提供できるという効果を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0016】

以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明が本実施例に限定されないことは言うまでもない。本発明において、識別するトウキとしては、ヒュウガトウキ(Angelica furcijuga Kitagawa)、ニホントウキ(Angelica acutiloba Kitagawa)、イヌトウキ(Angelica shikokiana Makino)などが挙げられ、各トウキの新葉約0.05gからDNA抽出キットISOPLANTII(NIPPON GENE製)を用いてDNAを抽出した。そして各トウキのDNAの18S-26SrDNAITS領域のシーケンスを行い塩基配列を決定し、得られた塩基配列から各トウキ特有のプライマーセットを設計する。尚、本実施例においては、DNAのサブクロニングを行った試料についてシーケンスを

50

行なった。またニホントウキに関しては、日本DNAデータバンク ( D D B J ) を用いて塩基配列データを取得した。

【実施例】

【0017】

( DNA の精製 )

18S - 26SrDNAITS領域のDNAサンプルは、各トウキDNAをPCR増幅した18S - 26SrDNAITS領域のDNAを電気泳動し、UVトランスイルミネータ上で得られたバンドゲルを切り出し、精製したものを使用する。すなわち、PCR増幅した18S - 26SrDNAITS領域のDNAを電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色し、UVトランスイルミネータ上で得られたバンドゲルを切り出し、蓋と底に穴を設けた0.5mlPCRチューブに入れ1.5mlマイクロチューブに重ね、8,000rpmで5分間遠心する。そしてゲルが下段のマイクロチューブに落下後、等量の平衡化中性フェノールを加え内容物をよく混合し-80の冷蔵庫内で30分間放置する。その後室温にて融解し15,000rpmで5分間遠心し分画された水層を新しいマイクロチューブに移し、等量のPCI (平衡化フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール) を加えボルテックスにかけ、15,000rpmで5分間遠心する。次に水層 (上層) を新しいマイクロチューブに移し、1/10量の3M酢酸ナトリウム、等量のイソプロパノールを加え4、15,000rpmで20分間遠心しDNAをペレットとする。さらに上清を捨て、70%エタノールを1ml加えボルテックスにて攪拌しペレットの洗浄を行い、4、15,000rpmで2分間遠心し、上精をマイクロピペットにて捨て減圧乾燥で水分を完全に除去し、乾燥後10μlのTEに溶解しDNAサンプルとする。

10

20

【0018】

( DNA サンプルのサブクローニング )

上記で精製したDNAサンプルのサブクローニングを行い、さらにサイクルシーケンスを行なう。まずDNA ligation Kit ver. 2 (Takara製) を用いてT-vector (pBluescript II SK(+)) と上記精製したサンプルDNAのライゲーションを行なった。マイクロチューブにT-vectorを1μl、サンプルDNAを4μl、Solution Iを5μl加えピペティングし16で一晩インキュベートし、さらにSolution IIIを加えligation DNAとした。次に100μlのコンピテントセルをligation DNAに加え氷上で30分間静置した後42にて2分間ヒートショックを与え、トランスフォーメーションを行なった。そして2分間氷上に静置した後modified LB medium (LB medium 1ml、1M Glucose 20μl、1M MgSO<sub>4</sub> 10μl、10M MgCl<sub>2</sub> 10μl) 中で37にて1時間振とう培養した。培養後12,000rpmで5分間遠心し上層を除き100μlの菌体を得た。この菌体を20mg/mlのAmpicillin 100μl、0.1M IPTG 50μl、20mg/ml X-gal 50μlをそれぞれスプレッドしたLBプレート培地にスプレッドし、37にて一晩インキュベートしてホワイトシングルコロニーを選抜した。次に菌体のベクターに確実にサンプルDNAがインサートされているかチェックしたのちインサートが確認できたものをプラスミド抽出しサイクルシーケンスを行なう。

30

40

【0019】

( インサートチェック及びプラスミド抽出 )

選抜したホワイトコロニーを滅菌爪楊枝にてピックアップし、PCR反応液 (10×buffer、dNTPmix、EXTaq、primer T3及びT7、純水) の入ったPCRチューブですすぎコロニーPCRを行なう。得られたPCR増幅物をアガロースゲルで電気泳動しエチジウムブロマイド染色後UVトランスイルミネータ上でバンドチェックを行い、精製したDNAがベクターにインサートされているかをチェックする (インサートがされたものは1kbp付近にバンドが現れる)。次にインサートが確認された菌を1.6mlのLB液体培地 (100ppm Ampicillin) に植菌し、37で一晩振とう培養する。培養後の液体培地全量をマイクロチューブに移し12,000

50

r p mで5分間遠心し、上澄みを除き集菌する。これにプラスミドバッファー1 ( 0 . 0 5 M T r i s - H C l、0 . 0 2 M E D T A )を1 0 0 μ l 加えボルテックスしよく混和させ、次いでプラスミドバッファー2 ( 0 . 4 N N a O H、2 % S D S )を2 0 0 μ l 加えボルテックスしよく混和させる。そして室温で5分間静置した後プラスミドバッファー3 ( 3 M 酢酸カリウム)を1 5 0 μ l 加え、クロロホルムを一滴添加しボルテックスし1 2 , 0 0 0 r p mで5分間遠心する。遠心後マイクロピペットにて水層を新しいマイクロチューブに移し、等量のP C I ( 平衡化フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール)を加えボルテックスする。1 2 , 0 0 0 r p mで5分間遠心した後水層を新しいマイクロチューブに移し、1 / 1 0 量の3 M 酢酸ナトリウムと等量のイソプロパノールを加えボルテックスし、1 5 , 0 0 0 r p m、2 5 で3 0 分間遠心する。遠心後上澄みを捨て減圧乾燥しT E 1 0 0 μ l に溶解する。これにR N a s e A ( 1 m g / m l )を5 μ l 加え3 7 で3 0 分間インキュベートしてRNAを除去し、T E を3 0 0 μ l とP C ( フェノール：クロロホルム = 1 : 1 )を等量加えボルテックスし完全に混和する。そして1 2 , 0 0 0 r p mで5分間遠心し、水層を新しいマイクロチューブに移し水層の1 / 1 0 量のプラスミドバッファー3、水層と等量のイソプロパノールをそれぞれ加えボルテックスし、- 2 0 にて3 0 分間インキュベートする。インキュベート後4 、 1 5 , 0 0 0 r p mで3 0 分間遠心し、上澄みを除き、8 0 % エタノールを5 0 0 μ l 加え4 、 1 5 , 0 0 0 r p mで3 0 分間遠心し洗浄する。上澄みを捨て減圧乾燥した後、T E 2 0 μ l に溶解したものについてサイクルシーケンスを行なう。

10

## 【 0 0 2 0 】

20

( サイクルシーケンス )

サイクルシーケンスにはBig Dye Terminayor v3.1 Cycle Sequencing Kit ( Applied Biosystems 社製 ) を用いた。PCR チューブに上記で得られたサンプルDNAを約20 ng、Ready Reaction Premixを2 μ l、Big Dye Sequencing Bufferを3 μ l、primer ( T3、T7 ) を3 . 2 p m o l 加え、純水で2 0 μ l にしピペッティングし混和した。そしてPCR thermal cyclerを用いてサイクルシーケンス反応を行なった。反応液をマイクロチューブに移し、1 2 5 m M E D T A 溶液を5 μ l、9 9 . 5 % エタノールを6 0 μ l 加え転倒混和し1 5 分間静置した後、1 5 , 0 0 0 r p m、4 で2 0 分間遠心した。上精を捨て7 0 % エタノールを5 0 0 μ l 加え洗浄し、1 5 , 0 0 0 r p m、4 で1 0 分間遠心しエタノールを取り除き減圧乾燥させ、TSRを1 5 μ l 加えボルテックスした。さらに9 5 で2 分間インキュベートした後2 0 分間氷上に静置した。そしてシーケンスチューブに全量に移して蓋をし、Genetic Analyzer ( PRISM 310 ABI 社製 ) を使用しシーケンスを行なった。得られた1 8 S - 2 6 S r D N A I T S 領域の塩基配列の結果を配列番号1及び配列番号2に示す。

30

## 【 0 0 2 1 】

( プライマーの設計 )

上記のシーケンスにより得られた塩基配列から、G E N E T Y X - M A C v e r 1 0 . 1 ( ジェネティックス社製 ) を使用して他のAngelica属の塩基配列と比較し、ヒュウガトウキ及びイヌトウキが持つ特異的な塩基配列をプライマーの3 末端に指定してプライマーを設計した。その結果を配列番号3から配列番号9に示す。また得られたプライマーはトウキごとにHyu ( ヒュウガトウキ )、Inu ( イヌトウキ ) と表される ( 表1 参照。 )。そしてプライマーの合成はSigma - Aldrich Japan 社に委託した。

40

## 【 0 0 2 2 】

【表 1】

配列番号	プライマー
3	Hyu-F4
4	Hyu-R3
5	Inu-F1
6	Inu-F2
7	Inu-R2
8	Inu-R3

10

## 【0023】

(キットの作製)

ヒュウガトウキの識別用として、以下の構成によって識別用キットを作製した。

1. ヒュウガトウキ、イヌトウキのプライマーペア
2. PCRに必要な試薬 (Taq DNAポリメラーゼ、10x buffer、2.5mM dNTP)

各プライマーペアは表1に示される各プライマーのF、Rの何れかの組合せが選択され、識別する未知のトウキから目的のトウキの識別に最適なものが採用される。尚、本実施例においてはヒュウガトウキとイヌトウキのプライマーペアによるキットを作製しているが、他のトウキ(例えばニホントウキ)が含まれたものであってもかまわない。以下に本キットの使用法とその結果を示す。

20

## 【0024】

(ヒュウガトウキとイヌトウキの識別)

まずヒュウガトウキ或いはイヌトウキと識別できない未知のトウキからDNAを定法に従い抽出を行なう。そして、得られたDNAサンプルをヒュウガトウキ及びイヌトウキのプライマーペアを含むキットを用いてPCR増幅(multiplex PCR)を行なう。PCR増幅にて得られた副産物をアガロースゲルで電気泳動し、ヒュウガトウキ及びイヌトウキ特有のバンドの有無を確認する。本実施例においては、まずヒュウガトウキとイヌトウキのプライマー(Forward、Reverse)キットを混合してヒュウガトウキDNA、とイヌトウキDNA、ヒュウガトウキ及びイヌトウキDNAミックスそれぞれについてPCR増幅した後、アガロースゲル電気泳動を行った。結果を図1に示す。

30

## 【0025】

図において1、4、7はヒュウガトウキDNAのみ、2、5、8はイヌトウキのみ、3、6、9はヒュウガトウキ及びイヌトウキの混合DNAである。1、2、4、5、7、8はそれぞれの植物のDNAが増幅されており、ヒュウガトウキは500bp付近に特有のバンドが現れ、イヌトウキは350bp付近に特有のバンドが現れている。そして3、6、9は両植物のDNAが増幅されており、前記二つの分子量と同じ位置にそれぞれの植物特有のバンドが現れている。尚、10、11、12も上記と同様のDNAを使用した例であるがイヌトウキDNAのみの場合500bp付近に余分なバンドが生じており、これに使用したプライマーキットの組合せは不適合であった。

40

## 【0026】

以上のように、本発明によるヒュウガトウキの迅速識別キットによれば、識別を行なうための高度な植物分類学的知識や経験を必要とせず、確実にしかも短時間で未知のトウキからヒュウガトウキの識別が可能となる。しかも該トウキが粉末等に加工された後であっても容易に識別することが可能である。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0027】

本発明によるヒュウガトウキの迅速識別キットによれば、健康食品及び漢方医薬品分野

50

において、ヒュウガトウキの品質保証技術として利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】本発明に係るヒュウガトウキの迅速識別キットによるヒュウガトウキとイヌトウキの識別を示す写真である。

【 図 1 】

## 図面代用写真(カラー)



(図) multiplex PCR によるヒュウガトウキとイヌトウキの識別

H: ヒュウガトウキDNA

I: イヌトウキDNA

W: ヒュウガトウキ及びイヌトウキDNA

1:H	}	Hyu-F4:HyuR3/InuF1-InuR2	7:H	}	Hyu-F4:HyuR3/InuF2-InuR2
2:I			8:I		
3:W			9:W		
4:H	}	Hyu-F4:HyuR3/InuF1-InuR3	10:H	}	Hyu-F4:HyuR3/InuF2-InuR3
5:I			11:I		
6:W			12:W		

注: multiplex PCR は 2 対のプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)。

## 【 配列表 】

[2007175044000001.xml](#)



---

フロントページの続き

(72)発明者 熊本 典晃

宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 国立大学法人 宮崎大学内

(72)発明者 渡邊 茂彦

宮崎県西都市大字山田1489番地38

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 HA12 HA14

4B063 QA18 QQ04 QQ42 QR55 QR62 QS34 QX05