

天然物医薬品開発のための和漢薬の遺伝子解析及び網羅的成分分析

申請代表者	丸山 卓郎	国立医薬品食品衛生研究所	主任研究官
研究統括者	小松 かつ子	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	教授
所内共同研究者	當銘 一文	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	准教授
所内共同研究者	朱 姝	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	助教

■背景・目的

天然物医薬品は、天然由来であるがゆえに、含有成分の組成、含量にバラツキが生じ、品質を一定に保つことが難しいという不安定な要素を持っている。生薬の品質に大きな影響を与える因子としては、原料植物の遺伝的背景の違い、栽培/野生の別、産地などの生育条件の違い、加工調製法の違いなどが挙げられる。このため、天然物医薬品の開発には、薬効成分の同定や臨床研究の他に、上記の因子を理解し、効果的なレギュレーションを課すことにより、一定した成分組成、量を有する生薬を確保することが重要である。

本研究では、検討対象品目として、ニクジュヨウ、カノコソウ及びショウブコンを選択し、これらの生薬について、遺伝的多様性と LC/MS, GC/MS 分析の結果を結び付けた解析を実施し、各標的疾患に適した、あるいは、安全性の高い成分組成を持つ生薬資源の探索、特定を目指した。

■結果・考察

1. ニクジュヨウ

ニクジュヨウ（肉菴蓉）は、神農本草経の上品に収載され、腎陽を補い、精血を増し、腸を潤し、便を通ずるなどの効能で応用されてきた。JP18¹では、その基原として、ハマウツボ科(Orobanchaceae)の *Cistanche salsa* (C. A. Meyer) G. Beck ホンオニク、*C. deserticola* Y. C. Ma, 又は *C. tubulosa* (Schrenk) Wight の肉質茎であると規定されている。このうち、*C. deserticola* 及び *C. tubulosa* は中華人民共和国薬典²にも基原として規定されている。さらに、同科の *Boschniakia rossica* (Cham. et Schltdl.) B. Fedtsch. ex Fedtsch. et Flerov オニクの全草は、ワニクジュヨウとして日本薬局方外生薬規格 2018³に収載されている。東田らは、ニクジュヨウの骨格筋機能改善作用をもつ化合物としてフェニルエタノイドである acteoside (=verbascoside) を見出し、本化合物の投与により、骨格筋から pyruvate kinase M2 (PKM2) が分泌され中枢神経系へ移行し軸索伸展促進作用と骨格筋増加作用を示すことを明らかにしている⁴。さらに、acteoside にグルコースが1分子追加された echinacoside についても活性化化合物である可能性を検討している。本研究では、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにすること、それらに含まれる2つの活性化化合物の含量を調べることを目的とする。今年度はニクジュヨウの抽出物について¹H NMR 法による定量法 (qHNMR) の可能性について検討を行った。

HPLC を用いた検討で抽出に用いるメタノールの濃度を検討したところ、80%メタノールで最も高い抽出効率が得られたため、以後のニクジュヨウの抽出は80%メタノールで行った。ニクジュヨウエキスを DMSO-*d*₆ または CD₃OD に溶解し測定した¹H NMR スペクトルと、ニクジュヨウの代表的なフェニルエタノイド成分である echinacoside, acteoside, isoacteoside のスペクトルとを比較した。その結果、CD₃OD 中で測定したスペクトルにおいて、フェニルエタノイド類のシグナルはニクジュヨウエキスのスペクトルにおいても

種目 (特定研究)

十分な感度をもって検出できることを確認し、その量の大小を簡便に見積もることができることがわかった。これらのシグナルにはエキスのスペクトルにおいて比較的よく分離して観測されているものがあり、これらのシグナルを用いて、定量NMR法 (qHNMR法) によるフェニルエタノイド類の定量分析の可能性が示唆され、HPLCでの定量結果とも相関していることがわかった。また、これら化合物は共通する骨格構造をもち、共通するシグナルを示すことから、骨格構造が共通する化合物を一括して定量できることがわかった。さらに化合物ごとに特徴的な部分構造の違いに起因するシグナルが確認され、それらを用いた化合物ごとの定量が可能であることがわかった。以上より、ニクジュヨウのqHNMR法によるフェニルエタノイド類の定量分析法が確立できたと考えている。

上記の方法を用いて *C. salsa*, *C. deserticola*, *C. tubulosa*, *B. rossica* の植物サンプル18検体について検討したところ、個体差は大きいものの中国新疆ウイグル自治区産の *C. tubulosa* において echinacoside などのフェニルエタノイド類の含量が高いことを見出した。今後、検体数を増やして解析を進めることで、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにするとともに、すでに解析が済んでいる核ゲノムの ITS 領域の配列情報とを紐づけて、成分の差異と遺伝子配列の関係性についても解析を進める。

2. カノコソウ

カノコソウは、JP18において、カノコソウ *Valeriana fauriei* Briquet の根及び根茎と規定されている。本生薬は、元々、JP1~JP3に収載されていた欧州産カノコソウ (ワレリアナ根; *V. officinalis* L.) の代用または併用できる本邦産生薬の収載方針に基づき、JP2より収載されており、JP2~JP8までは、*V. officinalis* L. var. *latifolia* Miquel を基原植物学名として記載しているが、植物分類学上の扱いの変化に伴い、JP9以降、現在の *V. fauriei* が学名として採用されている⁵。カノコソウには、これまで、いくつかの品種が栽培されてきており、以前、盛んに栽培されたカメバキソウや、現在の市場品の主流であるホッカイキソウがある。これらは、精油量及びセスキテルペンの組成が異なることが知られており、また、近年では、需要の高まりに伴い、中国産も使用されている。本研究では、これらの試料について、遺伝子型と成分型の相関を探り、より薬用価値の高いものを、再現性よく供給するための基盤整備を行った。

Valeriana 属の遺伝子鑑別については、Fujii ら⁶により、葉緑体DNAの *psbA-trnH* intergenic spacer (IGS) 領域の有用性が示されており、本領域の塩基配列の違いにより、カノコソウと同属他種は区別可能であり、さらに、カノコソウは、5つの遺伝子型 (AH-1~AH-5) に細分類されることが明らかにされている。このことから、本領域の塩基配列解析を行った結果、日本のカノコソウ市場品31検体 (国内産29, 中国産2) は、3つの遺伝子型 (AH-1, 2, 5) に分類された。国内産のカノコソウは、AH-1, 2のいずれかを示し、中国産の2検体は、いずれもAH-5を示し、Fujii らの報告と一致した。

同じ試料に対して、GC/MS分析を行った結果、主に15本のピークが認められた。NIST検索、標品及び各検体からの精製品、その加水分解成績体との保持時間及びマススペクトルの比較から、このうちの9本のピークについては、borneol; bornyl acetate; α -terpinyl acetate; valeranone; α -kessyl acetate (KA); α -kessyl alcohol; 1-*O*-acetyl-2, 10-bisaboladiene-1, 6-diol (ABD); 2, 10-bisaboladiene-1, 6-diol (BD); kessyl glycol diacetate (KGD) と同定された。GC/MSデータに対して、多変量解析であるHCA及びPCAを行ったところ、市場品は、3つの成分型 (J_1 , J_2 , C) に分類された。さらに、参考試料として分析したカメバキソウも、別の成分型 (K) を示した。 J_1 , J_2 型は、いずれもKGDを主精油成分としていたが、 α -terpinyl acetate などのマイナー成分の含量に違いが見られた。一方、C型は、KGDとは骨格の異なるセスキテルペンであるABDを主精油成分としていた。また、K型は、KAを主精油成分としており、Suzuki らの報告⁷と一致した。

これらの成分型と *psbA-trnH* IGS 領域の遺伝子型を比較したところ、両者は、よく一致した。すなわち、AH-1の遺伝子型を示した検体は J_1 型、AH-2は J_2 型、AH-5は、C型を示した。このことから、各精油成分型の違いは、環境要因ではなく、遺伝的背景の違いに起因していると考えられた。

種目 (特定研究)

カノコソウは、漢方処方用薬ではなく、主に鎮静作用を目的に、種々の生薬製剤に配合される生薬である。先行研究では、バルビツレート誘導睡眠に対する延長作用やロコモーターアッセイによる自発運動量の現象が報告されており^{8,9}、その活性化合物として KGD 類が報告されている。一方、カノコソウには、Nerve Growth Factor (NGF; 神経成長因子)増強作用も知られており¹⁰、その活性化合物として、kissoone 類と共に、BD が報告されている。従って、この成分型を持つカノコソウには、認知症に対する効果も期待される。

以上のことから、カノコソウの精油成分型を把握し、イライラ、ヒステリー、認知症など、それぞれの症状の治療に適合する成分型を持つカノコソウを用いることで、より有効な薬物治療の実現が期待される。本研究成果は、カノコソウによる、より有効な薬物治療のための基礎的知見を与えるとともに、*psbA-trnH* IGS 配列が、有用な DNA マーカーとなることを示している。

3. ショウブコン

ショウブコンは、ショウブ *Acorus calamus* の根茎を基原とする生薬であり、類似生薬であるセキシウコンとともに、一般用医薬品製造販売承認基準の胃腸薬基準に掲載されている。両者は、よく似た外観を有することから、しばしば誤用されるものの、ショウブコンには、公的規格がない。また、Sugimoto ら¹¹は、ショウブコンに複数の精油型が存在することを報告している。そこで、本研究では、ショウブコンの品質標準化を目的に、ショウブコン及びセキシウコン市場品の遺伝子解析及び GC/MS 分析を行った。

ショウブコン市場品 9 検体 (安徽省, 広西産, 各 3 ロット, 江西省, 浙江省, 湖北省産, 各 1 ロット), セキシウコン市場品 3 検体 (安徽省産 2 ロット及び四川省産) について、5S rDNA IGS 領域, 核 rDNA internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域及び葉緑体 DNA の *psbA-trnH* IGS 領域の塩基配列解析を行った。広西チワン族自治区産の 3 ロットのうち、2 ロットは、いずれの領域においても PCR 産物が得られなかった。解析の結果、いずれの領域もショウブコンとセキシウコンを、鑑別可能であったが、*psbA-trnH* IGS 領域は、単一個体内に複数の配列を認めるものがあり、直接シーケンス法による鑑別には不向きであった。Sugimoto らは、国内で収集した *A. calamus* について、5S rDNA IGS 領域の塩基配列解析を行い、3 つの遺伝子型に分かれることを報告している。今回の解析したショウブコン市場品では、このうちの 2 つと、両者の混合物が認められた。

同じ試料について、GC/MS による精油成分の分析を行った。Sugimoto らの報告通り、ほぼアサロンのみからなる chemotype A, アサロンは僅かで、セスキテルペン類と推定される多数の成分を含む chemotype B, 両者の中間型である chemotype M の全てが認められたが、それらに属さない chemotype として、アサロンとメチルオイゲノールと推定される成分が、同程度含まれるものが検出された。一方、セキシウコン市場品は、全て chemotype A であった。

Sugimoto らは、5S rDNA IGS 領域の遺伝子型と chemotype が相関すると報告しているが、今回、我々が使用した試料では、相関性は認められなかった。原因として、Sugimoto らの実験材料が、国内産の *A. calamus* 6 検体に限られている点が推定された。*A. calamus* には、2 倍体, 3 倍体, 4 倍体が存在し、The Plant List では、それぞれを、*A. calamus* var. *americanus*, var. *calamus*, var. *angustatus* に細分類している。Plants of the World online では、国内に分布する *A. calamus* は、*A. calamus* var. *angustatus* であるとされており、一方の中国では、*A. calamus* var. *angustatus* の他に、*A. calamus* var. *calamus* も分布するとされている。国内に比べて、中国産の *A. calamus* は、遺伝的多様性が大きいと推定され、このことが、国産の *A. calamus* よりも多様な成分型を生じているものと思われる。

今後、検体数を増やして、この点を検証する予定である。

■結論

ニクジュヨウについては、基原種や産地の異なるニクジュヨウの成分的多様性を明らかにすること、活性成分の定量を目的として、定量 NMR を中心に検討を行い、実験条件の確立を行うとともに、その条件を

種目（特定研究）

用いた解析から、中国新疆ウイグル自治区産の *C. tubulosa* においてフェニルエタノイド類の含量が高いことを見出した。今後、遺伝子情報と合わせて解析を進めることで、活性成分の含量が高い基原植物の遺伝子型、産地の特定につながることを期待される。

カノコソウについては、葉緑体 DNA の *psbA-trnH* IGS 配列と精油成分組成に相関があることを明らかにした。それぞれの主精油成分が持つ薬理活性は異なることから、精油成分型の違いを理解した上で、それぞれの症状に適した精油型のカノコソウを用いることで、より有効性の高い治療が実現できると期待される。

ショウブコンについても、精油成分組成に多様性が確認され、既報の情報との比較から、主産地である中国では、日本国内産のものよりも、多様性が大きいことが示唆された。毒性物質であるアサロンの含量が低い個体も見出されていることから、今後、さらに検体数を増やして検討を行うことで、より安全性の高いショウブコンの産地及び遺伝子型を特定することができると考えている。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 2021 年. 第十八改正日本薬局方, pp. 2017-2018.
- 2) 国家薬典委員会編, 2015 年. 中華人民共和国薬典 2015 版, 第一部, p. 135, 中国医薬科技出版社, 北京.
- 3) 局外生規 2018 出版検討会, 2020 年. 和英対訳日本薬局方外生薬規格 2018, pp. 201-202, 薬事日報社, 東京.
- 4) Kodani A., Kikuchi T., Tohda C., *J. Neurotrauma.*, **36**, 1935-1948 (2019).
- 5) Yanagisawa K., *Jpn. J. History Pharm.*, **48**, 63-74 (2013).
- 6) Fujii T., Mori T., Tatsuo Y., Takao Y., Fujino H., Tsuchida T., Minami M., *J. Nat. Med.*, **75**, 699-706 (2021).
- 7) Suzuki H., Zhang B. C., Harada M., Iida M., Satake M., *Shoyakugaku Zasshi*, **47**, 305-310 (1993).
- 8) Takamura K., Kakimoto M., Kawaguchi M., Iwasaki T., *Yakugaku Zasshi*, **93**, 599-606 (1973).
- 9) Yoshitomi S., Watanabe M., Kawanishi F., Satake M., *Nat. Med.*, **54**, 55-60 (2000).
- 10) Guo Y., Xu J., Li Y., Yamakuni T., Ohizumi Y., *Planta Med.*, **72**, 373-375 (2006).
- 11) Sugimoto N., Kiuchi F., Mikage M., Mori M., Mizukami H., Tsuda Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 481-485 (1999).