

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08881

研究課題名(和文)トリカブト種とその由来推定に関する分子生物学的および成分分析情報からのアプローチ

研究課題名(英文) An approach to estimating the species and habitat of aconites based on a molecular biological and ingredient analysis

研究代表者

中屋敷 徳 (NAKAYASHIKI, NORI)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10146029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：国内に自生するトリカブトの分子生物学的分析を行った。2倍体種(染色体数16)は北海道、東北、北関東および関東以南の地理的4群に大別された。一方、多数の種に分類されている4倍体種(同32)に種を特定できる変異はなかった。核DNAのITSには地域特異的配列が存在したので、DNA分析によるトリカブトの大まかな自生地推定に有用と思われる。

トリカブト塊根に含まれるアルカロイド主要4成分の構成およびその濃度について、トリカブトの種あるいは調べた自生地土壌成分との間に相関はなかった。しかし有毒成分の構成あるいは無毒性については移植前後でその特徴が変わらなかったため、遺伝的な支配を受けていると推測された。

研究成果の概要(英文)：The molecular biological analysis of Japanese aconites was carried out. Diploid species ($2n=2x=16$) were roughly classified into four geographical groups: Hokkaido, Tohoku, northern Kanto and the southern part of Japan. We could find no species-specific sequence that could identify the species in the tested tetraploid species ($2n=4x=32$). Since the geographical district-specific sequence was present in the ITS region of the nuclear DNA, the DNA analysis of aconites seems to be useful for the rough estimation of their habitat location.

The composition and concentrations of the four major alkaloids contained in the aconite tuberous roots did not correlate with either the aconite species or the data obtained from a general soil analysis in the examined habitats. However, it was hypothesized that the constitution of each toxic alkaloid or non-toxicity in individual aconites was genetically controlled, because these features were mostly unchanged before and after transplantation.

研究分野：法医学

キーワード：トリカブト DNA分析 種分類 ジテルペン系アルカロイド 自生地

1. 研究開始当初の背景

(1) トリカブトは北半球に分布する猛毒を含む植物であり、日本国内でも山野に広く自生し、一部の種は観賞用にも販売されている。一方、生薬としての薬効を持つことから、漢方製剤にも利用されている。主に北海道・東北地方では、早春期に一部の山菜と間違えて摂食した中毒事例が毎年のように発生している。またその毒性の強さから自殺目的あるいは殺人目的で利用されることもある。一般にトリカブト中毒は、血液等に含まれる毒成分(ジテルペン系アルカロイド主要4成分: アコニチン、メサコニチン、ヒパコニチンおよびジェサコニチン)を機器分析により検出することで証明されてきた。当大学法医学教室でもトリカブト中毒死亡者の司法解剖を数例経験している。

(2) 国内のトリカブト亜属(Aconite)は形態学的特徴から少なくとも30種以上に分類されているが、その同定は非常に難しいことが知られている。これまで遺伝子レベルの研究は少なく、国内では、(主に関東以南の種を対象とした)進化系統分類学的な比較(Kitaら, 1995)のみであった。MatsuyamaとNishi(2011)は、核DNAのITS(Internal Transcribed Spacer region)領域を対象としてトリカブトを含む日本の4種類の毒草をreal-time PCR法により分子生物学的に証明する方法を開発し、トリカブトの同定が可能であると報告した。しかし各種トリカブトを分子生物学的に比較し、その特徴から種を同定している報告はない。

2. 研究の目的

トリカブト中毒は法医学的に重要な事例をもたらすことがある。国内各地に多数の種が自生しているが、特に採取や栽培に関する規制はなく、容易に入手可能である。一方、これらの種と毒物学的特徴との関連性については不明な点が多い。本研究では、

(1) 各地に自生する多数のトリカブト種DNA配列を明らかにし、その多様性や種特異的な特徴の存在を調べる。

(2) DNAによるトリカブト草本の証明および種の同定法を確立する。

(3) 異なる種あるいは季節におけるトリカブト草本(主に塊根)の毒成分の含有量と成分比率を調べる。

(4) 移植前後の毒成分を比較し、地域あるいは土壌成分との関連性を調べる。

(5) 遺伝学的検査と毒物学的分析を関連付けた国産トリカブトの特性を明らかにする。

3. 研究の方法

材料は、全国各地に自生している草本を採取し、さらに一部は提供された試料(主に乾燥した葉)を対象とした。

(1) 分子生物学的分析

DNAを常法により葉から抽出し、核DNAのITS配列および葉緑体DNAの6ローカス

(psbA-trnH, matK, trnS-G, trnL-F, rbcLおよびrpl20-rps12)について、その塩基配列を決定した。その後の配列比較により種内および種間変異性について調べた。

(2) 毒性分析

一般に(最も有毒成分の濃度が高いとされている)塊根を対象とした。採取した試料だけでなく、その子根を別の場所(土壌)に移植し、次年度の塊根も試料とした。

毒性分析は、塊根をスライスして常温でシリカゲル乾燥し、その粉末から抽出した成分を、LC-MS/MSにより主要4成分の濃度を測定し、含有される成分比率を算出した。

(3) トリカブト塊根の全成分分析、および一般的な土壌分析も行い、種と自生地域間の関連性、および土壌成分と毒性成分濃度との関連性についてもそれぞれ検討した。

4. 研究成果

(1) 分子生物学的知見

国内の2倍体7種56試料、さらに4倍体16種および種不明の277試料について検討した。日本のトリカブトDNAを特異的に増幅するプライマーを設計し、マルチプレックスPCRによる簡便なトリカブトの同定法、さらには2倍体種を識別する改良法も開発した。

調べた7ローカス配列のうち、rbcLは調べた試料全てで同一塩基配列を示した。2倍体種と4倍体種間でpsbA-trnHとtrnL-Fで共通配列があったものの、その他のローカス配列は両グループ間で明らかに異なっていた。

a 2倍体種

ITS配列では、全2倍体種に共通する6か所の1塩基置換が存在した(ジョウシュウトリカブトのみ5か所)。東北の2種はほぼ同様であったが、北海道3種(1亜種を含む)は別の3塩基が、関東南部~四国の地域のサンヨウブシは1塩基が共通していた。一方、北関東にのみ自生するジョウシュウトリカブトには他の2倍体には見られない7塩基の違いが見られた。cpDNAでは、全2倍体種に共通する塩基置換が、matKに1か所、trnS-Gに3か所存在した。一方、北海道種と東北種に共通する塩基置換がmatKに4か所およびrpl20-rps12に1か所存在した。サンヨウブシは地域により若干の個体差が見られた。ジョウシュウトリカブトはtrnL-Fが4倍体と同じ配列だったものの、他の配列にいずれも独自の配列変異が検出された。

b 4倍体種

北海道から四国地域に自生する16種を調べたにもかかわらず、調べた核DNAおよびcpDNAにおいて、特定の変異性を示す種は観察されなかった。しかし、ITS配列では(種の違いを超えて)地域特異的に存在する塩基置換が複数検出された。一方、cpDNAの各ローカスにおける変異性検出率は高い方からtrnS-G>matK>rpl20-rps12>psbA-trnH>trnL-Fであったが、いずれも特に高頻度とは言えなかった(8.1~1.3%)。psbA-trnHを除く4

ローカスのハプロタイプ (n=179) では 37 種類に分類され、そのうち 77 試料 (43%) は同じ配列だったものの、その他のハプロタイプには地域的偏りが見られた。新たな発見として、4 倍体種では報告の無かったムカゴを持つ 2 種 (キタヤマブシおよびハクバブシ) に遭遇したが、これらはいずれも周囲のムカゴの無い同種トリカブトと同じ DNA 分析結果を示し、種内変異であると思われた。

まとめ

分子生物学的にトリカブト DNA を検出する方法を確立した。多種他地域の試料の分析により、以下のことが推定された。

1. 国産トリカブト亜属の 2 倍体種と 4 倍体種は明らかに遺伝的に異なっていた

2. DNA レベルでジョウシュウトリカブトは独立した種であり、国内の 2 倍体種は北海道種、東北種、北関東種 (ジョウシュウトリカブト) および関東以南種 (サンヨウブシ) の地域的な 4 群に大別された。

3. 4 倍体の各種を明確に識別できる変異は全く見つからず、逆に互いの近縁性は極めて高かった。

4. 4 倍体種の ITS 配列には地域特異的な塩基置換が存在し、トリカブトの (産地) 由来を推測することが可能であった。

(2) 毒性分析からの知見

おもに主要 4 成分 (アコニチン、メサコニチン、ジェサコニチン、ヒパコニチン) の構成、比率ならびに総濃度を調べた。北海道・東北地方の 4 倍体草本には毒性が最も強いとされるジェサコニチンが占める割合が多いが、南下するに従ってその比率は減少傾向にあり、検出された最南部は栃木県北部であった。この 4 種とは別のアルカロイド成分 (13DM) のみ含む草本が存在するとともに、ほぼ無毒である草本も少なからず存在した。しかし特定の種に伴うような 4 成分の有無およびその濃度や構成パターンの傾向は認めされなかった。一方、毒性が低いとされている 2 倍体種および別亜属のレイジンソウ類では、有毒な上記 4 成分がいずれもかなり低いか検出されないレベルであることが確認された。

自生地で採取した草本と、異なる土壌に移植した場合の毒性成分濃度および成分比率の比較では成分構成はほぼ保持されていたものの、各毒性成分の濃度のばらつきが大きかった。同一草本の母根と子根の比較では構成成分濃度に差が生じていた。無毒草本の移植では、その子根から有毒成分が検出されることはなかった。

全成分の網羅的な多変量解析結果は、自生地域毎に収束するような傾向が観察されたが、特定の種を識別できるような分布ではなかった。言い換えれば種によって全成分構成がまとまる傾向は見られなかった。一方、自生地土壌の一般的分析項目 (腐食率、pH

および各種金属イオン濃度) について毒性成分濃度との関係を調べたが、すべての項目で相関は見られなかった。

まとめ

1. 国内の 2 倍体種はほぼ無毒であり、4 倍体種にも無毒なものが少なからず存在した。

2. 毒性が最も高いジェサコニチンは、北海道～関東北部地域で観察された。

3. 特定の種あるいは自生地土壌成分と有毒成分の構成および無毒性との関連性は認められなかった。

4. 有毒成分構成および無毒性は遺伝的に支配されていると考えられ、その成分濃度は環境の影響を受けて変化すると推定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

中屋敷徳、出羽厚二、渥美聡孝、トリカブト属レイジンソウ亜属植物の多様性と近縁性の分析、DNA 多型、査読有、24 巻、2016、97-100

Matsusue A, Yuasa I, Nakayashiki N, Dewa K, Nishimukai H, Kashiwagi M, Hara K, Waters B, Takayama M, Ikematsu N, Kubo S, The global distribution of the p.R1193Q polymorphism in the *SCN5A* gene, *Legal Medicine*, 査読有、2016、72-76

中屋敷徳、出羽厚二、沢和浩、根本秀一、大森威宏、2 倍体トリカブト亜属 (キンポウゲ科) 植物の分子生物学的分析、DNA 多型、査読有、25 巻、2017、79-82

新津ひさえ、藤田友嗣、熊谷礼子、藤田さちこ、中村祐貴、筋浦立成、吉田 徹、出羽厚二、スイセン の誤食後に死亡した一剖検例、*法医学の実際と研究*、査読有、60 巻、2017、47-53

[学会発表] (計 7 件)

中屋敷徳、臼井聖尊、新津ひさえ、小梶哲雄、湯浅勲、舟山真人、出羽厚二、トリカブト種とその由来についての分子生物学的および成分分析によるアプローチ。第 99 次日本法医学会学術全国集会。2015 年 6 月 11-12 日、高知市文化プラザかるぼーと (高知県高知市)

中屋敷徳、出羽厚二、渥美聡孝、トリカブト属レイジンソウ亜属植物の多様性と近縁性の分析。日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会。2015 年 11 月 19-20 日、岡山大学創立 50 周年記念館 (岡山県岡山市)

中屋敷徳、湯浅勲、沢和浩、川上新一、東隆行、出羽厚二、国産トリカブト亜属

(キンポウゲ科) 2倍体植物の分子生物学的比較. 日本植物分類学会第15回大会. 2016年3月6-8日, 富山大学五福キャンパス(富山県富山市)

中屋敷徳、出羽厚二、沢和浩、根本秀一、大森威宏. 2倍体トリカブト亜属(キンポウゲ科)植物の分子生物学的分析. 日本DNA多型学会第25回学術集会. 2016年12月1-2日, 東京大学大気海洋研究所(千葉県柏市)

中屋敷徳、臼井聖尊、新津ひさえ、小椋哲雄、湯浅勲、舟山真人、出羽厚二. トリカブト種とその由来についての分子生物学的および成分分析によるアプローチ~第2報. 第101次日本法医学会学術全国集会. 2017年6月8-9日, 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

中屋敷徳、沢和浩、根本秀一、大森威宏、鳥居万恭、近藤和男、出羽厚二. ムカゴを持つトリカブト亜属植物の分子生物学的背景について. 日本植物分類学会第17回大会. 2018年3月8-10日, 金沢歌劇座(石川県金沢市)

鳥居万恭、増戸秀毅、近藤和男、中屋敷徳、稗田真也、野間直彦. 京都市大原野森林公園で発見されたムカゴを持つキタヤマブシ. 日本植物分類学会第17回大会. 2018年3月8-10日, 金沢歌劇座(石川県金沢市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 中屋敷 徳
(Nakayashiki Nori)

岩手医科大学・法科学講座法医学分野・准教授

研究者番号: 10146029

(2)研究分担者 新津ひさえ
(Niitsu Hisae)

岩手医科大学・法科学講座法医学分野・助教

研究者番号: 80128933

(3)連携研究者
()

研究者番号:

(4)研究協力者
()