

## 特集

**DNA 多型を用いた遺伝的多様性解析と鑑定法**

味岡ゆい, 市橋泰範, 久島広晃, 小萱香代, 堀川大介, 南 基泰

中部大学大学院応用生物学専攻

**1. はじめに**

分子生物学の発展により, 様々な生物種について分子系統学的な解析による分類が行われており, 生物の識別, 鑑定及び系統解析にはゲノムそのものを用いるのがもっとも決定的であると考えられている(山崎 2002). 分子系統学的解析とは, 塩基やアミノ酸配列を用いて生物の系統関係を推定することである. 表現型レベルの形質に比べ, アミノ酸, 核酸レベルの形質は形質変化のパターンが規則的でモデル化しやすいため定量的, 統計的解析がしやすい. また, 形質の情報量が多く, 通常はそれぞれの形質が独立しているため, 全ての生物を通して系統関係の推定が可能である(長谷部 1994). このように, これまでに調査されてきた外部形態などの表現型レベルに比べ, 得られる情報量が多いことから, より信頼性の高い系統解析ができ, 系統関係が推定されれば, 形態的多様性がいつ生じたかという推定が可能になる(長谷部 1996).

近年, 様々な生物種を対象にして, DNA 解析が行われ, 生命の本質を明らかにしている. 本報告では, 「DNA 多型を解析することによって何がわかるのか?」を学問及び実学的立場から, 近年報告されている研究について概説する. 最初に, 「DNA を利用した分子マーカー」について概説する. そして, 学問的な立場から「DNA からみた植物進化」, 「昆虫の遺伝的多様性とその地理的変遷」についての最近の論文を紹介する. 更に実学的な立場から, 「食品素材や産地特定のための DNA 鑑定技術」, 最後に薬学分野で盛んになってきた「生薬の DNA 鑑定」といった実用的な技術としての分子マーカー技術についての最近の研究報告を概説する.

**2. DNA を利用した分子マーカー**

DNA は, 遺伝情報のほとんどが含まれていると考えられるため, 親子から分類群間まで, 生命のつながりの関係を調べるために利用される最も情報量の多いマーカーである. 近年, DNA の特定の領域を増幅する技法である PCR 法 (polymerase chain reaction) が開発されたことにより DNA を扱う研究が容易になった(Wolf・Liton 1998).

葉緑体 DNA 及びミトコンドリア DNA は基本的に母親由来で遺伝し, 遺伝子の組換えは生じないため, 母系をたどる系統推理によく利用される. 一方, 核 DNA は生物個体を形成するための遺伝情報の大半を含んでいる. 両親から 1 セットずつ引き継いだ核内に 2 セットある DNA を, それぞれを分けて解析する共優性マーカー, ひとつくりにして解析する優性マーカーがある(加賀谷 2005).

以下では, DNA を分子マーカーとして利用する方法について紹介する.

**2-1. ダイレクトシーケンス法 (Direct Sequence)**

PCR 法で特定の領域を増幅し, 塩基配列を DNA シーケンサーで解析する方法であるが, 試薬や機械も PCR までの段階に比べて格段に高価なものとなる(田村 1997; 中山 1996).

**2-2. PCR-RFLP 法 (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

ダイレクトシーケンスよりも簡便に DNA 多型を検出する方法のひとつが PCR-RELP である. CAP (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) と呼ばれ, PCR で増幅した DNA 断片を, 制限酵素によって切断し, その切断長の変異を検出する. 核 DNA の PCR-RELP は共優性マーカーであるため適用範囲

が広く, また, 実験が容易なため多くのサンプルの処理に特に威力を発揮する(Botstein *et al.* 1980;津村 2001).

### 2-3. SSCP 法 (Single-Strand Conformational Polymorphism)

高温で熱変性させ, その後急冷させた PCR 産物の DNA 断片は塩基配列に応じて特有の二次構造をとる(Hayashi・Yandell 1993;Orita *et al.* 1989). 電気泳動により, この構造の違いを調べる(加賀谷 2005). 1 塩基レベルの多型が検出できるとされているが, 実際の検出力は 1 塩基レベルより低いと言われている. しかし核 DNA の SSCP マーカーは共優性であるとい利点がある(錦野 2001;Kalpana *et al.* 2004).

### 2-4. SSR 法 (Simple Sequence Repeat , microsatellite)

ゲノム中にある特定の塩基配列の繰り返しが現れる領域をマイクロサテライト領域と言ひ, この繰り返しの回数には変異が非常に生じやすいため, 最も解像度の高い共優性マーカーとして利用されている(井鷲 2001). マイクロサテライト領域を挟んだ領域を PCR で増幅して電気泳動により増幅産物の長さの違いを調べたり, シーケンサーを利用して塩基配列の長さを決定する方法である.(Zietkiewicz *et al.* 1994). 個体群構造を扱った研究や親子判定を行う場合に欠かせないものとなりつつある(井鷲 2001).

### 2-5. SNPs 法 (SingleNucleotide Polymorphisms)

ゲノム中に多く存在する 1 塩基のみの置換を含む遺伝子座を解析するのが SNPs で, 手法というよりも解析対象を示すものである(Botstein *et al.* 1980;津村 2001). 利用可能な遺伝子座の数が多いため, 多くの遺伝子座を用いることにより, 異なる起源の生物が稀に同じ配列を示す「収斂」を見分けることができる(加賀谷 2005). 上記のダイレクトシーケンスや PCR-RFLP も SNPs のタイピングの手法となるが, 多くのサンプル処理に有効なタイピング法も多く開発されている(Botstein *et al.* 1980;津村

2001).

### 2-6. RAPD 法 (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

通常の PCR では 20~30 塩基のプライマーを目的とする DNA 領域の増幅に利用するが, 本手法ではランダムな配列の 10~12 塩基の通常より短めのプライマーを利用して全 DNA の多数の遺伝子座を増幅し, DNA 断片の長さの変異を比較する(John *et al.* 1990; Welsh *et al.* 1990). 市販のプライマーセットで容易に研究に取り掛かることができるが, 優性マーカーであるためホモとヘテロの区別ができない. また, 一度に多数の遺伝子座を増幅するので実験に再現性を持たせることが難しいという欠点がある(加賀谷 2005).

### 2-7. AFLP 法 (Amplified Fragment Length Polymorphism)

制限酵素で全ゲノムを切断し, 各 DNA 断片の両端にアダプターと呼ばれる特定の塩基配列を持った短い DNA 断片を結合させる. そして, アダプターの配列と相補的な配列を有するプライマーで PCR を行ひ, DNA シーケンサーで各断片の長さの違いを明らかにする. 親子判定や個体識別など高い解像度を必要とする研究に適している(Poeter *et al.* 1995).

## 3. DNA からみた植物進化

### 3-1. 分子系統学の成立

18 世紀に C. von Linne は著書「自然の体系」のなかで多くの生物種をその類似性と差異により分類した. 特に植物においては性体系に基づく分類を実践した(大場・斉藤 1994). 界, 門, 綱, 目, 科, 属, 種と一連の階層的な分類群に分けるリンネの生物の分類体系は, 彼の思いとは裏腹に, 後に進化論の土台となった. それは, この階層分類体系が生物の進化史の関連性を表現するために採用された‘生命の樹’と類似していたからである. 更にこの階層分類体系は, 生物種間の類似性だけでなく進化上の類縁関係も示す系統学としても解釈されるようになる(Brown 2000).

それに端を発し、分子レベルでの情報を利用した系統学が分子系統学である。分子系統学で利用される分子レベルでの情報は、従来系統学に利用されてきた形態学的形質の情報に比べて、単純かつ明確であり、数理的解析もしくは統計的解析に利用可能である (Brown 2000)。分子進化時計の概念から、生物種間の関係性に時間の次元が加えられ (Lewin 1998)、類縁関係の比較的遠い生物間の比較では真核生物のリボソームを構成する 18SrRNA、比較的近い生物間の比較ではミトコンドリア DNA、植物では葉緑体 DNA などが今日分子系統学的解析によく利用されている (佐藤・長谷川 2004)。そして、このような分子系統学に加えて、系統学に側系統性・側系統群を導入した分岐論 (Henning 1965) の確立により、従来の系統学にある恣意的な部分を客観的にし、論理的にはどんな生物の系統関係も推定できるようになったとされた (長谷川 2001)。

しかし、その分子系統学においても従来から系統学にまつわる数々の問題点を抱えている。例えば、用いる分子データの種類により系統関係の位相が異なることや逆に少ない分子データからでは統計学的に十分に支持されないことが挙げられる。また、系統樹を作成する際に非常に複雑な数学的な問題も残されている。例えば、100 以上の種を対象に系統解析を行うと可能な系統樹の数は宇宙にある粒子の数を超えてしまう。さらに、DNA 塩基配列の塩基置換率が非常に高い領域においては、複数回の塩基置換が生じる転換により情報が失われる可能性がある。その結果として、long branch attraction により比較的遠縁の種同士が誤って近い関係を示してしまう (Hendy・Penny 1989)。前記したようにいまだ様々な問題が残されているが、植物の系統学において、3 つのゲノムとして核、ミトコンドリア及び葉緑体のゲノムからの情報が一致することは系統関係の推定における信頼できる指標のひとつとされる (Savolainen・Chase 2003)。

被子植物において、葉緑体ゲノム上の *rbcl* 遺伝子 (Chase *et al.* 1993; Savolainen *et al.* 2000a)、*atpB* 遺伝子と *rbcl* 遺伝子の組み合わせ (Savolainen *et al.* 2000b)、挿入繰り返し配列 (Goremykin *et al.* 1996)、

核ゲノム上のいくつかの rDNA との組み合わせ (Soltis *et al.* 1997; Soltis *et al.* 1999; Soltis *et al.* 2000)、フィトクロム遺伝子 (Mathews・Donoghue 1999)、ミトコンドリアゲノム上の *matR* 及び *atp1* 遺伝子 (Qiu *et al.* 1999; Qiu *et al.* 2000)、またその他多くの遺伝子 (Graham・Olmstead 2000) により、数千種間の比較をした系統解析が行なわれた。各領域ごとに推定される系統関係が異なるパターンで描かれている場合もあるが、全く一致しないということはほとんどなかった (Soltis *et al.* 1998)。そして、科以上の分類レベルにおいては、3 つのゲノムは同じ進化の歴史を辿ってきたと考えられる (Savolainen・Chase 2003)。

また、個々の遺伝子による系統解析においては、構造的及び機能的制約の違いにより異なる系統関係を導く可能性があるが、いくつかの遺伝子を組み合わせることにより緩和されると考えられる (Savolainen・Chase 2003)。そして、もし被子植物において葉緑体ゲノム上に機能的制約が働いていたとしたら、それらの領域で生じる変化は共通の歴史を反映しているだけでなく、機能を保持するための収束的な変化を反映することとなる。しかし、実際にはそのような事例はないとされており (Savolainen *et al.* 2002)、このような葉緑体ゲノム固有の性質から、植物少なくとも被子植物における系統推定は著しい進歩を遂げることができた (Savolainen・Chase 2003; 村上 2001)。

### 3-2. 分子系統学から被子植物の再分類

リンネの分類体系により陸上植物はコケ植物、シダ植物、裸子植物及び被子植物に大別されている。そして、現在の分子系統解析においては、コケ植物は単系統群か不明であるが、シダ植物は明らかに単系統群ではなく、裸子植物及び被子植物は単系統群で、被子植物は花の咲く植物で、現在最も多様化している単系統群であることが明らかとなっている (佐藤・長谷川 2004)。

近年、被子植物の分子系統学において、異なるゲノム上の遺伝子からの推定でも系統推定が大概一致することが認められ、伝統的な分類体系を分子系統

学の知見を反映させた新しい分類体系に組替える時期が来たとされている(Savolainen・Chase 2003). そこで, Angiosperm Phylogeny Group は公開されている系統関係を客観的に解釈し直し, 科以上の分類レベルにおける階層分類体系を試み, 1998 年, 2003 年(Angiosperm Phylogeny Group 1998) (Angiosperm Phylogeny Group 2003)とその分類体系が公開された.

従来, 被子植物の分類体系は, 多くの植物学の教科書で単子葉類と双子葉類に分類されてきた. しかし, 原始的な双子葉類は単子葉類に近い系統関係であることが新たに認められ, それらの uniaperturate pollen とその他の双子葉類の triaperturate pollen (後者を真正双子葉類) の分類体系へと改められることとなった(Angiosperm Phylogeny Group 1998). その分類体系の見直しにより, 形態からでは区別がつかない収斂進化の一例が解き明かされた. ハス(*Nelumbo nucifera*)は従来形態や自生環境の類似性から原始的な双子葉類のスイレン科(*Nymphaeaceae*)に近縁とされていたが, 本種は真正双子葉類であることがわかり, 北半球の温帯に自生するズズカケノキ属(*Platanus*)と南半球に自生するヤマモガシ科(*Proteaceae*)に近縁であることが証明された(Soltis *et al.* 1999).

### 3-3. 分子系統学から被子植物の起源

分子系統学は, 系統関係を反映した新しい分類体系を構築するほかに, その祖先を解明する手がかりともなる. そして, その祖先を理解することで, 進化の方向性や時間的規模が明らかとなると考えられる(Savolainen・Chase 2003).

従来モクレン属(*Magnolia*)の大きな花は, 被子植物の花の原型とされていた. しかし, 近年の分子系統学の成果から主要な被子植物のクレードの外側に位置するアムボレラ属(*Amborella*)やコショウ属(*Piper*)などの他の花もモクレン属同様に原始的であるとされた(Soltis *et al.* 1999). しかしながらその一方で, 他の分子系統解析によると, アムボレラ属は原始的な被子植物ではないと報告している研究もある

(Goremykin *et al.* 2003).

また従来グネツム目(*Gnetales*)は, 木部における導管, 網目状の葉脈, 単純で単性の花様器官からなる生殖器官の類似性から被子植物に近縁であるとされていたが, 近年の分子系統学から針葉樹に近縁であるとされた(Donoghue・Doyle 2000).

以上のように分子系統学の研究から被子植物の祖先を解明する手掛かりが得られているが, 最終的に被子植物の祖先種がどのような形態を示していたかを明らかにするためには, 現存する種を研究しているだけでは解明できない(Donoghue・Doyle 2000). そのため, 化石による研究が改めて重要であることが指摘されている(Savolainen・Chase 2003). 最も古い被子植物の化石は, およそ1億2500万年以降のもので, スイレン科(*Nymphaeaceae*) (Friis *et al.* 2001)と*Archaeofractaceae*科の他の水生植物である. 特に*Archaeofractaceae*科の形態は, 花卉や萼片がなく, 二つ折りの雌蕊葉の下に一对の雄蕊を持ち, 形態及び分子系統解析から, 知られている被子植物の姉妹種と示唆されている(Sun *et al.* 2002). この研究では, 被子植物の起源をめぐる多くの仮説のなかで偽花説を支持し, 被子植物の祖先種は胚珠と花粉器官を具えた分枝系を持つことが示唆された.

今後も, 祖先をより理解するために, 化石から得られた知見を加えた分子系統学が重要視されていくと考えられる.

### 3-4. 分子系統学から植物進化

上記したように, 現存する種の系統関係の推定だけでは祖先を完全に理解することはできないが, 分子系統学から植物進化において他にもいくつかの重要な成果が今後期待される.

例えば, ゲノムサイズ(C-values)のデータベースが充実してきたことから, ゲノムサイズを考慮した被子植物の系統樹により, 被子植物の祖先のゲノムは小さいことが推測された(Leitch *et al.* 1998). この研究から, どのようにしてゲノムが増加し, 現存する被子植物に認められるような大きなゲノムとなったのかという問題が提起された. この問題ははるまで解釈されてい

ないが、今後は利己的 DNA や他のレトロトランスポゾンの研究により明らかにされるかもしれない (Savolainen・Chase 2003)。

ゲノムの変化は被子植物の放散に最も寄与しているとされ、現存する植物のおよそ 70%は倍数化により生じた系統とされている (Grant 1971)。従って、被子植物の系統関係を明らかにすることは、その系統が劇的なゲノムの拡大や収縮を経験しているかを判断する材料となる。それゆえに、ゲノム進化からの知見と系統学からの知見は、植物進化の解明に貢献すると考えられる。

その一例として、タマネギ属 (*Allium*) とアロエ属 (*Aloe*) で典型的な植物テロメア配列の欠損が、*in situ* ハイブリダイゼーションによって明らかにされた (Adams *et al.* 2001)。上記属内に分類されている種は多くの分類体系において、遠縁の種とされているが (Angiosperm Phylogeny Group 1998)、同じアスパラガス目 (クサスギカズラ目) (*Asparagales*) に含まれる。そのため、このテロメア配列の欠損は、進化の中において 1 回しか生じておらず、8000 万年前に *Doryanthaceae* 科から分岐したと考えられる (Adams *et al.* 2001)。このように、今後は分子系統学の情報なくしてゲノム進化は解明できないため、植物進化の解明に系統学は重要と考えられる。

さらに、被子植物において、多くの種を含む科では、平均的に葉緑体及び核 DNA 上の中立的置換の割合が大きい。また、形態から遠縁である科についても、塩基置換の割合が高いとされている (Barraclough・Savolainen 2001)。これらの塩基置換は、DNA 修復の不十分さや突然変異原への暴露が多かったためと思われる。このように高い突然変異率が発生に関わる遺伝子に影響を及ぼし、形態の多様性を増加させていると考えられる (Savolainen・Chase 2003)。

その興味深い例として、奇妙な生態学的地位を占める食虫植物のタヌキモ科 (*Lentibulariaceae*) の例が挙げられる。タヌキモ科の中でタヌキモ属 (*Utricularia*) はムシトリスミレ属 (*Pinguicula*) よりも形態的に非常に多様であり、また、陸から水中まで幅広

い環境に自生している。そして、そのタヌキモ属の方が塩基置換の割合が高く、そこには世代交代の時間の長さによる違いは関係していないとされている (Jobson・Albert 2002)。そして、これらのことは塩基置換の増加が分岐を増加させるという仮説と関係していると考えられる (Jobson・Albert 2002)。このように、植物の分子系統学は塩基置換と種の多様性の関係を解き明かしつつある。

しかし、いまだ多くの植物のゲノム情報はわかっておらず、EMBL もしくは GenBank に登録されている植物の塩基配列情報の 81%以上は、たった 13 種に由来するものである (Savolainen・Chase 2003)。そのため、表現型における多様性の起源を解き明かすためには、現在のモデル生物以外の種についての大規模なゲノムプロジェクトが必要である。そして、そのプロジェクト遂行のためには系統樹思考が重要となると考えられている (Savolainen・Chase 2003; Angiosperm Phylogeny Group (APG) 2003)。

### 3-5. 分子系統学からゲノム系統学へ

近年になり多くのゲノムが解読されはじめたため、分子系統学は新たな時代へと移り変わってきた。いわゆるゲノム系統学の時代の到来である (Delsuc 2005)。そこには、伝統的な系統学における二つの重要なステップがあり、相同な形質の同定と系統樹の作成がある。しかし、ゲノム情報の活用により、相同な形質としての情報源を分析するよりも系統関係を推定する手法の改善が強調されるようになっている。そこで、ゲノム系統学における近年の手法として ‘sequence-based methods’ と ‘methods based on whole-genome features’ が挙げられる。

‘sequence-based methods’ とは、ゲノム系統学の時代に先駆けとして行なわれていた手法であり、直系相同遺伝子をアライメントし系統推定をする手法である。その中の系統推定には、supermatrix アプローチと supertree アプローチがある。supermatrix アプローチは個々の遺伝子を鎖状につなぎ解析する系統推定の手法であり、supertree アプローチは個々の遺伝子から得られた最適な系統樹を組み合わせる系統推

定の手法である。また, もう一つの手法 ‘methods based on whole-genome features’ とは, 遺伝子の役割, 遺伝子の順序及びゲノムにおけるオリゴヌクレオチドの分布の比較から系統推定をする手法である。

被子植物は陸上で放散しており, 生物の多様性のパターンや過程を研究する上でのモデルとなっている。そこで, ゲノム系統学の ‘sequence-based methods’ の supertree アプローチから, 被子植物の科についての系統関係が推定された。その成果として, ダーウィンの忌まわしき謎とされる ‘被子植物の素早い出現と初期の多様化’ が明らかにされた。つまり, 被子植物の多様化率は非常に不安定なパターンを示していることが明らかとなり, 被子植物は生物学的な形質と環境との相互作用が反映した複雑な多様化の過程をたどったと考えられた (Davies *et al.* 2004)。

また, ゲノム系統学において, 複雑な形質を扱う比較形態学の伝統的な手法を駆使することで, 稀に起きるゲノム変化 (rare genomic changes (RGCs)) の研究が行うことが可能になるかもしれない。稀に起きるゲノム変化とは, 挿入や欠失, トランスポゾン (SINE 及び LINE), ミトコンドリアと葉緑体 DNA の順序の変化, 遺伝子重複, 遺伝子の融合と分裂, 遺伝暗号の変化であり, 系統樹の節を支持する特性として使われる可能性がある (Rokas・Holland 2000)。

### 3-6. ゲノム系統学から…

ゲノム系統学は従来の分子系統学における確率論的もしくはサンプルの誤差を最小限に抑えることができる。しかし, システム上の誤差を免れたわけではない。すでに指摘した long-branch attraction の他に, 系統推定のモデルの違いにより生じる問題や進化速度の違いから生じる heterotachy という現象が問題として残されている。

その問題を解決すべく系統推定のモデルの研究が注目を浴びている。系統推定のモデルとして, 距離行列法, 最節約法, 最尤法及びベイズ法があるが, 近年では上記のシステム上の誤差を緩和するため, 最尤法及びベイズ法が好まれて使われている。しかし, それらのモデルも heterotachy の影響を受けると考

れており (Kolaczowski・Thornton 2004), そのため様々なモデルを組み合わせた ‘mixture model’ が提案されている (Pagel・Meade 2004)。

さらに, 非常に複雑な数学的な問題として NP 完全問題に属する計算上の問題が残されている。データのサイズが大きくなると, その最適解を求めるのに時間がかかってしまうため (三中 2006), この問題はゲノム系統学において見逃せない重要な課題となっている (Delsuc *et al.* 2005)。

近年のゲノム系統学は様々な生物種を対象とし, ‘生命の樹’ の解明へと向かっている。しかし, 最終的に, その解明は生物の多様化する進化パターンが解明されなければ実現することはできない。もし, 種分化の時間間隔が非常に短ければ, たとえ完全なゲノム情報があったとしても, ほとんどの系統学的な兆候がみられず, 系統樹の節を正確に決定することができなくなる。さらに, 進化過程の本質そのものために, 隔離種や絶滅危惧種などの系統関係を推定することは非常に困難となる。それゆえに未解決の部分が残るかもしれないが, 今後のゲノム系統学から多くの知見を得ることができると考えられる。そして, ゲノム系統学からの知見を利用して, 生物やゲノムの進化, 遺伝子の機能, 環境との相互作用を理解するといった問題へと着手することができるようになるであろう。

## 4. 昆虫の遺伝的多様性研究における分子マーカーの利用

### 4-1. 昆虫の種多様性とその危機

昆虫は節足動物の多足類の祖先から分化したと考えられ (中筋ら, 2000), それらの最も古い化石は, 約 4 億年前の古生代デボン紀の地層から出土したトビムシ目 (*Collembola*) やイシノミ目 (*Microcoryphia*) の仲間である。また翅を獲得していないが, 石炭紀後期になるとカゲロウ目 (*Ephemeroptera*), トンボ目 (*Odonata*), カワゲラ目 (*Plecoptera*) などの有翅昆虫類の化石が現れた。古生代の終期であるペルム紀には現存の昆虫の目の大部分が出現し, 新生代第三紀には現存昆虫の科のほとんどが分化していたと考

えられる(中筋ら, 2000).

昆虫は、現在地球上に生存する生物のなかで種多様性の最も大きな一群で、現存動物種の 3 分の 2 を越える約 100 万種がすでに記載され、未記載種を含めると、少なくとも 500 万種の昆虫が地球上に生存していると考えられる。昆虫の種多様性が大きいのは、翅を獲得し、体節を機能的な構造に分化させて行動圏を広げるとともに、体を小さくし、各々の種の生態的地位を小さくすることにより、地球環境と利用資源を細分化して、各々の環境に適応する種を派生してきた結果である(内藤 2003)。

このように昆虫は地球上で最も繁栄しているが、人類の科学技術の進歩に伴う森林伐採、大規模開発、合成化学物質の乱用などが環境破壊と汚染を招き、その結果その生存が現在、急速に脅かされている。また、生物農薬としての昆虫の放飼など人為的攪乱が他の昆虫を含む生物多様性に影響を及ぼすことも考えられる(野田ら 2004)。特殊で狭い生態的地位に適応を果たしてきた昆虫にとっては、最近の 20～30 年の地球環境の変化は、彼らの進化史で例をみないほど激烈なものかもしれない(内藤 2003)。

日本では 1993 年に「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律」が施工され、法律によって貴重な野生生物が保護されることになった。1998 年に絶滅危惧種のベッコウトンボ (*Libellula Angelina*) の捕獲が法律で禁止されたのをはじめ、国や地方自治体が天然記念物指定や保護条例などにより、ホタル科 (*Lampyridae*) の仲間やギフチョウ (*Luehdorffia japonica*) などの絶滅が心配されるチョウを保護する動きが増えている。これまでは主として希少種の個体や個体群が保護の対象となるか、あるいはそれらが生活する生態系が保全の対象とされてきたが、最近では、昆虫の遺伝的多様性を保全する動きが高まってきている(内藤 2003)。

#### 4-2. 昆虫の遺伝的多様性研究に利用される分子マーカーの種類

昆虫に利用する DNA マーカーは、核 DNA もしくはミトコンドリア DNA のどちらを対象にするか、またその

中の機能的な役割を担っている領域もしくはそうではない領域を解析するかで得られる結果の解釈が異なる。(加賀谷 2005)。

#### 4-3. DNA マーカーを利用した昆虫の遺伝的多様性研究の実際例

現在では、昆虫の遺伝的多様性に関する研究が多く報告されている。以下では、分子マーカーを利用した研究の実際例としてダイレクトシーケンス法、PCR-RFLP 法、SSR 法、SNPs 法、RAPD 法、AFLP 法を用いた研究について紹介する。

##### 4-3-1. ミトコンドリアハプロタイプの分布から推測される日本の湿地帯におけるオオルリハムシ (*Chrysolina virgata*) の系統地理学 (Sota *et al.* 2004)

日本の湿地帯に生息するオオルリハムシの個体群における遺伝学的変異をミトコンドリアのチトクロームオキシダーゼサブユニット I 遺伝子領域 750 塩基対のシーケンケンスデータをもとに調べたところ、ハプロタイプの異なる 2 系統の存在が明らかとなった。そのうちの 1 系統(クレード A)は本州北東部から九州にわたって分布し、26 のハプロタイプから構成されるが、残りの 1 系統(クレード B)は単一のハプロタイプで、クレード A と共存する本州北東部の狭い範囲に限られた分布域を持った。ハプロタイプについての階層クレード解析の結果から、現在のハプロタイプの分布パターンは大陸からのコロニゼーションの繰り返しと気候の変化に基づくことが示唆された。

##### 4-3-2. スギカミキリ (*Semanotus japonicus*) のミトコンドリア遺伝子の地理的構造 (Shoda *et al.* 2003)

日本に分布し、スギに穿孔するスギカミキリの外部形態には地理的構造が認められる。宿主であるスギが氷期に分断分布していたために、本種の種内に遺伝的構造が形成された可能性がある。個体群の遺伝的構造変化の過程を明らかにすることを目的として、異なる形態的特徴を示した岩手県から愛媛県の 4 個体群の 52 個体についてミトコンドリア DNA の CO I,

CO II 領域の部分配列を決定した。その結果, 10 ハプロタイプが検出され, 2 クレードに大別される有意な遺伝的距離の相違が認められた。それらは日本海側と太平洋側のスギ退避地に由来する系統であると考えられた。岩手個体群では日本海側, 太平洋側の双方のハプロタイプが検出された。スギは氷期に日本海側と太平洋側の両退避地から北上して, 東北で混交したと考えられている。スギの移動に伴いスギカミキリ個体群が東北で二次的接触したことが示唆された。

#### 4-3-3. PCR-RFLP によるミカンコミバエ (*Bactrocera dorsalis*) 種群の識別のためのミトコンドリア DNA の D-loop の解析 (中原 2000)

アジア, オーストラリアを中心に分布するミバエ科 (*Tephritidae*) *Bactrocera* 属は幼虫時代にマンゴウ等の生果実を加害する経済的な害虫である。日本においても輸入禁止品を決定する上で重要であるが, 外部形態からの同定が困難な種が含まれている。そこで, 横浜植物防疫所で累代飼育中のミカンコミバエ種群 5 種 9 系統を用いて PCR-RFLP による各種ミバエの識別法開発を行った。PCR によって 12SrRNA の一部, 数個の tRNA および D-loop 領域の全領域を含む, 約 1600bp のミトコンドリア DNA 断片が増幅され, 17 種類の制限酵素により処理し, 断片パターンを比較した。その結果, 9 種類の制限酵素によって 23 種類の断片パターンが得られ, スリランカ産 *B.kandiensis* は他の 4 種との遺伝的相同性がもっとも低く, 東南アジア産の他の 4 種とは離れた関係にあることが示唆された。

#### 4-3-4. マイマイガ (*Lymantria dispar*) における SSR 多型領域 (Koshio *et al.* 2002)

SSR 領域は, 近年, 行動生態学における父子判定や精子優先度のみに用いられるのみならず, 異なる地域集団の集団遺伝学的比較研究や生物地理学的研究においても, しばしば用いられているが, 鱗翅目での SSR 多型領域についての報告はまだ多くはない。その鱗翅目のマイマイガにおいて, SSR 領域として新

たに 3 つの多型領域を特定され, これらは複数の対立遺伝子を持ち特定の地域集団にしか見られないものも存在した。これまでに報告されている多型領域と併用することによって今後の行動生態学的研究のみならず, 日本のマイマイガ集団の集団遺伝学的解析においても有用であると思われる。

#### 4-3-5. ハマダラカ的一种 (*Anopheles gambiae*) の同一種内でのヌクレオチドの変異: マラリアベクターへの生物学的考察 (Morlais 2004)

ハマダラカ的一种 (*A. gambiae*) はマラリア媒介者である。最近のゲノムレベル解析の手法発達に伴い, *A. gambiae* のゲノム配列が明らかとなり, マラリア媒介者への新しい生物学的考察がなされ, 蚊の媒介による伝染病を抑える打開策をもたらすはずである。同一種内の異なる 3 系統の蚊のコード領域で, およそ 125 塩基対につき 1 塩基多型 (SNPs) を示した。特に, 蚊の免疫に関する遺伝子と病原体認知のレセプターでの置換率は高く, より高いヌクレオチド多型が見られた。これに比べ, *A.gambiae* の天然の個体群の SNP の位置の遺伝子型は対照的なパターンを示し, エステル含有タンパク質である TEP3 の遺伝子における突然変異 Y443H は, この突然変異が淘汰圧のもとに生じたことを示した。SNPs 基礎研究が, 媒介者の能力を決定する表現型形質に関連する塩基配列の変異を同定するのに有用なものであることを示した。

#### 4-3-6. RAPD によるアリモドキゾウムシ (*Cylas formicarius*) の DNA 多型の検出 (Kamura *et al.* 2002)

熱帯から亜熱帯の 50 カ国以上に分布するアリモドキゾウムシはサツマイモの深刻な害虫である。南西諸島のアリモドキゾウムシの室内累代飼育個体群の DNA レベルでの地理的変異を調べるため, RAPD による分類を行った。3 種類のプライマーで PCR を行い, 得られた PCR 増幅産物の多型解析を行ったところ, 9 タイプに分別された。これらの中には南西諸島の全個体群に共通するタイプが認められたが, 地域に特異的なタイプも得られた。

#### 4-3-7. AFLP による台湾および八重山諸島のタカサゴシロアリ(*Nasutitermes takasagoensis*) (等翅目:シロアリ科) の遺伝距離 (Garcia *et al.* 2004)

シロアリは、主に熱帯の地域に分布し、高く統合されたコロニーを構成する社会性昆虫であるが、その社会性を理解するうえで欠かせない遺伝的個体群構造、遺伝的多様性と遺伝子流動の研究がこれまでできてこなかった。個体群の分散能力と同系交配率は遺伝標識を用いて間接的に判断できるので、AFLP を用いて日本南部の八重山諸島におけるタカサゴシロアリの個体群構造を解析したところ、中程度の亜集団構造であることがわかった。翅のあるシロアリはこれまで数 100m 以上飛べないとされていたが、数 km 以上飛ぶ可能性があることも示唆された。さらに、新しく台湾南部の Hengchuen 半島からサンプルを集め、八重山諸島から集めたサンプルと比較した。その結果台湾のサンプル、八重山諸島 6 産地のサンプルを用いて、遺伝距離が予測した結果、3 種類のプライマーの組み合わせで全 155 個の AFLP 断片が得られ、8 個 (5%) の多型バンドが得られた。台湾の個体群と他の島々の個体群の間の遺伝距離は八重山諸島の個体群間のものより大きかった。このことは台湾と八重山諸島間の遺伝距離はその間の遺伝子流動を妨げるのに十分大きかったことが示唆された。

#### 4-4. 昆虫の遺伝的多様性研究の今後

昆虫の遺伝的多様性の研究は DNA レベルでの解析が主流となってきている。しかも少数個体にもとづく種間や属間の分子系統の構築という初期の研究から種内の地域個体群間や個体群内の個体変異の解明へと、より詳細で多量の遺伝情報が急速に蓄積されている。また、これまでは農林業の重要害虫や分類学的に興味をひく昆虫が、DNA 解析の対象とされることが多かったが、最近では種多様性の保護の立場から対象昆虫を選ぶ例が増え、保全生態学の立場から昆虫の遺伝的多様性を研究する状況が整ってきた。一方で、分子情報の意義についても、今後検証が進むものと思われる。ミトコンドリア DNA と核 DNA の系統情報の不一致や、現実問題として対象と

する分類群の違いにより解析に適する遺伝子を選択しなければならない事実は、遺伝情報の一次元的取り扱いの難しさを示唆している。コドンを構成する 3 塩基のうち、第 3 塩基が第 1 および第 2 塩基に比べ置換速度が顕著に速い事実は、このレベルですでに選択がかかっていることを示唆しているとも受け止められ、今後系統構築の基盤である分子進化の中立性の検証にまで立ち返ることになるかもしれない (内藤 2003)。

昆虫は少なくとも数 100 万種が現存していると思われるが、保全生態学の立場からは絶滅が危惧される昆虫の遺伝的特性を解明するのが急務である。個体数減少に伴う遺伝的多様性の偏りなどが明らかにされ、健全な遺伝的多様性の回復の方策が模索される日が近いかもしれない。そのためには健全な昆虫についても、絶滅危惧種と平行して遺伝情報の蓄積が必要である (内藤 2003)。

## 5. 食品の DNA 鑑定

### 5-1. 日本における食品の現状と問題点

近年、イチゴ及びウナギなどの輸入品が急増し国内の生産を圧迫している (松元 2003)。これは、他の輸入品にも同様であり、国産品の低迷や海外産の安価な製品との競争は、国内経営者を楽観視できない状況に陥らせている (松元ら 2003)。このような状況の中、生産者や流通業者の中には、輸入品あるいは他の国内品との差別化を図るため、様々な方策を講じている。

そのひとつが特徴ある品種の栽培及び新品種の開発により高価格を維持し、経営を安定させることである。その結果、品種の多様化が進行した。

また、消費者は味、香、色など好みのものを選択できる機会が増え、また生産者にとっても品種の特性を生かすための栽培法を開発するための技術力が増し、結果的に農業の活性化につながると考えられた。しかし今、食品の安全対策だけでは解決できない別次元の深刻な問題が生じている (永田 2004)。

開発された新品種は知的財産そのものであり、特許権や商標権など同様に、新品種の育成者の権

利は育成者権(知的財産権)として付与及び保護され(丸山 2003), 無断で販売することはできない。しかし, 国内でしか生産されていないはずの品種が国内に輸入されるという問題が生じた。輸入イチゴを対象として品種識別を行ったところ, 「レッドパール」と判定されたイチゴパックの一部から「さちのか」と推定される個体が検出された。「レッドパール」は, 韓国の一部の業者に許諾が認められているため, 判定された個体が確認されても理に叶った結果と言える。しかし, 「さちのか」は許諾が認められていないため, 本来ならば逆輸入されることはない(松元 2003)。さらに, 韓国で普及するイチゴ品種の大半が, 日本で育種・登録されているものであることが明らかとなった(竹次 2004)。このように品種の多様化は, 品種の原料原産地を不明確にし, 輸入品と国産品との混合を生じさせた。また, 品種間に価格差が生じると, 一見ただけで判別が困難な品種では, 表示とは異なる品種を流通・販売する不正表示が問題となることが多い(松元 2003)。

食品は, 生鮮食品と加工食品に分類できる。生鮮食品とは天然食材のことであり, 動物性食品(肉類, 魚介類など)と植物性食品(穀物, 野菜, 果実類など)に分けられる。一方, 加工食品(冷凍食品, 缶詰, 漬物など)は, 天然食材を加工した食品である。平成12年「農林物質の規格化及び品質表示の適正化に関する法律」(JAS法)の改正により市販される酒類医薬品を除く全ての飲食品について表示制度が整備された。生鮮食品には「原産地」, 加工食品の一部の品目には「原料原産地」の表示が義務づけられた(高嶋・森田 2002)。

従来, 品種の同定は品種の特性, 主に形態的特徴により行われ, 場合によっては比較栽培試験によってなされてきた。しかし, 相応の期間と費用を要するものであり(丸山 2003), その判断基準を客観的かつ明快に説明することは難しい。また, 草型や生育特性などの情報がなく収穫物のみから識別を行う場合, 必要な情報が十分に得られないこともある。漬物などの加工食品ともなると, 一般に外観から形態的特徴を見極めることは難しく, その結果, 原料として利用さ

れている品種の識別を行うことは極めて困難である(丸山 2003; 福岡 2004)。このように, 用いた品種と表示の同一性を証明することは極めて困難である(松元 2003)。

そこで, 食品情報の信頼確保のため, 高精度な科学的検証が必要となる(永田 2004)。食品素材の不正表示の防止, 有良品種の保護及び産地の特定を行うため, 同一品種か他品種であるかをDNA塩基配列の異同により判定する「DNA鑑定」の開発が必要とされた(松元 2003; 矢野 2003)。

## 5-2. 食品のDNA鑑定の問題点

分子生物学的手法を用いた品種識別は, アロザイムなどのタンパク質レベルから始まった。アロザイムは最初に普及した分子マーカー(指標)であり, DNAをマーカーとして使われ始めたのは1970年代以降のことである。アロザイム分析は電気泳動と酵素の活性染色を組み合わせた酵素型の検出技術で, 1960年代にその基礎がつけられた(Markert・Moller 1959)。当時, この技術は革新的な分析技術として広く受け入れられた。アイソザイムは環境的影響を受けにくい遺伝形質のため, 品種識別や遺伝解析に有効であった。また, 共優性を示すので, ヘテロ個体とホモ個体の区別が可能である。しかし, 分析できるアイソザイムの数は限られており, 得られる多型の数は少なく, 果樹の枝変わりなど突然変異で生じた個体の識別は困難であった(別所 2000)。1980年代に入るとDNAを直接分析する手法が開発され, DNA多型の検出法としてRFLPが行われるようになった。しかし, この手法は分析時間がかかること, また, 通常は放射性同位元素の使用が必要であることなどの欠点がある。1990年代に入ると, PCRの開発によりDNA分析手法の様相は大きく変わった。利点として, 簡易・迅速であること, 少量の試料で行えること, 試料の形状に左右されないこと, 環境要因の影響を受けないこと, 結果が客観的で安定していることなどが挙げられる(松元ら 2003; 丸山 2003)。このPCRを応用した多型検出技術(RAPD, AFLP, ISSRなど)が開発され, 特にSSRは再現性が高く, 多型の検出感度が極めて高い

ため、品種間の変異に富む。また、オルガネラ DNA を用いた研究も PCR の活用で急速に進んだ(津村 2001)。

しかし、PCR を応用した鑑定技術が報告されている一方、食品、特に加工食品の DNA 鑑定技術確立においては、様々な問題が存在する。加工食品とは、加熱(煮る・焼く等)、味付け、粉碎、搾り汁等の耕作を加えたことにより、物理的・科学的特性の変化が生じたものである(丸山 2003)。そのため、加工食品は加熱による DNA 分解、また調味料を用いた食品は DNA 変性が生じ、保存の観点からみると極めて厳しい状態にさらされている。コメの場合、学校や会社における給食や持ち帰り弁当、冷凍米飯や無菌包装米などの加工米飯は精米に比べて、炊飯加熱を受けているため DNA の一部が分解、また変性したタンパク質が DNA 抽出を妨げるなどの問題がある(大坪・中村 2002)。そのため加工食品から抽出された DNA は、低分子に断片化されていることが多い。また、食品に PCR を阻害する物質が含まれている可能性もある。茶の DNA 鑑定においては一部の紅茶サンプルでの DNA マーカーが増えにくいことが報告されている(松元 2003)。さらに、加工食品では DNA 抽出が可能であっても、様々な品種の食材が混合しているため、DNA が溶出混合している可能性があり、特定品種の検討ができず、特異的な DNA マーカーの探索も非常に困難である。以上のことから、DNA マーカーを用いて表示通りの品種が用いられているか否かを確かめるためには、加工食品の素材から DNA 解析を行う必要がある。

### 5-3. 食品の DNA 鑑定法

DNA 鑑定は、ヒト以外の動物、植物、水産の分野においても、血統、品種、系統の判別などの面で、その重要性はますます高まっている(矢野 2003)。以下では、現在までに報告されている食品における DNA 鑑定法の代表的な食品について紹介する。

#### 5-3-1. PCR 法を利用したコメの品種識別法

コメは、日本の農業上また日本人の生活上におい

て最も重要な食物である。近年、消費者の良食味指向が進み、コシヒカリ、ひとめぼれ、ヒノヒカリ、あきたこまち等の良食味米の生産が増加し、流通市場でも高い価格で取引がされている。しかし、魚沼産「コシヒカリ」や秋田県「あきたこまち」は生産量よりも流通量が多いという意見もあり、コメの品種識別が大きな課題となっていた(松元ら 2003; 大坪・中村 2002)。

従来、コメの品種は植物体や米粒の形態、出穂期などの諸特性によって識別・特定されてきた。しかしながら、これらの特性は環境などの要因に大きく左右され、正確に品種を特定することは必ずしも容易ではなかった(赤木 2002)。そこで、試料の形状に左右されず、さらに近縁種の判別も可能である DNA を用いた品種識別の開発が進められた。現在までに、国内産 10 品種の識別が可能な RAPD(大坪・中村 2002)、SSR(赤木 2002)、RFLP と SSR の組み合わせた分析法(河野ら 2000)などが報告されている。また、このような技術は実用化されており、県産米の品種識別に用いられている。秋田県総合食品研究所では県産の「あきたこまち」の品種保証に PCR による品種判別を適用している。秋田県以外に、滋賀県農業試験場、熊本県農業研究センター、福岡県総合農業試験場、新潟県総合農業研究所、富山県農業技術センター、石川県農業総合試験場などにおいても、RAPD 法による自県産米の品種判別が行われている(大坪・中村 2002)。さらに、品種識別技術の迅速化と簡易化および低価格化のため、全国の作付面積の約 36% を占めており、流通量も最も多いコシヒカリの品種識別キット(雲聡 2005)が販売されているなど、コメの品種識別は最も発展していると考えられる。

#### 5-3-2. ミトコンドリア 16S リボソーム RNA 遺伝子の DNA 多型を用いたウナギの産地特定法

近年、日本産ウナギ(*Anguilla japonica*)の稚魚であるシラス捕獲量の減少、ウナギの蒲焼などの需要拡大により、日本産シラスが異常な高値となると共に多様な外国産(*A. anguilla* など)シラスの輸入が始まっている。しかし、フランス産の *A. anguilla* は魚体の大きさでおおよその区別ができるが、他の種はシラスの

段階ではほとんど識別ができない。そのため、外国産を日本産と偽ったり、多量に混入させたりするなどの不正取引により養鰻業者が被害を受けている。

そこで不正防止のため、ミトコンドリア 16S リボソーム RNA 遺伝子を用いたリアルタイム PCR (Watanabe *et al.* 2004), 種特異的なプライマーを用いた PCR (Sezaki *et al.* 2005), ミトコンドリア・チトクロム b 遺伝子を用いた PCR-RFLP (若尾ら 1999) が報告されている。PCR-RFLP では日本産に加えアメリカ産 (*A. rostrata*), フランス産 (*A. anguilla*), フィリピン産 (*A. marmorata*), オーストラリア産 (*A. australis*・*A. reinhardti*), インドネシア産 (*A. celebesensis*) の 6 種について種を識別した (若尾ら 1999)。また, この方法を用いて市販のウナギ加工品 (蒲焼き, 白焼き, レトルト) を調査した結果, 日本産に加え, フランス産, アメリカ産が検出された。このことより, 市販品で日本産表示がありながら日本産以外のウナギであることが確認された。そのため本手法はウナギ原産地表示の科学的指標のひとつとなると考えられた (高嶋・森田 2002)。

### 5-3-3. 毛色関連遺伝子 (MC1R 遺伝子, KIT 遺伝子) の DNA 多型を利用したブタの品種識別法

日本における豚肉市場の主な品種はほとんどが西洋白色種 (ランドレースあるいは大ヨークシャー) 及びディロック種であり, それ以外には, メイシヤン種, バークシャー種 (黒豚) などが挙げられる。その中でもバークシャー種は, 脂肪融点が高く肉には甘みがあり, 特においしいとされてきた。しかし, 一腹産子数が少なく, 体重増加も遅いため, 出荷量が徐々に減少している。

近年, 市場内において, バークシャー種以外を黒豚と表示した食肉が生産量より多く出荷されるなどの問題が生じた。そこで, 平成 11 年農水省畜産局は「黒豚」の定義 (表示) を純粋バークシャー種同士の交配による産子とした。しかし, 食肉になった段階で純粋バークシャー種であることをどのように識別するかが問題となり, 品種識別の開発が急務であった。そこで, 2 つの毛色関連遺伝子 (MC1R 遺伝子, KIT 遺

伝子) の DNA 多型を用いた品種識別の研究が報告された (三橋・奥村 2000)。この手法により, 「黒豚」と不正表示されたバークシャー種 (白黒斑) 及び主要品種: 白色品種 (ランドレース, 大ヨークシャー), デュロック種 (褐色), ハンプシャー種 (白黒斑), メイシヤン種 (中国黒色) の品種識別が可能となった。さらにこの手法は, 食肉及び加工肉 (ハム・ソーセージなど) にも用いることができると報告された。また, 黒豚の識別法以外にも, ミトコンドリア DNA 非コード領域を用いた静岡型銘柄豚: 大ヨークシャー種系統種「フジヨーク」識別のための研究報告がされた (井手ら 2005)。以上のように, 黒豚表示の不正防止以外にも静岡型銘柄豚のような優良品種識別のための DNA 鑑定法の開発も進んでいる。

### 5-3-4. SSR マーカーを利用したイチゴ品種の識別法

イチゴ (*Fragaria ananassa*) の品種は一種のブランドとなっており, 商品の価格や消費者の購買意欲に大きく影響している (國久ら 2002)。「東の女峰, 西のとよのか」の 2 大品種と呼ばれていたイチゴは, 品種の多様化が進み, 「章姫」「とちおとめ」「さちのか」などの新品種が育成された (松元 2003)。また, こうした風潮を受け, 全国各地で地域型新品種の育成も進み, 栽培地域を限定した「さがほのか」「さつまおとめ」などの品種が生まれた (國久ら 2002)。しかし, 一方で, 国内で育成された品種の海外での違法使用及び生産物の逆輸入が増加し問題となっている (松元 2003; Shimomura・Hirashima 2006)。そこで, こうした違法使用抑制を目的にイチゴの品種識別法: 8 品種識別可能な SSR マーカー (Shimomura・Hirashima 2006), 14 品種識別可能な PCR-PFLP (國久ら 2002) などが開発された。

### 5-3-5. カテキン合成関連遺伝子の DNA 多型を利用した茶品種識別とその起源探索

茶 (チャ) (*Camellia sinensis*) は, 緑茶の原料として用いられている工芸作物である。消費者の健康志向の高まりにより, 渋みの主成分であり品質に直接関係するカテキンに多くの機能性があることが一般的に知

られるようになった。またカンドリンクの普及により、消費量の減少に歯止めをかけた(松元 2003)。これまで、収穫時期の集中の回避や品質の多様化のために多品種化が求められていたが、現在でも栽培されている茶品種の 83%は「やぶきた」である。一方、茶業関係者のなかには、「さえみどり」「ふじかおり」などの特徴ある品種に代えて差別化を図る動きもでてきた。しかし、栽培されている茶に他品種の混入、また、製品として流通している内容物が表示通りか否かななどの問題が生じ、茶の品種識別技術が必要とされた(松元ら 2003)。

Matsumoto *et al.* (1994)により、日本産と中国産の遺伝的相違を検討するため、カテキン合成関連遺伝子；フェニルアラニン・アンモニア・リアーゼ(PAL)、カルコン・シンターゼ(CHS)、ジヒドロフラボノール・ヒドロキシラーゼ(DFR)の葉緑体 DNA を DNA プローブに用い RFLR が行われた。その結果、3つの遺伝子のうち特に PAL DNA マーカーは遺伝的多様性の評価において効果的なツールであると報告された(Matsumoto *et al.* 1994)。さらにこの方法を用いて、品種識別を行なったところ、45 品種(緑茶 39 品種、紅茶 6 品種)を識別可能であることを明らかとした(Shiv Shankhar・Matsumoto 2003)。

また、茶の起源を検討する研究も行われた。日本各地から収集された茶を RFLP 分析した結果、全て同じ起源であると考えられた(Matsumoto *et al.* 2002)。また、同様の方法を用い、韓国産と日本産を比較した結果、異なる RFLP パターンが示され、韓国産は日本産より多くの遺伝的多様性が確認された。さらに異なる 2 つの遺伝的グループが確認され、韓国の茶は古代中国から伝来したグループと日本から 50~100 年前伝来したグループがあると考えられた(Matsumoto *et al.* 2004)。

このように、茶の DNA 鑑定は品種識別のほか、種の起源を探索する方法としても用いられている。

#### 5-4. 今後の食品の DNA 鑑定

食品の原料表示は多くの場合、消費者にとって唯一の情報源である(永田 2004)。食品の信頼性と価

値を高めるためには、品種の識別が重要である(矢野 2004)。表示とは異なる内容物であるかどうかを識別可能な技術の存在は、実際に鑑定に用いなくても、抑止的な効果も期待できる。事実食肉の黒豚の表示をめぐることは、DNA を用いた識別技術が確立されたことにより、不正表示が減少したという例もある(松元ら 2003)。

また、DNA 多型分析による識別技術については、今回紹介した食品(コメ、ウナギ、ブタ、イチゴ、茶)以外にインゲンマメ、小麦、イグサなどの幅広い分野での技術開発が進められつつあるが、実用化されているものはコメ、ブタなどごく一部に限られている。そのため、今後一層の品種識別技術の拡大が必要であり、さらに、流通・陳列されている農産物や加工製品などを対象とした DNA 鑑定技術の確立が必要とされている(松元ら 2003; 矢野 2003; 矢野 2004)。今後、DNA 鑑定は、短時間、安価、かつ正確に品種や産地を鑑定できる実行力として発展することによって、不正商取引の抑止力、品種保存、表示の不正防止として機能することが期待される(福岡 2004; 若尾ら 1999)。

## 6. 生薬の DNA 鑑定

### 6-1. 日本における生薬の現状と問題

生薬には、歴史的に長年にわたり用いられ伝承されたものが多くある。これらの生薬は時代とともに変遷し受け継がれて現代にいたっている(西部三省 2002)。日本では、薬事法で生薬も医薬品として認められているため、医薬品・医薬部外品・健康食品として幅広く使用されている。近年、健康への関心の高まりにより、特に健康食品・医薬部外品等として繁用されるようになった。また医療機関においても、糖尿病を始めとする生活習慣病の有病者数の増大や、疾患の多様化から多くの薬剤の併用を余儀なくされている患者が多くなっていることが背景となり、漢方製剤は種々の慢性疾患あるいは急性疾患の治療に使用されている(西村 2005)。そのため、日本での漢方生薬製剤の生産高は 1000 億円を超える大きな市場となっている(厚生労働省医政局 2004)。

このように漢方薬の需要が増している中, 高品質な製品を市場に安定供給することは重大な課題である。基本的な漢方製剤の品質を支えているのは, 構成する生薬個々の品質であることは言うまでもない。しかし, 原料となる生薬については, 天然物という性格上, 品質を一定に保つための人為的な制御は容易ではない(諸田 2006)。それは一般に生薬は生産地, 気象条件, 加工法などによって品質に差を生じやすいからである(藤田 1972; 霜川ら 1980)。更に漢方製剤に使用されている原料生薬は, そのほとんどを中国からの輸入に頼っていることも管理を複雑化させる要因となっている(諸田 2006; 日本特産農産物協 2003)。

管理が必要となる問題として, 他の植物が混入した生薬が市場に出回っていることがある。著者が研究している茵陳蒿(インチンコウ)は, 日本では基原植物はカワラヨモギ(*Artemisia capillaris*)一種と定義されているにもかかわらず, 頭花がよく類似しているオトコヨモギ(*A. japonica*)の混入があることが報告されている(今井・三瓶 1952)。薬用成分 capillarisin や 6, 7-dimethylesculetin を共に含むのは, 外国種を含む 49 種のヨモギ属植物の花蕾を調べた結果カワラヨモギのみであった(後藤・小宮 1978)。そのため, 他のヨモギ属植物の混入は茵陳蒿の品質低下につながると考えられる。このように, 他の植物が混入した生薬が容易に市場に流出してしまうのは, 基原植物に他の植物が混入しても識別が困難なためである。

また, このような問題は他の生薬でも報告されており, 肉從蓉(ニクジュウヨウ)は“中国薬局方”に基原植物として *Cistanched eserticola* が記載されているが (Chinese Pharmacopeia Committee Ministry of Public Health 2000), *C. salsa*, *C. tubulosa* が混入していることが明らかになっている(Hu *et al.* 1994)。

生薬が医薬品として使用される限り, 薬事法に記載された基原植物以外の類縁種の混合は避けなくてはならない。すべて品質の同一性が強く求められる。したがって生薬の基原及び品質を的確に評価することが重要となってくる(西部三省 2002)。そこで, より正確でかつ効率的な鑑定法が求められている。

## 6-2. 生薬鑑定の問題点

薬用植物及び生薬の基原植物の同定は一般の植物と同様に, 花など地上部の形態的な特徴から種を同定する。しかし, 開花期ではない栄養成長期や, 生薬として加工された製品は, 形態的な特徴を示す部位が失われていることがよくある(菱田 2004)。また, 一般に生薬は含有する成分の数が多く, 一つ二つの有効成分だけではその生薬の評価ができないものがほとんどである(西岡 1983)。そこで, 近年, DNA 解析技術を応用し, 客観的で同定材料の形状などに依存しない DNA 塩基配列情報による薬用植物・生薬の鑑別法が注目されている(菱田 2004)。

## 6-3. 生薬の DNA 鑑定法

生薬の鑑定は, これまでは形態観察による種の識別や含有成分に基づく化学的確認試験によるケモタキソミーが行われてきた。分類と成分の関係について様々な情報が重ねられてきたが, 近年分子生物学が発展するまではこれらを大局的に結ぶ法則性はなかった(山崎 2002)。

生薬の鑑定法には様々な DNA マーカーが用いられている。ここでは, 生薬の鑑定法としてよく用いられている 7 つの方法の応用例について紹介する。

### 6-3-1. ダイレクトシーケンス法による木通(モクツウ)と朮(ジュツ)の基原植物の鑑定

ダイレクトシーケンスは現在鑑定法としてよく使われている。第 14 改正日本薬局方に「木通(モクツウ)」の基原植物に規定されてされている日本に自生するアケビ科アケビ属 (*Laradizabalaceae Akebi*) 2 種 (アケビ *A. quinata*, ミツバアケビ *A. traifoliata*) と, この 2 種の雑種と考えられるゴヨウアケビ (*A. × pentaphylla*) 識別が試みられた。3 種の核内 DNA の ITS1, 2 領域を解析され, 各々の種で明確な違いがみられ, *A. × pentaphylla* が雑種であることが示唆された(北岡 2006)。

他にも RFLP 法とダイレクトシーケンス法の組み合わせで解析が行われている。アトラクチロドン属

(*Atractylodes*)由来の生薬朮(ジュツ)の RFLP と葉緑体 *trnK* の塩基配列決定を基に鑑定法が確立された(Mizukami *et al.* 2000).

### 6-3-2. PCR-RFLP 法による甘草(カンゾウ)の基原植物の識別

本分析検査法は, RFLP を検出する操作が煩雑で, 検出に時間を要すること, 検出に多量の DNA を必要とするため微量のサンプルからの検出には使用できないなどの問題がある. また, ハイブリッド結合やその後の操作の条件により結果が異なることがある(DNA 品種識別委員会 2002;戸丸 2001). このような問題点を補うため, RFLP は他の方法と組み合わせ用いられることが多い, 例えば RFLP と RAPD 解析でカンゾウ属(*Glycyrrhiza*) 4 種(カンゾウ *G. glabra*, ウラルカンゾウ *G. uralensis*, *G. echinata*, *G. pallidiflora*) の近縁関係が検討されている(Yamazaki *et al.* 1994).

### 6-3-3. dCAPS 法による半夏(ハンゲ)の産地特定

PCR 産物を特定の制限酵素で切断して RFLP を見いだす, PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) という手法がある. PCR-RFLP は PCR 産物の塩基配列が不明な場合でも利用することができるが, 増幅産物の塩基配列情報があると使いやすい. 特定領域の DNA 断片の塩基配列を比較して制限酵素認識部位での塩基配列の差異があればその制限酵素を用いる. 適当な制限酵素認識部位での差異がない場合はプライマーを工夫して PCR 増幅産物に制限酵素認識部位を導入する dCAPS (derived CAPS) 法が使われることが多い. PCR-RFLP マーカーあるいは dCAPS マーカーは共優性マーカーで, 1塩基の多型を検出することもできる(Bostein *et al.* 1980;津村 2001;DNA 品種識別委員会 2002). RAPD と PCR-RFLP で中国と韓国の半夏(ハンゲ)の基原植物であるカラスビシャク(*Pinellia ternata*)の識別が試みられた. RAPD 法は 3 つの 20 塩基のランダムプライスをつかって識別できるバンドパターンが検出された. また, PCR-RFLP 解析では,

はっきりした特徴が韓国と中国原産の各個体に得られた. これらの結果は RAPD と PCR-RFLP が中国と韓国のカラスビシャクの産地識別に使えることが示唆された(Chung *et al.* 2002).

### 6-3-4. SSCP 法による冬虫夏草(トウチュウカソウ)の種間変異の検出

フコムシナツクサタケ(*Cordyceps sinensis*)は中国産の薬物の一つであり, 何世紀もの間アジアで冬虫夏草と強壯剤食品として使われてきたが, パウダーとして販売されるため, 品質がしばし疑問視されている. そこで ITS2 をベースにした PCR-SSCP を使って種間変異が解析されている. これは生薬成分の違いや発酵醸造産業における品質管理に使用される可能性を示している(Kuo *et al.* 2006).

### 6-3-5. SSR 法による柑橘由来生薬の種及び品種識別法

柑橘類に属するカラタチ属(*Poncirus* 属), キンカン属(*Fortunella* 属), *Microcitrus* 属, *Eremocitrus* 属, *Atlantia* 属, *Severinia* 属の 29 系統が 7 つの SSR マーカーを用いて系統関係が調査されている(Pang *et al.* 2003). このように, 複数の SSR マーカーを用いると品種識別能力は非常に高くなるが, SSR マーカーのプライマーの設計に費用と労力がかかることが欠点である. また, プライマーの一方の 5' 末端を標識して, PCR 産物を変性ポリアクリルアミドゲルで分離すると SSR の 2 塩基の差異まで検出することができる. 増幅されたバンドにはマイナーなバンドが含まれることがあるので, どれが識別の対象とするバンドであるかを明らかにしておく必要がある(井鷲 2001;DNA 品種識別委員会 2002).

### 6-3-6. RAPD 法による各種生薬の基原植物の簡易識別

トウキは, 浄血・鎮静・強壯作用のある生薬当帰(トウキ)の基原植物である. 日本で自生するトウキには多くの変種が存在しており, 中でもヤマトウキ(*Angelica acutiloba*)とホツカイトウキ(*A. acutiloba* var.

*sugiyamae*)が生薬原料として多く取り扱われている。これらは地上部で区別可能であるが、生薬原料である根茎部の識別には伝承的な五感識別が行われているのが現状である。そこで、RAPD による多型解析を行った結果、それぞれの種を識別するのに有効なランダムプライマーが見出された(角谷 2006)。また、ムラサキバレンギク属 (*Echinacea*) 3 種 (*E. angustifolia*, *E. purpurea*, *E. pallida*)や、ウコン属 (*Curcuma*) 3 種 (*C. wenyujin*, *C. sichuanensis*, *C. aromatica*)についても同様に RAPD で同定している (Kapteyn *et al.* 2004; Chen *et al.* 1999)。他にも、RAPD と eastern blotting と ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) の組み合わせで、オタネニンジン属 (*Panax*) 3 種 サンシチニンジン (*P. notoginseng*)、アメリカニンジン (*P. quinquefolius*)、トチバニンジン (*P. japonicus*) の同定が可能である (Tanaka *et al.* 2005)。

しかし、RAPD の問題点としては、僅かな PCR 条件 (鋳型 DNA) とプライマーとの量比やアニーリング温度、PCR 装置など)によって結果が異なり、再現性に欠けることと、増幅バンドが多いことから識別判定に誤りを生じる可能性があることなどが挙げられる。また、異なるプライマーの併用が困難であるため、使用するプライマーの数だけ PCR および電気泳動を行う必要があり、時間と労力を要することになる (DNA 品種識別委員会 2002; 西脇・川窪 2000)。

#### 6-3-7. AFLP 法によるパパイヤの遺伝距離の検討

パパイヤ (*Carica papaya*) の遺伝関係を AFLP 法で評価している。エクアドル産の *C. papaya* と *Vasconcella* 属と *Jacaratia* 属を AFLP 解析した結果、Cluster 解析と PCO (Principal Coordinate Analysis) 解析をすることで 3 属の種を識別し、遺伝子距離が明らかとなった (Van Droogenbrowck *et al.* 2004)。他に、AFLP と phytochemical markers を使用したエキナセア・アングステイフォリア (*Echinacea purpurea*) の解析がされている (Baum *et al.* 2001)。

#### 6-3-8. MASA 法による人参(ニンジン)生薬の識別

DNA レベルで人参薬の識別のために簡易で再現性のある方法を開発することを目的として、3 種類間の 18S rRNA 遺伝子塩基配列決定の違いをベースとした、PCR-RFLP 法と MASA 法が適用された。これら 2 つの解析方法は 3 種の人参生薬で行われ、その結果は設定されたコンディションのもとで PCR-RFLP 法と MASA 法は、サンシチニンジン (*Panax notoginseng*)、アメリカニンジン (*P. quinquefolius*)、トチバニンジン (*P. japonicus*) 同定に用いることができる (Fushimi *et al.* 1997)。

MASA は PCR 機械と電気泳動装置ならびに反応試薬があれば比較的簡単で、適切な PCR プライマー設計と PCR 条件の基礎検討を十分行うことで、再現性のよい高精度の結果が得られる (関谷 1997)。

#### 6-4. 今後の生薬と DNA 解析

生薬の二次代謝物に関して、これまでに化合物・細胞組織・種あるいは変種レベルでの多様性に関する膨大な記述的情報が蓄積されてきた。しかしながら、従来の生薬資源研究は、成分化学や形態による系統分類、新規化合物探索などが主流であった。一方、分子生物学は生物全般に共通な「普遍性」を明らかにし、これにより生物における複雑な事象のメカニズムが次々と解明されてきた。近年、この生薬学と分子生物学の融合による生薬の DNA 鑑定が広く用いられるようになった。

植物において、モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム解読が終了し、いよいよ本格的なポストゲノム世代に突入した。そして遺伝子機能を解明するファンクショナルゲノム学及び多様性を対象とする比較ゲノム学が可能となった。そこで、先人が蓄積してきた膨大な生薬の二次代謝物の多様性に関する情報を詳細にかつ根源的に理解する術を手に入れたのである。生薬における有用物質生産の多様性を有機化学・生化学・分子生物学及び分子遺伝学法を活用して解明しエンジニアリングする研究は、これまでに多くの生薬資源を生んだ「植物の多様性」の根源的理解と生薬資源の「持続可能な有効利用」を展開するための新学問分野として必要である。これらの成果は

将来, 分子育種などの能動的な新薬用資源の創出に応用できる(山崎 2002).

## 7. 最後に

この数年間で, DNA の解析は容易となった. 各理科学メーカーから簡単に DNA を抽出できるキットが販売され, 各研究室単位で PCR 装置を持てるようになった. それだけに, DNA 多型を検出することは容易となり, そこそこの予算を獲得しさえすれば, 誰にでもできる技術となってしまった. そして, 得られた結果を系統樹作製のためのソフトに入力すれば, 「なんとなくになる系統樹が描けてしまう」. 描けた系統樹が, そこそ地理的変異を反映していれば, 学会で発表してしまう. このような行為が果たして研究と言えるのか? 例え, DNA 鑑定法の確立のための実学的技術開発であろうと, 最終的には「種の実像」に迫ることを目的としなければ, そこに「科学」は存在しないと著者らは考える.

## 謝辞

本総説は文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業(平成14年度~18年度)の援助を受けて書かれた. 記して謝意を表します.

## 引用文献

- Adams, S. P., Hartman, T. P. V., Lim, K. Y., Chase, M. W., Bennett, M. D., Leitch, I. J., Leitch, A. R., 2001, Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere repeat sequences 5'-(TTTAGGG)<sub>n</sub>-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants, *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*, 268 : 1541-1546.
- 赤木宏守, 2000, DNA 多型によるイネの品種識別, *育種学研究* 2: 89-96.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG), 1998, An ordinal classification from the families of flowering

plants, *Ann. MO Bot. Gard.*, 85 : 531-553.

- Angiosperm Phylogeny Group (APG), 2003, An update of the angiosperm phylogeny group classification from the orders and families of flowering plants: APG II, *Bot. J. Linn. Soc.*, 141 : 399-436.
- Barracough, T. G., Savolainen, V., 2001, Evolution rates and species diversity in flowering plants, *Evolution*, 55 : 677-683.
- Baum, B. R., Meachanda, S., Livesey, J. F., Binns, S. E., Arnason, J. T., 2001, Predicting quantitative phytochemical markers in single *Echinacea* plants or clones from their DNA fingerprints, *Phytochemistry* 56(6) : 543-549.
- 別所英男, 2000, 果樹における品種識別技術の現状と育種への利用, *農業および園芸*, 第75巻, 第5号: 539-550.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. H., Davis, R. W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Human Genetics*, 32(3) : 314-31.
- Brown T. A., 2000, 分子系統学, ゲノム 新しい生命情報システムへのアプローチ, 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, pp. 433-457.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R. A., Hills, H. G., Qiu, Y. L., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W.

- J., Karol, K. G., Clark, W. D., Hedren, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K. J., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q. Y., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. M., Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Learn, G. H., Graham, S. W., Barrett, S. C. H., Dayanandan, S., Albert, V. A., 1993, Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*, *Ann. MO Bot. Gard*, 80 : 528-580.
- Chase, M. W., Salamin, N., Soltis, D. E., Soltis, P. S., López, A. J., Fédrigo, O., Naylor, G. J. P., 2002, Phylogeny reconstruction and functional constraints in organellar genomes: plastid *atpB* and *rbcL* sequences versus animal mitochondrion, *Syst. Biol.*, 51 : 638-647.
- Chinese Pharmacopeia Committee Ministry of Public Health, 2000, "Chinese Pharmacopeia 2000 Part 1", the People's Republic of China. Chemical Industry Publishing House, Beijing, pp. 103-104.
- Chen, Y., Bai, S., Cheng, K., Zhang, S., Nian, L., 1999, Random amplified polymorphic DNA analysis on *Curcuma wenuujin* and *C. Sichuanensis*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 189, 24(3):131-133.
- Chung, H. S., Um, J. Y., Kim, M. S., Hong, S. H., Kim, S. M., Kim, H. K., Park, S. J., Kim, S. C., Hwang, W. J., Kim, H. M., 2002, Determination of the site of origin of *Pinellia ternata* roots based on RAPD analysis and PCR-RFLP, *Hereditas*136 : 126.
- Davies, T. J., Barraclough, T. G., Chase, M. W., Soltis, P. S., Soltis, D. E., Savolainen, V., 2004, Darwin's abominable mystery: insights from a supertree of the angiosperms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(7) : 1904-1909.
- DNA品種識別委員会, 2002, 植物のDNA品種識別についての基本的留意事項-技術開発と利用のガイドライン-, pp. 1-10,  
URL: <http://www.hinsyu.maff.go.jp/>.
- Delsuc F, Brinkmann H, Philippe H, 2005, Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life, *Naure Genet.*, 6 : 361-375.
- Donoghue, M. J., Doyle, J. A., 2000, Seed plant phylogeny: demise of the anthophyte hypothesis?, *Curr. Biol.*, 10, R106-109.
- Friis, E. M., Pedersen, K. R., Crane, P. R., 2001, Fossil evidence of waterlilies (Nymphaeales) in the Early Cretaceous, *Nature*, 410 : 357-360.
- 藤井紀行, 2002, 高山植物は北方由来?, 生物の科学 遺伝, 2002年3月号, 56巻2号, 裳華房, 東京, pp. 79-83.
- 藤田早苗助, 1972, 薬用植物栽培法, 農文協, 東京, pp. 157-162.
- 福岡浩之, 2004, 野菜の DNA 品種識別確立に向けての技術的問題点とその方策, 農業および園芸, 第79巻, 第1号:175-179.
- Fushimi, H., Komatsu, K., Isobe, M., Namba, T., 1997, Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three Ginseng drugs *Biol Pharm Bull.*, 20(7) : 765-9.
- Garcia, J., Maekawa, K., Miura, T., Matsumoto,

- T., 2004, Genetic distance between *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae) populations in Taiwan and the Yaeyama Islands, analyzed by amplified fragment length polymorphism markers, *Entomological Science*, 7(3) : 245-249.
- Goremykin, V., Bobrova, V., Pahnke, J., Troitsky, A., Antonov, A., Martin, W., 1996, Noncoding sequences from the slowly evolving chloroplast inverted repeat in addition to *rbcL* data do not support Gnetalean affinities of angiosperms, *Mol. Biol. Evol.*, 13 : 383-396.
- Goremykin, V. V., Hirsch-Ernst, K. I., Wölfl, S., Hellwig, F. H., 2003, Analysis of the *Amborella trichopoda* chloroplasts genome sequence suggests that *Amborella* is not a basal angiosperm, *Mol. Biol. Evol.*, 20 : 1499-1505.
- 後藤実, 小宮威弥, 1978, 茵陳蒿の研究を巡って, 漢方の臨床, 25 : 885-897.
- Graham, W. W., Olmstead, R. G., 2000, Utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of basal angiosperms, *Am. J. Bot.*, 87 : 1712-1730.
- Grant V., 1971, *Plant Speciation*, Columbia Press. 85-94
- 長谷部光泰, 1994, 分子データからみた陸上植物の系統, 植物の自然史—多様性の進化学—, 北海道大学図書館刊行会, 北海道, pp. 211-227.
- 長谷部光泰, 1996, 形態形成遺伝子と進化, 細胞工学分別冊 植物細胞工学シリーズ5 植物のゲノムサイエンス—遺伝子・染色体から生態機能を解明する—, 秀潤社, 東京, pp. 76-85.
- 長谷部光泰, 2001, 系統学, 植物学がわかる, 朝日新聞社, 東京, pp. 64-67.
- Hayashi, K., Yandell, D. W., 1993, How sensitive is PCR-SSCP?, *Hum Mutat.*, 2(5) : 338-346.
- Hendy, M. D., Penny, D., 1989, A framework for the quantitative study of evolutionary trees, *Syst. Zool.*, 38 : 310-321.
- Henning W., 1965, Phylogenetic systematics, *Ann. Rev. Ent.*, 10 : 97-116.
- 菱田敦之, 2004, DNA 塩基配列と SNPs による生薬基原植物の鑑別, 創薬等ヒューマンサイエンス研究第5分野, KH53121, pp. 83-86.
- 井手華子, 堀内篤, 知久幹夫, 寺田圭, 奥村直彦, 2005, ミトコンドリア DNA 非コード領域の多型による系統豚「フジョーク」の母系解析, 日豚会誌, 42 巻, 3号, :130-138.
- 今井統雄, 三瓶信良, 1952, 茵陳蒿(カワラヨモギ)に関する研究, 高峰研年報, 4:54-59.
- 井鷲裕司, 2001, マイクロサテライトマーカー分析法, 森の分子生物学, 種生物学会, 文一総合出版, 東京, pp. 275-304.
- Jobson, R. W., Albert, V. A., 2002, Molecular rates parallel diversification contrasts between carnivorous plant sister lineages, *Cladistics*, 18 : 127-136.
- 加賀谷悦子, 2005, 森林昆虫研究における分子マーカーの利用, 樹木医学研究, 9(1):1-8.
- Kalpna, J., Preeti, C., Dnyaneshwar, W., Bhushan, P., 2004, Molecular markers in herbal drug technology, *CURRENT SCIENCE*, 87(2) :

159-165.

Kapteyn, P. Goldsbrough, J. Simon, 2004, Genetic relationships and diversity of commercially relevant *Echinacea* species. TAG Theoretical and Applied Genetics, 105(2) : 369-376.

Kaundun, S. S. , Matsumoto, S. , 2003, Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid psthway in Tea, *Camellis sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties, Theor Appl Genet, 106 : 375-383.

Kawamura, K. , Sugimoto, T. , Matsuda, Y. , Toyoda, H. , 2002, Detection of polymorphic patterns of genomic DNA amplified RAPD-PCR in sweet potato weevils , *Cylas formicarius* (Fabricus)(Coleoptera: Brentidae) , Applied Entomology and Zoology, 37(4) : 645-648.

北岡文美代, 2006, 四国産 *Akebi* 属植物の DNA 研究, 日本生薬学会第 53 回年会講演要旨集, 2006 年 9 月 30 日, 埼玉, p. 263.

Kolaczowski, B. , Thornton, J. W. , 2004, Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous, Nature, 431 : 980-984.

Koshio, C. , Tomishima, M. , Shimizu, K. , Kim Heui-Soo, Takenaka. , 2002, Microsatellites in the gypsomoth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae), Applied Entomology and Zoology, 37(2):309-312.

河野いずみ, 竹内善信, 島野公利, 佐々木卓治, 矢野昌裕, 2000, DNA マーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較, 育種学研究, 2 :

197-203.

厚生労働省医政局, 2004, 薬事工業生産動態統計年報平成 15 年時報, 東京, pp. 1-491.

國久美由紀, 松本哲, 吹野伸子, 2002, イチゴ品種識別に有効な DNA マーカーの開発, 育種学研究, 第 4(別 2), 259.

Kuo, H. C. , Su, Y. L. , Yang, H. L. , Huang, I. C. , Chen, T. Y. , 2006, Differentiation of *Cordyceps Sinensis* by a PCR-Single-Stranded Conformation Polymorphism-Based Method and Characterization of the Fermented Products in Taiwan, Taylor & Francis, 20(2) : 161-170.

Leitch, I. J. , Chase , M. W. , Bennett , M. D. , 1998, Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants, Ann. Bot. (Lond. ), 82 : 85-94.

Lewin, R. , 1998, 分子進化時計, DNA から見た生物進化, 株式会社日経サイエンス, 東京, pp. 62-69.

Markert, C. L. , Moller, F. , 1959, Multiple Forms of enzymes : tissue, ontogenetic, and species specific patterns , Proceedings of the National Academy of Sciences, Biochemistry, 45:753-763.

松元哲, 2003, 茶およびイチゴの DNA 多型を用いた品種識別技術, 農業技術, 58(11):23-27.

Matsumoto S. , Takeuchi A. , Hayatsu M. , Kondo S. , 1994 , Molecular clonig of phenylalanine ammonialyase cDNA and classification of varieties of tea plants (*Camellia sinensis*) using tea PAL cDNA probe, Theor. Appl. Genet. , 87:671-675.

- Matsumoto S., Kiriiwa Y., Takeda Y., 2002, Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA, *Theor. Appl. Genet.*, 104 : 998-1002.
- Matsumoto S., Kiriiwa Y., Yamaguchi S., 2004, The Korean Tea plant ea plants (*Camell sinensis*) : RFLP analysis of genetic diversity and relationship to Japanese Tea, *Breeding Science*, 54 : 231-237.
- 松元哲, Shiv Shankhar Kaundun, 氏原ともみ, 2003, DNA マーカーを用いたチャ品種識別技術, 農業および園芸, 第 78 巻, 第 1 号:78-83.
- Mathews, S., Donoghue, M. J., 1999, The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes, *Science*, 286 : 947-950.
- 丸山恵史, 2003, 植物新品種育生者の権利保護と DNA 品種識別, 育種学研究 5:127-135.
- 三中信宏, 2006, 系統樹思考の世界 すべてはツリーとともに, 株式会社講談社, 東京, pp. 1-294.
- Mizukami H, Okabe Y, kohda H, Hiraoka N. 2000. Identification of the crude drug *Atractylodes rhizome* (Byaku-jutsu) and *Atractylodes lancea rhizome* (So-juutsu) using chloroplast *trnK* sequence as a molecular marker, *Biol Pharm Bull.*, 23(5) : 589-594.
- Morlais, I., Poncon, N., Simard, F., Cohuet, A., Fontenille, D., 2004, Intraspecific nucleotide variation in *Anopheles gambiae*: New insights into the biology of malaria vectors, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*,
- 71(6)795-802.
- 諸田隆, 2006, 高品質な漢方製剤の安定供給をめざして, 日本生薬学会第 53 回年会講演要旨集, 2006 年 9 月 29, 埼玉, p. 57
- 村上哲明, 2001, 分類学, AERA MOOK 植物学がわかる, 朝日新聞社, 東京, pp. 68-71.
- 中原重仁, 真崎誠, 金田昌士, 杉本民雄, 村路雅彦, 2000, PCR-RFLP によるミカンコミバエ種群 *Bactrocera dorsalis* complex species(Diptera:Tephritidae:Dacinae)の識別 I, ミトコンドリアDNAのD-loopの解析, 植物防疫所調査研究報告, (36)37-41.
- 内藤親彦, 2003. 16 昆虫類, 保全遺伝学, 小池裕子, 松井正文, 東京, pp. 241-242.
- 中筋房夫, 内藤親彦, 石井実, 藤崎憲治, 甲斐英則, 佐々木正己, 2000, 応用昆虫学の基礎, 東京, pp. 7-15.
- 永田忠博, 2004, 農が支える安全・安心な暮らし[2]—トレーサビリティと判別技術(食品の身元保証のための技術開発の現状)—, 農業および園芸, 79(10):1105-1112.
- 日本特産農産物協, 2003, 薬用作物(生薬)関係資料, 日本特産農産物協会, 東京, pp. 1-74.
- 中山広樹, 1996, 「バイオ実験イラストレイテッド 本当にふえるPCR」, (株)秀潤社, 東京, pp. 127-131.
- 錦野泰行, 2001, SSCP分析法, 森の分子生物学, 種生物学会, 文一総合出版, 東京, pp. 263-274.
- 西村信弘, 2005, 漢方薬と西洋薬の消化管吸収過程における相互作用に関する研究, YAKUGAKU

- ZASSI, 125(4):363-369.
- 西岡五夫, 1983, 大黃の化学, 現代東洋医学 4:49-55.
- 西脇重也, 川窪伸光, 2000, はじめに:分子生態学への招待, 森の分子生物学, 種生物学会, 文一総合出版, 東京, pp. 3-9.
- 野田隆志, 日本典秀, 村路雅彦, 2004, 生物農薬の放飼が在来昆虫個体群の遺伝的多様性に及ぼす影響の解析, 環境保全研究成果集, 2002(1), pp. 18, 1-18. 16.
- 大場達之, 斉藤明子, 1994, リンネと博物学-自然誌科学の源流-, 千葉県立中央博物館友の会, 千葉, pp. 81-101.
- 大坪研一, 中村澄子, 2002, 米の品種のDNA判別, 醸協, 第97巻, 第12号:843-848.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989, Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms, National Academy of Sciences.,86(8):2766-2770.
- Pagel, M., Meade, A., 2004, A phylogenetic mixture model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data, Syst. Biol., 53:571-581.
- Pang, X. M., Hu, C. G., Deng, X. X., Yi, 2003, Phylogenetic relationships among citrus and its relatives as revealed by SSR markers, Chuan Xue Bao, 30(1):81-87.
- Qiu, Y. L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Zanis, M., Zimmer, E. A., Chen, Z., Savolainen, V., Chase, M. W., 1999, The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes, Nature, 402:404-407.
- Qiu, Y. L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Zanis, M., Zimmer, E. A., Chen, Z., Savolainen, V., Chase, M. W., 2000, Phylogeny of basal angiosperms: analysis of five genes from three genomes, Int. J. Plant Sci., 161, S3-S27.
- Rokas, A., Holland, P. W., 2000, Rare genomic changes as a tool for phylogenetics, Trend Ecol. Evol., 15:454-459.
- 佐藤矩行・長谷部光泰, 2004, 生物界の広がりと体制の多様性, 発生と進化, 株式会社岩波書店, 東京, pp. 1-9.
- Savolainen, V., Fay, M. F., Albach, D. C., Backlund, A., van der Bank, M., Cameron, K. M., Johnson, S. A., Lledó, M. D., Pintaud, J. -C., Powell, M., Sheahan, M. C., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Weston, P., Whitten, W. M., Wurdack, K. J., Chase, M. W., 2000a, Phylogeny of the eudicots: a nearly complete familial analysis based on *rbcL* gene sequences., Kew Bull., 55:257-309.
- Savolainen, V., Chase, M. W., Hoot, S. B., Morton, C. M., Soltis, D. E., Bayer, C., 2000b, Phylogenetics of flowering plants based upon a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences, Syst. Biol., 49:306-362.
- Savolainen, V., Savolainen, V., Chase, M. W., Salamin, N., Soltis, D. E., Soltis, P. S.,

- Lopez, A. J., Fedrigo, O., Naylor, G. J. P., 2002, Phylogeny reconstruction and functional constraints in organellar genomes : plastid *atpB* and *rbcL* sequences versus animal mitochondrion, *Syst. Biol.*, 51 : 638-647.
- Savolainen, V., Chase, M. W., 2003, A decade of progress in plant molecular phylogenetics, *Trend Genet.*, 19 : 717-724.
- 西部三省, 2002, 生薬の基原と品質評価, *YAKUGAKU ZASSI*, 122(6):363-379.
- 関谷剛男, 1997, 「PCR による特定領域の変異の検出」, 「PCR 法最前線(基礎から応用まで)」共立出版(株), 東京, pp. 140-142.
- Sezaki, K., Itoi, S., Watabe, S., 2005, A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer, *FISHERIES SCIENCE*, 71 : 414-421.
- 霜川由志子, 奥田生世, 桑野美都子, 牛尾直美, 宇野典子, 大橋裕, 1980, ミシマサイコの栽培と育種(第2報)栽植密度の検討, *生薬学雑誌*, 34:215-220.
- Shimomura, K., Hirashima, K., 2006, Development and Characterization of Simple Sequence Repeats (SSR) as Markers to identify Strawberry Cultivars (*Fragaria×ananassa Duch.*), *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 75 (5) : 399-402.
- Shoda, E., Kubota, K., Makihara, H. 2003, Geographical structuring of mitochondrial DNA in *Semanotus japonicus* (Coleoptera: Cerambycidae), *Applied Entomology and Zoology*, 38(3):339-345.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Nickrent, D. L., Johnson, L. A., Hahn, W. J., Hoot, S. B., Sweere, J. A., Kuzoff, R. K., Kron, K. A., Chase, M. W., Swensen, S. M., Zimmer, E. A., Chaw, S. M., Gillespie, L. J., Kress, W. J., Sytsma, K. J., 1997, Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences, *Ann. MO Bot. Gard.*, 84 : 1-49.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Mort, M. E., Chase, M. W., Vincent Savolainen, Hoot, S. B., Morton, C. M., 1998, Inferring complex phylogenies using parsimony: an empirical approach using three large DNA data sets for angiosperms, *Sys. Biol.*, 47 : 32-42.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E., Chase, M. W., 1999, Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology, *Nature*, 402 : 402-404.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Chase, M. W., Mort, M. E., Albach, D. C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W. J., Hoot, S. B., Fay, M. F., Axtell, M., Swensen, S. M., Nixon, K. C., Farris, J. S., 2000, Angiosperm phylogeny inferred from a combined data set of 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences, *Bot. J. Linn. Soc.*, 133 : 381-461.
- Sota, T. Hayashi M., Iwai, D., 2004, Phylogeography of the leaf beetle *Chrysolina virgata* in wetlands of Japan inferred from the distribution of mitochondrial haplotypes, *Entomological Science*, 7(4) : 381-388.
- 角谷晃司, 2006, RAPD 分析による大和トウキと北海トウキの識別, *日本生薬学会要旨集*, 2006年9月

埼玉, p. 138.

三橋忠由, 奥村直彦, 2000, DNA による豚の品種識別, 特にパークシャー種(黒豚)の識別, 農業技術, 55(6):8-13.

Sun, G., Ji, Q., Dilcher, D. L., Zheng, S., Nixon, K. C., Wang, X., 2002, Archaeofractaceae, a new basal angiosperm family, Science, 296: 899-904.

高嶋康晴, 森田正昌, 2002, うなぎ加工品の DNA 鑑定について, 農林消費技術センター調査研究報告, Vol. 11, No. 26:51-59.

竹次 稔, 2004, 育成者権の侵害を巡る動き—現場で何が起きているのか—, 農業および園芸, 第 79 号, 第 1 号:199-204.

Tanaka, H., Fukuda, N., Shoyama, Y., 2005, Identification and differentiation of *Panax* species using ELISA, RAPD and eastern blotting, *Phytochem. Anal.*, 17: 46-55.

田村隆明, 1997, 「遺伝子工学実験ノート(下)」, (株)羊土社発行, 東京, pp. 80-89.

戸丸信弘, 2001, RFLP 分析法, 森の分子生物学, 種生物学会, 文一総合出版, 東京. pp. 221-235.

陶山佳久, 2001, AFLP 分析法, 森の分子生物学, 種生物学会, 文一総合出版, 東京. pp. 251-262.

津村義彦, 2001, PCR-RFLP 法, 森の分子生物学, 種生物学会, 文一総合出版, 東京. pp. 275-304.

津村義彦, 2001, プロローグ: 遺伝的多様性研究ガイド, 森の分子生物学, 種生物学会, 文一総合出版, 東京, pp. 158-169.

Tu, P. F., He, Y. P., Lou, Z. C., 1994, Survey and protection of medicinal resources of desert living *Cistanche* (*Cistanche deserticola*) [J]. 1994. Chin Tradit Herb Drugs (中草药)25(4):205-208.

雲聡, 2005, コメの DNA 品種判別キットの開発, 農林水産技術研究ジャーナル 28(2):42-45.

Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., Gheysen, G., 2004, AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (*Caricaceae*) from Ecuador. TAG, Theoretical and Applied Genetics, Volume 105, Numbers 2-3. 209-215.

Von, P., Bleeker, R. H., Reijans, M. M., Lee, T., Friters, M. H. A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Research, 23(21): 4407-4414.

若尾卓成, 疋田雄一, 常由俊宏, 梶眞壽, 久保田裕明, 久保田隆之, 1999, PCR-制限断片多型法を用いたウナギ種簡易 DNA 鑑定, Nippon Suisan Gakkaishi, 65(3):391-399.

Watanabe, S., Minegishi, Y., Yoshinaga, T., Aoyama, J., Tsukamoto, K., 2004, A Quick Method for Species Identification of Japanese Eel (*Anguilla japonica*) Using Real-Time PCR: An Onboard Application for Use During Sampling Surveys, Mar. Biotechnol 6: 566-574.

Welsh, J., McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18(24): 7213-7218.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Antoni Rafalski,

K. J. L. J., Tingey, S. V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic Acids Research*, 18(22) : 6531-6535.

Wolf, A. D., A. Liton., 1998, Contribution of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology, *Molecular Systematics of Plants II - DNA Sequencing*, Pamela S, Soltis, Douglas E. Soltis, J.J. Doyle, Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, pp. 43-86.

山崎真巳, 2002, アントシアニン生合成系を中心とした薬用植物二次代謝の多様性の解明とトランスジェニック植物への分子生物学的展開, *薬学雑誌*, 122(1):47-56.

Yamazaki, M., Sato, A., Shimomura, K., Saito, K., Murakoshi, I., 1994, Genetic relationships among *Glycyrrhiza* plants determined by RAPD and RFLP analyses, *Biol Pharm Bull.*, 17(11) : 1529-1531.

矢野博, 2003, DNA 品種識別技術の基礎と応用, *Techno Innov*, Vol. 13, No. 1, Page18-24.

矢野博, 2004, DNA 品種識別技術の開発とその活用について, *農業技術*, 59(8) :337-341.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics*, 20(2):176-83.