

DNA分析を利用したコカ葉の識別法の検討

長岐 潤弥*, 野口 大*, 三枝 朋樹*

Study on the identification of coca leaves using DNA analysis

Junya NAGAKI*, Hiroshi NOGUCHI* and Tomoki SAEGUSA*

*Tokyo Customs Laboratory

2-7-11, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

In Japan, the coca leaf is designated as a narcotic by the Narcotics and Psychotropics Control Law. Therefore, imported goods which are suspected of being coca leaves are examined for the presence of cocaine. In this study, DNA analysis, which is widely used for species identification, was used to identify coca leaves. The intergenic spacer between *trnT* and *trnL*, intron of *trnL*, and intergenic spacer between *trnL* and *trnF* on the chloroplast DNA were used in this study. As a result, on these three loci, *Erythroxylon coca* had different nucleotide sequences from flax (*Linum usitatissimum*) of a family which is considered to be closely related to the Erythroxylaceae family, and had identical nucleotide sequences with *Erythroxylon novogranatense*. To distinguish coca leaves from other plant leaves using DNA analysis, it is necessary to determine DNA regions in which the nucleotide sequences from coca species which are controlled as narcotics are different from those from other species of the Erythroxylaceae family.

1. 緒 言

コカ葉は麻薬及び向精神薬取締法の麻薬に指定されている。コカ葉の形態的特徴は主脈の両側に沿って葉脚から頂端に向かい二条の弧線があるという点だが¹⁾、コカ葉が粉碎されていたり、食品に混入されていた場合、弧線を確認することができない。

今回の研究では生物種の判定に広く用いられているDNA分析によってコカ葉の識別ができるか検討した。具体的には、葉緑体DNA上の *trnT* と *trnL* の間のスペーサー領域、*trnL* のイントロン領域、*trnL* と *trnF* の間のスペーサー領域を増幅することができ²⁾、幅広い種の植物に適用できると報告されているプライマー³⁾を用いてコカ葉の識別が可能か検討した。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

コカ標準試料 (東京都薬用植物園から譲り受けたコカ葉)

Erythroxylon coca (コカ)

Erythroxylon novogranatense (ジャワコカ)

コカ葉

コカキャンディ (中心に緑色の塊があり、その周りを飴で固めた球状のもの)

コカ葉を粉末状に加工したもの

市販されているアマ (*Linum usitatissimum*) の種子 (コカノキ科の近縁科とされている植物⁴⁾)

2.1.2 試薬

DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN 製)

TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (TaKaRa Bio 製)

ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems)

プライマー (UCP-AB、CD、EF を一つの組として使用)

UCP-A²⁾: CATTACAAATGCGATGCTCT

UCP-B²⁾: TCTACCGATTTCGCCATATC

UCP-C²⁾: CGAAATCGGTAGACGCTACG

UCP-D²⁾: GGGGATAGAGGGGACTTGAAC

UCP-E²⁾: GGTTCAAGTCCCTCTATCCC

UCP-F²⁾: ATTTGAACTGGTGACACGAG

(UCP-A 及び B は *trnT* と *trnL* の間のスペーサー領域、UCP-C 及び D は *trnL* のイントロン領域、UCP-E 及び F は *trnL* と *trnF* の間のスペーサー領域を増幅するプライマー対である)

2.2 分析装置

試料破砕機: FP100A (Q Biogene 製)

PCR 増幅装置: Gene Amp® PCR system9700 (Applied Biosystems 製)

電気泳動装置: Mupid-exU (Advance 製)

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-7-11

DNA シークエンサー：ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer
(Applied Biosystems 製)

2.3 実験

コカ標準試料を約 2 mg、コカ葉を約 10 mg、コカキャンディの緑色の塊の部分を中心に約 35 mg、コカ粉末を約 2 mg、アマの種子を 1 粒 (約 5 mg) について、それぞれマイクロ遠心チューブに採取し、ジルコニアボールを入れて試料破砕機で破砕した。コカ葉とコカキャンディの採取量が異なるのは、2 mg では PCR に必要な量の DNA が抽出できず、採取量を変更したためである。次に、DNeasy® Plant Mini Kit に添付のプロトコルに従い DNA を抽出した。抽出した DNA をそれぞれのプライマー対で TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version を用いて以下の条件で PCR を行った。

反応液組成 (1 反応分)

10× Ex Taq buffer	2.5 µl
d NTP mixture (各 2.5 mM)	2.0 µl
Ex Taq (5 U/µl)	0.125 µl
F-Primer (5 µM)	2.0 µl
R-Primer (5 µM)	2.0 µl
DNA 抽出液	2.0 µl
滅菌水	14.375 µl
合計	25.0 µl

PCR 条件

94°C 5 分

→(94°C 30 秒→54°C 30 秒→72°C 2 分)×30 サイクル

→72°C 10 分

→20°C ∞

増幅した PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製した。精製した PCR 産物は、PCR 反応で使用する各プライマーを用いて下記条件で、サイクルシークエンス反応を行った。

反応液組成 (1 反応分)

5× sequence buffer	2.0 µl
滅菌水	6.2 µl
Big Dye terminator ver. 3.1	0.5 µl
Primer (5 µM)	0.3 µl
精製済み PCR 産物	1.0 µl
合計	10.0 µl

サーマルサイクラー条件

96°C 1 分

→(96°C 30 秒→50°C 20 秒→60°C 4 分)×30 サイクル

→20°C ∞

サイクルシークエンス反応後、エタノール沈殿により未反応色素を除去し、DNA シークエンサーにより PCR 産物の塩基配列を決定した。

3. 結果及び考察

3.1 PCR 産物の電気泳動結果

各検体の PCR 産物について、TBE buffer を用いて 1.0% アガロースゲル電気泳動を行った結果を Fig.1 に示す。

trnT と *trnL* の間のスペーサー領域を増幅する UCP-A 及び B のプライマー対では、コカ標準試料、コカ葉、コカキャンディ及びコカ粉末では約 600bp の増幅産物が、アマでは約 500bp の増幅産物が確認できた。

trnL のイントロン領域を増幅する UCP-C 及び D のプライマー対では、コカ標準試料、コカ葉、コカキャンディ及びコカ粉末では約 600bp の増幅産物が確認できたが、アマでは約 600bp 及び約 700bp の 2 つの増幅産物が確認できた。

trnL と *trnF* の間のスペーサー領域を増幅する UCP-E 及び F のプライマー対では、コカ標準試料、コカ葉、コカキャンディ及びコカ粉末では約 500bp の増幅産物が、アマでは約 400bp の増幅産物が確認できた。

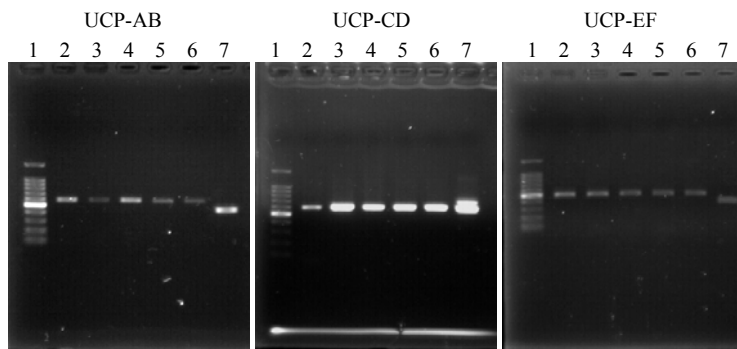


Fig.1 Electrophoresis of PCR products

Lane 1, 100 bp DNA ladder; Lane 2, *Erythroxylon coca Lam*; Lane 3, *Erythroxylon novogranatense Hieron*; Lane 4, coca leaf; Lane 5, coca candy; Lane 6, coca powder; Lane 7, *Linum usitatissimum*

3.2 塩基配列の決定及び比較

各検体について、UCP-A 及び B、UCP-C 及び D 及び UCP-E 及び F の各プライマー対を用いて増幅した PCR 産物の塩基配列を Fig.2~4 に示す。

(1) コカ標準試料

UCP-A 及び B の増幅産物は 554 塩基、UCP-C 及び D の増幅産物は 572 塩基、UCP-E 及び F の増幅産物は 467 塩基対であることを確認したが、コカとジャワコカの塩基配列は全ての座位において同一であった。また、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されているデータと比較したところ、いずれのプライマー対を用いた増幅産物でも 95% 以上の一致率を示すデータは登録されていなかった。

(2) コカ葉、コカキャンディ、コカ粉末

UCP-A 及び B の増幅産物は 555 塩基、UCP-C 及び D の増幅産物は 572 塩基対であることを確認し、いずれも塩基配列は同一であった。また、UCP-E 及び F の増幅産物についてはコカ葉のみ 467 塩基対であることを確認した。

(3) アマ

UCP-A 及び B の増幅産物は 415 塩基、UCP-E 及び F の増幅産物は 320 塩基であることを確認し、DDBJ に登録されているデータと比較したところ、UCP-A 及び B を用いた増幅産物に対しては 90%以上の一致率を示すデータはなく、UCP-E 及び F を用いた増幅産物については *Linum usitatissimum* (アマ) と 100%一致した。また、UCP-C 及び D の増幅産物については、それらの塩基配列を決定することはできなかった。

(4) コカ標準試料、コカ葉、コカキャンディ、コカ粉末及びアマの塩基配列の比較

コカ標準試料とコカ葉、コカキャンディ、コカ粉末の塩基配列を比較したところ、UCP-A 及び B を用いた増幅産物では、相互に 99%一致し (2 塩基相違)、UCP-C 及び D を用いた増幅産物では全て一致し、UCP-E 及び F を用いた増幅産物では、相互に 99%一致 (2 塩基相違) した。また、コカ標準試料とアマの塩基配列の一致率は、UCP-A 及び B を用いた増幅産物では 56%、UCP-EF を用いた増幅産物では 46%であった。

3.3 考察

コカ (*Erythroxylon coca*) とアマ (*Linum usitatissimum*) について、研究対象とした座位の塩基配列を比較したところ、UCP-A 及び B を用いた増幅産物では 554 塩基中 44%、UCP-E 及び F を用いた増幅産物では 467 塩基中 54%相違したことから、今回検討した

座位においては、コカノキ科の近縁科とされる科に属するアマとコカは識別できることが分かった。しかし、これらの座位において、コカとコカノキ科コカ属に属するジャワコカ (*Erythroxylon novogranatense*) の塩基配列に違いがみられないことから、今回検討した座位ではコカとジャワコカを識別することはできないことが分かった。

コカノキ科とその近縁科の植物について、米国立生物工学情報センターの分類法 (NCBI taxonomy database) に基づき作成した分類図を Fig.5 に示す⁵⁾。下線部の植物は今回の研究で対象とした植物である。植物の分類体系上、コカとアマでは科レベル、コカとジャワコカでは種レベルの違いがあり、今回利用したプライマーでは科レベルの識別はできるが、種レベルの識別はできない可能性がある。また、コカノキ科には 4 属約 200 種⁶⁾の植物が知られており、DDBJ に塩基配列が登録されていないものも多く存在している。

2012 年 4 月現在、DDBJ に登録されているコカノキ科の植物の塩基配列の領域は、今回決定した領域以外に葉緑体 DNA 上の *matK* や *rbcL*、ミトコンドリア DNA 上の *nad6* 等、複数の領域のものが登録されている。今後、コカ葉の識別法を開発するにあたっては、これらの領域を増幅できるプライマーでも試みると共に、コカ、ジャワコカ以外のコカノキ科の植物の塩基配列を比較する必要がある。

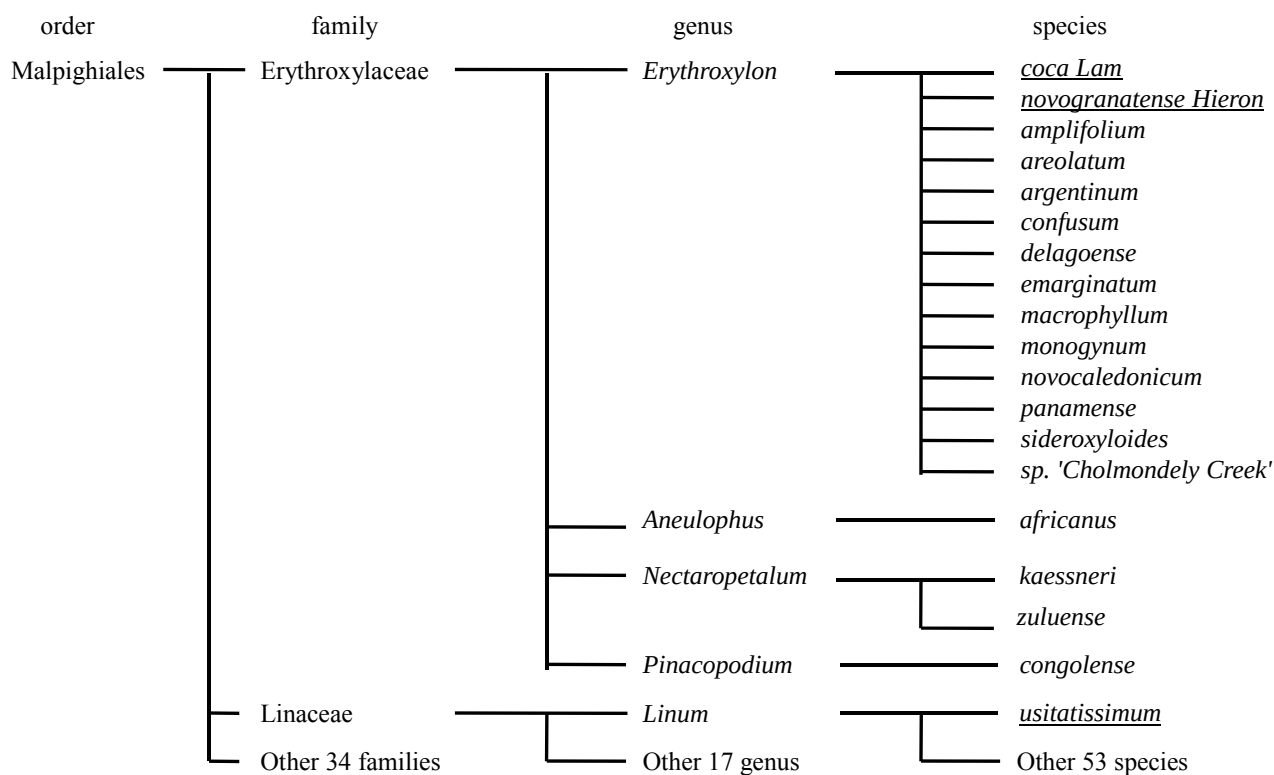


Fig.5 Classification map of Malpighiales

Source : NCBI taxonomy database on website as of 2012.08.15

4. 要 約

コカキャンディ、コカ粉末から DNA 抽出を試みたところ、PCR 増幅するのに必要な量の DNA を抽出することができた。今回検討した3つの座位 (*trnT* と *trnL* の間のスぺーサー領域、*trnL* のイントロン領域、*trnL* と *trnF* の間のスぺーサー領域) においては、コカ (*Erythroxylon coca*; コカノキ科) の塩基配列とコカノキ科の近縁科とされている科に属するアマ (*Linum usitatissimum*; アマ科)

との塩基配列を比較したところ差異が認められたが、コカとコカノキ科コカ属に属するジャワコカ (*Erythroxylon novogranatense*; コカノキ科) との塩基配列には変異がなく、両者を識別することはできなかった。今後、DNA 分析によるコカ葉の識別法を開発するには、少なくとも麻薬であるコカ、ジャワコカとそれ以外のコカノキ科の植物との間で、塩基配列に十分な変異のある領域を見つける必要がある。

文 献

- 1) 化学大辞典編集委員会編: “化学大辞典 3”, P.620 (1960), (共立出版).
- 2) P. Taberlet, L. Gielly, G. Pautou, J. Bouvet : Plant Molecular Biology, **17**, 1105 (1991).
- 3) 三枝朋樹、三浦徹、片山貴之: 関税中央分析所報, **49**, 15 (2009).
- 4) 一戸良行: “麻薬の科学” , P.100 (1982), (研成社).
- 5) “Taxonomy browser (The NCBI Taxonomy Homepage)”,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=U&id=3646&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- 6) 奥田拓男編: “天然薬物辞典”, P.152 (1986), (廣川書店).

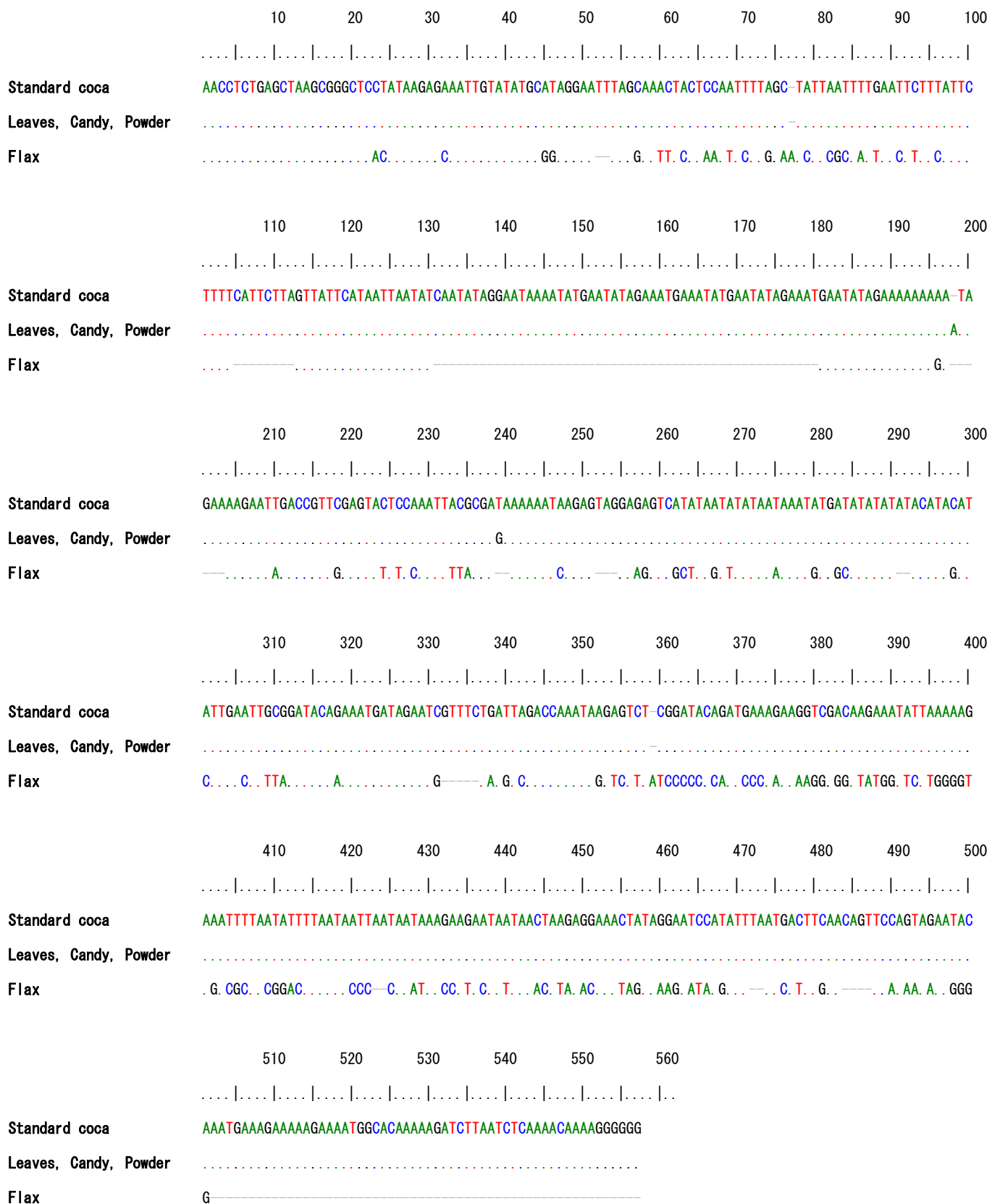


Fig.2 Nucleotide sequences of samples using primers UCP-A and B

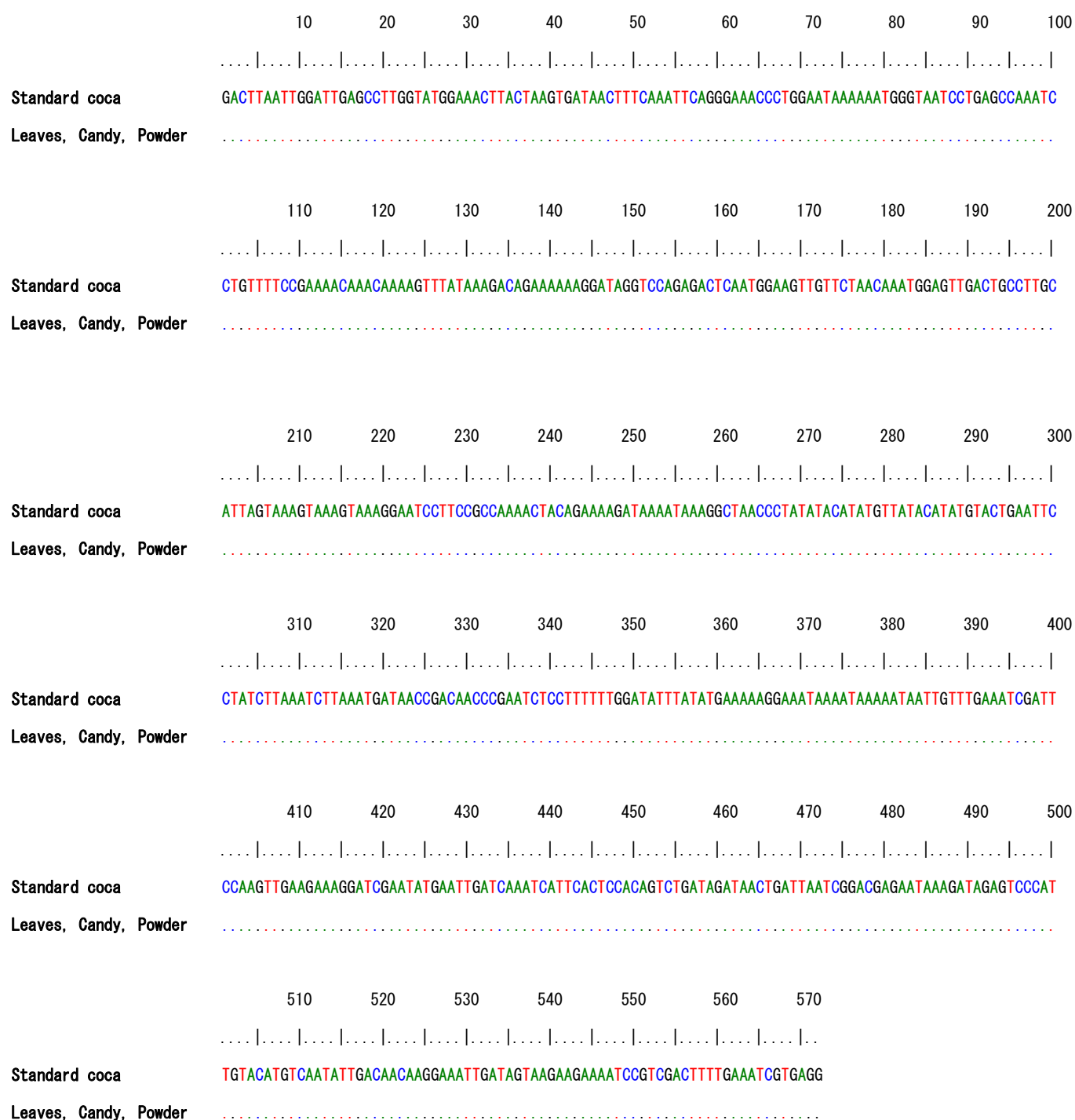


Fig.3 Nucleotide sequences of samples using primers UCP-C and D

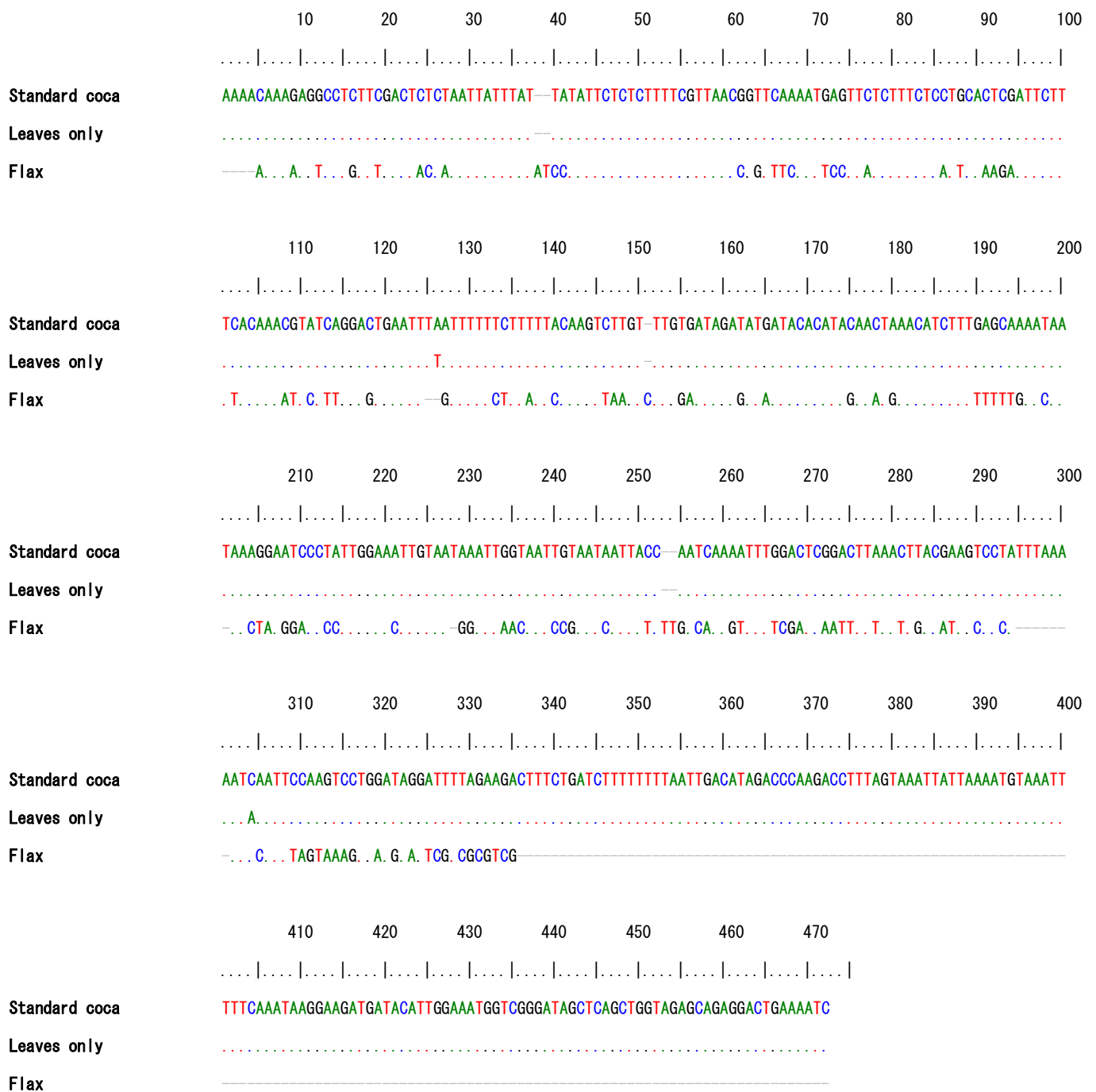


Fig.4 Nucleotide sequences of samples using primers UCP-E and F