

論文の内容の要旨

生物材料科学 専攻
平成 21 年度博士課程 進学
氏名 石野貴久
指導教員名 鮫島正浩

論文題目 **イチイ科樹木およびその内生菌を利用した
タキソール生産に向けた遺伝子解析**

[第一章序論]

イチイ属樹木特有の二次代謝物であるタキソール(一般名 Paclitaxel)は、幅広い癌に効果を示す強力な抗癌剤で、タキソールを含むタキソイド系薬剤の世界での販売総額は年間 45 億ドルにも上っている。その構造は、環状ジテルペンアルカロイドの一種であり、一般的なジテルペンのゲラニルゲラニルピロリン酸から TXS(taxadiene synthase)という酵素により、基本となるタキソイド骨格が形成されたのち、18 の酵素が関わって生合成される非常に複雑な構造となっている。そのため、化学的な全合成は実用的な供給方法とはなりえていない。現在は、主に葉に比較的多く含まれている前駆物質 **Baccatin III** からの半合成とイチイ属樹木の細胞培養法といった生合成経路を利用した供給方法が一般的となっている。しかし、依然として供給不足は否めず、現状の生産性を向上させるために、タキソール生合成酵素遺伝子についての知見をまとめることは大変意義深いと考えられる。そこで、本研究ではまず、イチイ属樹木のキャラボクのタキソール生合成酵素遺伝子やその転写調節領域についての知見をまとめた。次に、別の供給不足解

消のために新規供給源の発見を目指し、タキソール生合成の関連酵素遺伝子をタキソイド生成能のマーカーとして、同じイチイ科植物のカヤとイチイ科樹木内生菌の遺伝子解析を行った。

[第二章]

イチイ属樹木キャラボクのタキソイド生成酵素遺伝子のクローニングおよび転写調節領域解析

イチイ属樹木の栽培法および細胞培養法によるタキソイド生産性増加を目指し、園芸種として日本全国に幅広く分布しているキャラボク (*Taxus cuspidata ver. nana*) を材料として、タキソール生合成酵素遺伝子の解析を行った。東京大学附属の小石川植物園で採取したキャラボク葉から DNA を抽出し、タキソイド生成の鍵酵素である TXS および BAPT (3-amino-3-phenylpropanoyl-13-*O*-transferase) の遺伝子をクローニングし、その上流配列、転写調節領域解析を行った。その結果、TXS 上流にはエチレン応答シス配列が存在することを確認した。このことから、細胞の枯死によってタキソイド生産がスタートする可能性が示唆された。また、TXS, BAPT 共に、光応答性のシス配列を多数有しており、光条件を検討することで、現状の細胞培養の生産性を向上させることができると考えられた。

[第三章]

タキソイド生成能を有する新規植物の探索

日本でのタキソール生産の基盤を拡大するため、タキソール生成能を持つ新規植物の候補として、日本特有の樹木で、数少ないイチイ科の樹木であるカヤ (*Torreya nucifera*) に注目した。

東京大学附属の小石川植物園で採取したカヤ葉から DNA を抽出し、これに対して *Taxus × media* 由来の TXS, BAPT, TaH (taxadiene 13 α -hydroxylase) の mRNA 配列情報に基づき設計したプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果として、確認されたバンド部分をゲル抽出し、PCR を行った結果、既知の TXS, BAPT, TaH と 95% 以上の高い相同性の産物を確認できた。次に、カヤ葉から得たゲノム DNA から TXS, BAPT のクローニングを行った。その結果、TXS 遺伝子に相当すると思われる配列として約 3400bp を読むことができ、一方、BAPT 遺伝子に対しては 1000bp 程度読むことができた。いずれの配列についても、既知の遺伝子と 95% 以上の高い相同性を示した。また、クロロホルムで葉の成分を抽出し、HPLC を用いて成分分析を行った結果、210~220nm あた

りで極小値を取り、235nm のあたりで極大値となる吸収ピークをもつタキソイド特有のスペクトルを有する物質の存在を確認できた。以上のことから、タキソールを含むタキソイド系の物質はイチイ属樹木特有と考えられてきたが、その存在はカヤ属を含めたイチイ科樹木に及ぶことが確認でき、タキソール生産樹木をより幅広く選択できる可能性が広がった。

[第四章]

タキソール生産性樹木からの内生菌の単離およびタキソール生成能の検討

1993年に、太平洋イチイ内生菌 *Taxomyces andreanae* がタキソールを生産すると報告されている。このことから、イチイ科樹木だけではなく、それらの内生菌の中にも、タキソール生産能を有する菌株が広く分布する可能性が考えられたが、これまで遺伝子解析については例がない。そこで、イチイ科植物のイチイ (*Taxus cuspidata*) からカヤ (*Torreya nucifera*) の内生菌を単離し、その遺伝子解析を行うことでタキソイド生成能を調べることで新たなタキソール供給資源となりうる内生菌を探索した。

各樹木の葉や葉柄、樹皮を表面殺菌し、PDA培地に接種した。その後、発生した菌糸を植え継ぎ、単離を行った。分離菌株の rDNA の ITS1 領域の配列を調べることで、菌種を同定した。その結果、イチイからは *Phomopsis* 属を中心に 10 種類の菌が、カヤからは *Xylaria* 属を中心に 11 種類の菌が単離された。イチイとカヤの内生菌が大きく異なる結果となり、宿主特異性がうかがえた。次に、各菌種において、イチイ属樹木で既知のタキソール生成酵素で、特に利用性の高い TXS, BAPT, TaH の 3 つの酵素遺伝子の存在可能性を、ドットプロットハイブリダイゼーション法で調べ、タキソイド生産性の一次スクリーニングとした。その結果、イチイ内生菌として *Colletotrichum gloeosporioides* および *Paraconiothyrium microdiplodia*、カヤ内生菌として *Cordyceps dipterigene* および *Sordariomycete* の 4 種において、TXS、TaH、BAPT 3 つすべての酵素のプロープでハイブリダイズし、これらの酵素の遺伝子配列を有する可能性が示唆された。次にこの 4 種の中で、比較的成長の早いイチイ内生菌 *C. gloeosporioides* と唯一タキソール生産の報告がないカヤ内生菌 *C. dipterigene* に関して、サザンハイブリダイゼーション法とゲノムウォーキング法を用いて遺伝子解析を進めた。その結果、*C. gloeosporioides* では TXS と BAPT、*C. dipterigene* では 3 つの酵素遺伝子の部分配列を取得することができた。以上から、この 2 種にはタキソール合成経路が存在すると考えられ、新たなタキソール供給資源としての利用の可能性が期待された。

また、*C.dipterigene* の BAPT に関しては、上流配列を 250bp 程度読むことができた。開始コドンの 50bp 上流に位置する転写開始に関わるイニシエーター配列までは、キャラボク上流配列と高い相同性を示したが、それより上流は 50%程度しか相同性がなかった。また、キャラボクの場合と異なり、水ストレスや脱水応答性のシス配列を有していることが分かった。

[第五章総括]

イチイ属樹木キャラボクのタキソール生合成に関与する鍵酵素遺伝子の転写調節領域の解析を行い、その結果、TXS 上流にはエチレン応答シス配列が存在すること、また、TXS,BAPT 共に光応答性のシス配列を多数有していることなどを確認した。これらの情報は、タキソール生産に関わる培養や栽培条件を検討する上で大きな手掛かりとなると考えられる。

イチイ科植物カヤにおいて、タキソールと考えられる物質の存在を確認し、また、その生合成に関与する 3 つの酵素である TXS,BAPT,T α H の遺伝子の存在を確認した。このことから、タキソイド供給のための対象樹種がイチイ属樹木に加えてカヤ属を含めたイチイ科に広がった。

イチイ科樹木内生菌 *C. dipterigene* と *C. gloeosporioides* に TXS、BAPT をコードする遺伝子の存在を確認した。これまで、タキソールを生産する内生菌の報告はあるものの、その遺伝子に関する報告はない。したがって、本研究の成果により、内生菌によるタキソール生産に向けた遺伝子技術の応用の道が拓かれた。