

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石野 貴久

イチイ属樹木が生産する二次代謝物であるタキソールは有用な抗癌剤として知られており、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。タキソールは環状ジテルペンアルカロイドの一種であり、ジテルペンのゲラニルゲラニルピロリン酸から Taxadienesynthase (TXS) という酵素によりタキサン環骨格が形成されたのち、引き続き 18 ステップの酵素反応によって生合成される非常に複雑な化合物である。現在、タキソールは葉に比較的多く含まれている前駆物質 Baccatin から半合成による生産あるいはイチイ属樹木の培養細胞を利用した生合成により生産されることが一般的であるが、そのいずれにおいても生産性が著しく低いことから、生産性を著しく向上させるための手法を開発することが求められている。その解決法のひとつはタキソール生合成系の一連の酵素遺伝子の高発現化であるが、タキソール生合成系酵素遺伝子に関する研究はまだ限られている。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情報を取得することを目標とした。さらに、タキソール生産のあらたな供給源を発見することを目指して、イチイ科樹木のカヤとイチイ科樹木内生菌についてタキソール生合成系酵素遺伝子の探索を行った。

まず、タキソールの主な供給方法となっているイチイ属樹木で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 cuspidate ver. nana*) を材料として、タキソール生合成酵素遺伝子上流配列を調べ、転写調節領域の解析を行った。キャラボク葉から DNA を抽出し、タキサン環骨格の形成に関与する酵素である TXS およびタキソール前駆体の Baccatin にフェニルアラニンと結合させる反応を触媒する酵素である 3-Amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transferase (BAPT) の遺伝子をクローニングし、さらにその上流配列の解析を行った。その結果、TXS 遺伝子上流にはエチレン応答性シス配列が存在することを確認した。さらに、TXS および BAPT 遺伝子上流には光応答性のシス配列を多数有することを見出した。

次に、タキソール生成能を持つ新規植物を目指して、日本特有のイチイ科樹木であるカヤ (*Torreya nucifera*) に注目し、タキソール生合成系の有無を確認するため、関連酵素遺伝子の探索を試みた。その結果、カヤ葉から得たゲノム DNA から既知の TXS、BAPT、さらに Taxadiene 5-hydroxylase (TaH) 遺伝子と高い相同性の配列が存在することを PCR 法による遺伝子断片の増幅により確認した。そこで、さらにゲノム DNA から TXS ならびに BAPT のクローニングを行った結果、TXS 遺伝子に相当すると思われる配列として約 3400bp を取得することができた。一方、BAPT 遺伝子に対しては 1000bp 程度を取得することができた。いずれの配列についても既知の対応遺伝子と 95% 以上の高い相同性を示した。これまでタキソールを含むタキソイド系の化合物はイチイ属樹木に特有と考えられて

きたが、以上の結果により、イチイ属以外のカヤ属を含めたイチイ科樹木にその生合成酵素系が広く存在することが示唆された。

イチイ属樹木の内生菌 *Taxomyces andreanae* もタキソールを生産することがすでに報告されている。このことは、イチイ科樹木だけではなく、それらの内生菌についてもタキソール生産の供給源となりうることを示唆している。そこで、イチイ科植物のイチイ (*Taxus cuspidata*) およびカヤ (*Torreya nucifera*) の植物体から内生菌を単離し、その中に新たなタキソール供給資源となりうる内生菌が存在する可能性について遺伝子解析により明らかにすることを試みた。供試樹木の葉、葉柄、また樹皮から内生菌を単離し、それぞれについて rDNA の ITS 1 領域の配列情報に基づき菌種を同定した。その結果、イチイからは *Phomopsis* 属を中心に 10 種類の菌が、カヤは *Xylaria* 属を中心に 11 種類の菌が単離された。次に、各菌についてタキソール生合成系に存在する酵素である TXS、BAPT および TαH の遺伝子存在の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た。その結果、イチイ内生菌として *Colletotrichum gloeosporioides* および *Paraconiothyrium microdiploia*、カヤ内生菌として *Cordyceps dipterigene* および *Sordariomycete*、合計 4 種の菌株から得たゲノム DNA とともに 3 種の酵素遺伝子プローブがハイブリダイズした。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* とカヤ内生菌 *C. dipterigene* について、サザンハイブリダイゼーション法とゲノムウオ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 遺伝子、*C. dipterigene* では 3 つの酵素遺伝子に高い相同性を示す部分配列を取得することができた。以上の結果から、この 2 種の内生菌にはタキソール生合成経路が存在すると考えられた。

以上の結果をまとめると、イチイ属樹木キャラボクについては、そのゲノム DNA 上でのタキソール生合成系酵素遺伝子の解析から、光の存在によってタキソールの生産性が制御されると考えられ、これらの情報に基づきタキソール生産に関わる細胞培養条件などを検討することが必要であることが示唆された。また、イチイ科樹木のカヤやイチイ科樹木の内生菌である *C. dipterigene* あるいは *C. gloeosporioides* もタキソール生産のあらたな供給源となりうることが示唆された。

以上、本研究の成果により、タキソール生産に向けた新たな供給源の確保とそのことを目的とした遺伝子技術の利用のための道筋が拓かれたことは、学術上、応用上、貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文を博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。