

## 論文

# 日本産イチイ科植物内生菌のタキソイド生成能の検討

石野貴久\*・寺田珠実\*・鮫島正浩\*・鴨田重裕\*\*

## Ability to Synthesize Taxoids of Endophytic Fungi in Japanese Taxaceae Plants

Takahisa ISHINO\*, Tamami TERADA\*, Masahiro SAMEJIMA\*, Shigehiro KAMODA\*\*

### 1. はじめに

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、微小管の脱重合阻害という特徴的な作用機構を有し、幅広い癌に効果を示す強力な抗癌剤である。近年ではさらに、アルツハイマー病への効果も示されてきた<sup>1)</sup>。

また、今まではその副作用が使用の課題になっていたが、アルブミン付与やミセル化など使用方法の改善がなされてきており、その利用は拡大を続けている。現在タキソールを含むタキソイド系薬剤のアメリカでの販売価格は年間6億ドルにも上る。

有用で市場ニーズも大きいタキソールは以下の4つの方法で供給がなされている<sup>2)</sup>。

- A) 太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮からの抽出<sup>3)</sup>
- B) 化学的全合成<sup>4),5)</sup>
- C) 前駆物質 Baccatin III からの半合成（含有量は葉の0.1%程度）<sup>6)</sup>
- D) Plant cell fermentation (PCF) 法（細胞培養法）<sup>7),8)</sup>

しかし、成人一人の治療に年間3gが必要であるにもかかわらず、樹齢100年の樹木の樹皮からわずか0.3gしか取れない。またタキソールの化学的全合成は工程が多いため、コストの面で実用的ではない。よって、A),B)の方法ではなく、現在は主に、C),D)の方法で供給されている。特にD)の方法は、エリシター、植物成長調節剤、生合成前駆体などをくわえることで、生産を数倍に増加することに成功している。しかし、未だ1mgあたり1000円と非常に高価であり、現状の生産性では需要に応えるには至っていない。

そこで、タキソールの生産増加を目指し、新規ソース候補として、イチイ科植物の内生菌の利用に着目した。植物内生菌は植物組織間や細胞内で生育し、基本的に病兆を示さない微生物と定義され、その正体は主に糸状菌と放線菌である。植物内生菌は宿主植物と似た生理活性物質を生産することが知られており、土壌微生物とは異なる代謝経路を獲得していると考えられている。微生物の生理活性物質のスクリーニングは50年以上前から行われてきており、近年その多様性に再び注目が集まり、タイ、カンボジア、ラオスなどの東南アジアでは新規有用生理活性物質の探索と多様性を生む生合成関連酵素遺伝子の調査、および生産系の確立に向けて研究が進められ

\* 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻

Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

\*\* 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林樹芸研究所

Arboricultural Research Institute, The University of Tokyo Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

ている。現在も、ペニシリンやセファロsporinといった抗生物質や植物ホルモンであるジベレリン、プラバスタチンという高脂血症用薬が放線菌や糸状菌の培養によって供給されており、その他の生理活性物質や薬剤の生産に放線菌や糸状菌といった微生物の利用が期待されている<sup>9)</sup>。

本研究では、内生菌の培養によるタキソール供給源としての利用可能性はもちろん、タキソール生合成関連酵素遺伝子についての知見を得ることも目的とし、日本産のイチイ、およびいくつかのタキソール生成酵素遺伝子を有しているイチイ科植物カヤ<sup>10)</sup>の内生菌を単離し、そのタキソール生成能を検討した。

## 2. 試料と実験方法

### 2.1 内生菌の単離と同定<sup>11)</sup>

#### 2.1.1 試料採取

試料として、東京大学附属小石川植物園よりイチイ (*Taxus cuspidata*) とカヤ (*Torreya nucifera*) の葉、樹皮、葉柄を採取した。

#### 2.1.2 単離

試料より内生菌を単離するため、70%エタノールで2分、次亜塩素酸ナトリウムで5～15分滅菌して、各部位とも1cm長の断片に切断し、Potato dextrose agar (PDA) 培地に置床した。伸長してきた菌糸を、PDA培地に継代して、目視で単一菌糸となるまで継代を繰り返した。

#### 2.1.3 同定

種間で変異が存在する rDNA (リボソーム DNA) のスペーサー領域 (Internal transcribed spacer ; ITS) の塩基配列情報を調べることで菌種を同定した<sup>12)</sup>。まず、菌糸を液体窒素中ですりつぶして粉末状にし、DNA抽出用キットである DNeasy Plant Maxi kit (QIAGEN 社) を用いて、添付のプロトコールに従い、DNAを抽出した。抽出したDNAをテンプレートとして、rDNAのうち18S, 28SRNAをコードする保存性の高い遺伝子領域から作製したプライマー-ITS1f-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') と ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用いてPCRを行った (図-1)。PCRはサーマルサイクラー Veriti200 (ABI 社) を用いて、94℃ -1分 - (94℃ -20秒, 45℃ -20秒, 72℃ -2分) × 35 サイクル -72℃ -2分の反応サイクルで行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認したのち、SUPREC<sup>TM</sup>PCR (TAKARA 社) を用いてプライマー除去して、OPERON 社のシーケンス解析サービスに委託して配列を解読した。そして、日本DNAデータベース (DDBJ) のBLAST検索を用いて菌種を同定した。

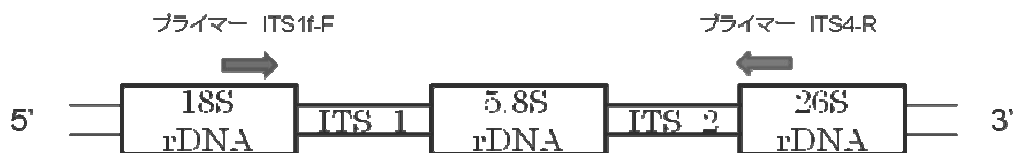


図-1 菌種同定PCR増幅領域とプライマー結合位置

Fig. 1 Target regions and the binding sites of primers for endophytic fungi identification.

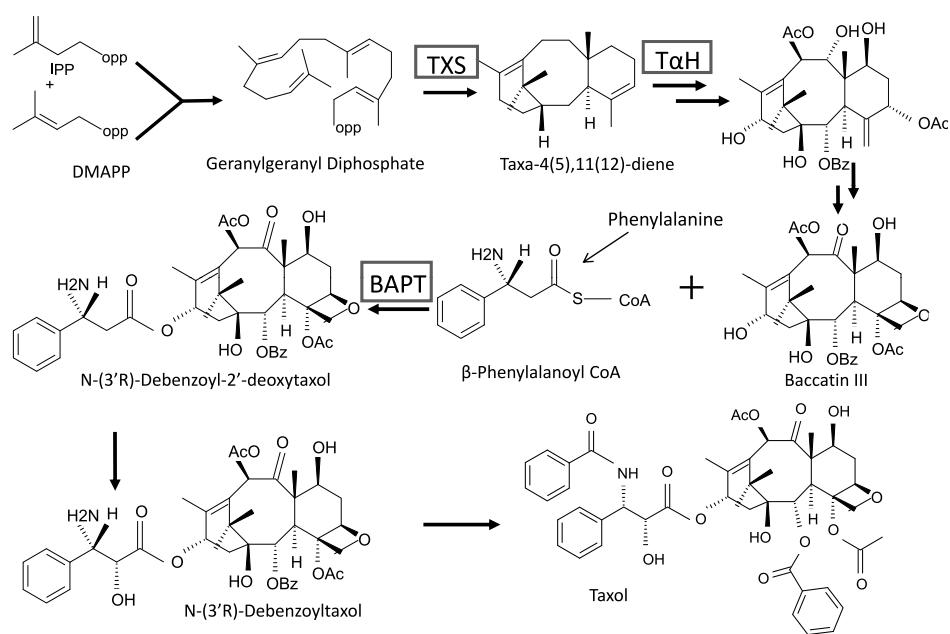


図-2 タキソール生成経路

Fig. 2 Overview of the paclitaxel biosynthetic pathway and enzymes.

## 2.2 内生菌のタキソール生成能の検討

### 2.2.1 ドットプロットハイブリダイゼーション

単離同定できた菌種のうち、イチイ内生菌 6 種類、カヤ内生菌 5 種類についてドットプロットハイブリダイゼーションを行った。2.1.3 と同様に DNeasy Plant Maxi kit を用いて 11 種の内生菌から抽出した DNA を 10 $\mu$ g ずつ、Hybond N + メンブレン (GE ヘルスケア社) にしみ込ませ、254nm の UV をあてメンブレンに固定した (イチイ *Taxus cuspidate* をコントロールとして用いた)。イチイ属樹木で既知のタキソール生成関連酵素のうち、特に利用性の高い TXS (taxadienesynthase), BAPT (3-amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transeferase), T $\alpha$ H (taxadiene13 $\alpha$ -hydroxylase) という 3 つの酵素遺伝子 (図-2)<sup>13)~16)</sup> から作製した (OPERON 社) 50 ~ 100bp の連続した DNA 断片をプローブ (表-1) とした。市販の AlkPhos Direct (GE ヘルスケア社) のプロトコールに従い、55 $^{\circ}$ C で一晩ハイブリダイゼーションを行い、65 $^{\circ}$ C でメンブレンを洗浄した。その後、一晩露光して状態を観察した。このドットプロットハイブリダイゼーションの結果をタキソール生成能の有無を示す一次スクリーニングとした。

### 2.2.2 サザンハイブリダイゼーション

2.2.1 の 3 つのタキソール生成酵素のプローブにおいてスポットを確認することのできた内生菌の DNA を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。まず、DNA を 2 種類の制限酵素 *Hind* III と *Eco*R I を同時に用いて処理し (double digest 処理)、アガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動を行ったゲルを、10  $\times$  SSC (standard saline citrate) で浸した濾紙の上に置き、ゲルの上に Hybond N + メンブレンを乗せ、DNA のトランスファーを一晩行った。その後、

表-1 ドットプロットに使用したプローブ配列  
Table 1 Sequences of probe for dot blot hybridization.

TXS1	aatgcagcgtgaagatgaatgcattggggaacaaggcaatccacgatccaa (52bp)
TXS2	cgaattgcagagccaaatctgaggggcaaatgatgtgggttctccaaatcagggcgaaccagagtaaaa atgctcgagaggaagtgggtgctctggtcc (100bp)
TXS3	tgtcgaatg atgagcagta gcaactggcac tagcaagggtg gttccgaga cttccagtac (60bp)
BAPT1	cccttttctggcggtcagaataaagaaaatggggaactgaagtggagtgcacagggcagggt gttctgtttctggaagccatggctgacagcgac (100bp)
BAPT2	ctttcagtcttaacagatctcgataactacaatccatcgttcagcagttgatttttctctaccacagg (70bp)
BAPT3	atacagatattgaggacctccatctctgattgttcagtaactcgttttcatgtgggggtttgt tgt (70bp)
T $\alpha$ H	ggtaaaagacctcgtcttctccgtcgcaagccgctgtttttgtataactgagga (57bp)

These probes were produced from *Taxus cuspidate* DNA sequences

2.2.1と同様に254nmのUVを照射してDNAを固定した。市販のAlkPhos Direct (GEヘルスケア社)のプロトコルに従い、55°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。この際、イチイ属樹木のキャラボク (*Taxus cuspidata var. nana*) のDNAをテンプレートにして、表-2に示したプライマー (BAPTに関してはf1,r1の組み合わせのみ) を用いてPCRを行い、そのPCR産物 (TXS877bp, BAPT444bp, T $\alpha$ H311bp) のシーケンスを確認後、プローブとして使用した。65°Cで洗浄した後、一晩露光して状態を観察した。

### 2.2.3 ゲル抽出とPCR解析

*Cordyceps dipterigene* のDNAをHind IIIとEcoR Iでdouble digest処理して、アガロースゲル電気泳動を行い、サザンハイブリダイゼーションでバンドが確認できた部分を切り出して、

表-2 キャラボクのタキソール生成酵素遺伝子プライマー  
Table 2 Primers specific for taxol biosynthetic enzymes.

TXSf	atcgatcga ttgcttaacac
TXSr	tccagcagat cgatggaatac
BAPTf1	atccgctctg ttctgaaatac
BAPTf1	atccgctctg ttctgaaatac
BAPTf2	acgacgcac atggaagaat
BAPTf2	acgacgcac atggaagaat
BAPTf2	acgacgcac atggaagaat
BAPTf2	acgacgcac atggaagaat
BAPTf2	acgacgcac atggaagaat
T $\alpha$ Hf	ggtaaaagacc tcgtcttctccgtcg
T $\alpha$ Hr	tctcttctc cgccagtgaattcc

f: forward, r: reverse

QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN 社) を用いてゲルからのフラグメント抽出を行った。ゲルから抽出したフラグメント DNA をテンプレートにして、表-2 のプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動によりサイズを確認した。PCR はサーマルサイクラー Veriti200 (ABI 社) を用いて、94°C -2 分 - (94°C -30 秒, 53°C -30 秒, 72°C -2 分) × 30 サイクル -72°C -3 分の反応サイクルで行った。

次にその PCR 産物を、pGEM-T Easy Vector System I (PROMEGA 社) を用いて TA クローニングをした。コンピテントセルは *E.coli* DH5  $\alpha$  (TAKARA 社) を用い、アンピシリン (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 入りの LB 培地上、37°C で一晩培養した。コロニーからボイル法で DNA を調製し、pGEM-T Easy Vector System I のクローニングサイトの両側にある T7 プロモーターおよび SP6 プロモーター配列のプライマーを用いた PCR によりサイズ確認を行い、陽性クローンの絞り込みを行った。バンドが確認できたものは、シーケンス解析サービス (OPERON 社) に委託して配列を読んだ。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 内生菌の同定結果

イチイとカヤの内生菌を培養して得た菌糸から DNA を抽出し、rDNA の部分塩基配列を決定して菌種の同定を行った。

イチイからは *Phomopsis* 属を中心に 10 種類 13 個体 (A-M) の菌が、カヤは *Xylaria* 属を中心に 11 種類 13 個体 (A-M) の菌が単離された (表-3)。ほぼ同じ場所に生育する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る結果となった。

また、今回単離されたイチイ内生菌のうち 3 種類 (*Phomopsis phaseolorum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Paraconiothyrium microdiploia* sp), カヤ内生菌のうち 2 種類 (*Sordariomycete*, *Xylaria venosula*) は、既にタキソール生産性が報告されているものであった<sup>17)</sup>。

#### 3.2 内生菌のタキソール生成能の検討

##### 3.2.1 ドットプロットハイブリダイゼーション

同定した菌種のうち、タキソール生産性が報告されている 3 種を含むイチイ内生菌 6 種類、タキソール生産性が報告されている 2 種を含むカヤ内生菌 5 種類を対象として、タキソール生成能を知るため、これらの内生菌がタキソール生合成経路で働く 3 種の酵素遺伝子 TXS, T $\alpha$ H, BAPT を有するかどうかをドットプロットハイブリダイゼーションで調査した。イチイ内生菌では、タキソール生産性が報告されていた菌種以外は、1 種類しか単離されてこなかった *Phyllosticta papayae* と *Phomopsis* 属のうち固体培地で成長の早い 2 種を選抜した。カヤ内生菌では、菌種名が同定しきれないものが多かったが、タキソール生産性が報告されている 2 種に近く、成長の早い *Xylaria* 属 3 種と *hypoxylon* 属 1 種を選抜した。

3 種 (TXS, T $\alpha$ H, BAPT) の酵素遺伝子をプローブとして行ったドットプロットの結果を図-3 と表-4 に示した。今回のハイブリダイゼーションの結果として、イチイ内生菌 H [*Colletotrichum gloeosporioides*], L [*Paraconiothyrium microdiploia*], カヤ内生菌 A [*Xylariaceae Cordyceps dipterigene*], H [*Sordariomycete*] の 4 種において、TXS, T $\alpha$ H, BAPT 3 つすべての酵素のプローブ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。4 種のうち 3 種はタキソール生産性が報告されているものであったが、カヤ内生菌 A [*Xylariaceae*

表-3 イチイとカヤの内生菌の単離同定結果

Table 3 Molecular identification of endophytic fungi based on DNA sequence analysis shaded area: endophytic fungi reported taxol production.

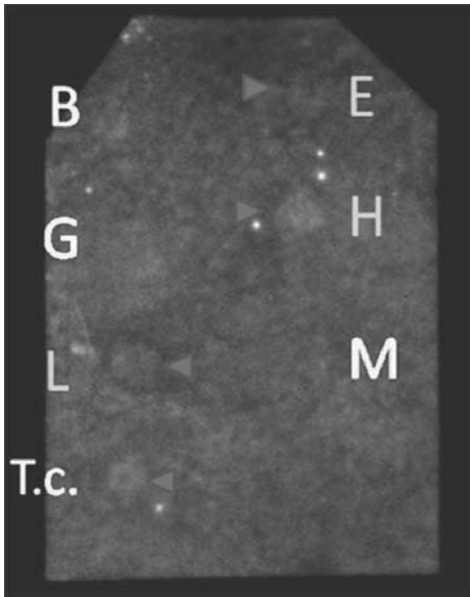
*Taxus cuspidata*

	Names of fungi
A	<i>Botryosphaeria parvastain</i>
B	<i>Phomopsis phyllanthicola</i>
C	<i>Phomopsis liqidambari</i>
D	<i>Phomopsis amygdal</i>
E	<i>Phomopsis phaseolorum</i>
F	<i>Phomopsis liqidambari voucher</i>
G	<i>Phomopsis vccinill</i>
H	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
I	<i>Phomopsis sp</i>
J	<i>Phomopsis vccinill</i>
K	<i>Melanconium juglandium or Phyllosticta papayae</i>
L	<i>Paraconiothyrium microdiplodia sp</i>
M	<i>Phyllosticta papayae</i>

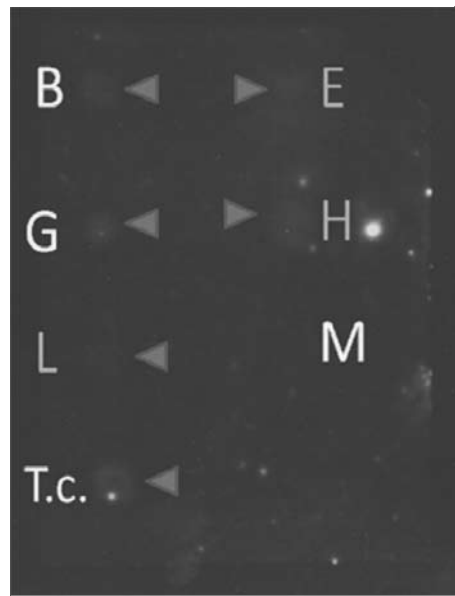
*Torreya nucifera*

	Names of fungi
A	<i>Xylariaceae sp Cordyceps dipterigene</i>
B	<i>Hypoxyton sp</i>
C	<i>Hypoxyton sp unidentified Xylarialean</i>
D	<i>Hypoxyton sp unidentified Xylarialean</i>
E	<i>Not identified</i>
F	<i>Hypoxyton sp unidentified Xylarialean</i>
G	<i>Xylaria sp</i>
H	<i>Sordariomycete(xylaria)</i>
I	<i>Xylaria hypoxyton</i>
J	<i>Xylaria venosula</i>
K	<i>Phomopsis amygdali</i>
L	<i>Phomopsis amygdali Phomopsis fukusii</i>
M	<i>Not identified</i>

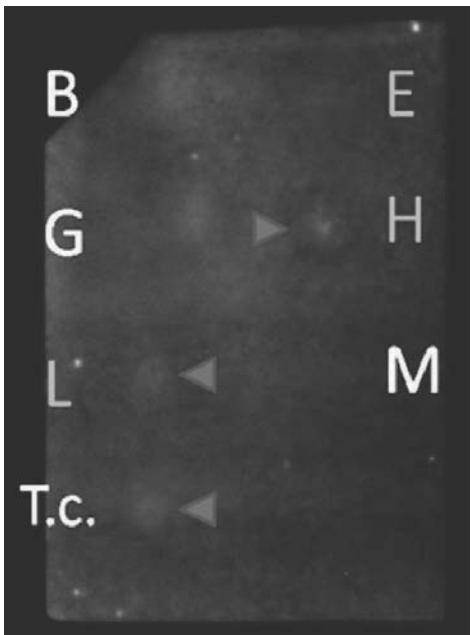
a:



Probe TXS



Probe T $\alpha$ H



Probe BAPT

図-3 ドットプロットハイブリダイゼーション結果

Fig. 3 Dot blot hybridization analysis.

a: イチイ内生菌 b: カヤ内生菌

a: endophytic fungi from *Taxus cuspidata*

b: endophytic fungi from *Torreya nucifera*

▲ :Hybridization signal

b:

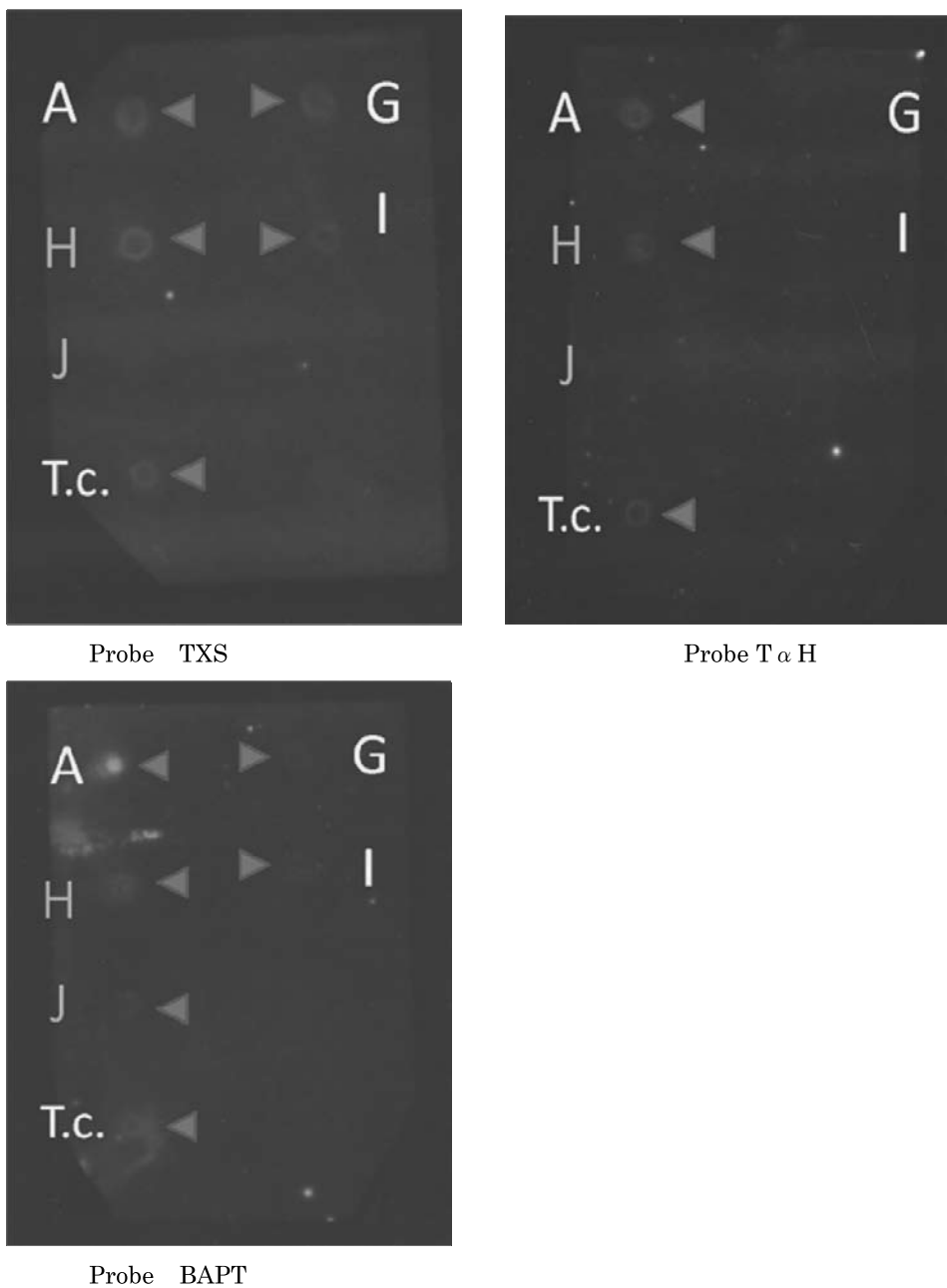


図-3 ドットプロットハイブリダイゼーション結果 (続き)  
 Fig. 3 Dot blot hybridization analysis. (Continued)



表-4 内生菌とハイブリダイゼーション結果

Table 4 Summary of dot blot hybridization analysis using genomic DNA from endophytic fungi.

*Taxus cuspidata*

	Names of fungi	TXS	T $\alpha$ H	BAPT
B	<i>Phomopsis phyllanthicola</i>	×	○	×
E	<i>Phomopsis phaseolorum</i>	○	○	×
G	<i>Phomopsis vccinill</i>	×	○	×
H	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	○	○	○
L	<i>Paraconiothyrium microdiplodia sp</i>	○	○	○
M	<i>Phyllosticta papayae</i>	×	×	×

*Torreya nucifera*

A	<i>Xylariaceae sp Cordyceps dipterigene</i>	○	○	○
G	<i>Xylaria sp</i>	○	×	○
H	<i>Sordariomycete(xylaria)</i>	○	○	○
I	<i>Xylaria hypoxylon</i>	○	×	○
J	<i>Xylaria venosula</i>	×	×	○

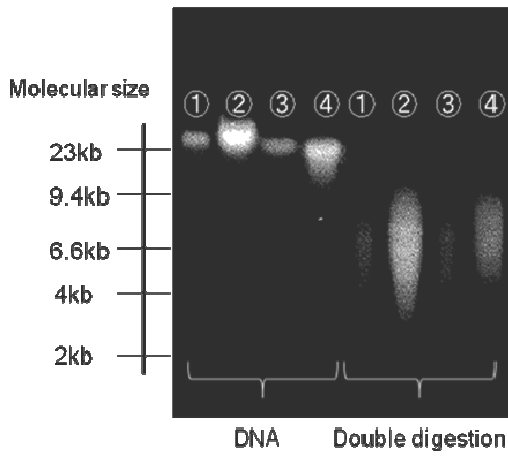
*Cordyceps dipterigene*] は今回初めて、これらの遺伝子がそろっていることが示唆できた。また、この他の菌においても、1つないしは2つの酵素のプロープでハイブリダイズしていた。今回のプロープでは3つ全てを検出できなかっただけで、これらの内生菌にはタキソール生合成経路を有している可能性は捨てきれないが、現段階においてはイチイ属樹木内でタキサン骨格の水酸化以降の段階において、タキソール生産に関わっている菌種の可能性が推測された。

### 3.2.2 サザンハイブリダイゼーションと遺伝子配列

調査した3種の酵素全ての存在が示唆された4種の内生菌のうち、これまでタキソール生産性が報告されていなかった *Cordyceps dipterigene* について、これら3種の酵素遺伝子の存在の確証を得るため、よりプロープ長の長いキャラボクの3遺伝子の部分配列をプロープとして用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。そのサザンハイブリダイゼーションの結果を図-4に示した(T $\alpha$ Hをプロープとして用いた場合に関しては、シグナルが弱く、十分な感度を得られなかったため今回は記載していない)。この結果、*Cordyceps dipterigene* のDNAを *Hind* IIIと *EcoR* Iで double digest 処理したものの9kb~4kbのあたりにTXSをコードする遺伝子が、6kb~2kbの間にBAPTをコードする遺伝子が含まれていることが示唆された。

そこでこの部分に含まれるDNAをゲル抽出してテンプレートとしてPCRを行い、そのPCR産物をTAクローニングして遺伝子配列を読んだ。その結果を図-5に示した。その結果、イチイ属由来の既知のTXSと97%の相同性を示す877bpのDNA断片を確認した。また、同様に

a:



b:

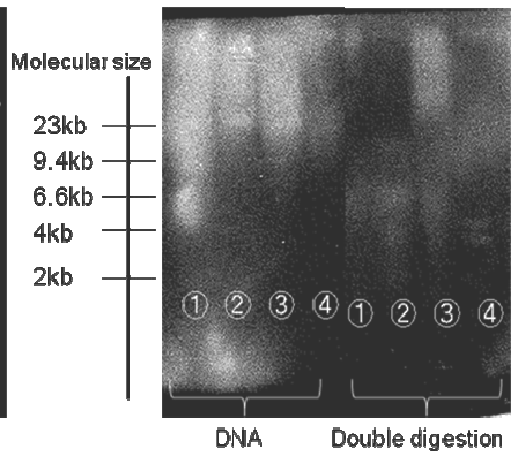


図-4 *Cordyceps dipterigene* のサザンハイブリダイゼーション結果

Fig. 4 Southern hybridization analysis. *Cordyceps dipterigene* genomic DNA was double digested with *Hind* III and *EcoR* I.

a: プローブ TXS b: プローブ BAPT 1

a: TXS b: BAPT 1 (プライマー-flr1 の組み合わせ)

各図左より: ①: イチイ、②: カヤ、③: キャラボク、④: *Cordyceps dipterigene* の DNA、それら 4 サンプルの *Hind* III と *EcoR* I による double digest 処理サンプル

左はマーカーサイズ

①: *Taxus cuspidata*, ②: *Torreya nucifera*, ③: *Taxus cuspidata* var. *nana*, ④: *Cordyceps dipterigene*

a:TXS 877bp  
TGCGATCGAT TGCTTAGCAC GACCAATTCT GTTATCTCCC TCTGGGCTTG  
 CAAAACAGGG CACAGCCAAC TAGAACATGG TTAGAATCAT GCCATTTTGG  
 GAAAAAAGAA CAGTGTGAA GGTTFCTGG TCAATCAACT AATGTTTGT  
 TTCTCATTTT TTGGGGGGGA TTTATCATG GTGGGTGGAC CAGTCAGCCT  
 TGCAAAATATT TGTGATGTTT AAGCGCCAAA TCTGTTGTCT CATTATTTTT  
 CTATTTTTTT CTCCACAGAT ACTGAGTTTA TTGCAGAGAA TCTAGATTAC  
 TCAATGAGGA AGATGAGCTG TCCCCTGATT TCGAAATAAT CTTCTCTGCT  
 CTGTTGCAA AGGNAAAAGC GTTGGGGGTC AATCTTCCTT ACGATCTTCC  
 ATTTATCAAA TTTTGTGGA CAACACGGGA AGCCAGGCTT ACAGAGTGG  
 TGAAAATCTCT GTTACTGTTT TTAATAAAAA AACTGGTAA TCATGTTCTG  
 GATTTGTAAT TTGTTCTTTT TGGCCATTGC AGTGTTCCTG CGGCAGCAGA  
 CAATATTCCA GCCAACATGT TGAATGCGTT GGAGGGTCTC GAGGAAGTTA  
 TTGACTGGAA CAAGATTATG AGGTTTCAAA GTAAAGATGG ATCTTCTCTG  
 AGCTCCCCTG CTTCCACTGC CTGTGTACT GATGAATACA GGGGACGAAA  
 AATGTTTCAC TTTTCTCAAC AATCTGCTGG ACAAATTCGG CGGCTGCGGT  
 ATGATTTGTT TTTAACAAG AAATCTTTG TGTGCGTGCT GATTCCAACA  
 TTAGCATTCA AGTGATFAA TTAATGGTA CGAACTGTGA ATTACAGTGC  
 CCTGTATGTA TTCCATCGAT GAGCTGGC

b:TaH  
 GGGATCTTTT TCTGTTCCAC TCAACATTCC CGGATTCAGT TACCATAAAG  
 CGATTCAGGC AAGGGCCACC CTCGCTGACA TCATGACCTC TTTGATAGAA  
 AAGAGGAGAA ATGAGCTGCG TGCAGGCACT GCATCTGAGA ATCAAGATTT  
 GCTCTCTGTT TTGCTCACTT TCACTGACGA AAGGGGAAT TCACT

c:BAPT1 444bp  
ATCGCTCTG TTCTGAATAC TTAGAGATGA AGAAGACAGG TTCGTAGCA  
 GAGTTCATG TGAATATGAT TGAGCGAGTC ATGGTGAGAC CGTGCCTGCC  
 TTCGCCAAA ACAATCCTCC CTCTCTCCGC CATTGACAAC ATGGCAAGAG  
 CTTTTCTAA CGTATTGCTG GTCTACGCTG CCAACATGGA CAGAGTCTCT  
 GCAGATCTG CAAAAGTGAT TCGGGAGGCT CTCTCCAAGG TGCTGTTTAA  
 TTATTACCCT TTTGCTGGC GGCTCAGAAA TAAAGAAAAT GGGGAACCTG  
 AAGTGGAGTG CACAGGGCAG GGTGTTCTGT TTCTGGAAGC  
 CATGGCTGAC AGCGACCTTT CAGTCTTAAC AGATCTCGAT AACTACAATC  
 CATCGTTTCA GCAGTTAATT TTTTCTCTAC CACAGGATAC AGATATTGAG  
GACC

d:BAPT2 431bp  
GACGACGAT CATGGAAGAA TGCAAAGAAA GTTATCTTC ATTTGAAATT  
 GTAGCAGCAT TGGTTGGCT AGCAAAGATA AAGGCTTTTC AAATCCACA  
 TAGTGAGAA GTGAAGCTTC TTTTTCGAAT GGACTTGAGG AGATCATTTA  
 ATCCCCCTCT TCCACATGGA TACTATGGCA ATGCCTTTGG TATTGCATGT  
 GCAATGGATA ATGTCATGA CCTTCTAAGT GGATCTCTTT TGGCACTAT  
 AATGATCATA AAGAAATCAA AGTCTCTTT ACACAAAAGAA CTCAACTCAA  
 AAACCGTGAT GAGCTCGTC TGTAGTAGAT GTCAATACGAA GTTTGAAGAT  
 GTAGTTTCAA TTAGTGATTG GAGGACTTCT ATATATTATG AAGTGGACTT  
 TGGGTGGGA GATGCAATGA ACGTGACAC T

図-5 *Cordyceps dipterigene* のタキソール生成酵素遺伝子の部分配列

Fig. 5 Partial sequences of three paclitaxel biosynthetic pathway genes from *Cordyceps dipterigene*.

a:TXS, b:T  $\alpha$  H, c:BAPT1, d:BAPT2

Underline : primer site

イチイ属由来の BAPT とほぼ 100%の相同性を示す 431bp と 444bp の DNA 断片を確認した。

また, *Cordyceps dipterigene* の DNA をテンプレートとして, T $\alpha$ H のプライマーで PCR を行った結果, イチイ属由来の既知の T $\alpha$ H と相同性 100%の 195bp の DNA 断片を確認した。

これらのことから, *Cordyceps dipterigene* は TXS, BAPT, T $\alpha$ H という 3つのタキソール生成酵素遺伝子を有していることが示され, そのタキソール生成能がうかがえる。また, これらの遺伝子配列の知見は, イチイ属樹木以外では初の報告となる。

## 要 旨

イチイ属樹木特有の抽出成分として知られるタキソールは, 幅広い癌に効果のある強力な抗癌剤であるが, 供給不足のため依然として高価な薬剤である。この供給不足解消の新たな手段として, 内生菌の利用に着目した。イチイに加え, 同じイチイ科であるカヤの内生菌の単離同定を行い, そのタキソール生産可能性についてタキソール生成酵素遺伝子の有無という観点から検討を行った。まず, 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, 既知のタキソール生合成関連酵素の内, 特に利用性の高い TXS (taxadienesynthase), BAPT (3-amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transeferase), T $\alpha$ H (taxadiene13  $\alpha$  hydroxylase) という 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を行うことで調べ, 一次スクリーニングとした。その結果, イチイ内生菌 [*Colletotrichum gloeosporioides*], [*Paraconiothyrium microdiplodia*], カヤ内生菌 [*Xylariaceae* sp, *Cordyceps dipterigene*], [*Sordariomycete*] の 4 菌種において, 3 種全てのプローブでハイブリダイズした。このうち, カヤ内生菌の *Cordyceps dipterigene* に注目して, サザンハイブリダイゼーションを行ったところ, 上記 3 種の酵素のプローブでバンドが確認できた。その部分をゲル抽出してテンプレートとし, PCR を行い, 塩基配列を読んだところ, 上記 3 種の酵素遺伝子と 95%以上の高い相同性を示し, タキソール生成酵素遺伝子を有する微生物を初めて発見することができた。

キーワード：タキソイド, イチイ科植物, 内生菌, ハイブリダイゼーション, タキソール生成酵素

## 4. 引用文献

- 1) Butler, D., Bendiske, J., and Michaelis, M.L. *et.al.* (2007) Microtubule-stabilizing agent prevents protein accumulation-induced loss of synaptic markers. *Eur. J. Pharmacol.* 562: 20-27
- 2) Heinig, U., and Jennewein, S. (2009) Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin. *African J. of Biotech.* 8:1370-1385
- 3) Schiff, P.B. and Horwitz, S.B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *PNAS* 77:1561-1565
- 4) Holton, R.A., Somoza, C., Kim, H.B., Liang, F., Biediger, R.J., and Boatman, P.D., (1995) The total synthesis of paclitaxel starting with camphor. *ACS Symp.Ser.* 583:288-301
- 5) Nicolaou, K.C., Yang, Z., Liu, J.J., Ueno, H., Nantermet, P.G., and Guy, R.K., *et al.* (1994) Total synthesis of taxol. *Nature* 367:630-634
- 6) Holton, R.A., Biediger, R.J., and Boatman, P.D. (1995) Semisynthesis of Taxol and Taxotere. In *Taxol: Science and application*. Suffness, M. (eds), CRC Press, Boca Raton, pp.97-121
- 7) Gibson, D.M., Ketchum, R.E.B., Vance, N.C., and Christen, A. A. (1993) Initiation and growth of cell

- lines of *Taxus brevifolia*. Plant Cell Rep. 12:479-482
- 8) 坂井淳一・安東政義・内山武夫・藤沢 一・北畠睦己・豊泉和樹・広瀬克利 (2002) イチイカルス培養によるタキソールならびに関連タキソイドの生産 .The Chemical Society of Japan 2:231-238
  - 9) Greve,H.,Mohamed,I.E., Pontius,A.,Kehraus,S., Gross,H., Konig,GM. Fungal metabolites:structural diversity as incentive for anticancer drug development (2010) Phytochemistry Reviews 9:537-545
  - 10) Ishino, T, Aizawa, E, Terada, T, Samejima, M and Kamoda, S (2009) Ability of Taxoids Production in Japanese Taxaceae Plants.Bull.Tokyo.Univ.For 120:45-52
  - 11) Miao, Z., Wang, Y., Yu, X., Guo, B., and Tang, K. (2009) A New endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. Applied Biochemistry and Microbiology 45:81-86
  - 12) 杉山智明・森満範・宮内輝久・中谷誠・原田陽 (2003) PCR 法による木材腐朽菌の同定 木材保存 29:98-104
  - 13) Croteau, R., and Raymond, E.B. Ketchum,R.E.B.*et al* (2006) Taxol biosynthesis and molecular genetics. Phytochemistry Reviews 5: 75-97
  - 14) Robert M., Long, R., and Croteau, R. (2005) Preliminary assessment of the C13-side chain 2-hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. Biochem. Biophys. Research Communications 338:410-417
  - 15) Walker, K., Fujisaki, S., Long, R., and Croteau, R. (2002) Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. PNAS 99:12715 – 12720
  - 16) Jennewein, S., Wildung, M.R., Chau, M., Walker, K, and Croteau, R. (2004) Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. PNAS 101:9149-915
  - 17) Liu, K., Ding, X., Deng, B. and Chen, W. (2009) Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. J. Ind. Microbiol. Biotech.36:1171-1177

(2011年5月9日受付)

(2011年7月11日受理)

## Summary

Taxol is a potent antimetabolic agent with excellent activity against a range of cancers. Several methods have been developed for taxol production, e.g, total chemical synthesis, semisynthesis from precursor Baccatin III and plant cell culture. But, taxol supply does not meet demand. So, in order to lower the price of taxol and make it more widely available, we focused on endophytic fungi as an alternate source of supply. This study investigated the endophytic fungi diversity of *Taxus cupidata* and *Torreya nucifera* and screened the taxol-producing fungi in the host. Endophytic fungi obtained from bark, leaf and leaf stem were identified by sequence analysis of the internal transcribed space (ITS1-5.8S-ITS2) of rDNA. 10 endophytic fungal strains were isolated from *Taxus cupidata* and 11 strains from *Torreya nucifera*. We researched the gene sequences of the paclitaxel biosynthetic pathway enzymes in 21 endophytic fungi to discover taxol-producing fungi. We examined the presence of TXS, BAPT and T $\alpha$ H, thought to be a key enzyme for taxoid production, by dot blot hybridization for first screening of taxol-producing fungi. As a result we were able to obtain four fungi strains in which TXS, BAPT and T $\alpha$ H hybridization signals were observed. They were *Colletotrichum gloeosporioides* and *Paraconiothyrium microdiploia* from *Taxus cuspidate*, *Cordyceps dipterigene* and *Sordariomycete* from *Torreya nucifera*. Secondly we focused on *Cordyceps dipterigene* and researched the gene sequence of TXS, BAPT and T $\alpha$ H by southern hybridization, gel extraction

and PCR. As a result we were able to obtain the sequences of three taxol biosynthetic pathway genes from *Cordyceps dipterigene* and from this we concluded that *Cordyceps dipterigene* has the ability of taxoid production. This report is the first discovery of an endophytic fungus which has several taxol biosynthetic pathway genes.

**Key word:** taxoid, Taxaceae, endophytic fungi, hybridization, taxol biosynthetic enzymes