

日本産イチイ科植物におけるタキソイド生成能

石野貴久*¹・会沢栄志*^{1,*2}・寺田珠実*¹・鮫島正浩*¹・鴨田重裕*³

Ability of Taxoids Production in Japanese *Taxaceae* Plants

Takahisa ISHINO*¹, Eishi AIZAWA*^{1,*2}, Tamami TERADA*¹,
Masahiro SAMEJIMA*¹ and Shigehiro KAMODA*³

はじめに

イチイ科イチイ属樹木の産生するパクリタキセルはタキソイドの一種の強力な新規抗癌剤である。チュープリンの脱重合を阻害するというこれまでの抗癌剤とは異なる作用機構¹⁾に基づく上に、卵巣癌、乳癌、肺癌、胃癌などの幅広い癌に効果のあるという特徴を有する¹⁾。しかし、成人一人の治療に年間 3g が必要であるのに対して、パクリタキセルが最初に単離されたタイハイヨウイチイ (*Taxus brevifolia*) の樹齢 100 年の樹皮からわずか 0.3g しか取れない²⁾のが実情である。日本産イチイ (*Taxus cuspidata*) などのカルスを誘導し、そのカルス培養によるタキソイド生産が試みられ、カルスにエリシター、植物成長調節剤、生合成前駆体などを添加することで、生産を数倍に増加することに成功しているが、元々の含有量が少なく、実用化には至っていない³⁻⁶⁾。化学的全合成は工程 (50 以上) が多すぎて実用的でないため、現在は、プランテーションによって栽培された *Taxus baccata* の葉に多く含まれている 10-deacetylbaaccatin III あるいは baaccatin III を前駆体とした半合成で供給されている⁶⁾。しかし需要に対して供給が追いついていないのが現状である。今回、この供給不足解消への第一歩として、日本産イチイ属樹木であるキャラボク (*Taxus cuspidata* var. *nana*) と、イチイ科カヤ属のカヤ (*Torreya nucifera*) において、タキソイド生成能を有しているかを、タキソイド生成関連酵素をコードする遺伝子配列の有無の観点で、すでに配列が知られているイチイ (*Taxus cuspidata*) と比較した。その結果、キャラボク、カヤにいくつかのタキソイド生成関連酵素遺伝子の存在することが明らかとなった。

材料及び実験方法

1. 植物材料

本研究では、東京大学大学院理学系研究科附属小石川植物園より採取したイチイ、キャラボク、カヤの葉を使用した。

*¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻

*¹ Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

*² 現所属: 独立行政法人 国際協力機構

*² Japan International Cooperation Agency

*³ 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

*³ Arboricultural Research Institute, University Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

2. ゲノムDNAの調製

材料として用いた3種類の植物の葉を液体窒素で凍結し、乳鉢・乳棒にて粉末状にした。植物DNA抽出用キットであるPhytopure plant DNA extraction kit(GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いて、標準のプロトコールにしたがい、ゲノム抽出を行った。

3. プライマーの設計⁷⁾及びPCR条件

現在推定されているタキソール生合成経路⁸⁻¹⁰⁾をFig. 1に示した。またその生合成経路上で既知の12種類のタキソイド生成関連酵素のうちGGPPS(geranylgeranyldiphosphatesynthase), TXS(taxadienesynthase), T α H(taxadiene 13 α -hydroxylase), T10 β H(taxane 10 β -hydroxylase), PAM(phenylalanine aminomutase), BAPT(3-amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transferase), DBTNBT(3-N-debenzoyltaxol-N-benzoyltransferase)の計7種類の酵素のプライマーを、塩基配列既知の*Taxus \times media*, *Taxus brevifolia*の塩基配列を基に作成した。DNA polymeraseはExTaq DNA polymerase(Takara)を用い、PCR反応槽はgene Amp2700(ABI)を使用した。温度サイクルは、94 $^{\circ}$ C -2' - (94 $^{\circ}$ C -30", 各アニール温度にて-30", 72 $^{\circ}$ C -2') \times 30サイクル-72 $^{\circ}$ C -3'を基本とし、テンプレートとプライマーの組み合わせごとにアニール温度を変化させ、最適条件を探った。最終的に用いたプライマーの塩基配列とアニール温度をTable 1に示した。

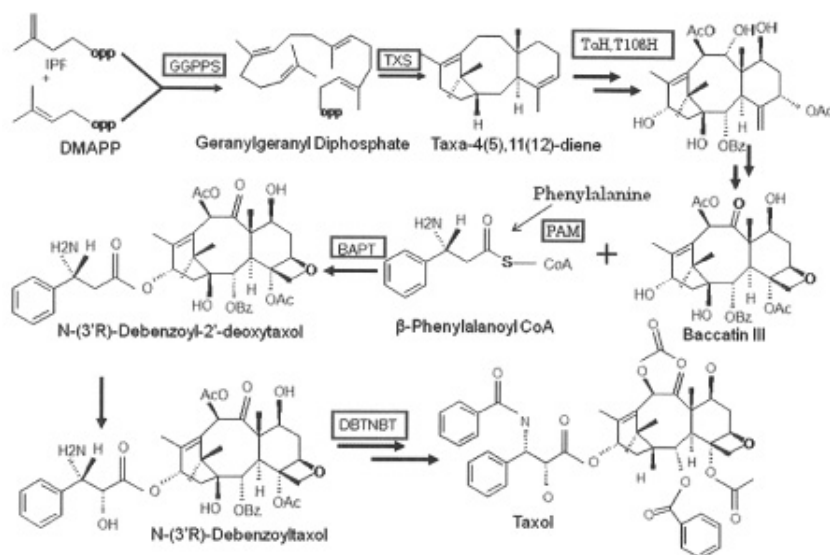


Fig. 1. Overview of the paclitaxel biosynthetic pathway and enzymes.

The abbreviations are:

GGPPS, geranylgeranyl diphosphate synthase;

TXS, taxadiene synthase;

T α H, taxadiene 13 α -hydroxylase;

T10 β H, taxane 10 β -hydroxylase;

PAM, phenylalanine aminomutase;

BAPT, 3-amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transferase;

DBTNBT, 3-N-debenzoyltaxol-N-benzoyl transferase.

Enzyme name	Primer sequence	Annealing temperature	
		<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Taxus cuspidata</i> var. <i>nana</i> <i>Torreya nucifera</i>
GGPPS f	agcaccacaatacacaggtc	56°C	56°C
GGPPS r	ccgaattctcgcaatctcat		
TXS f	agcactggcactagcaaggt	53°C	51.2°C
TXS r	attcgataccocatgataca		
BAPT f	atccgctctgtctgaatac	49°C	53°C
BAPT r	ggctccaataatctgfatoc		
DBTNBT f1	agtatatgtagtgaggcggg	53°C	51°C
DBTNBT r1	gatcatttaagaggctcttg		
DBTNBT f2	gcagatcctgcgactgfaat	52°C	49°C
DBTNBT r2	tgcaggcgtataaggctcttc		
T α H f	ggtaaaagacctgctctctccgtcg	46°C	55°C
T α H r	tctcctgtccgocagtgaaattcc		
T10 β H f	ttcattctgcagcacatgtaactocca	48°C	46°C
T10 β H r	ttagaggctttcttgatcggaggtgoc		
PAM f	ggcagacacaacaacgacgcoct	53°C	50.5°C
PAM r	agctacagtcgctctcgggaatttc		

Table 1. Sequences of primer and annealing temperature.
f: forward, r: reverse

4. PCR産物の確認と産物のTAクローニングと塩基配列の解析

抽出したイチイ、キャラボク、カヤのDNAをテンプレートにそれぞれの酵素のプライマーを用いてPCRを行い、それらのPCR産物はアガロースゲル電気泳動によりサイズの確認を行った。

次にその産物を、pGEM-T Easy Vector System I (Promega)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 *a* (Takara)を用い、アンピシリン (100 μ g/ml) 入りのLB培地上、37℃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対峙するT7プロモーターおよびSP6プロモーター塩基配列に対応する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。陽性クローンでは、ABIプリズム310DNA解析装置 (ABI)を用いて塩基配列の解析を行った。

5. ドットプロットハイブリダイゼーション

上述した方法では、うまく塩基配列を確認できなかったカヤでのTXSの存在可能性をより詳しく探るため、オリゴDNAをプローブとしたドットプロットハイブリダイゼーションを行った。

抽出した3種類のDNA溶液を核酸ブロッティング用メンブレンのHybond-N+ (GEヘルスケアバイオサイエンス)に固定し、市販の核酸直接標識・検出試薬キットであるAlkPhos Direct (GEヘルスケアバイオサイエンス)のプロトコールに従い、*Taxus brevifolia*の塩基配列をもとに作成したTXSのプローブ (52塩基)を用いてハイブリダイゼーションを行った。洗浄を繰り返し、ノイズが小さくなったと判断したところで、一晩露光して、写真撮影した。撮影にはインスタント化学発光検出器のミニカメラRP2069 (GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いた。

結果と考察

アニール温度を変化させて調べた1例として、イチイとキャラボクのPAMに関するPCR産物の電気泳動結果をFig. 2に示した。キャラボクは単一のバンドを示しており、イチイとの差は明白であった。このことから、学名は酷似しているものの、イチイとキャラボクは同一種ではないことが伺えた。

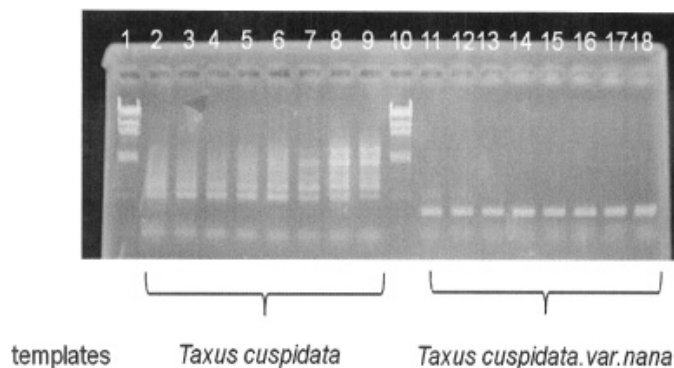


Fig. 2. Comparison of the PAM gene in *Taxus* plants by the electrophoretic analysis of PCR products. Numbers indicate: 1 and 10, marker; other, annealing temperature (2 and 11, 43.8℃; 3 and 12, 46℃; 4 and 13, 48.3℃; 5 and 14, 50.6℃; 6 and 15, 52.9℃; 7 and 16, 55.2℃; 8 and 17, 57.1℃; 9 and 18, 58℃).

本実験で初めて読まれた遺伝子塩基配列を Fig. 3 に示した。キャラボクに関しては、今回調べた7種類の酵素のPCR産物すべてで塩基配列を読むことができ、またそのすべてが既知の塩基配列と90%以上の高い相同性を示す結果となった。そのため、キャラボクはタキソイド生成関連酵素群の遺伝子塩基配列を有していることが示唆された。キャラボクではDBTNBTの塩基配列を

A

GGPPS
 1 AGCCACAAA TCACAAGGTC TTGGAGAGG ACACGTGCTG TCTTGCAGG GATGCCCTGC
 61 TTTTCAATTC ATTTGAGCAT ATTTGCTGTG CTACAAGCAA GACTGTGCC ATGTATAGGA
 121 CTTAAAGGGT GATATCTGAA TTGGTAAGA CAATAGGCTC TCAAGGGCTT GTAGGGTGAC
 181 AGGTGGTTGA TATTACATCC GAGGGGGATG CTAATGTGGA CTTGAAAMCC CTGGAATGGA
 241 TFCATATACA CAAGACTGCT GTGCTCTTGG AATGTTCACT TGTGAGTGA GGAATCTTGC
 301 GTGGTGTACT AGAGAGTAGG ATTTGGAGAA TTGG

TKS
 1 ATTOGATACC CCATGATCCA CCTGGAGCTG GTTGTGAAA ACCGAGTTGA GGGCCTGAGG
 61 AAACCGTGGC TTCTCAGATC CATCAGAGGA AATGGTGGCC ACCCTGGCCA CCCAGCAGT
 121 GTGGTATGCA GAAGCGACTGA TATCTCCGTC TCGAGCGCCA TTGAACATAT CTTTAAATTT
 181 CACAACACAG TCATCTGCCG GTTCTTGGTA AGTGAAGCTC TGGAGTTTAC AGAAATGTCA
 241 GCCTACAAAT ATGAAGACTT AAATCTACCC ATTAATAACC TTTAAACTGT TTTCTACTTT
 301 TCCCTACTCT ACGAAATGGT GTCTCCAGAG

BAPT
 1 ATCCGCTCTG TTCTGAATAC TTAGAGATGA AGAAGACAGG TTGGTAGCA GAGTCCATG
 61 TGAATATGAT TGAGCGAGTC ATGGTGGAGC CGTGCCTGGC TTGGCCAAA ACAATCTCC
 121 CTCTCTCCGC CATTGACAC ATGGCAGAGG CTTTTCTAA CGTATTTGTC GTCTACGCTG
 181 CMAACATGGA CAGACTCTCT GCAGATCTGT CAAGAATGAT TGGAGAGGCT CTCTCCAGG
 241 TGCTGGTTTA TTATTACCTT TTGCTGGCC GGCTCAGAAA TAAAGAAAT GGGGAAGCTG
 301 AAGTGGAGTG CACAGGGGAG GGTGTTCTGT TTCTGGAGGC CATGGCTGAC AGGCACCTTT
 361 CAGTCTTAAC AGATCTGAT AACTACAATC CATCGTTTCA CGAGTTGATT TTTTCTACT
 421 CACAGGATAC AGATATTGAG GACC

T10 βH
 1 TTACTCTTGC AGCACAATGA CTCCCATTCC TCTTCTCTAT TCACTCCCTC CTCTCTCAA
 61 CCCACTGCTG CCAAATGGAT AGCTTCAATTT TCTGTGAGAG CATAGGAACA AAATTTGGG
 121 AGCTGGAGTC TTCCCCCGCT ATTTCTTCCC TTACCGTCAAC ACCTATCTCT GCCATTATTC
 181 TTCTCTTGTCT CTTCGGTTAC AATCACCGAT CCTCTGTTA

TαH
 1 TCTCCTTGTG CGCCAGTGAA TTCCCCCTTT CGTCACTGAA AGTGAGCAA ACAGAGAGCA
 61 AATCTGATT CCCAGATGCA GTGCTGACAG CGAGCTCAAT TCTCCTCTTA TCTATCAAG
 121 AGTCTATGAT GTCAGCGAGG GTGGCCCTTG CTTGAATCGC TTTATGGTAA CTGATCCGG
 181 GAATGTTGAG TGGAAACAGAA AAAGATCCCA CAAGAATAAC TTCAACAGG TTATGAAAT
 241 GCTCCTGAGC GTGCTCTCA GTTATACCAA AAAACAAGCG GCTTGGGAGC GAGAAGACGA
 301 GGTCTTTTAC CAA

PAM
 1 TACAGTGCCT TCTGGGAAAT TTCTACTGCA AACATCACAC GAACCGGACA ATCTGAAATT
 61 CTACTGAAAT ATTCACGATG AAATCACGCA GATTTGTCC AAACACTTTG GAACACTAG
 121 ACGCCGTTGG GCGACCCATT TGGTTGGCGG AGAAACCCCT GCAGGCGAGT CAGCAGAGGC
 181 ACCGTAAATC TGCCGTGGCC AATTTGATCG AACACTTCT GCACGTCTC TTGGGGGCTC
 241 TGCTTCTTTC TGCCACTCAT CACACTGTG TGAGCTCTT CCGAACAATA TCTGTAATAAA
 301 GGAAGGAATT TGGAAACCTG GATTTCTCAG AGGGCGTGT TGTGTCTGCT C

DBTNBT 1
 1 TAGTATATGT GATGGACGTG GAGCTGGTCA ATTTCTACAT GATCTTGCAG AGATGGCGAG
 61 GGGAGAAGAT AAGCTTTTAT GTGAACCAAT ATGGAATAGA GATCTGCTGA AGCTGAAGA
 121 TCTTACACAT CTTCAATTTT ATCCTCTGTA TTGGTAAGC CCTTTAGTCA CAGCTGAGGA
 181 ATGGATTCAAT CCTCTCTTGG TTATAAACCT TGACACAATA ACAAGTATA AGCAGTCTAT
 241 TATGGAAGAA TATAAAGAAG TTGTCTACT ATTCGAAAT GTGGCAGCAT TAACCTGGC
 301 AGCAATACA AAGGTTCTTC AAATTCACCA TACTCAGAT GTGAAGCTTA TCTTGTGCT
 361 CGATGTGAGG AAATCAATTT ATCCGCCCTT CCACCTGATG TATGTAATG CTATTGGTTT
 421 TGCAATGCA ATGGATAATG

DBTNBT 2
 1 TTGAGGGGAT ATAAAGTCTT CAGGCTCAA CAATCTCTTA TTCCATATG GCTCCAATGA
 61 GGGCTTAACC TCTCCCTGG CCATCTCTGC GAAGACTTAA ACAATTTGGC CTGACCCAGC
 121 ACCATCACAT ATAGTATGG CCAAGCTTAA TCCCAACA AACCCTCCAC ATGTAATAATG
 181 AATTAACCTC ATAAATACA TACAACAACA ACAAGTATA TTTATACAAA CACACAGAAA
 241 ACCATATCAT ATCATAGTAG GGATACCTAA GAAAGTTACC TGAACAACA GAGGATGGAG
 301 GTCTGGAATA GGGGTATCGG GTGGAAGTGA GTAAGTAGC TTCCCAATCC TGGTTGGGT
 361 AATCAAAATC TCCCAACCGT GAAAGTTTC GTCCGCTGGC TTCTCAACA GAGCACCTTC
 421 CCGGTGCAAT CCATCTCCAG CTCCCAAT

B

GGPPS
 1 CGGAATTCCT CAATCTGATC CTCTGAGCA CCACAAGGA TCCCTCCACT CACAAGTAA
 61 CATTCCAAGA GCACAGTCT TGTGTACATG AATCCATTCA CAGAGTTTTT AGGTCAACAG
 121 CAGTATCCCC CTCACATGTA ATATCAACAA CTTGTCCTCC TACAAGCCCT TGAGAGCCTA
 181 TTGTCTTACC CAATTCAGAT ATCACCTCCA AAGTCTATC ACTAGGCACA ATTTGCTGTG
 241 TAGTCACTGC AATATGCTCA ATGCAAAATG AAGCAGAGC ATCCCTGCA AGAACAGCAG
 301 TGTCTCTCA AAGACTTGT GATTTGTGGG CT

BAPT
 1 GGTCTCAAT ATCTGTATCC TGTGGTAGAG AAAAATCAA CTGCTGAAC GATGGATTGT
 61 AGTATGAGG ATCTGTTAAG ACTGAAAGT CGCTGTGAGC CATGGCTTCC AGAACAGAA
 121 CACCTGCCC TGTGCACTCC ACTCAAGTT CCCCATTTC TTTATTTCTG AGCCGCCAG
 181 CAAAAGGGA ATAAATAACC AGCACCCTGG AGAGAGCTC TCGAATCACT CTTGCGAGAT
 241 CTGACAGAGC TCTGTCCATG TTGGCAGCGT AGACAACCAA TACGTTGAAA AAAGCTCTTG
 301 CCATGTTGTC AATGGCGGAG AGAGGGAGGA TTGTTTGGG CGAAGCGAGC CAGGCTCTCA
 361 CCATGACCCG CTCAATCATA TTCACATGGA ACTCTGCTAA CGAACCTGTC TTTTCACT
 421 CTAAGTATTC AGAACAGAGC GGAT

TαH
 1 TTGGTAAAG ACCTGCTTCT CTCGCTGCA AGCCGCTTGT TTTTGGTAT AACTGAGGAG
 61 CACTGCGAGG AGCAACTTCA TAACCTGTTG GAAGTATTC TTGTTGGAT TTTTCTGTT
 121 CCACTCAACA TTCCGGGATT CAGTACCAT AAAGGATAT AGGCAAGGGC CAECTCGCT
 181 GACATCATGA CCTCTTTGAT AGAAAAGAG AGAAATGAGC TGCTGTGAGG CACTGCACT
 241 GGGATCAAG ATTTGATCTC TGTTTGTCTC ACTTCACTG ACGAAAAGGG GAATCAACT
 301 GCGGACAGG AGA

Fig. 3. Partial sequences of seven paclitaxel biosynthetic pathway genes from *Taxus cuspidata* var. *nana* and *Torreya nucifera*.

A: *Taxus cuspidata* var. *nana*

B: *Torreya nucifera*

2種類読むことができ、それらをそれぞれ1,2と示した。そのうちDBTNBT 1については、*Taxus × media*のDBTNBTのmRNAの塩基配列とは全く相同性はなく、この440bpの配列全体で*Taxus cuspidata*のtaxadien-5- α -ol-O-acetyltransferaseと86%の相同性を示し、また、66bpのところから最後(440bp)までの部分で、*Taxus cuspidata*のtaxoid-O-acetyltransferaseと85%の高い相同性を示した。よって、この部分は、ベンジル基を置換する酵素ではなく、アセチル化に関わる酵素の活性部分をコードしていると考えられる。

カヤに関しては、PCR法を用いた場合、タキソイド生成のキーエンザイムと考えられるTXSの存在は確認できなかったが、今回の7つの酵素のうち、GGPPS, TaH, BAPTという3種類の酵素で塩基配列既知のものと高い相同性を示す結果となった。特にBAPTは、baccatin IIIの13位側鎖に β -Phenylalanoyl CoAを結合させる半合成の段階を触媒する酵素であることから、タキソール供給増加への応用が考えられるようになった。

カヤにおいてPCR法で確認できなかったTXSの存在可能性をより詳しく調べるため、ドットプロットハイブリダイゼーションを行い、その結果をFig. 4に示した。カヤでイチイと同程度のスポットが確認でき、TXSを有する可能性が示された。しかし、TXSの存在やタキソイド生成能に関して言及するためには、今後、サザンハイブリダイゼーションを行い、クローニングを進めていくなど、さらなる検討を要する。

要 旨

キャラボク、カヤにおけるタキソイド生成能の有無を、タキソイド生成関連酵素をコードする遺伝子配列をもつかどうかという観点からイチイと比較検討した。この3種類の植物の葉よりDNAを抽出後、塩基配列既知の*Taxus × media*, *Taxus brevifolia*から作成した7種類の酵素の

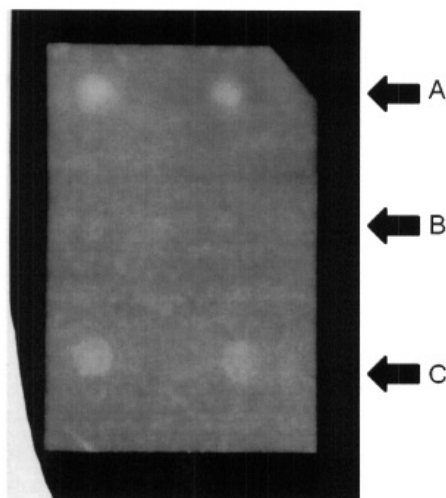


Fig. 4. Dot blot hybridization analysis of the TXS-positive *Taxaceae* plants.

A: *Taxus cuspidate*

B: *Taxus cuspidata* var. *nana*

C: *Torreya nucifera*

プライマーを用いて、PCRを行い、そのPCR産物の塩基配列を読んで相同性を調べた。また、タキソイド生成に関するキーエンザイムと考えられるTXSにおいては、ドットプロットハイブリダイゼーションも行った。その結果、キャラボクでは7種類の酵素すべてで配列が読め、高い相同性を示したので、他のイチイ属樹木と同様にタキソイド生成能を有していると推測された。カヤではGGPPS, T α H, BAPTの3種類の酵素遺伝子が確認でき、TXSに関してもドットプロットハイブリダイゼーションでスポットが確認された。

キーワード： イチイ科植物・タキソイド・PCRクローニング・DNA塩基配列解析・ドットプロットハイブリダイゼーション

引用文献

- 1) 坂井淳一・安東政義・内山武夫・藤沢一・北島睦己・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. 日本化学会誌 2 :231 - 238.
- 2) 海老塚豊(2004) 医薬品天然物化学. 南江堂, 202-203.
- 3) XU, Q., CHENG, J., GE, Z., YUAN, Y. (2005) Abnormal mitosis versus apoptosis of *Taxus cuspidata* induced by oleic acid in two-liquid-phase suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 37 :76 - 81.
- 4) WU, Z. L., YUAN, Y., MA, Z. H., HU, Z. D. (2000) Kinetics of two-liquid-phase *Taxus cuspidata* cell culture for production of taxol. *Biochemical Engineering Journal* 5: 137-142.
- 5) 安東政義・内山武夫・鈴木敏夫・平田直則(1999) 抗ガン剤タキソールの細胞培養による大量生産法の開発新潟大学地域共同研究センター年報 第4巻.
(<http://www.ccr.niigata-u.ac.jp/kyodokenkyu/annual/vol4/v403j.html>)
- 6) KETCHUM, R.E.B., CROTEAU, R.(1998) Recent progress toward an understanding of Taxol biosynthesis in plant cell cultures. In *Towards Natural Medicine Research in the 21th Century(Proceeding of the International Symposium on Natural Medicines)*. AGETA, H., AIMI, N., EBIZUKA, Y., FUJITA, T., HONDA, G.(eds), Elsevier Science, Amsterdam, 339-348.
- 7) LONG, R. M., CROTEAU, R. (2005) Preliminary assessment of the C-13-side chain 2-hydroxylase involved in taxol biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 410-417.
- 8) WALKER, K., FUJISAKI S., LONG, R., CROTEAU, R. (2002) Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 12715 - 12720.
- 9) JENNEWAIN, S., WILDUNG, M.R., CHAU, M.D., WALKER, K., CROTEAU, R. (2004) Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in taxol biosynthesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9149-9154.
- 10) MANJARI, M., MAJUMDER, A., JHA, S. (2006) Organogenesis and plant regeneration in *Taxus wallichiana*(Zucc.). *Plant Cell Rep.* 25: 11-18.

(2008年9月18日受付)

(2008年11月28日受理)

Summary

We researched the gene sequences of paclitaxel biosynthetic pathway enzymes in *Taxus cuspidata* var. *nana* and *Torreya nucifera* to discover whether they have the ability of taxoid production, using *Taxus cuspidata* as a comparison. Genomic DNA was extracted from the needles of the three species. Sequences of seven paclitaxel biosynthetic pathway genes were amplified from genomic DNA by PCR with primer pairs based on the sequences of *Taxus × media* and *Taxus brevifolia* and these were analyzed. We also examined the presence of TXS, thought to be a key enzyme for taxoid production, by dot blot hybridization. As a result, we were able to obtain the sequences of seven paclitaxel biosynthetic pathway genes from *Taxus cuspidata* var. *nana* and from this we assumed that *Taxus cuspidata* var. *nana* has the ability of taxoid production. The three sequences of GGPPS, T a H and BAPT were observed in *Torreya nucifera*. In addition, TXS hybridization spots were observed. These indicated that *Torreya nucifera* probably has the sequence of TXS.

Key words: taxaceae, taxoid, dot blot hybridization, PCR cloning, DNA sequencing