

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

石野 貴久

目次

第1章 序論	— 1
1-1 イチイ科樹木について	
1-2 タキソールについて	
1-3 最近のタキソール生産に関する研究内容	
1-4 本研究の目的および概略	
参考文献	
第2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	— 33
2-1 緒言	
2-2 実験	
2-2-1 キャラボクのタキソール関連酵素遺伝子の存在確認	
2-2-2 キャラボクのタキソール関連酵素遺伝子上流配列解析	
2-3 結果	
2-3-1 キャラボクのタキソール関連酵素遺伝子の存在確認	
2-3-2 キャラボクのタキソール関連酵素遺伝子上流配列解析	
2-4 考察	
参考文献	
第3章 タキソイド生成能を有する新規植物の探索	— 75
3-1 緒言	
3-2 実験	
3-2-1 カヤのタキソール生成関連酵素遺伝子の存在確認	
3-2-2 カヤの葉の成分分析	
3-3 結果	
3-3-1 カヤのタキソール生成関連酵素遺伝子の存在確認	
3-3-2 カヤの葉の成分分析	
3-4 考察	
参考文献	

第4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 — 111

4-1 緒言

4-2 実験

4-2-1 イチイ科樹木内生菌の単離と同定

4-2-2 内生菌のタキソール生成能の検討

4-2-3 イチイ内生菌 *Colletotrichum gloeosporioides* と
カヤ内生菌 *Cordyceps dipterigene* の成分分析

4-3 結果

4-3-1 イチイ科樹木内生菌の単離と同定

4-3-2 内生菌のタキソール生成能の検討

4-3-3 イチイ内生菌 *Colletotrichum gloeosporioides* と
カヤ内生菌 *Cordyceps dipterigene* の成分分析

4-4 考察

参考文献

第5章 総括

— 159

謝辞

業績リスト

略歴

第 1 章 序論

第1章 序論

1-1 イチイ科樹木について

イチイ科は球果植物門マツ綱マツ目に分類されている裸子植物の一つの科であり、マツ目の分子系統樹における位置づけは Fig.1 のようになる。(Cheristenusz ら 2011)。しかし、イチイ科の定義は未だ意見の分かれるところであり、広義にはイヌガヤ科であるウラジロマキ属とイヌガヤ属を含むが、狭義ではイチイ属とカヤ属のみが分類されている(米倉ら 2009)。

本研究においては、イチイ科は狭義の方であるイチイ属とカヤ属のみを意図する。

イチイ (*Taxus cuspidata*)

イチイ科イチイ属の樹木は約 11 種類が知られており(Strobel ら 1996)、そのうち日本に生育している種が *Taxus cuspidata* である。

イチイは、日本全国に分布する常緑針葉樹である。雌雄異株で高さは 20m 程度にまで成長するが、その成長は遅い。葉は二列に並んでいる(濱野 2005)。4 月ごろに小さな花をつけ 9 月~10 月の初秋に赤い実をつける。この赤い実は有毒とされており、その原因は主にタキソイドの一種であるタキシシン B であると考えられている (Wilson ら 2001)。

全世界で抗癌剤として幅広い癌の治療に利用されているタキソールを生産する唯一の植物種であり、薬用植物として最も注目を集めている樹種の一つであると言える。

キャラボク (*Taxus cuspidata* var. *nana*)

秋田県から鳥取県までの日本海側に分布する常緑の低木。イチイの変種とされ、高さは 1~2m。そのため園芸種として庭の垣根などにも利用される。枝葉が密生し葉の大きさもイチイよりも小さく、らせん状に互生する。

イチイと同様に 4 月ごろに小さな花をつけ 9 月~10 月の初秋に赤い実をつけるが、この赤い実はやはり有毒である。(濱野 2005)

カヤ (*Torreya nucifera*)

イチイ科カヤ属。本州の宮城県以南、四国九州にも分布する常緑高木で、大きいものは高さ 25m、径 2m ほどになる。ただし成長は非常に遅く、この大きさになるまでに 500 年近くかかる。雌雄異株であり、花期は 4~5 月である。

主な用途として、材が緻密で光沢があることやその香から、将棋盤や碁盤として利用され、最高級のものとして知られている。

また、その種子から取れる油は、てんぷら油として用いられ、含有成分のシアドン酸の効果によって中性脂肪とコレステロールを下げる効果があることが示されている(Endo ら 2007)。

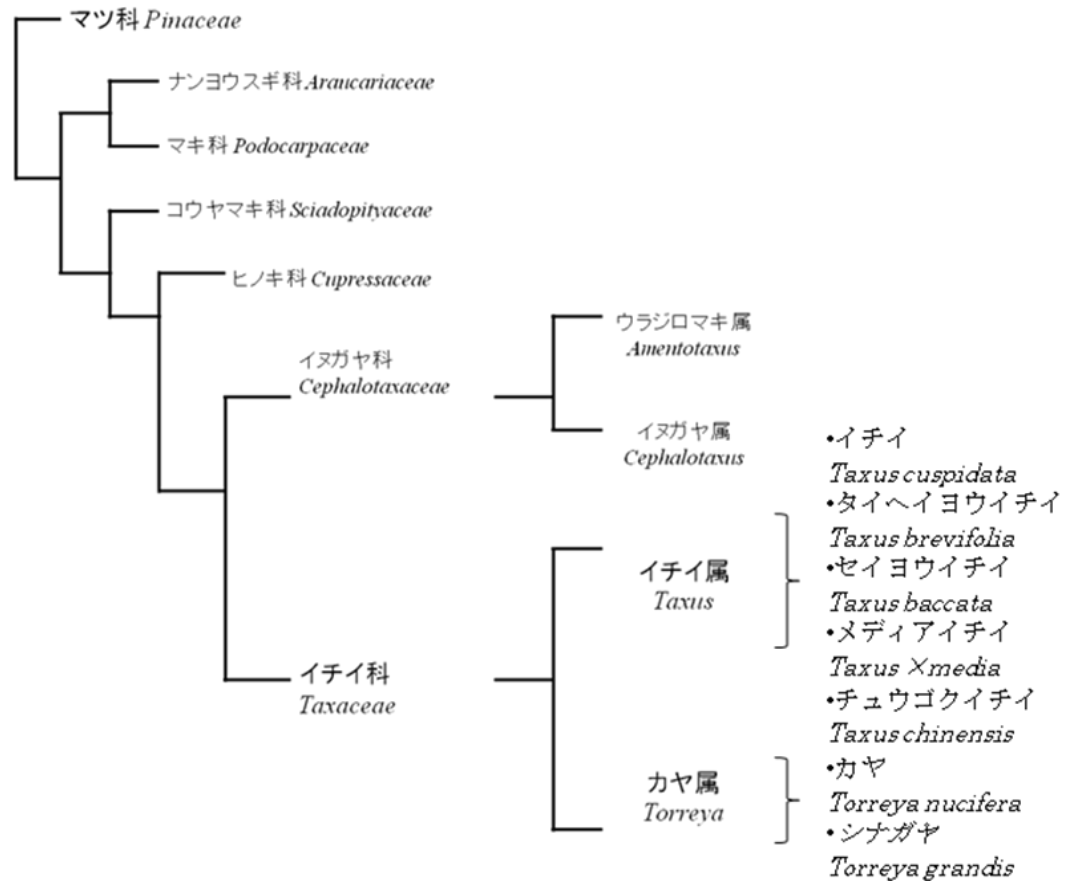


図 1 マツ目の分子系統樹
Fig. 1 Evolution tree of Pinales

1-2 タキソールについて

タキソールの発見と実用化

タキソールはイチイ属樹木特有のテルペノイドであり、強力な抗がん作用を有する物質として、世界中で癌治療に利用されている。タキソールの歴史は古く、1958年からアメリカの国立がんセンターNational Cancer Institute (NCI)によって行われた植物由来の天然物の抗がん活性を調べる大規模スクリーニングによって発見された。その際、約 1000 種の植物の抽出物の抗がん活性が調べられ、1964 年に *Taxus brevifolia*(太平洋イチイ)の樹皮からの粗抽出物に細胞毒性があることがわかり、抗癌剤としての使用の可能性が示された。1966 年には細胞毒性を有する純粋な化合物が単離されタキソールと命名された。1971 年には Wall,Wani らによって化学構造が決定された(Wani ら 1971)。

その後、NCI によってタキソールの臨床試験が推進されてきたが、実用化されるまでに約 20 年もの時間がかかった。その理由は 2 つある。

一つ目は、タキソールが様々な溶媒に対して難溶であり、製剤化が非常に困難であったことである。これは、ポリオキシエチレンヒマシ油と無水エタノールを溶媒とすることで解決された。二つ目は、合成が困難でイチイの木からの抽出しかタキソールを供給の方法がなく臨床試験を行うのに十分な量を確保するのが困難であったことである。これは、未だに問題となっているが、当時の NCI 主導の大量伐採によって原料を確保することで解決した。(小川ら 2007)

これらの努力によって臨床研究は進み、1992 年に米国食品医薬品局 Food and Drug Administration(FDA)より卵巣がんへの使用が認可された。1994 年には乳がんへの使用も認可された(Suffness and Wall 1995)。現在は、その他に非小細胞肺がん、胃がん、子宮体がんへの使用が認可されている。

また、日本においては、1997 年に卵巣がん、1999 年に非小細胞肺がん、と乳がん、2001 年に胃がん、2005 年に子宮体がんに対する使用の認可が下りている。現在もその適応範囲や投与方法などで拡大を見せている。

タキソールの作用機構

タキソールは微小管を形成するチューブリンに作用する物質である。これまで、ニチニチソウに含有されるビンクリスチンやビンブラスチン、コルヒカムに含まれるコルヒチンなどチューブリンに作用し、微小管の重合阻害を起こすことで有糸分裂を阻害する物質は知られてきた(Iwasaki 1993, 岩崎ら 1994, 岩崎ら 2000)。しかし、タキソールはこれまでのチューブリンに作用する抗がん剤とは異なり、微小管の脱重合阻害による細胞分裂の阻害という非常にユニークな作用機構を有していることが、1979 年に Schiff,Horwitz らによって解明された

(Schiff ら 1979, Horwitz 1992)。微小管は α -チューブリンと β -チューブリンのヘテロダイマーが結合することで形成されるプロトフィラメントが13本集まり筒状の構造を形成している。タキソールは、 β -チューブリンの217-233アミノ酸残基部分に結合し、その結合によって、 α -チューブリンと β -チューブリンの縦の結合強度が強くなるだけでなく、横のプロトフィラメント間の結合も強くなっていることがXiao らによって明らかにされている(Xiao ら 2006)。この、結合強度が強くなることで微小管が安定化し、脱重合が阻害されアポトーシスが誘導され細胞死が引き起こされると考えられている。タキソールの構造(Fig.2)の中で、チューブリンとの結合に関わっている部分は、13位側鎖、C4位のアセチル基、C2位のベンゾイル基、オキセタンD環、そしてタキサンのコア構造(Fig.2)の5つの部位と考えられている(Georg ら 1995, Kingston ら 1995, Jimenez-Batbero ら 2002, Wang ら 2003)。そのため、修飾を受けていないタキサジエンもわずかながら抗がん作用を有している。

また、タキソール処理培養細胞を用いて染色体の動態研究の結果、経時的にG2+M期細胞の増加とG1期細胞の減少が認められ、タキソールは細胞周期をG2+M期でブロックすることが考えられている(Wilson ら 1985, Kumar 1981, Parness ら 1981)。

癌細胞は通常の細胞に比べて、細胞分裂速度が速いため、顕著に細胞死が誘導され、抗癌作用を示すこととなっている。

タキソイド系薬剤の市場価値

がん関連薬は医薬品市場全体の成長率7%を上回る18%で拡大しており、医薬品市場の中でも最も成長率が高い存在になっている。米国の医療品市場調査会社のIMS社では、2003年に300億ドル(3兆5000億円)だった世界市場が2012年には、800億ドル(8兆円)に達すると予想されている(McCoy 2004)。

そんな中、現在癌治療の現場で実際に使用されているタキソイド系薬剤は次の3種類である。

①タキソール(パクリタキセル)

タキソール(Fig.2)は非常に適用範囲の広い抗癌剤で、卵巣がん、非小細胞肺癌、乳がん、胃がんの効果を示し、認可されている(Rose 1992, Kubota ら 1997, Yamori ら 1997)。そのため、それぞれの癌に効果を示す抗癌剤との併用治療に多く使用されており、特にシスプラチン、カルボプラチンとの併用治療では卵巣がんに対して60%以上の高い奏効率を示し、TC(Taxol and Cisplatin)治療として多くの医療現場で使用されている(Jekunen ら 1994, Goldspiel 1997, Brown 2003)。そのため全世界での販売総額は年間約12億ドルにも上る。

しかし、その副作用は強い。その原因は、タキソールが水に全く溶けな

め、溶媒にポリオキシエチレンヒマシ油が用いられており、それが原因でアナフィラキシーショックがおこるためである。また、これらの過敏症状を予防するために、抗ヒスタミン剤やステロイドの前投与が必要となってしまうことや、投薬が3週間に一回で、その一回に3時間もの時間がかかるなど、問題点も少なくない(渡辺 2004)。

②タキソテール(ドセタキセル)

タキソテール(Fig.3)の作用機構は、タキソールと同じ微小管脱重合阻害である。しかし、抗癌スペクトルに微妙に違いがあり、タキソールの適用癌に加えて胃がん、食道がん、頭頸部がんにも効果を示し認可されている(佐々木 2004)。

また、タキソールとは溶媒が異なりエタノールを用いるため、アナフィラキシーショックをあまり引き起こさない。加えて、タキソールで引き起こされる手足に出現する神経症状が軽微であると考えられている。また、投薬も1時間で済み、タキソールに比べて少し安価に治療ができるというメリットがあり、全世界での販売総額は年間約30億ドルにも上っている。

③アブラキサン

アブラキサンは、人血清アルブミンにタキソールを結合させ平均130nmにナノ粒子化した新剤型・新用量のタキソール製剤で、アメリカでは2005年に認可され、日本では2010年に乳がんに対する使用が認可された。2010年までに世界39カ国で承認・利用されている(Rizvi ら 2006, Desai ら 2006)。

タキソールは水に極めて難溶であるため、本剤では人血清アルブミンにタキソールを結合させることにより、従来のタキソール製剤で使用されている添加物ポリオキシエチレンヒマシ油及びアルコールを用いることなく、生理食塩液に懸濁することが可能となった。

その結果、ステロイドや抗ヒスタミン剤の前投薬は必須ではなくなり、添加物に関連する過敏症等の問題点が改善され、点滴時間が3時間から30分に短縮されるなどの利便性が得られるとともに、さらに有効性も確認された。

現在は乳がんに対してのみ承認されているが、今後の適用の広がりが期待される。現在は全世界で約3億ドルの販売額となっている。

現在は、アブラキサンその他、タキソールをミセル化して包むことで、患部に薬を届けるドラッグデリバリーシステムの開発が進められている。

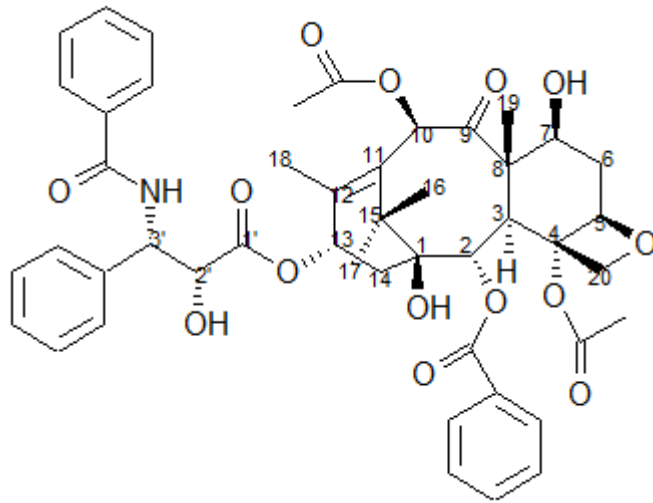


図 2 タキソールの構造式
Fig. 2 Structure of Taxol

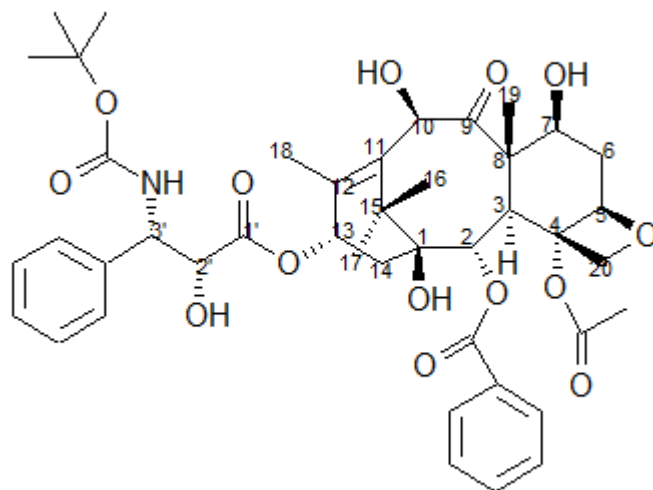


図 3 タキソテールの構造式
Fig. 3 Structure of Taxotere

タキソールの供給方法

タキソールは、現在、以下の4つの方法で供給がなされている。

i) 太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮からの抽出

タキソールが発見された当時はもちろん、未だ有効な供給方法の一つである(Kikuchi and Yatagai 2003)。イチイ属樹木間で多少の含有量の差はあるものの、樹皮において乾燥重量当たり 0.01%~0.04%程度タキソールが含まれており、これは樹齢 100 年の樹木の場合、約 0.3g に相当する。部位別の含有量も調べられており、最も多い部位は樹皮、次いで根となっていて、樹幹部分はほとんど含まれていない(Vidensek ら 1990, Glowniak ら 1996, Sottani ら 2000)。そのため、タキソールを抽出するためには樹皮をはぐ必要があり、木の再生は難しく、イチイの成長の遅さも相まって、イチイ樹木保全の面からも持続可能性の低い手法となってしまっている。

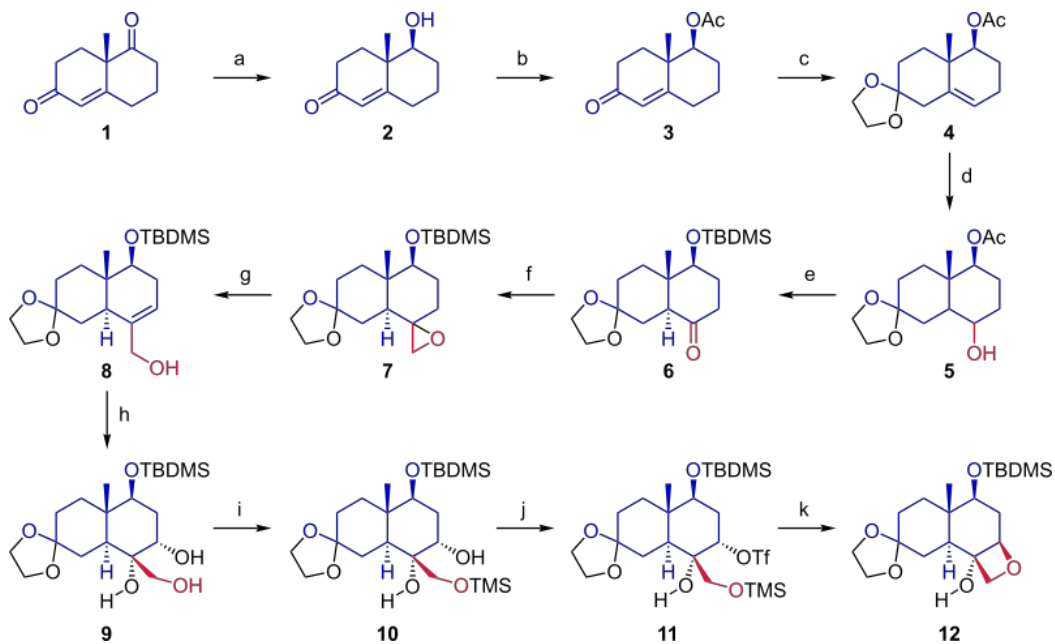
ii) 化学的全合成

タキソールの有機化学的な全合成の方法は 1994 年に Robert A. Holton らによって解明された(Holton ら 1994)。Holton らは 1982 年より研究を開始しており、実に 12 年もの歳月をかけて完成させたことになる。しかし、全合成には 50 ステップ以上の工程を要し、コストがかかりすぎるため商業的な生産性をクリアできていなかった。そのため、現在でも、効率的なタキソールの有機合成は主要な研究課題の一つとなっている。2006 年までに Kyriacos C. Nicolaou ら(Nicolaou ら 1994)、Samuel Danishefsky ら(Danishefsky ら 1996)、Paul A. Wender ら(Wender ら 1997a, b)、向山光昭ら(向山ら 1998)、桑嶋功ら(桑嶋ら 1998, 2000)、高橋孝志ら(高橋ら 2006)といった7つのグループが異なる方法で全合成の方法を解明している。しかし、タキソールの複雑な基本骨格に加え、水酸基等の置換基の多さによる立体性が合成のネックとなり、未だに商業的な生産性をクリアできていない。

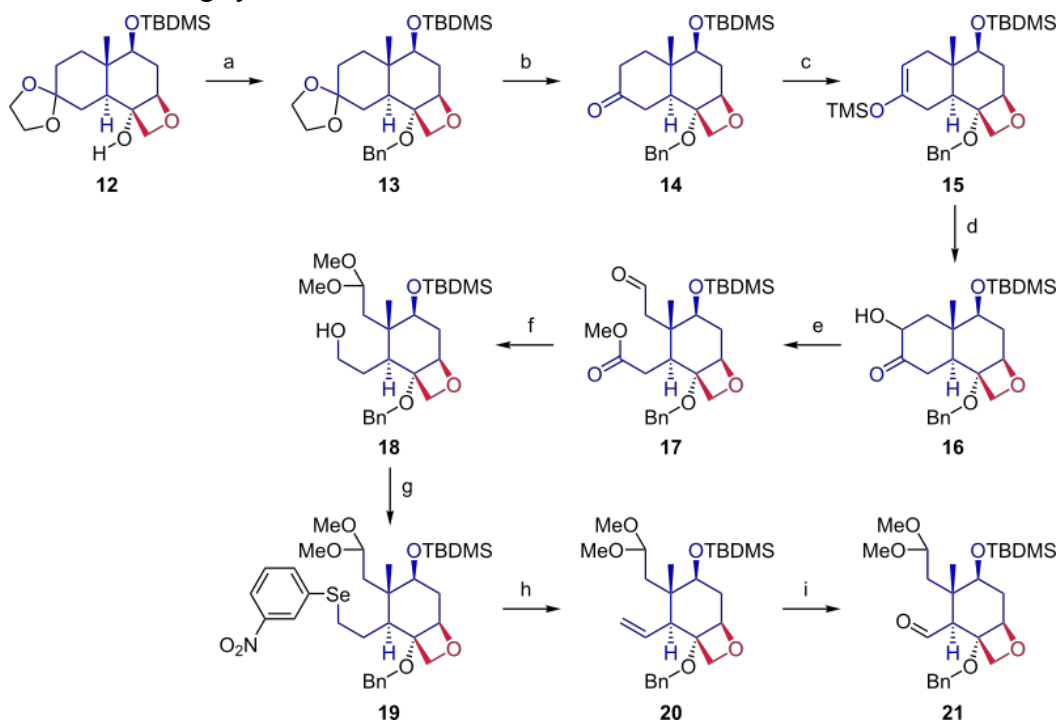
以下にダニシェフスキーのタキソール全合成の模式図を示す。(Fig. 4)

その全工程は 53 ステップにもなる。

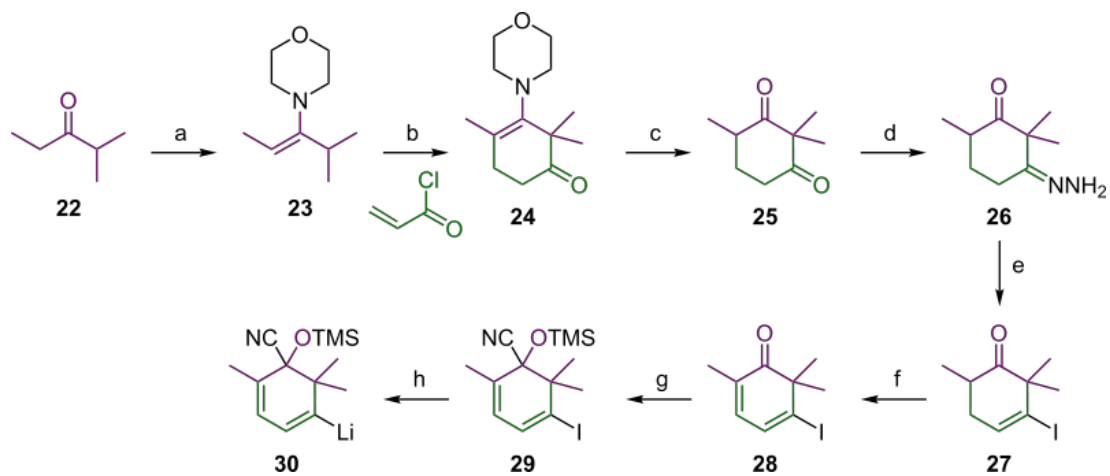
D 環の合成 D ring synthesis



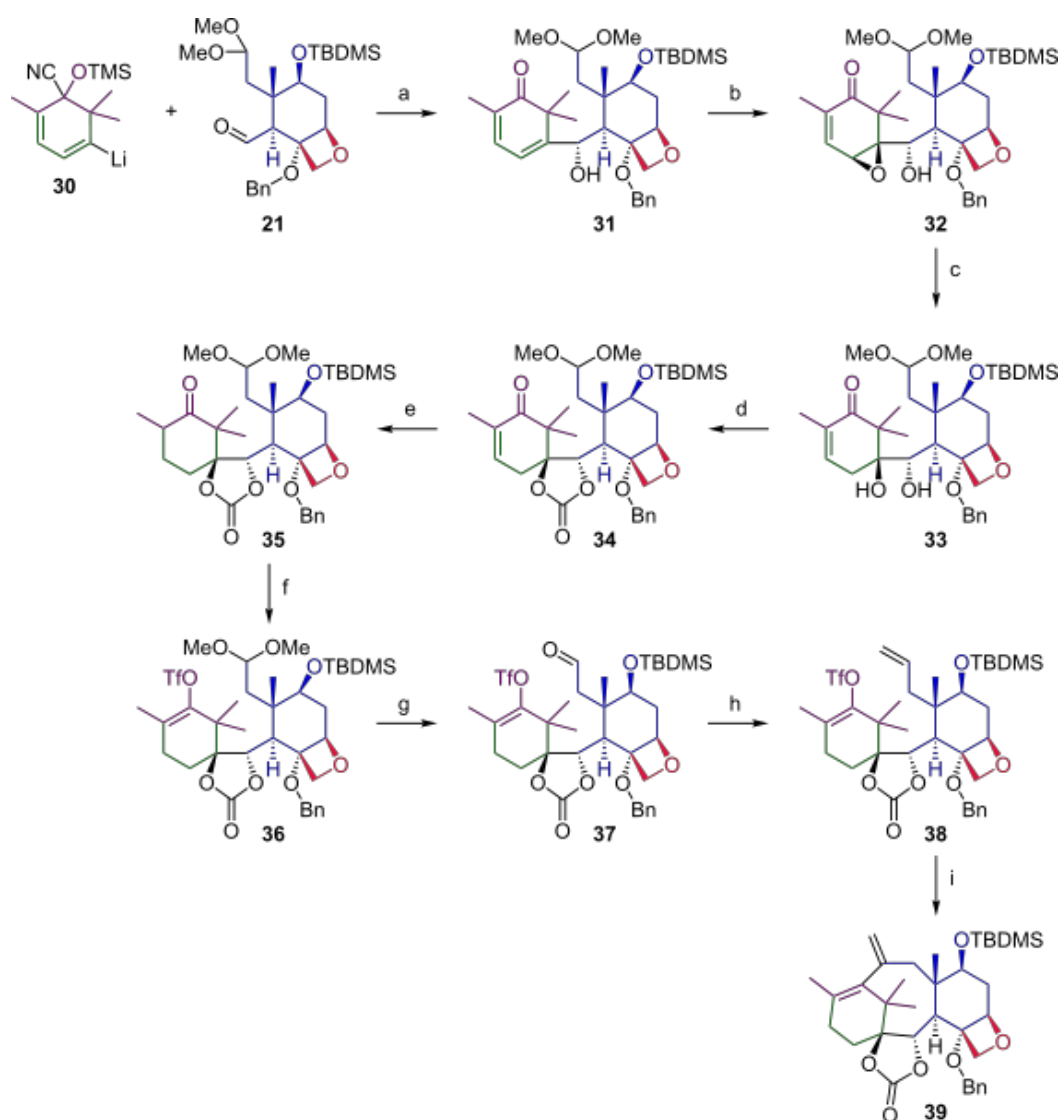
C 環の合成 C ring synthesis

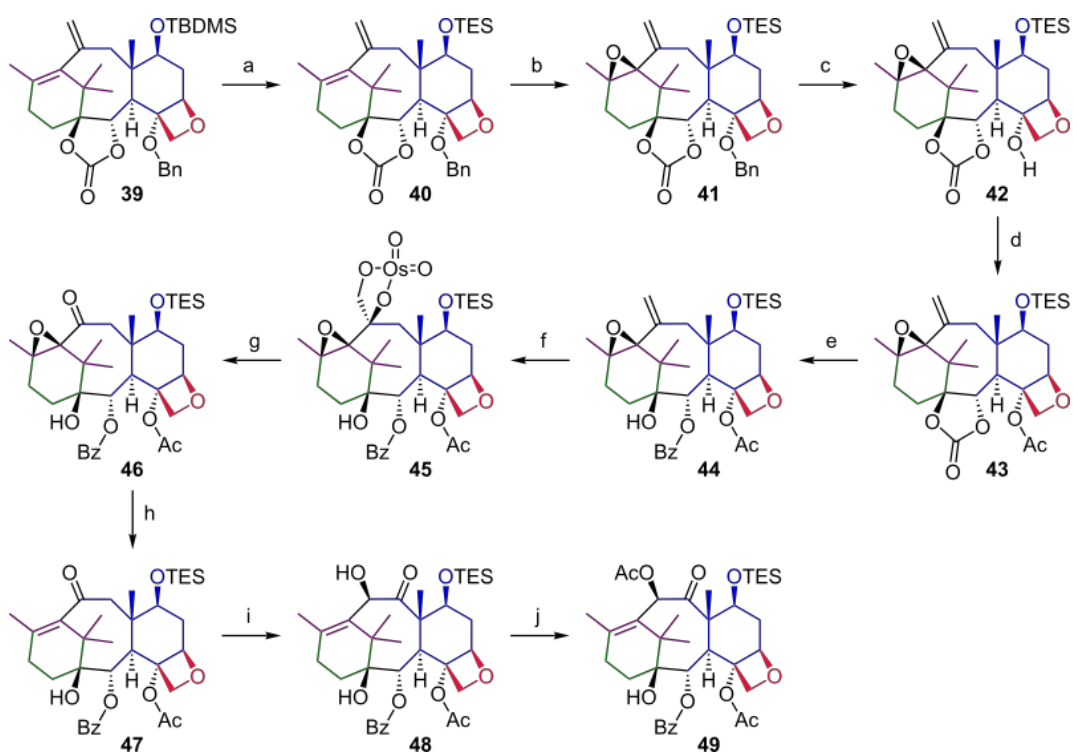


A 環の合成 A ring synthesis



B 環の合成 B ring synthesis





尾部(13位側鎖)の付加 Tail(C13 side chain) addition

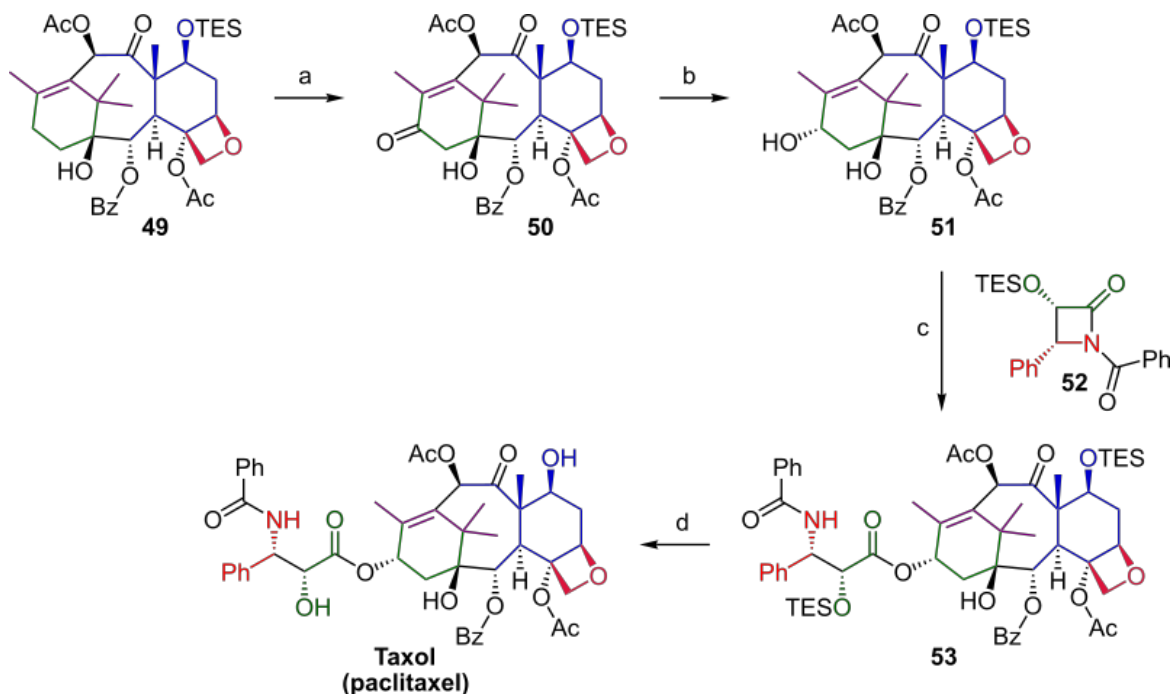


図4 ダニシェフスキーのタキソール全合成法

Fig. 4 Total synthesis of Taxol by Danishefsky (Danishefsky ら 1996)

iii) 前駆物質 Baccatin III からの半合成

タキソールに比べ、比較的葉に多量(乾燥重量の 0.1%程度)に含まれている前駆物質 Baccatin III (Fig. 5)からの半合成は、少し前まではもっとも主要な供給方法であった。その内容としては、前駆物質の Baccatin III の 13 位に側鎖を結合させ、その後の修飾を有機化学的手法で行うもので、Baccatin III の複雑な合成を省けるため全合成比ベコストがかからないメリットがある。その反応は、上記の全合成の過程の最後で尾部の付加反応となる(Ojima ら 1992, Holton ら 1995, Patel ら 1998)。また、タキソールと違い、Baccatin III は針葉から抽出できるため、樹木の再生が可能であり、持続可能性の高い手法である。しかし、抽出後のバイオマスの廃棄問題や、強い毒性を示す溶媒を含む有機溶剤の使用という問題が未だ残っている。(小川ら 2007)

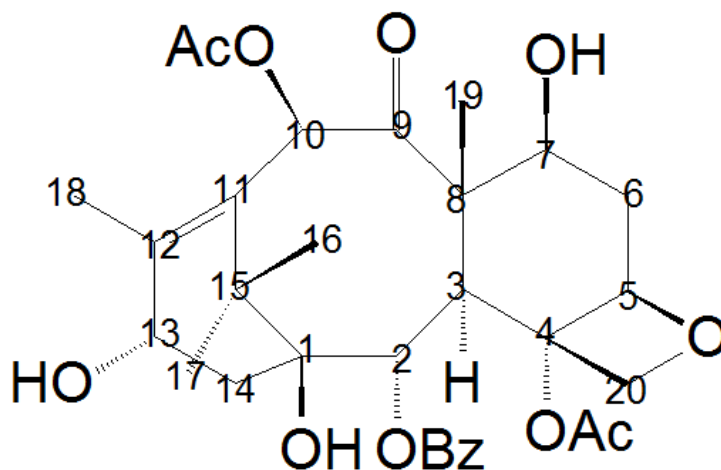


図 5 バッカチン III の構造式
Fig. 5 Structure of Baccatin III

iv) 細胞培養法 (Plant cell fermentation(PCF)法)

現在最も主要な供給方法になっている。1990年代からの研究をもとにして、タキソールの販売権を有しているブリストルマイヤー社が2003年に開発、実用化した手法で、*Taxus chinensis*の細胞をタンクで培養し、抽出、クロマト精製、晶析によりタキソール原薬を得る方法である(Craggら1991, Ketchumら1999, Nguyenら2001)。PCF法によりイチイの木を傷めることなく1年を通して安定的に原料を入手することができ、バイオマス廃棄の問題もゼロにすることができた。また、化学反応の必要性をゼロにしたことから、中間生成物6つを取り除くことに成功し、これによって10種の有機溶剤と6つの乾燥過程を省くことができ、当初5年で32トンの有害化学薬品の使用を削減することに成功した。タキソールのPCF法の技術は2004年の米国グリーンケミストリー大統領賞の代替合成反応賞(Alternative Synthetic pathways Award)を受賞した。(U.S.Environmental Protection Agency 2004)

日本でも2003年7月にこの方法でのタキソール生産が承認されており、さらなる生産性や抽出条件に関する特許が数多く出されている(小川ら2007)。

1-3 最近のタキソール生産に関する研究内容

細胞培養法によるタキソール生産の改善研究

イチイ属樹木の細胞培養法による供給は現在の主なタキソール供給方法であり、そのため多くの研究がなされていて、現在でも数多くの特許が出されている。この細胞培養法の問題点は①まだまだ供給量が少ない、②抽出の際に有機溶媒を大量に消費する、③抽出後の廃細胞が大量に出るといった3つが考えられる。これまで、特に①の問題を解決するための研究が数多くなされてきていて、メチルジャスモン酸を加えることで毎日 2.71mg/l の生産性があるという報告もある(Bentebibel ら 2005)。また、エリシターとして様々な濃度のメチルジャスモン酸やサリチル酸を加えて実験を行った結果、メチルジャスモン酸を 10mg/l とサリチル酸を 100mg/l 加えた場合に、生産性が 16 倍になり、39.5mg/l となることが報告されている(Khosroushahi ら 2006)。

生産増加の次の手として近年注目されているのが内生菌との共培養である。これはイチイの細胞培養のリアクターと菌体培養のリアクターをメンブレンで仕切り、低分子化合物は行き来できるような環境で培養するというものである(Li ら 2009)。その結果、リアクター全体の濃度として 25mg/l のタキソール濃度となり、イチイカサの量が半分で済んでいることを考えると、従来のメチルジャスモン酸やサリチル酸の組み合わせよりも高い生産性を示した。

次に②および③の問題点を解決する方法の一つとして注目されているのが二層培養法である。細胞培養の上にオレイン酸などの有機溶媒層を作りそのまま培養を続けると、培養中に生産したタキソールがオレイン酸層に溶出し、オレイン酸層のみを回収することで、培養細胞は繰り返し使用できるというものである(Xu ら 2005)。

しかし、タキソールは樹皮にもっとも多いことから推測できるように、細胞死によって誘導されると考えられており、オレイン酸でもわずかながら細胞のアポトーシスを誘導するが再利用できるような細胞の状態では生産性は低い物となっている。

よって、①、②および③の3つの課題を同時にクリアするのは現時点では機構上の矛盾を抱えており非常に困難である。

タキソールの生合成関連酵素遺伝子のクローニング

複雑な化合物を有機合成する場合、その立体制御や活性化の困難さ、意図しない部分の反応などクリアすべき課題が多く工程が多くなり、実用的でなくなってしまう。その点、生合成においては酵素の立体選択性、位置特異性といった基質特異性が高く、非常に扱いやすい。そのため、非常に構造の複雑な化合物であるタキソールの生産に生合成酵素を利用するため、生合成経路解明に向けて多くの研究がなされてきた。また、近年の代謝工学の発達により、複雑な化合物の生産制御として、RNAi等の技術を用いて、類縁体の合成に関わる酵素の発現を抑制することで、目的物質の生産を向上させるということも可能となってきたので、目的物質の生合成には直接関わらない類縁体生産酵素遺伝子情報を取得する研究も行われてきている(Allenら2004,Fujiiら2007,佐藤2011)。

これまでの研究からタキソールの生合成に19の酵素が関わっていると考えられている。Fig. 6およびFig. 7に、そのタキソールの生合成経路を示す。

まず最初に、Taxadiene synthase という酵素によってゲラニルゲラニル二リン酸の環化がおこり、タキソイドの基本骨格であるタキサジエンに変換する(Fig. 7)。

続いて、この基本骨格を8つのP450による水酸化とエポキシ化、3つのacyl/aroyl transferase によるアシル化(アセチル化とベンゾイル化)がおこる。その後、D環の形成と9位の水酸基の酸化が起こり、ここまで14の酵素が関わってBaccatin IIIが形成される。その他13位に結合する側鎖の形成に5つの酵素が必要となり、全体として19の酵素が必要となる。水酸化の順番は、タキソイド類縁体の頻度から、C5位→C10位→C13位→C9位→C7位→C2→C4C20のエポキシ化→C1だと推定されている(Floss and Mocek 1995)。どの段階でアセチル化が起こるかは未だ解明されていない。

これまでに主にR.Croteau、K.Walkerのグループによって、ゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素を含む11の酵素がクローニングされている(Table 1)。その他、タキソイドの多様性を生み出すいくつかのP450とacyl/aroyl transferaseが発見されてきたが、未だ生合成経路解明には至っていない。

現在、Koksal,Croteauらによって新たな生合成経路酵素の解明と各酵素の三次元構造の解明が行われている(Koksal,Croteauら2011)。

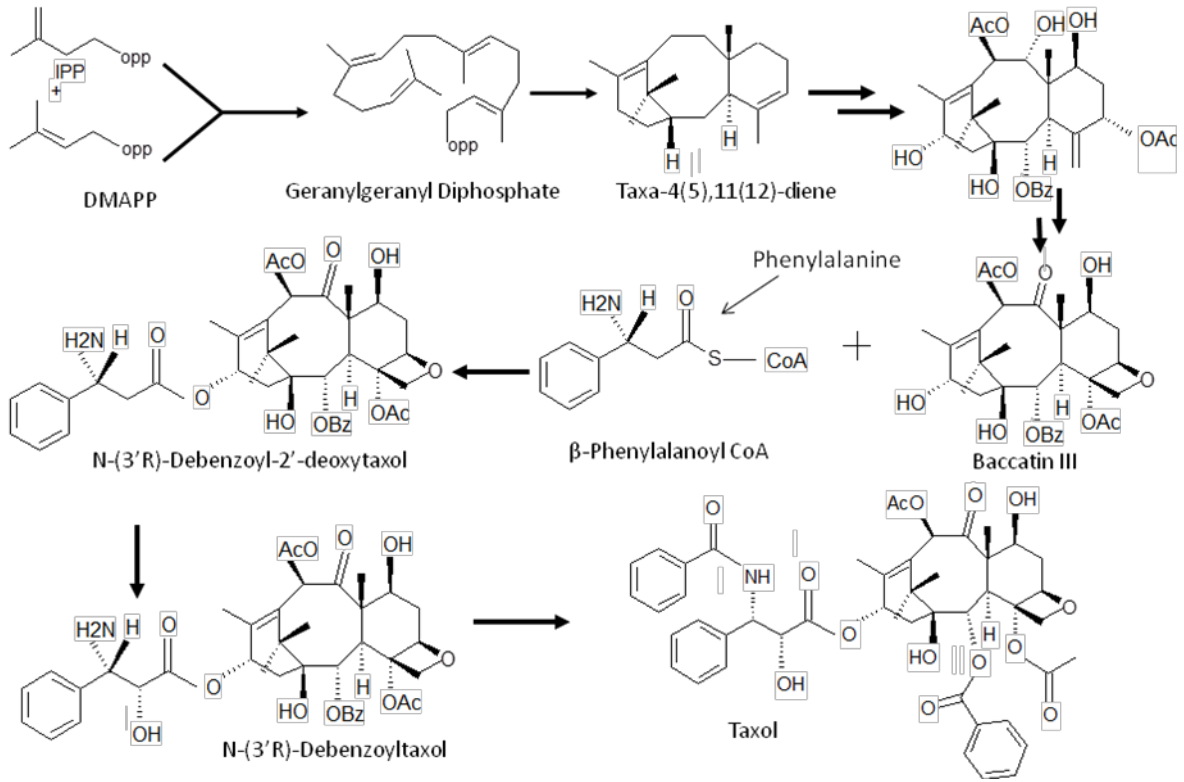
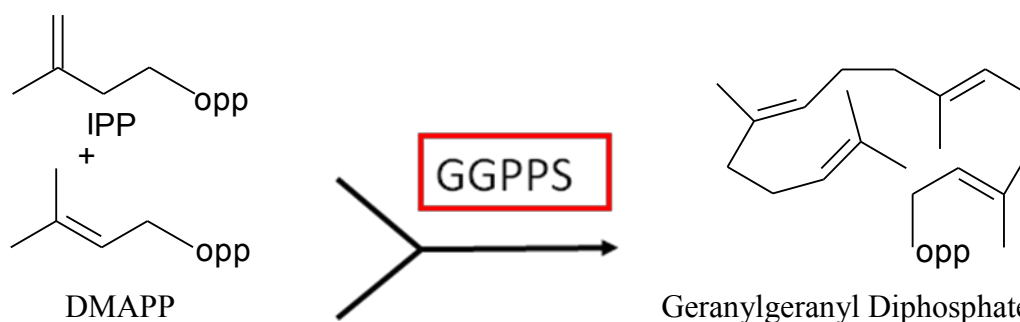


図6 タキソール生合成経路
 Fig. 6 Overview of Taxol biosynthetic pathway

表1 これまでクローニングされてきたタキソール生成関連酵素

Table 1 Cloned genes involved in Taxol biosynthesis pathway in *Taxus*

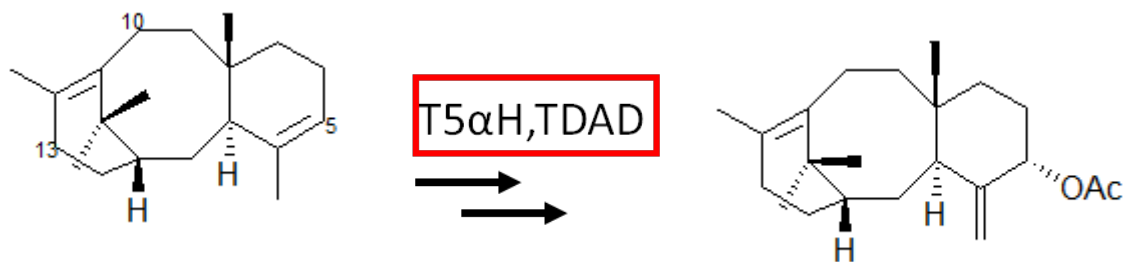
略称 Abbreviation	酵素名称 Enzyme names	参考文献 Reference
TXS	taxadiene synthase	Wildung ら 1996
T5 α H	taxadiene5 α hydroxylase	Jennwein ら 2004
TDAT	taxadiene 5 α -ol O-acetyltransferase	Waiker ら 2000c
T10 β H	taxan 10 β -hydroxylase	Schoendorf ら 2001
T α H	taxadiene 13 α -hydroxylase	Jennwein ら 2001
DBBT	taxan 2 α -O-benzoyltransferase	Walker ら 2000b
DBAT	10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyltransferase	Walker ら 2000a
PAM	phenylalanine aminomutase	Walker ら 2004
BAPT	Baccatin III:3-amino,3phenylpropanoyltransferase	Walker ら 2002a
DBTNBT	3'-N-debenzoyl-2-deoxytaxol-N-benzoyltransferase	Walker ら 2000b



GGPPS : イソペンテニルピロリン酸(IPP)とジメチルアリルニリン酸(DMAPP)からゲラニルゲラニルニリン酸(GGPP)を合成する。(Hefner ら 1998)
Synthesis of GGPP from IPP and DMAPP



Geranylgeranyl Diphosphate
Taxa-4(5),11(12)-diene
TXS : ゲラニルゲラニルニリン酸(GGPP)を環化してタキソイドのコア構造を形成するタキサジエンを合成する(Wildung ら 1996)。
Synthesis of taxadiene from GGPP

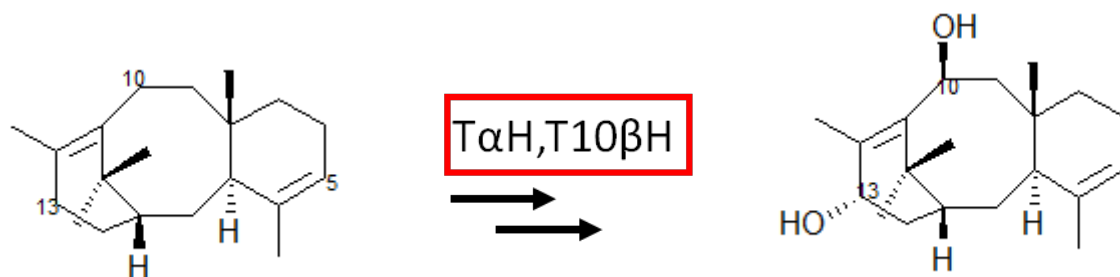


T5 α H: タキサジエンの5位を水酸化する(Jennwein ら 2004)。

Conversion of taxadiene to taxadiene 5 α -ol

TDAD : 5 位の水酸基のアセチル化を行う(Waiker ら 2000c)。

Conversion of taxadiene 5 α -ol to taxadiene 5 α -yl acetate

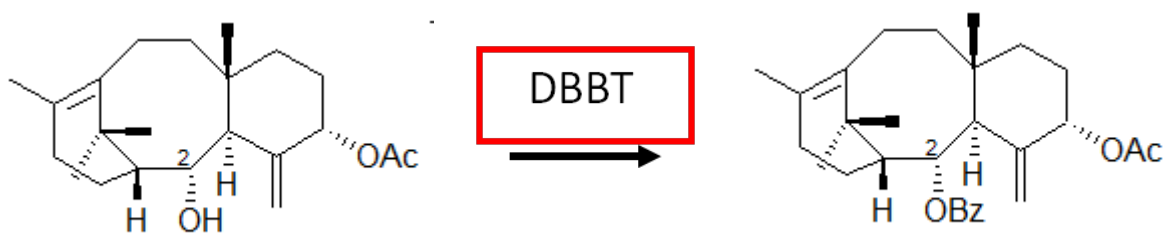


T10 β H : タキサジエンの10位の水酸化を行う(Schoendorf ら 2001)。

Hydroxylation at C10 of taxoids

T α H : タキサジエンの13位の水酸化を行う(Jennwein ら 2001)。

Hydroxylation at C13 of taxoids



DBBT : 2 位の水酸基のベンゾイル化を行う(Walker and Croteau2000b)。

Benzoylation at C2 α position



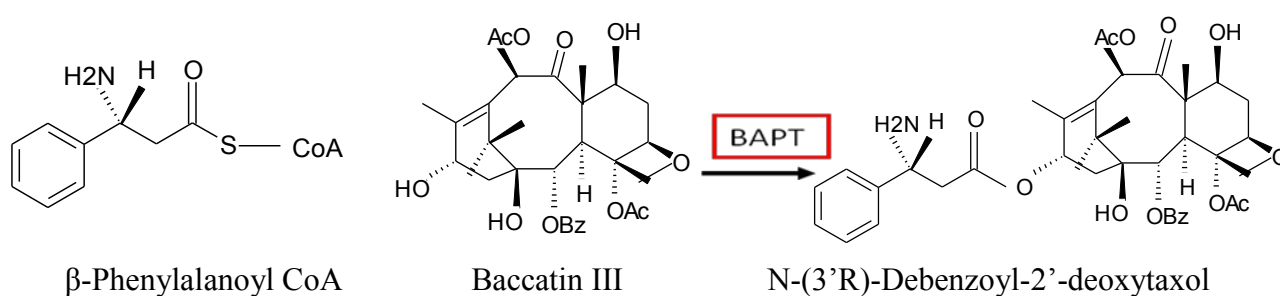
DBAT : 10 位の水酸基のアセチル化を行う (Walker and Croteau2000a)。

Acetylation at C10 β position



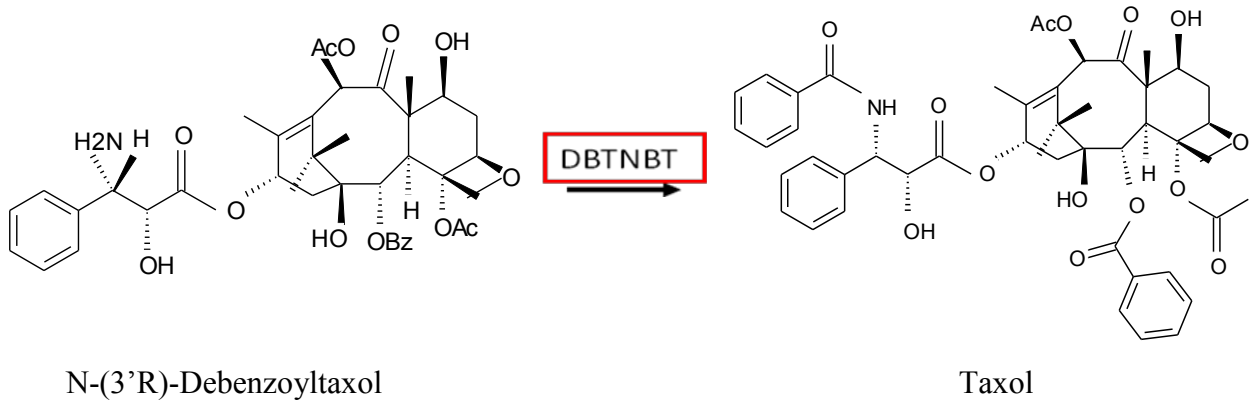
PAM : 13 位の側鎖となるフェニルアラニンのアミノ基の位置を 2' から 3' に移す (Walker ら 2004)。

Conversion of α -Phenylalanine to β -Phenylalanine



BAPT : BaccatinIII の 13 位の水酸基と側鎖を結合させる半合成の段階を触媒する (Walker ら 2002a)

Ligation of β -Phenylalanoyl CoA to BaccatinIII



DBTNBT : BaccatinⅢに結合した側鎖の3'位のアミノ基にベンゾイル基を付加する反応を行う(Walkerら 2000b)。
 Benzoylation at C2' of side-chain

図7 タキソール生成酵素の機能
 Fig. 7 Function of enzymes related to Taxol biosynthesis

タキソイド関連酵素遺伝子の異種発現

生合成経路の解明、関連酵素のクローニングが進み、酵母や大腸菌を用いた酵素の異種発現によるタキソイドの生産研究が盛んとなってきた。どの研究成果においても、GGPPS および TXS の発現生産についてはすでに成功している (Huang ら 2001)。しかし、いくつかの水酸化酵素を共発現させた場合、タンパク自体の発現はしているものの水酸化された生産物の量は非常に少なくなってしまう。その原因としては、P450 が膜タンパクであり、NADPH を必要とすることから、大腸菌や酵母での発現では活性が低くなってしまうと考えられている (Jennewein ら 2006)。

タキソール生産性内生菌の発見

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、その正体は主に担子菌、子囊菌、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、土壤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古く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、特にタイ、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ている。現在も、ペニシリンやセファロスポリン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 (Tan ら 2001, Strobel ら 2004, 五十嵐 2005, Greve ら 2010)。

タキソールもその例外ではなく、タキソールを生産する菌に関しては、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。その後も多くの研究がすすめられ、いくつかのタキソール生産性内生菌が報告されている。しかし、その生産量は非常に少なく、実用化には至っていない (Stierle ら 1993, Strobel ら 1993, Stierle ら 1995)。

1-4 本研究の目的と概略

本研究は大きく 3 つの章からなるが、その全てで共通の課題はタキソールの供給不足解消である。その大きな目的としては、タキソール生産が知られるイチイ属樹木の遺伝子情報の整備とタキソール供給新規ソースの探索である。

まず 2 章では、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* var. *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。イチイ属樹木間においても、タキソールや前駆物質 **Baccatin III** の生産量は異なり、それどころかタキソイド類縁体の種類も異なる。そのため、イチイ属樹木のタキソール生合成酵素遺伝子の全長をクローニングしておくことは、これらの違いを生み出す原因を解明する手掛かりとなると考えられる。また、これらの遺伝子上流配列を知ることは、これらの遺伝子発現調節因子を知ることであり、栽培法や細胞培養法でのよりよい環境づくりの手助けになると考えられる。

次に 3 章では、現状イチイ属樹木のみ依存しているタキソール生産の基盤を拡大することを目的とし、タキソール生成能を持つ新規植物を探索した。これまでイチイ属樹木以外でタキソイドを生産する樹木は報告されていない。本研究においては日本特有の樹木で、イチイ属以外では唯一イチイ科に分類されているカヤ属のカヤ (*Torreya nucifera*) に注目して、そのタキソイド生成能を調べた。

最後に 4 章では、イチイ科樹木のイチイ (*Taxus cuspidata*) とカヤの内生菌をタキソール生産の新規ソースとして着目した。元来、植物に内生する糸状菌や放線菌は天然物の宝庫として、創薬のためのリード化合物探索やその生産に利用されてきた。タキソールに関しても、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以来、いくつかのタキソール生産性内生菌が報告されている。そこで本実験では、タキソール生産への内生菌の利用可能性を広げるために、イチイとカヤから内生菌を単離し、新規タキソイド生成内生菌を発見することおよびそれらのタキソール生成関連酵素遺伝子の情報をまとめることを目標として実験を行った。

参考文献

- Allen R.S., Millgate A.G., Chitty J.A., Thisleton J., Miller J.A., Fist A.J., Gerlach W.L. and Larkin P.J. (2004) RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nat. Biotechnol.* 22: 1559-1566.
- Bentebibel S., Moyano T., palazon J., Cusido R.M., Bonfil M., Eibl R., Pinol T. (2005) Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnol. Bioeng.* 89:647-655
- Brown D.T. (2003) Preclinical and clinical studies of the taxanes. In: Itokawa H, Lee KH (eds) *Taxus – The Genus Taxus*. Taylor & Francis, London. UK, pp 387–435
- Cheristehusz M.J.M, Reveal JL., Farjon A., Gardenr MF., Mill RR. & Chase MC.(2011) A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa* 19 : 55-70
- Cragg G.M, Snader K.M (1991) Taxol:the supply issue. *Cancer Cells* 3:233-235
- Danishefsky S.J., Masters J.J., Young W.B., Link J.T., Snyder L.B., Magee T.V., Jung D.K., Isaacs R.C.A., Bornmann W.G., Alaimo C.A., Coburn C.A., Di Grandi M.J. (1996) Total synthesis of baccatin III and taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 2843–2859
- Desai N., Trieu V., Yao ZW., Louie L, Ci S., Yang A., Tao CL., De T., Beals B., Dykes D., Noker P., Yao R., Labao E., Hawkins M., Soon-Shiong P. (2006) Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of Cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with Cremophor-based paclitaxel. *Clinical Cancer Research.* 12(4): 1317-1324
- Doi T., Fuse S., Miyamoto S., Nakai K., Sasuga D., Takahashi T. (2006) A Formal Total Synthesis of Taxol Aided by an Automated Synthesizer. *Chemistry. An Asian Journal* 1: 370 – 383
- Endo Y., Osada Y., Kimura F., Shirakawa H., Fujimoto K. (2007) Effects of Japanese Torrey (Torreya nucifera) Seed Oil on the Activities and mRNA Expression of Lipid Metabolism-Related Enzymes in Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(1):231-233

Floss H.G., Mocek U. (1995) Biosynthesis of taxol. Suffness M (ed) Taxol – Science and Applications. CRC Press, Boca Raton, USA, pp 191–208

Fujii N., Inui T., Iwasa K., Morishige T., and Sato F. (2007) Knockdown of berberine bridge enzyme by RNAi accumulates (S)-reticuline and activates a silent pathway in cultured California poppy cells. Transgenic Res. 16: 363-375.

Georg G.I., Boge T.C., Cheruvallath Z.S., Clowers JS., Harriman GCB., Hepperle M. & Park H. (1995) The medicinal chemistry of Taxol In: Suffness M (ed) Taxol – Science and Applications.. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 317–375

Glowniak K., Zgorka G., Jozefczyk A., Furmanowa M. (1996) Sample preparation for taxol and cephalomannine determination in various organs of *Taxus* sp. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 14 :1215-1220

Goldspiel B.R. (1997) Clinical overview of the taxanes. Pharmacotherapy 17:110S-125S

Greve H., Mohamed IE., Pontius A., Kehraus S., Gross H., Konig GM. (2010) Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development Phytochemistry Reviews. 9:537-545

濱野周泰 (2005) 葉っぱでおぼえる樹木 柏書房株式会社:42-44

Hefner J., Ketchum R.E.B., Croteau R. (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production. Arch. Biochem. Biophys. 360:62–74.

Holton R.A., Biediger R.J., and Boatman P.D. (1995) Semisynthesis of Taxol and Taxotere. Taxol:Science and Application. Suffness, M.(eds), CRC Press, Boca Raton. 97-121

Holton R.A., Somoza C., Kim HB., Liang F., Biediger RJ., Boatman PD., Shindo M., Smith CC., Kim SC., Nadizadeh H., Suzuki Y., Tao CL., Vu P., Tang SH., Zhang PS., Murthi KK., Gentile LN., Liu JH. (1994) First total synthesis of taxol. J.Am.Chem.Soc. 116:1597-1598

Horwitz SB. (1992) Mechanism of action of Taxol *Trends Pharmacol.Sci* 13:134-136

Huang QL., Roessner CA., Croteau R., Scott AI. (2001) Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorg. Med. Chem.* 9:2237–2242.

五十嵐康弘 (2005) 植物内生菌からの生理活性物質のスクリーニング バイオサイエンスとインダストリー 63(4):246-247

Iwasaki S. (1993) Antimitotic agents: Chemistry and recognition of tubulin molecule *Med.Res.Reviews.* 13(2):183-198

岩崎成夫 (1994) 微小管系に作用する天然生理活性物質. 化学と生物 32(3):153-159

岩崎成夫, 白井隆一 (2000) 微小管機能を制御する天然有機物化合物：コルヒチン部位に結合するコンブレタスタチンおよびキュラシン A 関連化合物の合成と構造活性相関 薬学雑誌 120(10):875-889

Jekunen A.P., Cheristen R.D., Shalinsky D.R., Howell S.B. (1994) Synergistic interaction between cisplatin and taxol in human ovarian carcinoma cells in vitro. *British Journal of Cancer* 69(2):299-306

Jennewein S., Long R.M., Williams R.M., Croteau R. (2004) Cytochrome P450 taxadiene 5a-hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of Taxol biosynthesis. *Chem Biol* 11:379–387.

Jennewein S., Rithner C., Williams R., Croteau R. (2001) Taxol biosynthesis: taxane 13a-hydroxylase is a cytochrome P450- dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13595–13600.

Jime'nez-Barbero J., Amat-Guerri F., Snyder J.P. (2002) The solid state, solution and tubulin-bound conformations of agents that promote microtubule stabilization. *Curr. Med.Chem. Anti-Cancer Agents* 2: 91–122.

JingHong M., DeJong Y.L., Arthur P., Robert B., Long M., Jennewein S., Williams D., Croteau R.B. (2006) Genetic Engineering of Taxol Biosynthetic Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biothechnol. Bioeng.* 93(2):212-224

Ketchum R.E.B., Gibson D.M., Croteau R., Shuler K.L. (1999) The kinetics of taxoids accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyljasmonate. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 97-105

Khosroushahi A.Y., Valizadeh M., Ghasemopour A., Khosroushahi M., Naghdibadi H., Dadpour M.R., Omid Y. (2006) Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International* 30: 262-269

Kikuchi Y., Yatagai M. (2003) The commercial cultivation of *Taxus* species and production of taxoids. In: Itokawa H, Lee KH (eds) *Taxus – The genus Taxus*. Taylor & Francis, London, UK:151–178

Kingston D.G.I. (1995) Recent advances in the chemistry and structure–activity relationships of paclitaxel *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 583: 203–216.

Koksal M., Jin Y., Coates R.M., Croteau R., Christianson D.W. (2011) Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature* 469:116-120

Kubota T., Matuzaka S.W., Hoshiya Y., Watanabe M., Kitajima M., Asanuma F., Yamada Y., Koh J.I. (1997) Antitumor activity of paclitaxel against human breast carcinoma xenografts serially transplanted into nude mice. *Journal of Surgical Oncology* 64 (2): 115-121

Kumar N. (1981) Taxol-Induced Polymerization of Purified Tubulin-Mechanism of Action. *J. Biol. Chem.* 256(20):435-441

Kusama H., Hara R., Kawahara S., Nishimori T., Kashima H., Nakamura N., Morihira K., Kuwajima I. (2000) Enantioselective total synthesis of (–)-Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3811–3820

Li Y.C., Tao W.Y., Cheng L. (2009) Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83:233-239

McCoy M. (2004) Lining up to make a cancer drug. Chem.Eng. News 82:12-14

Morihira K., Hara R., Kawahara S., Nishimori T., Nakamura N., Kusama H., Kuwajima I. (1998) Enantioselective total synthesis of Taxol. J. Am. Chem. Soc. 120: 12980-12981

Nicolaou K.C., Yang Z., Liu J.J., Ueno H., Nantermet P.G., Guy R.K., Claiborne C.F., Renaud J., Couladouros E.A., Paulvannan K., Sorensen E.J (1994) Total synthesis of Taxol. NATURE 367(6464): 630-634

小川一誠,西條長宏,野田起一郎,田村友秀,渡辺亨,坂田優,塚越茂,佐谷秀行,ブリストルマイヤーズ株式会社 (2007) Recent Advances in Taxol chemotherapy.

Ojima, I.; Habus, I.; Zhao, M.; Zucco, M.; Park, Y. H.; Sun, C. M.; Brigaud, T. (1992) New and efficient approaches to the semisynthesis of taxol and its C-13 side chain analogs by means of β -lactam synthon method. Tetrahedron 48:6985-7012

Parness J., Horwitz S.B. (1981) Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. Journal of Cell Biology. 91(2):479-487

Patel R. (1998) Tour de paclitaxel. Biocatalysis for semisynthesis. Annu. Rev. Microbiol. 52: 361-395

Rizvi NA., Azzoli C., Miller V et al. (2006) Phase I/II Study of ABI-007 as First Line Chemotherapy in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. Proceedings from the 42nd annual meeting of the American Society of Clinical Oncology.

Rose W.C. (1992) Taxol-A review of its preclinical invivo antitumor-activity. Anti-Cancer Drugs. 3 (4): 311-321

佐々木康綱 (2004) がんサポート情報センター 薬事典 タキソテール
http://www.gsic.jp/medicine/mc_01/06/index.html

佐藤文彦 (2011) イソキノリンアルカロイド生合成系にみる代謝工学の可能性と課題 第48回植物化学シンポジウム講演集 2-9

Schiff P.B., Fant J., Horwitz S.B. (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by Taxol. *Nature* 277:665-667

Schoendorf A., Rithner C.D., Williams R.M., Croteau R. (2001) Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1501–1506.

Shiina I., Iwadare H., Sakoh H., Hasegawa M., Tani Y., Mukaiyama T. (1998) New method for the synthesis of Baccatin III. *Chem. Lett.* 1:1–2.

Sottani C., Turei R., Micoli G., Fiorentino M.L., Minoia C. (2000) Rapid and sensitive determination of paclitaxel in environmental samples by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14: 930-935

Stierle A., Strobel G.A., Stierle D. (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260:214–216

Stierle A., Strobel G., Stierle D., Grothaus P., Bignami G. (1995) The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod. Lloydia* 58: 1315–1324

Strobel G.A., Daisy B., Castillo U., Harper J. (2004) Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products* 67(2):257-268

Strobel G.A., Hess W.M., Ford E., Sidhu R.S., Yang X. (1996) Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17:417-423

Strobel G.A., Stierle A., Stierle D., Hess W.M. (1993) *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbiferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon* 47:71–80.

Suffiness M., Wall.M.E. (1995) Discovery and development of Taxol In: Suffiness M(ed) Taxol-Science and Applications.CRC Press,Boca Raton,FL,USA:3-25

Tan R.T. et al (2001) Endophytes:a rich source of functional metabolites. Nat. Prod.Rep. 18:448-459

U.S.Environmental Protection Agency (2004) Greener Synthetic Pathways Award (<http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/pgcc/winners/gspa04.html>)

Vidensek N., Lim P., Campbeli A., Carlson C. (1990) Taxol content in bark,wood,root,leaf,twig,and seedling from several *Taxus* species. Journal of Natural Products 33(6):1609-1610

Walker K., Croteau R. (2000a) Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Proc Nat Acad Sci USA 97:583–587.

Walker K., Croteau R. (2000b) Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA:taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 97:13591–13596.

Walker K., Schoendorf A., Croteau R. (2000c) Molecular cloning of a taxa-4(20), 11(12)-dien-5a-ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 374:371–380.

Walker K., Fujisaki S., Long R., Croteau R. (2002a) Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. Proc Nat Acad Sci USA 99:12715–12720.

Walker K., Long R., Croteau R. (2002b) The final acylation step in Taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain Nbenzoyltransferase from *Taxus*. Proc Natl Acad Sci USA 99:9166–9171.

Walker K., Klettke K., Akiyama T., Croteau R. (2004) Cloning,heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. J Biol Chem 279:53947–53954.

Wang X., Itokawa H., Lee K.H. (2003) Structure–activity relationships of taxoids. In: Itokawa H & Lee K-H (eds) *Taxus – The Genus Taxus*. Taylor & Francis, London, UK. :298–386

Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E., Coggon P., McPhail A.T. (1971) Plant antitumor agents.IV.The isolation and structure of taxol.a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*.*J Am Chem Soc* 93:2325-2327

渡辺 亨 (2004) がんサポート情報センター 薬事典 タキソール
http://www.gsic.jp/medicine/mc_01/05/

Wender P.A., Badham N.F., Conway S.P., Floreancig P.E., Glass T.E., Granicher C., Houze J.B., Janichen J., Lee D.S., Marquess D.G., McGrane P.L. *et. al* (1997a) The pinene path to taxanes .5. Stereocontrolled synthesis of a versatile taxane precursor. *Journal of the American Chemical Society*. 119(11): 2755-2756

Wender P.A., Badham N.F., Conway S.P., Floreancig P.E., Glass T.E., Houze J.B., Krauss N.E., Lee D.S., Marquess D.G., McGrane P.L. *et. al* (1997b) The pinene path to taxanes .6. A concise stereocontrolled synthesis of taxol. *Journal of the American Chemical Society*. 119(11): 2757-2758

Wildung M.R., Croteau R. (1996) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem* 271:9201–9204

Wilson C.R., Sauer J., Hooser S.B. (2001) Taxines : a review of the mechanism and toxicity of yew (*Taxus* spp.) alkaloids. *Toxicon* 39 (2-3), 175-85.

Wilson L., Miller H.P., Farrell K.W., Snyder K.B., Thompson W.C., Purich D.L. (1985) Taxol Stabilization of Microtubules invitro – Dynamics of Tubulin Addition and Loss at Opposite Microtubule ends. *Biochemistry*. 24 (19): 5254-5262

Xiao H., Verdier-Pinard P., Fernandez-Fuentes N., Burd B., Angeletti.R., Fiser A., Horwitz S.B., Orr G.A. (2006) Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(27):10166-10173

Xu Q., Cheng J., Ge Z., Yuan Y. (2005) Abnormal mitosis versus apoptosis of *Taxus cuspidate* induced by oleic acid in two-liquid-phase suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 37: 76–81

Yamori T., Sato S., Chikazawa H., Kadota T. (1997) Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *Japanese Journal of Cancer Research* 88(12): 1205-1210

米倉浩司, 邑田仁 (2009) 高等植物分類表 株式会社北隆館:35

第2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

第2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

2-1 緒言

現在、タキソールの主要な供給方法となっているのは、イチイ属樹木の針葉から抽出した前駆物質 **Baccatin III** からの半合成とイチイ属樹木の細胞培養法である。この二つの方法に共通しているのは、途中までイチイ属樹木のタキソール生合成経路を利用している点である。これまでに、Croteau, Walker, Jenewin らのグループによって、様々なイチイ属樹木において多くのタキソール生合成関連酵素遺伝子がクローニングされてきており (Wildung and Croteau 1996, Hefner 1998, Walker 1998, Walker 2000a, Waiker 2000b, Schoendorf 2001, Jennwein 2001, Walker 2002a, Walker 2004)、その遺伝子情報についてまとめられてきた。

しかし、彼らの研究は mRNA から cDNA を合成してクローニングしていくものであり、ゲノム DNA 情報としての酵素遺伝子上流配列や転写調節因子に関する知見はほとんどない。イチイ属樹木のプランテーションおよび細胞培養法による生産性向上を目指すうえで、発現制御に関わる転写調節領域の情報を取得することは、適切な培養条件を検討するための大きな手掛かりとなる。そこで、この章では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* var. *nana*) を材料として、タキソール生成関連酵素遺伝子の転写調節領域についての知見を得ることを目的とした。キャラボクは、タキソールを有していることは調べられているが、その生成関連酵素遺伝子についての知見はほとんどないため、まずタキソール生成酵素遺伝子の存在を確認し、それに続いて、上流配列情報を取得して転写調節領域解析を行った。

2-2 実験

2-2-1 キャラボクのタキソール関連酵素遺伝子の存在確認

植物材料

本研究では、試料として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キャラボクの葉を使用した。

ゲノム DNA の調製

キャラボクの葉を液体窒素で凍結し、乳鉢・乳棒を用いて粉末状にした。従来のカリウム/SDS 法 (Dellaporta 1983) とポリサッカライドを効率的に除去する特殊な樹脂とを組み合わせることによって、植物から高純度なゲノム DNA を迅速・簡便に抽出することができる **Phytopure plant DNA extraction kit** (GE ヘルスケア社) を用いて、メーカーの標準プロトコールにしたがい、ゲノム抽出を行った。

プライマーの設計及び PCR 条件

現在推定されているタキソール生合成経路を Fig. 1 に示した。またその生合成経路上で既知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(taxane10 β -hydroxylase), PAM(phenylalanine aminomutase), BAPT(3-amino-3-phenylpropanoyl-13-*O*-transeferase), DBTNBT(3-*N*-debenzoyltaxol-*N*-benzoyltranseferase)の計 7 種類の酵素遺伝子のプライマーを、塩基配列既知の *Taxus x media*, *Taxus brevifolia* および *Taxus chinensis* の塩基配列(Hefner ら 1998, Wildung and Croteau1996, Schoendorf ら 2001, Jennwein ら 2001, Walker ら 2004, Walker ら 2002a, Walker ら 2000a, Steele ら 2005) を基に作成した。DNA polymerase は ExTaq DNA polymerase(Takara 社)を用い、PCR 反応槽は Gene Amp2700(ABI 社)を使用した。温度サイクルは、94 $^{\circ}$ C-2 分-(94 $^{\circ}$ C-30 秒、各アニール温度にて-30 秒、72 $^{\circ}$ C-2 分) \times 30 サイクル-72 $^{\circ}$ C-3 分を基本とし、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。

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

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 α (Takara)を用い、アンピシリン(100 μ g/ml)入りの LB 培地上、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。コロニーをつまようじでつついて、100 μ l の滅菌水に懸濁させ、ボイル法によりプラスミド DNA を抽出した (田村 1997)。そして、4 $^{\circ}$ Cで 12000rpm,8 分間遠心分離し、その上澄みをテンプレートとして、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、プリズム 310DNA 解析装置 (ABI 社)を用いて塩基配列の解析を行った。また、得られた塩基配列情報に対して DDBJ(DNA Data Base of Japan)の BLAST 検索を用いて、既知のものとの相同性を調べた。

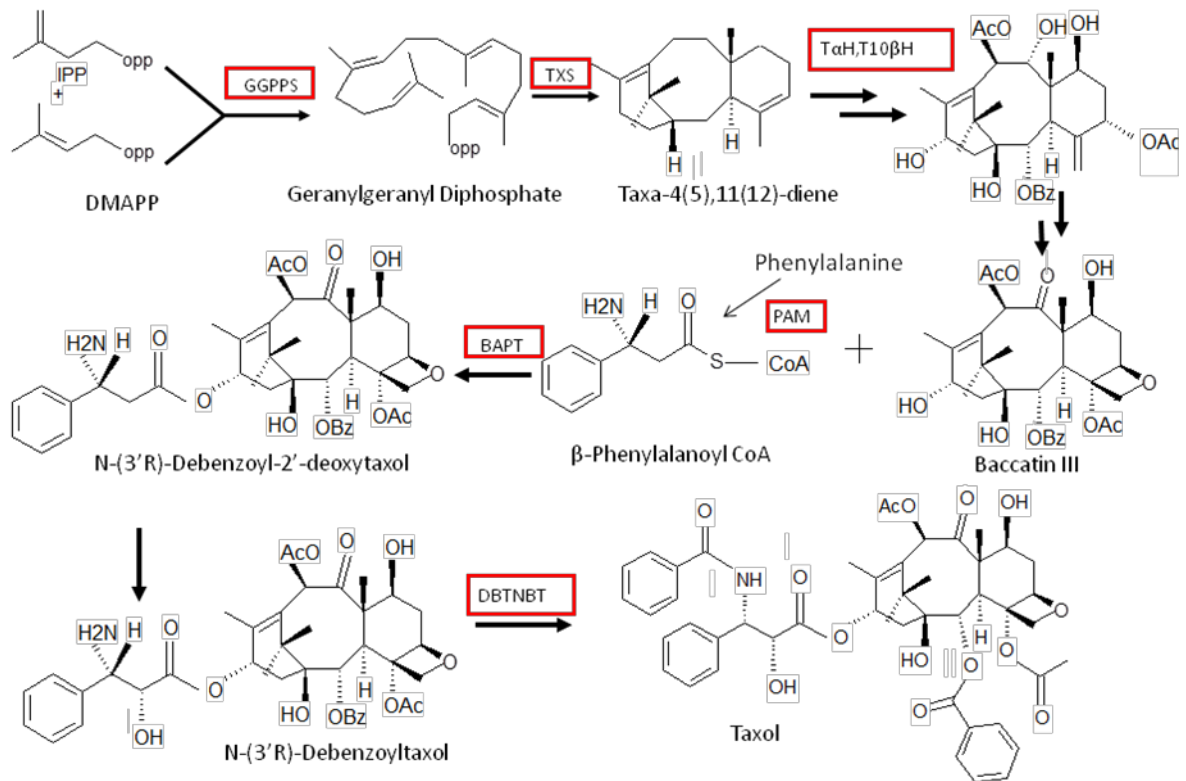


図1 タキソール生合成経路とタキソール生成酵素

Fig. 1 Biosynthetic pathway of Taxol and related enzymes

GGPPS(geranylgeranyl diphosphate synthase)

TXS(taxadiene synthase)

TαH (taxadiene 13α-hydroxylase)

T10βH (taxane 10β-hydroxylase)

PAM (phenylalanine aminomutase)

BAPT(3-amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transferase)

DBTNBT (3-N-debenzoyltaxol -N-benzoyl transferase)

表1 プライマー配列とアニール温度

Table 1 Primer sequences and annealing temperature

酵素名 Enzyme name	配列 Primer sequence	アニール温度 Annealing temperature
GGPPS F	agcccacaaatcacaaggtc	56°C
GGPPS R	ccgaattctcgcaatctcat	
TXS F	agcactggcactagcaaggt	53°C
TXS R	attcgatacccatgatcca	
BAPT F	atccgctctgttctgaatac	53°C
BAPT R	ggctctcaatatctgtatcc	
DBTNBT F1	agtatatgtgatggacgtgg	53°C
DBTNBT R1	gatccatttaagaggtcttg	
DBTNBT F2	gcagatcctgcgactgtaat	52°C
DBTNBT R2	tgcaggcgtataaggtcttc	
T α H F	ggtaaaagacctcgtcttctccgtcg	57°C
T α H R	tctccttgccgccagtgaattcc	
T10 β H F	ttcatcttgagcacatgtactcca	58°C
T10 β H R	ttgaggtgttctgatcggagtgtcc	
PAM F	ggcagacaacaacgacgcct	55°C
PAM R	agctacagtcgcttctgcggaatttc	

2-2-2 キャラボクのタキソール関連酵素遺伝子上流配列解析

タキソイドの生成のキーエンザイムの TXS 遺伝子、半合成のキーエンザイムの BAPT 遺伝子の全長クローニングおよび発現調節に関わる転写調節シス配列の情報を得るため GenomeWalker Universal kit(Clontech 社)を用いて遺伝子解析を行った。

GenomeWalker Universal kit を用いた上流配列解析

キャラボクの DNA を *Dra* I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Stu* I の 4 種類の平滑末端制限酵素で 37°C で一晩処理を行った。翌日に、25:24:1 のフェノールクロロホルムイソアミルアルコールを用いて反応を止め、エタノール沈殿により DNA 断片の精製を行った。その後、T4DNA リガーゼをもちいて Kit 付属のアダプター付加を行うため、16°C の恒温槽で一晩インキュベートを行った。アダプター配列を Fig. 2 に示す。

その後、アダプターが付加された DNA 断片群をテンプレートとして、アダプター配列の AP1 と 2-2-1 で得られた TXS, BAPT の部分配列より作製した特異的なプライマーを用いて PCR を行った。PCR 条件は Fig. 3 に示した。

次にこの PCR 産物を 30 倍に希釈したものをテンプレートとして、AP2 と先ほど使用した酵素特異的プライマーの 40bp 程度内側に作製した特異的プライマー 2 を用いて、2 回目の PCR を行った。

この PCR 産物の結果を電気泳動で確認し、オペロン社のシーケンス解析サービスに委託してその配列を取得した。

このプロトコルの概略図を Fig. 4 に示した。

5'-GTAATACGACTC(ACTATAGGGCACGCGTGGTCTCG)ACGGCCCGGGCTGGT-3'
 3'-H₂N-CCCACCA-PO₄-5'

図2 アダプター配列 アンダーラインは AP1 配列 ()内配列が AP2 配列
 Fig. 2 Sequences of the adaptor and adaptor primers

AP1 の PCR の条件 :	94°C	25sec	} × 7cycle
Condition of PCR cycle	72°C	3min	
with AP1 primer	94°C	25sec	} × 36cycle
	67°C	3min	
	67°C	7min	
	4°C	∞	
AP2 の PCR の条件 :	94°C	25sec	} × 5cycle
Condition of PCR cycle	72°C	3min	
with AP2 primer	94°C	25sec	} × 24cycle
	67°C	3min	
	67°C	7min	
	4°C	∞	

図3 Genome Walker kit の PCR 条件
 Fig. 3 Condition of PCR cycle for Genome Walker kit

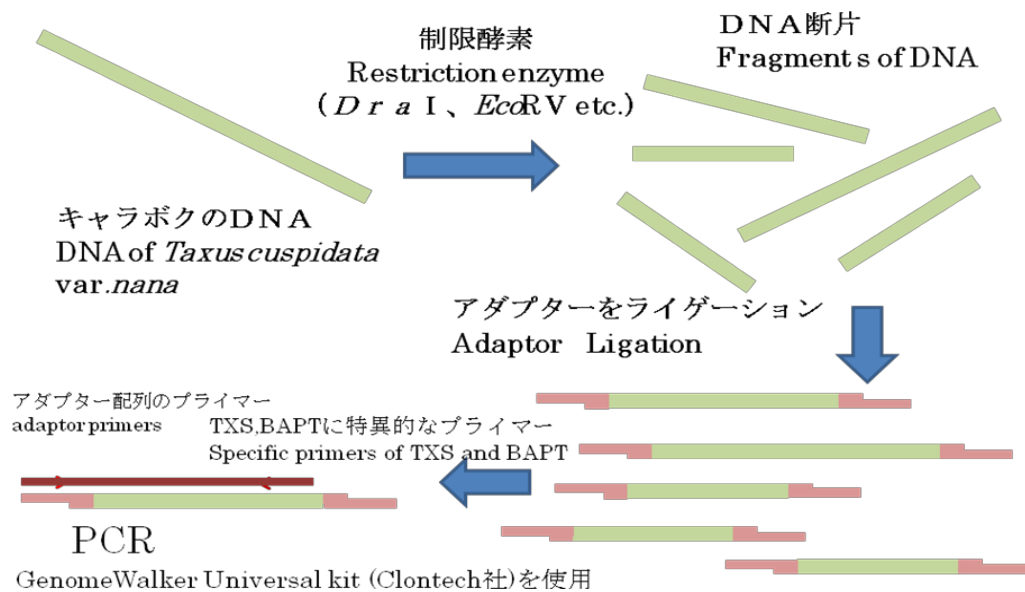


図4 Genome Walker kit 原理図
 Fig. 4 Genome Walker kit scheme

2-3 結果

2-3-1 キャラボクのタキソール関連酵素遺伝子の存在確認

今回の研究で、取得できたタキソール生合成関連酵素と思われる部分配列のシーケンス結果および相同性検索結果を Fig. 5~12 に示す。

Fig. 5 にはキャラボクの GGPPS と *Taxus × media*, *Picea abies*, *Abies grandis* の GGPPS 遺伝子とのアライメント図を示した。Fig. 6 は *Taxus brevifolia*, *Taxus baccata* の TXS 遺伝子とのアライメント図を示した。Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10, Fig. 12 においてもそれぞれ既知のイチイ属の BAPT, T10 β H, T α H, PAM, DBTNBT 遺伝子配列とのアライメント図を示した。Fig. 11 に関しては対象とした DBTNBT ではなく最も相同性の高かった *Taxus cuspidata* の acetyltransferase とのアライメント図を示した。

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、DBTNBT 遺伝子のプライマーで作成した PCR 産物を除く 6 種類の酵素遺伝子由来のプライマーで作製した PCR 産物では既知の各タキソール生合成関連酵素の遺伝子と 90%以上の高い相同性を示す結果となり (Fig.5~10)、キャラボクは一連の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。

DBTNBT 遺伝子のプライマーを用いた産物では、塩基配列を 2 種類読むことができ、それらをそれぞれ DBTNBT 候補遺伝子 1 および 2 と示した。Fig.11 に示したように、DBTNBT 候補遺伝子 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、*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。

また、DBTNBT 候補遺伝子 2 に関しては、*Taxus × media* の DBTNBT の mRNA の塩基配列と 93%の相同性を示したが、182bp 目から 93bp の相同性のない部分が含まれていた。

```

PiceabiesGGPPS      AGCCTACAAACCACAAGGTCTTTGGTGAAGGCACCGCTGTTCTTGCAGGGGATGCACTGC
Abiesgrandis        AGCCTACAAACCACAAGGTCTTGCGGGAAGGCACTGCTATTCTTGCAGGGGATGCACTGC
kyaraGGPPS          AGCCACAAATCACAAGGTCTTTGGAGAGGACACTGCTGTTCTTGCAGGGGATGCCCTGC
TaxusmediaGGPPS     AGCCAACAAATCACAAGGTCTTTGGAGAGGACACTGCTGTTCTTGCAGGGGACGCCCTGC
*** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * *
PiceabiesGGPPS      TTTCAATTTGCATTTGAACACATTGCAGTGTCCACAAGCAAAGTGTGGGGAGTGATAGGA
Abiesgrandis        TTTCAATTTGCATTTGAACACATTGCAGTATCCACAAGCAAATCTGTGGGGACTGATAGGA
kyaraGGPPS          TTTCAATTTGCATTTGAGCATATTGCTGTGGCTACAAGCAAGACTGTGCCTAGTGATAGGA
TaxusmediaGGPPS     TTTCAATTTGCATTTGAGCATATTGCTGTGGCTACAAGCAAGACTGTGCCTAGTGATAGGA
***** ** ***** * * ***** ** * *****
PiceabiesGGPPS      TTTTGAGGGTGGTATCTGAATTGGGTAGAACAATAGGCTCTCAAGGGCTCGTGGGTGGGC
Abiesgrandis        TTTTGAGGGTGGTATCTGAATTGGGTAGAACAATAGGCTCCAAGGGCTTGTGGGTGGGC
kyaraGGPPS          CTTTAAGGGTGATATCTGAATTGGGTAAGACAATAGGCTCTCAAGGGCTTGTAGGGTGAC
TaxusmediaGGPPS     CTTTAAGGGTGATATCTGAATTGGGTAAGACAATAGGCTCTCAAGGGCTTGTAGGGGGGC
** ***** ***** ***** ***** ** ** * *
PiceabiesGGPPS      AGGTTGCTGATATTACGAGTGAGGGGAATGCTTCTGTTGACCTTGACTCTGGAATGGA
Abiesgrandis        AGGTTGCTGATATTACGAGTGAGGGCGATGCTTCTGTTGACCTTGACACTCTGGAATGGA
kyaraGGPPS          AGGTGTTGATATTACATCCGAGGGGGATGCTAATGTGGACCTGAAAACCTGGAATGGA
TaxusmediaGGPPS     AGGTGTTGATATTACATCCGAGGGGGATGCTAATGTGGACCTGAAAACCTGGAATGGA
*** * ***** ***** ***** *** ***** * ** *****
PiceabiesGGPPS      TTCACATTCATAAGACTGCAGTGTCTTGGAGTGCTCAGTTGTGTGTGGGGCGATCATCA
Abiesgrandis        TTCACATTCATAAGACTGCAGTGTCTATTGGAGTGCTCAGTTATGTGTGGGGCGATCATT
kyaraGGPPS          TTCATATACACAAGACTGCTGTGCTCTTGAATGTTGAGTTGTGAGTGGAGGGATCCTTG
TaxusmediaGGPPS     TTCATATACACAAGACTGCTGTGCTCTTGAATGTTGAGTTGTGAGTGGAGGGATCCTTG
*** ** ** ***** ***** ***** ** ***** ** ***** * ***** *
PiceabiesGGPPS      GTGGTGCTTCAGAGAATGAGATTGAGAGAGTTAAA
Abiesgrandis        GTGGTGCTTCAGACAATGAGATTGAGAGAATTCAA
kyaraGGPPS          GTGGTGCTACAGAGGATGAGATTGCGAGAATTCGG
TaxusmediaGGPPS     GTGGTGCTACAGAGGACGAGATTGCGAGAATTCGG
***** ** ** * ***** ** * **

```

図 5 GGPPS 遺伝子のアライメント 下線はプライマー配列

Fig. 5 Genome sequence alignment of GGPPS partial sequences Under line : primer site

相同性	Taxus x media geranylgeranyl diphosphate synthase	(898-1232bp)	332/335(98%)
homology	Picea abies geranylgeranyl diphosphate synthase	(548-876bp)	279/335(81%)
	Abies grandis geranylgeranyl diphosphate synthase	(640-908bp)	279/335(81%)

```

kyaraTXS          CTCTGGAGACACCATTTCTGAGGTAGGGAAAAGTAGAAAACAGTTTAAACGGATTTAA
Taxusbrevifolia  CTCTGGAGACACCGTTTCTGAGGTAGGGAAAAGTAGAAAACAGTTTAAACGGATTTAA
Taxusbaccata      CTCTGGAGACACCGTTTCTGAGGTAGGGAAAAGTAGAAAACAGTTTAAACGGATTTAA
                    *****
kyaraTXS          TGGGTAGATTTAGTCGTTTCATATTTGTAGGCTGACATTTCTGTGAAGTGCAGAGTTCTAC
Taxusbrevifolia  TGGGTAGATTTAGTCGTTTCATATTTGTTGGCTGACATTTCTGTGAAGTGCAGAGTTCTAC
Taxusbaccata      TGGGTAGATTTAGTCGTTTCATATTTGTTGGCTGACATTTCTGTGAAGTGCAGAGTTCTAC
                    *****
kyaraTXS          TTACCAAGAACGGGCAGATGAGCTGGTTGTGAAAATTAAGATATGTTCAATGCGCTCGG
Taxusbrevifolia  TTACCAAGAACGGGCAGATGAGCTGGTTGTGAAAATTAAGATATGTTCAATGCGCTCGG
Taxusbaccata      TTACCAAGAACGGGCAGATGAGCTGGTTGTGAAAATTAAGATATGTTCAATGCGCTCGG
                    *****
kyaraTXS          AGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGGTGGCGAGGGTGGCGACCAT
Taxusbrevifolia  AGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGGTGGCGAGGGTGGCGACCAT
Taxusbaccata      AGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGGTGGCGAGGGTGGCGACCGT
                    *****
kyaraTXS          TTCCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCCTCAGGCCCTCAACTGGGTTTTCAACAA
Taxusbrevifolia  TTCCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCCTCAGGCCCTCAACTGGGTTTTCAACAA
Taxusbaccata      TTCCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCCTCAGGCCCTCAACTGGGTTTTAAACAA
                    *****
kyaraTXS          CCAGCTCCAGG-TGGATCATGGGGTATCGAAT
Taxusbrevifolia  CCAGCTCCAGGATTGGATCGTGGGGTATCGAAT
Taxusbaccata      CCAGCTCCAGGATTGGATCGTGGGGTATCGAAT
                    *****

```

図 6 TXS 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 6 Genome sequence alignment of TXS partial sequences	Under line : primer site
相同性 Taxus brevifolia taxadiene synthase(327-657bp)	327/331(98%)
homology Taxus baccata taxadiene synthase(302-632bp)	324/331(97%)

```

kyaraBAPT      ATCCGCTCTGTTCTGAACTTAGAGATGAAGAAGACAGGTTGTTAGCAGAGTTCCATG
TaxusmediaBAPT ATCCGCTCTGTTCTGAACTTAGAGATGAAGAAGACAGGTTGTTAGCAGAGTTCCATG
TaxuscuspidataBAPT -----ATGAAGAAGACAGGTTGTTGTCAGAGTTCCATG
                *****

kyaraBAPT      TGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCC
TaxusmediaBAPT TGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCC
TaxuscuspidataBAPT TGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCC
                *****

kyaraBAPT      CTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGGTCTACGCTG
TaxusmediaBAPT CTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGGTCTACGCTG
TaxuscuspidataBAPT CTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGGTCTACGCTG
                *****

kyaraBAPT      CCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGG
TaxusmediaBAPT CCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGG
TaxuscuspidataBAPT CCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGG
                *****

kyaraBAPT      TGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTG
TaxusmediaBAPT TGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTG
TaxuscuspidataBAPT TGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTG
                *****

kyaraBAPT      AAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTT
TaxusmediaBAPT AAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTT
TaxuscuspidataBAPT AAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTT
                *****

kyaraBAPT      CAGTCTTAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTCTCTAC
TaxusmediaBAPT CAGTCTTAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTCTCTAC
TaxuscuspidataBAPT CAGTCTTAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTCTCTAC
                *****

kyaraBAPT      CACAGGATACAGATATTGAGGACC
TaxusmediaBAPT CACAGGATACAGATATTGAGGACC
TaxuscuspidataBAPT CACAGGATACAGATATTGAGGACC
                *****

```

図7 BAPT 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 7 Genome sequence alignment of BAPT partial sequences Under line : primer site

相同性	Taxus x media phenylpropanoyltransferase (BAPT)(58-501bp)	444/444(100%)
homology	Taxus cuspidata phenylpropanoyltransferase (BAPT)(1-418bp)	417/418(99%)

```

TaxusmediaT10βH      TTCATCTTGCAGCACATGTACTCCCATTCCTCTTTCCTATTCACTCCCTCCTCTCAGA
TaxuscuspidataT10βH -----
kyaraT10βH          TTCATCTTGCAGCACATGTACTCCCATTCCTCTTTCCTATTCACTCCCTCCTCTCAAA

TaxusmediaT10βH      CCCACCTGCTCCAAATGGATAGCTTCATTTTTCTGAGAAGCATAGGAACAAAATTTGGGC
TaxuscuspidataT10βH -----ATGGATAGCTTCATTTTTCTGAGAAGCATAGGAACAAAATTTGGGC
kyaraT10βH          CCCACCTGCTCCAAATGGATAGCTTCATTTTTCTGAGAAGCATAGGAACAAAATTTGGGC
                        *****

TaxusmediaT10βH      AGCTGGAGTCTTCCCCTGCTATTCTTTCCCTTACCCTGCGACCTATTCTGCCATTATTC
TaxuscuspidataT10βH AGCTGGAGTCTTCCCCTGCTATTCTTTCCCTTACCCTGCGACCTATTCTGCCATTATTC
kyaraT10βH          AGCTGGAGTCTTCCCCGCTATTCTTTCCCTTACCGTCACACCTATTCTTGCCATTATTC
                        *****

TaxusmediaT10βH      TTCTCTTGCTCTTCCGTTACAATCACCGATCCTCTGTTA
TaxuscuspidataT10βH TTCTCTTGCTCTTCCGTTACAATCACCGATCCTCTGTTA
kyaraT10βH          TTCTCTTGCTCTTCCGTTACAATCACCGATCCTCTGTTA
                        *****

```

図 8 T10βH 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 8 Genome sequence alignment of T10βH partial sequences Under line : primer site

相同性	Taxus x media	5-alpha-taxadienol-10-beta-hydroxylase(37-255bp)	214/219(97%)
homology	Taxus cuspidata	5-alpha-taxadienol-10-beta-hydroxylase(1-145bp)	141/145(97%)


```

kyaraT α H      GGTAAAAGACCTCGTCTTCTCCGTCGCAAGCCGCTTGTTTTTTGGTATAACTGAGGAG
TaxusmediaT α H GGTAAAAGACCTCGTCTTCTCCGTCGCAAGCCGCTTGTTTTTTGGTATAACTGAGGAG
TaxuschinensisT α H GGTAAAAGACCTCGTCTTCTCCGTCGCAAGCCGCTTGTTTTTTGGTATAACTGAGGAG
*****
kyaraT α H      CACCTGCAGGAGCAACTTCATAACTTGTTGGAAGTTATTCTTGTGGGATCTTTTTCTGTT
TaxusmediaT α H CACCTGCAGGAGCAACTTCATAACTTGTTGGAAGTTATTCTTGTGGGATCTTTTTCTGTT
TaxuschinensisT α H CACCTGCAGGAACAACCTTCATAACTTGTTGGAAGTTATTCTTGTGGGATCTTTTTCTGTT
*****
kyaraT α H      CCACTCAACATTCCCGGATTGATTACCATAAAGCGATTGAGGCAAGGGCCACCCTCGCT
TaxusmediaT α H CCACTCAACATTCCCGGATTGATTACCATAAAGCGATTGAGGCAAGGGCTACCCTCGCT
TaxuschinensisT α H CCACTCAACATTCCCGGATTGATTACCATAAAGCGATGCAGGCAAGGGCCACCCTCGTT
*****
kyaraT α H      GACATCATGACCTCTTTGATAGATAAGAGGAGAAATGAGCTGCGTGCAGGCACTGCATCT
TaxusmediaT α H GACATCATGACCTCTTTGATAGAAAAGAGGAGAAATGAGCTGCGTGCAGGCACTGCATCT
TaxuschinensisT α H GACATCATGACCTCTTTGATAGAAAAGAGGAGAAATGAGCTGCGTGCAGGCACTGCATCT
*****
kyaraT α H      GGAATCAAGATTTGCTCTCTGTTTGGTCACTTTCACTGACGAAAGGGGGAATTCACTG
TaxusmediaT α H GAGAATCAAGATTTGCTCTCTGTTTGGTCACTTTCACTGACGAAAGGGGGAATTCACTG
TaxuschinensisT α H GAGAATCAAGATTTACTCTCTGTTTGGTCACTTTCACTGACGAAAGGGGGAATTCACTG
* *****
kyaraT α H      GCGGACAAGGAGA
TaxusmediaT α H GCGGACAAGGAGA
TaxuschinensisT α H GCGGACAAGGAGA
*****

```

図 9 T α H 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig.9 Genome sequence alignment of T α H partial sequences Under line : primer site

相同性	Taxus x media taxane 13-alpha-hydroxylase(618-930bp)	310/313(99%)
homology	Taxus chinensis taxane 13-alpha-hydroxylase(532-844bp)	309/310(99%)

```

TaxuschinensisPAM  GGCAGACAACAACGACGCCCTCGTAAGAATCCAGGGTCCAAATTCCTTCCTTTTACAG
TaxusmediaPAM      GGCAGACAACAACGACGCCCTCGTGAGAATCCAGGGTCCAAATTCCTTCCTTTTACAG
kyaraPAM           GGCAGACAACAACGACGCCCTCGTGAGAATCCAGGGTCCAAATTCCTTCCTTTTACAG
*****
TaxuschinensisPAM  ATTTGTTGGGAAGAGCTCGACACAGGTGTGATGAGTGCGAGAAGAGAGCAGACGCCGCA
TaxusmediaPAM      ATTTGTTGGGACGAGCTCGACACAGGTGTGATGAGTGCGAGAAGAGAGCAGACGCCGCA
kyaraPAM           ATTTGTTGGGAAGAGCTCGACACAGGTGTGATGAGTGCGAGAAGAAAGCAGACGCCGCA
*****
TaxuschinensisPAM  AGAGGACGTGCAGAAAGTTCGATGCAATTGCCGACGGCAGAATTACGGTGCCTCTGCT
TaxusmediaPAM      AGAGGACGTGCAGAAAGTTCGATGCAATTGCCGACGGCAGAATTACGGTGCCTCTGCT
kyaraPAM           AGAGGACGTGCAGAAAGTTCGATGCAATTGCCGACGGCAGAATTACGGTGCCTCTGCT
*****
TaxuschinensisPAM  GCACTGCCTGCAAGGGTTTCTCGGCCAACCAATGGGTGCGCCAACGGCGCTAGTCGTT
TaxusmediaPAM      GCACTGCCTGCAAGGGTTTCTCGGCCAACCAATGGGTGCGCCAACGGCGCTAG-----
kyaraPAM           GCACTGCCTGCAAGGGTTTCTCGGCCAACCAATGGGTGCGCCAACGGCGCTAGTCGTT
*****
TaxuschinensisPAM  CCAAAGTGTGGAAACAAATCTGCGTGATTTCTGCGTGAATATTTACAGTAGAATTTACAG
TaxusmediaPAM      -----
kyaraPAM           CCAAAGTGTGGAAACAAATCTGCGTGATTTCTGCGTGAATATTTACAGTAGAATTTACAG

TaxuschinensisPAM  TTGTTGGGTTGTTGATGTTTGCAGTAGAAATTCGGCAGAAGCGACTGTA
TaxusmediaPAM      -----
kyaraPAM           TTGTTGGGTTGTTGATGTTTGCAGTAGAAATTCGGCAGAAGCGACTGTA

```

図 10 PAM 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分、緑は終止コドン 終止コドン
下流：3'非翻訳領域

Fig.10 Genome sequence alignment of PAM partial sequences Under line : primer site
Green box is stop codon. Down stream from stop codon is 3' untranslated.

相同性	Taxus chinensis phenylalanine aminomutase(2061-2411bp)	347/351(98%)
homology	Taxus × media phenylalanine aminomutase(1999-2233bp)	233/235(98%)

```

T. C. taxadien-5ol-acetyltransfe  AGTATATGCGATGGAC---GAGGAGCTGGTCAATTTCTGCAAAGCCTTGCAGAGATAG
T. C. taxoid-0-acetyltransferase  AGTATATGTGATGGACCGAAGCGCTGGTCAATTTCTGCAAGCCTTGCC-AGATGG
kyaraDBTNBTlike1                AGTATATGTGATGGAC---GTGGAGCTGGTCAATTTCTACATGATCTTGCAGAGATGG
***** ***** ** ***** ***** ** ***** ** *
T. C. taxadien-5ol-acetyltransfe  CGAGAGGAGAAGATAAGCTATCATGTGAACCAATATGGAACAGAGAAGCTGCTGAAGCCT
T. C. taxoid-0-acetyltransferase  C-AGAGGAAAAGATAAACTTTCATGTGAACCAATATGGAACAGAGAAGCTGCTGAAGCCT
kyaraDBTNBTlike1                CGAGGGGAGAAGATAAGCTTTCATGTGAACCAATATGGAATAGAGATCTGCTGAAGCCT
* * * * * ***** ** ***** ***** ***** *****
T. C. taxadien-5ol-acetyltransfe  GAAGATCCTATACACCTCCAATTTTATCACTTGTATTGCTACCCCTTCTGGCCCTAC
T. C. taxoid-0-acetyltransferase  GAAGATCCTATACACCTCCAATTTTATCACTTGTATTGCTATGCCCTTCTGGCCCTCC
kyaraDBTNBTlike1                GAAGATCTTACACATCTCCAATTTTATCACTTGTATTGCTAGCCCTTTAGTC---AC
***** ** * * * ***** ***** ***** * * *
T. C. taxadien-5ol-acetyltransfe  ATTTGAGGAATGGTCCATGCCTCTCTTGTATAAACCTGCAACAATAAACACATGA
T. C. taxoid-0-acetyltransferase  AATTGAGAAATGGTTTCATGCCTCTCTTGTATAAACCTGCAACAATAAAATGTCTGA
kyaraDBTNBTlike1                AGCTGAGGAATGGATTCATGCCTCTCTTGTATAAACCTTGACACAATAACACGTATAA
* * * * * ***** * ***** ***** * * *
T. C. taxadien-5ol-acetyltransfe  AACAGTCTATTATGGAAGAATGTAATGAAGTTTGTCTTTCATTGAAATTGTGGCAGCA
T. C. taxoid-0-acetyltransferase  AACAGTCTATTATGGAAGAATGTAACGAAGTTTGTCTTTCATTGAAATTATGACAGCA
kyaraDBTNBTlike1                AGCAGTCTATTATGGAAGAATATAAGAAGTTTGTCTACATTGAAATTGTGGCAGCA
* ***** ***** *** ***** *** ***** ** *****
T. C. taxadien-5ol-acetyltransfe  TTAACTTGGCGAGCGAGGACAAAAGCTCTCAAATCCACAAAACCTCAAAATGTGAAGCT
T. C. taxoid-0-acetyltransferase  TTGGCTTGGAAAGCGAGGACAAAAGGCTTTCAAATCCACAAAACCTCAGAATGTGAAGCT
kyaraDBTNBTlike1                TTAACTTGGCGAGCGAATACAAAGGTTCTCAAATCCACATACTCAGAATGTGAAGCT
** ***** ***** ***** * * ***** ***** ***** *****
T. C. taxadien-5ol-acetyltransfe  TCTGTTTGGCGTGGACATGAAGAAATCATTTAATCCCCGTTTCCAAAAGGATACTATG
T. C. taxoid-0-acetyltransferase  TCTCTTTCAGTGGACATGAGGAAAGTATTTAATCCCCATTTCAAAAGGATACTATG
kyaraDBTNBTlike1                TATCTTTCAGTGTGATGTGAGGAAATCATTTGATCCCC---TTTCCACTGGAT-CTATG
* * ***** ** * * * * * ***** ***** ** * * * ***** *****
T. C. taxadien-5ol-acetyltransfe  GTAATGCCATTGGTTTTGCATGTGCAATGGATAATG
T. C. taxoid-0-acetyltransferase  GTAATGCCATTGGCTTTGCATGTGCAATGGATAAT-
kyaraDBTNBTlike1                GTAATGCTATTGGTTTTGCATGTGCAATGGATAATG
***** ***** ***** *****

```

図 11 DBTNBT 候補遺伝子 1 のアライメント 下線はプライマー部分

Fig.11 Genome sequence alignment of DBTNBTlike1 partial sequences Under line : primer site

相同性	Taxus cuspidata taxadien-5-alpha-ol-O-acetyltransferase(492-939bp)	387/446(86%)
homology	Taxus cuspidata taxoid-O-acetyltransferase(492-939bp)	376/446 (84%)

```

kyaraDBTNBTlike2 ATGGGAGCTGGAAGTGGATTGCACGGGG-AAGGTGCTCTGTTG-AGAAGCCA--GCGGA
TaxusmediaDBTNBT TGGGGAAGTGGGAAGTGGATTGCACGGGGGAAGGTGCTCTGTTGTAGAAGCCATGGCGGA
      **** *****
kyaraDBTNBTlike2 CGA-AACCTTTCAGCGTTGGGAGATTTTGATTACCACAA-CCAGCATT-GGGAAGCTACT
TaxusmediaDBTNBT CGACAACCTTTCAGTGTGGGAGTTTTGATTACCACAATCCAGCATTGGGAAGCTACT
      *** *****
kyaraDBTNBTlike2 TTA CTACTTCCACGGATACCCCTATTCACGACCTCCATCCTCTGGTTGTT CAGGTAAT
TaxusmediaDBTNBT TTA CTACTACCCTGATACCCCTATTCACGACCTCCATCCTCTGGTTGTT CAGGTAAC
      *****
kyaraDBTNBTlike2 TCTCTTAGGTATCCCTACTATGATATGATATGGTTTTCTGTGTTTGATAAATATCAT
TaxusmediaDBTNBT TC-----
      **
kyaraDBTNBTlike2 TTGTTGTTGTATGTATTTATGTAGTAATTCATTTACATGTGGGGGTTTGTGT
TaxusmediaDBTNBT -----GTTTACCTGCGGGGGTTTGTGT
      ***** **
kyaraDBTNBTlike2 GGGATTAAGTTTGGACCATACTATATGTGATGGTCGTGGTGCAGGCCAATTTGTTAAAGT
TaxusmediaDBTNBT GGGATTAAGTTTGGACCATAGTATATGTGATGGACGTGGTGCAGGTCAATTTCTTAAAGC
      *****
kyaraDBTNBTlike2 CTTCGAGAGATGGCGAGGGGAGAGGTTAAGCCCTCATTGGAGCCAATATGGAATAGAGA
TaxusmediaDBTNBT CCTAGCAGAGATGGCGAGGGGAGAGGCTAAGCCCTCATTGGAACCAATATGGAATAGAGA
      * * *****
kyaraDBTNBTlike2 GTTGTTGAAGCCTGAAGACNTTATACGCCTGCAA
TaxusmediaDBTNBT GTTGTTGAAGCCGAAGACCTTATACGCCTGCAA
      *****

```

図 12 DBTNBT 候補遺伝子 2 のアライメント

Fig.12 Genome sequence alignment of DBTNBTlike2 partial sequences

相同性 Taxus x media 3'-N-debenzoyltaxol N-benzoyltransferase

homology (DBTNBT)(307-486bp)175/191(92%)

相同性 Taxus x media 3'-N-debenzoyltaxol N-benzoyltransferase (DBTNBT)(487-665bp)

homology 165/179(92%)

2-3-2 キャラボクのタキソール関連酵素遺伝子上流配列解析

今回、TXS 遺伝子と BAPT 遺伝子の全長配列を読むことに成功した。その結果、キャラボクの TXS 遺伝子の全長は 3988bp、BAPT 遺伝子の全長は 1457bp であることが分かった。また、既知の TXS、BAPT の mRNA の配列からイントロンの位置を推定した。その結果、TXS 遺伝子は配列内に 13 のイントロンが、BAPT には配列内に 1 つのイントロン部位を持つことが示唆された。また、エキソンと考えられる部分をアミノ酸配列に変換した。その結果、キャラボクの TXS のアミノ酸配列は、*Taxus cuspidata* の TXS と 853/862bp 一致し、*Taxus × media* の TXS と 849/862bp 一致した。また、キャラボクの BAPT のアミノ酸配列は、*Taxus cuspidata* の BAPT と 438/445 一致し、*Taxus × media* の BAPT と 445/445 一致した。

TXS 遺伝子の全長配列を Fig. 13 に、アミノ酸配列を Fig. 14 に示し、BAPT 遺伝子の全長配列を Fig. 15 に、アミノ酸配列を Fig. 16 に示し、章末に記載した。

また、TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子上流配列を読み、植物の転写調節シス配列に関するデータベースの PlantPAN(Chang ら 2008)を用いて転写調節領域解析を行った。TXS 遺伝子上流配列解析の結果を Fig. 17 に、BAPT 遺伝子上流配列解析結果を Fig.18 に示し、章末に記載した。

2-4 考察

これまでの研究で、キャラボクにタキソールが存在していることは調べられてきた。しかし、その生合成関連酵素遺伝子に関してはほとんど調べられていなかった。そこで、この章ではキャラボクの 6 つのタキソール生成関連酵素遺伝子の部分配列情報を取得し、2 つのタキソール生成関連酵素遺伝子の全長クローニングとその上流配列情報を取得した。

本研究ではまず、PCR 法によって GGPPS 遺伝子、T10 β H 遺伝子、T α H 遺伝子、PAM 遺伝子の部分配列情報を取得し、その存在可能性を示した。これはキャラボクにおいて初めての発見となる。

また、PCR 法で得られた DBTNBT 候補遺伝子 1 断片は *Taxus cuspidata* の taxadien-5 α -ol-O-acetyltransferase と 86% の相同性を示しており、ベンジル基転移酵素ではなく、アセチル基転移酵素をコードしていると考えられる。しかし、タキソールの生合成関連酵素遺伝子はイチイ属樹木間で非常に保存性が高いことを考えると、5 位の水酸基をアセチル化する酵素遺伝子であると言うには、86% という相同性は、やや低いように思われる。また、タキソイド類縁体は約 360 あると言われているが、それらの生合成に関わるアセチル基転移酵素を含め、タキソール生合成に関わるアセチル基転移酵素間での相同性が高いことが報告されており (Hampel ら 2009)、今回の部分配列はアセチル基転移酵素とは推測できるものの、どの部分をどのタイミングでアセチル化するものかは推測できず、新規の酵素をコードする遺伝子かもしれない。

PCR 法に加えて Genome Walker kit を用いて、TXS 遺伝子と BAPT 遺伝子の全長配列を取得した。これらの情報に関しても、キャラボクでは初めての報告となった。また、今回の研究で得られたアミノ酸配列の比較から、キャラボクの TXS のアミノ酸配列 (Fig.14) は、*Taxus cuspidata* の TXS と 862 アミノ酸残基の内 853 アミノ酸残基が一致し、*Taxus media* の TXS と 849 残基一致した。また、キャラボクの BAPT のアミノ酸配列 (Fig.16) は、*Taxus cuspidata* の BAPT と 445 アミノ酸残基のうち 438 アミノ酸残基一致し、*Taxus media* の BAPT と 445 アミノ酸残基すべてが一致した。TXS の相同性では *T.cuspidata* との方が相同性が高いが、BAPT に関しては *T.media* と 100% の相同性を示していた。

テルペンの環化酵素は 2 つのタイプが報告されている。Class I は DD $\times\times$ D モチーフと (N,D)D $\times\times$ (S,T) $\times\times$ E モチーフという保存性の高い部分があり、そこに Mg²⁺などが配位して、イソプレノイドのピロリン酸部分のイオン化によって環化を引き起こす。Class II は、一般的な酸触媒作用によってカルボカチオンを形成する D \times DD モチーフによって、イソプレノイドの二重結合部分のプロト

ン付加により環化を起こす(Wendt ら 1998, Wendt ら 2000, Cristianson2006, Cristianson2008, Cao ら 2010)。

これまで、モノテルペン、セスキテルペン、トリテルペンの環化酵素の形質は報告されてきた(Whittington ら 2002, Lesburg ら 1997, Stark ら 1997, Wedt ら 1997)が、ジテルペン環化酵素は分子量も大きく報告されていなかった。しかし、2011年に *Taxus brevifolia* の TXS の 3次元構造が解明された(Koksal ら 2011)。その報告によると、TXS の N 末端から 79 残基目までは輸送ペプチドと考えられ、この部分のないものにも活性があった。また 80~93 残基目までが、基質が結合する活性中心ポケットの蓋となる部分で活性に必要な部分と推測されている(Lin ら 1996, Williams ら 2000a,b, Jin ら 2005)。そして、その 3次元構造から、C 末端である 553~862 残基までの部分でモチーフを含む Class I ドメインを形成しており、N 末側で Class II と似たドメインを形成していることがわかったが、Class II の方には重要な D×DD がなかった。また、基質を結合させた結晶構造解析においても、Class I ドメインで結合している様子が確認され、TXS は Class I ドメインで触媒作用を起こしていると考えられる。

そこで、今回キャラボクで読めたアミノ酸配列を見ていくと 80~93 残基に D DIPRLSANYH GDL という配列が保存されており、C 末端側では、Mg²⁺の結合に関わる D⁶¹³DMAD, N⁷⁵⁷DTKTYQAE というモチーフが保存されていた。また、基質との水素結合に関わる Y688, E691, S713, R768, Q770, Y835 アミノ酸残基も全て *Taxus brevifolia* の TXS と一致しており、単離されたキャラボクの TXS 遺伝子は TXS としての機能を有していると考えられる。

次に、TXS 遺伝子上流配列を PlantPAN で解析した結果、TATABOX を確認できた。また TATABOX 付近に 3 つのアブシジン酸応答配列 ACGTG (Stalberg ら 1996, Simpson ら 2003)を確認し、1 つのエチレン応答性配列 GCCGCC (Brown ら 2003)を確認できた。このことによって、細胞の枯死によってタキソール生産がスタートする可能性が示唆された。そして、今回の結果から今後、細胞培養法などでタキソール生産性を向上させる際に考慮すべき点となると考えられる。

次に BAPT のアミノ酸配列(Fig.16)に関して見てみると、アシル基転移酵素に共通してみられる DFGWG という配列(Nawarathne ら 2009)が確認できた。

BAPT 遺伝子に関しては上流配列に TATABOX ではなく、代わりとなるイニシエーター配列 CTATTTT を有していることが分かった。そのため、ここが転写開始点となる可能性が高い。

また、TXS, BAPT のどちらの酵素遺伝子の転写調節領域に関しても、多くの光応答性配列(Terzaghi ら 1995, Lam ら 1989)を確認することができ、光のコントロールによって発現制御、タキソール生産の増加につながる可能性が示唆された。

TaxusmediaTXSmRNA	GGTGTCCAACCTCAGCATTGATTTGGCATTGCAATTTGAACTCGTAATTTTCAGTAGTT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	-----
TaxusmediaTXSmRNA	CCCCTGCCTCTCTGCAGAAATGGCTCAGCTCTCATTTAATGCAGCGCTGAAGATGAATGC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ATGGCTCAGCTCTCATTTAATGCAGCGCTGAAGATGAATGC
kyaraTXSwhole	-----ATGGCTCAGCTCTCATTTAATGCAGCGCTGAAGATGAATGC

TaxusmediaTXSmRNA	ATTGGGGAACAAGGCAATCCACGATCCAACGAATTGCAGAGCCAAATCTGAGGGGCAAAT
TaxusbaccataTXSmRNA	ATTGGGGAACAAGGCAATCCACGATCCAACGAATTGCAGAGCCAAATCTGAGGGGCAAAT
kyaraTXSwhole	ATTAGGGAACAAGGCAATCCACGATCCAACGAATTGCAGAGCCAAATCTGAGGGGCAAAT
	*** *****
TaxusmediaTXSmRNA	GATGTGGGTTTGCTCCAATCAGGGCGAACCAGAGTAAAAATGTCGAGAGGAAGTGGTGG
TaxusbaccataTXSmRNA	GATGTGGGTTTGCTCCAATCAGGGCGAACCAGAGTAAAAATGTCGAGAGGAAGTGGTGG
kyaraTXSwhole	GATGTGGGTTTGCTCCAATCAGGGCGAACCAGAGTAAAAATGTCGAGAGGAAGTGGTGG

TaxusmediaTXSmRNA	TCCTGGTCCTGTGTAATGATGAGCAGTAGCACTGGCACTAGCAAGGTGGTTCCGAGAC
TaxusbaccataTXSmRNA	TCCTGGTCCTGTGTAATGATGAGCAGTAGCACTGGCACTAGCAAGGTGGTTCCGAGAC
kyaraTXSwhole	TCCTGGTCCTGTGTAATGATGAGCAGTAGCACTGGCACTAGCAAGGTGGTTCCGAGAC

TaxusmediaTXSmRNA	TTCCAGTACCATTGTGGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGTG
TaxusbaccataTXSmRNA	TTCCAGTACCATTGTGGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGTG
kyaraTXSwhole	TTCCAGTACCATTGTGGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGTG

TaxusmediaTXSmRNA	GCACCACAATGTTATACAAACTCTGGAGACACCATTTCTGTGAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	GCACCACAATGTTATACAAACTCTGGAGACACCATTTCTGTGAG-----
kyaraTXSwhole	GCACCACAATGTTATACAAACTCTGGAGACACCATTTCTGTGAGGTAGGGAAAAGTAGAAA

TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	ACAGTTTAAACGGATTTAATGGGTAGATTTAGTCGTTTATTTGTAGGCTGACATTTCT
TaxusmediaTXSmRNA	-----AGTTCTACTTTCCAAGAACGGGCAGACGAGCTGGTTGTGAAAATTAAG
TaxusbaccataTXSmRNA	-----AGTTCTACTTTCCAAGAACGGGCAGACGAGCTGGTTGTGAAAATTAAG
kyaraTXSwhole	GTGAACTGCAGAGTTCTACTTACCAAGAACGGGCAGATGAGCTGGTTGTGAAAATTAAG
	***** *****

TaxusmediaTXSmRNA	ATATGTTCAATGCGCTCGGAGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGG
TaxusbaccataTXSmRNA	ATATGTTCAATGCGCTCGGAGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGG
kyaraTXSwhole	ATATGTTCAATGCGCTCGGAGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGG *****
TaxusmediaTXSmRNA	TGGCGAGGGTGGCGACCGTTTCCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCCTCAGGCC
TaxusbaccataTXSmRNA	TGGCGAGGGTGGCGACCGTTTCCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCCTCAGGCC
kyaraTXSwhole	TGGCGAGGGTGGCGACCATTTTCCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCCTCAGGCC *****
TaxusmediaTXSmRNA	TCAACTGGGTTTTAAACAACCAGCTCCAAGATGGATCATGGGGTATCGAATCGCACTTTA
TaxusbaccataTXSmRNA	TCAACTGGGTTTTAAACAACCAGCTCCAAGATGGATCATGGGGTATCGAATCGCACTTTA
kyaraTXSwhole	TCAACTGGGTTTTCAACAACCAGCTCCAGGATGGATCGTGGGGTATCGAATCGCACTTTA *****
TaxusmediaTXSmRNA	GTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGGTCAATTCTGTTATCGCCCTCTCGGTTTGAAAA
TaxusbaccataTXSmRNA	GTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGGTCAATTCTGTTATCGCCCTCTCGGTTTGAAAA
kyaraTXSwhole	GTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGACCAATTCTGTTATCGCCCTCTCGGTTTGAAAA *****
TaxusmediaTXSmRNA	CAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	CAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAG-----
kyaraTXSwhole	CAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAGGTTAGAATCATGGCATTTTGGGAAAAAAAAACAGTG *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	TTGAAGGTTTACTGGTCAATCAACTAATGTTTTGTTTCTCATTTTTGGGGTGGATTTAT
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	CATTGGTTGGTTGATCAGTCAGCCTTGCAAATATATGTGATGTTAAGCGCCAAATCTGT
TaxusmediaTXSmRNA	-----G TACTGAGTTTATTGCAGAGAATCTAA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----G TACTGAGTTTATTGCAGAGAATCTAA
kyaraTXSwhole	TGTCTATTATTTTTCTATTTTTCTCCACAGGTACTGAGTTTATTGCAAAAAATCTAA ***** * *****
TaxusmediaTXSmRNA	GATTACTCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCGGATTCGAAATAATCTTTCCTGCTCTGC
TaxusbaccataTXSmRNA	GATTACTCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCGGATTCGAAATAATCTTTCCTGCTCTGC
kyaraTXSwhole	AATTACTCAATGAGGAAGATGAGCTGTCCCGGATTCGAAATAATCTTTCCTGCTCTGC *****

TaxusmediaTXSmRNA	TGCAAAGGCAAAGCGTTGGGGATCAATCTTCCTTAGCATCTCCATTATCAAATCTT
TaxusbaccataTXSmRNA	TGCAAAGGCAAAGCGTTGGGGATCAATCTTCCTTAGCATCTCCATTATCAAATCTT
kyaraTXSwhole	TGCAAAGGCAAAGCGTTGGGGATCAATCTTCCTTACAATCTTCATTATCAAATCTT *****
TaxusmediaTXSmRNA	TGTCGACAACACGGGAAGCCAGGCTTACAGA-----
TaxusbaccataTXSmRNA	TGTCGACAACACGGGAAGCCAGGCTTACAGA-----
kyaraTXSwhole	TGTCGACAACACGGGAAGCCAGGCTTACAGAGTGAGTGAAAACCTCTGTTACTGTTTTAA *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----TG
TaxusbaccataTXSmRNA	-----TG
kyaraTXSwhole	AAAAAAAAAAGTGAATATGTTCTGGATTGTAATTTGTTCTTTTGGCCATTGCAGTG **
TaxusmediaTXSmRNA	TTTCTGCGGTAGCAGACAATATCCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAGGGTCTGGAGG
TaxusbaccataTXSmRNA	TTTCTGCGGCAGCAGACAATATCCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAGGGTCTGGAGG
kyaraTXSwhole	TTTGTGCGGCAGCAGACAATATCCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAGGGTCTCGAGG *** *****
TaxusmediaTXSmRNA	AAGTTATTGATTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCT
TaxusbaccataTXSmRNA	AAGTTATTGATTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCT
kyaraTXSwhole	AAGTTATTGACTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCT *****
TaxusmediaTXSmRNA	CCCCTGCCTCCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCTTC
TaxusbaccataTXSmRNA	CCCCTGCCTCCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCTTC
kyaraTXSwhole	CCCCTGCCTCCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTTTTC *****
TaxusmediaTXSmRNA	TCAACAATCTGCTGGACAAATTCGGCGGCTGCG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	TCAACAATCTGCTGGACAAATTCGGCGGCTGCG-----
kyaraTXSwhole	TCAACAATCTGCTGGACAAATTCGGCGGCTGCGGTATGATTGTTTTTAAACAAGAAATT *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	CTTTGTGTGCGTGCTGATTCCAACAATGCATTCAAGTGATTAATTAATGTTACGAAC
TaxusmediaTXSmRNA	-----TGCCCTGTATGTATTCCATCGATCTGCTGGAACGCCTTTCGCTGGTTGA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----TGCCCTGTATGTATTCCATCGATCTGCTGGAACGCCTTTCGCTGGTTGA
kyaraTXSwhole	GTGAATTACAGTGCCCTGTATGTATTCCATCGATCTGCTGGAACGCCTTTCGCTGGTTGA *****

TaxusmediaTXSmRNA	TAACATTGAGCATCTCGGAATCGGTCGCCATTTCAAACAAGAAATCAAAGTAGCTCTTGA
TaxusbaccataTXSmRNA	TAACATTGAGCATCTCGGAATCGGTCGCCATTTCAAACAAGAAATCAAAGTAGCTCTTGA
kyaraTXSwhole	TAACATTGAGCATCTCGGAATCGGTCGCCATTTCAAACAAGAAATCAAAGGAGCTCTTGA *****
TaxusmediaTXSmRNA	TTATGTCTACAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	TTATGTCTACAG-----
kyaraTXSwhole	TTATGTCTACAGGTAAACCACTGTTTCTTCTTCTAACACTCGATTTTCTCTTTTCCTTT *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----ACATTGGAGTGAAAGGGGCATCGGT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ACATTGGAGTGAAAGGGGCATCGGT
kyaraTXSwhole	CCCTACTTGATATAATATTTGCTGGAAATGGGCAGACATTGGAGTGAAAGGGGCATCGGT *****
TaxusmediaTXSmRNA	TGGGGCAGAGACAGCCTTGTTCAGATCTCAACACAACAGCCCTCGGCCTGCGAACTCTT
TaxusbaccataTXSmRNA	TGGGGCAGAGACAGCCTTGTTCAGATCTCAACACAACAGCCCTCGGCCTGCGAACTCTT
kyaraTXSwhole	TGGGGCAGAGACAGCCTCGTTCAGATCTCAACACAACAGCCCTCGGCCTGCGAACTCTT *****
TaxusmediaTXSmRNA	CGCAGGCACGGATACGATGTTTCTTCAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	CGCAGGCACGGATACGATGTTTCTTCAG-----
kyaraTXSwhole	CGCAGGCACGGATACGATGTTTCTTCAGGTCAGAAGATCAGAAATAATGAAAATAAAAGA *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	AACTGGTTTTACTGTCTCATAGGCTATTCTTTTAGCCTCGTGGACGTCAAAAAGTTTTCA
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	TTTCATTTCAATTTGTTTTATCAGATCTCAAGACTGTTAAATTGTTTGCCATTTGTAAAA
TaxusmediaTXSmRNA	-----ATGTTTTGAATAATTTCAAAG
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ATGTTTTGAATAATTTCAAAG
kyaraTXSwhole	ATTCTTTGTGCTGATATGAAACAAAAATATGAAAGCAGATGTTTTGAATAATTTCAAAG *****
TaxusmediaTXSmRNA	ATGAAAACGGGCGGTTCTTCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTCGAATTGAGAAGCGTGG
TaxusbaccataTXSmRNA	ATGAAAACGGGCGGTTCTTCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTCGAATTGAGAAGCGTGG
kyaraTXSwhole	ATGAAAACGGGCGGTTCTTCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTCGAATTGAGAAGCGTGG *****

TaxusmediaTXSmRNA	TGAATCTTTTCAGAGCTTCGGACCTTGCATTTCTGACGAAGGAGCTATGGACGATGCTA
TaxusbaccataTXSmRNA	TGAATCTTTTCAGAGCTTCGGACCTTGCATTTCTGACGAAGGAGCTATGGACGATGCTA
kyaraTXSwhole	TGAATCTTTTCAGAGCTTCGGACCTTGCATTTCTGACGAAGGAGCTATGGACGATGCTA *****
TaxusmediaTXSmRNA	GAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGACGCACTTGAACGAAAATCTCAACCAATACAA
TaxusbaccataTXSmRNA	GAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGACGCACTTGAACGAAAATCTCAACCAATACAA
kyaraTXSwhole	GAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGACGCACTTGAACAAAAATCTCAACCAATACAA *****
TaxusmediaTXSmRNA	AACTATACAAAGAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	AACTATACAAAGAG-----
kyaraTXSwhole	AACTATTCAAAGAGGTTAGTACAATTTATTTTATTAACAAAAATATATCAATAATTCTA *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	CCAACATAATTAGGAGTAAACCTAAAGTTTCTATTATATGTAGTTAGAAATCAAGGTTT
TaxusmediaTXSmRNA	-----ATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATGAGT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATGAGT
kyaraTXSwhole	CTCTAATATGATGGATCATTTCAGATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATGAGT *****
TaxusmediaTXSmRNA	ATCCCAGCCTAGAAGCCAGAAGTTATATTGATTCGTATGACGACGATTATGTATGGCAG
TaxusbaccataTXSmRNA	ATCCCAGCCTAGAAGCTAGAAGTTATATTGATTCGTATGACGACGATTATGTATGGCAG
kyaraTXSwhole	ATCCCAGCTCTAGAAGCCAGAAGTTATATTGATTCGTATGACGATGATTATGTATGGCAG *****
TaxusmediaTXSmRNA	AGGAAGACTTTATACAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	AGGAAGACTCTATACAG-----
kyaraTXSwhole	AGGAAGACTCTATACAGGTGAGTCAAATATAATCACATTACCCTTCAATTTTATATAGA *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	ATTTATGAGCCGTTGTTGTATCGATTGCTATCTTTTCTCAGTATTGAGGTTATAATCCGT
TaxusmediaTXSmRNA	-----AATGCCATCTTTGAGTAATTCAAAATGTTTAGAATTGGCAAAATTGGACTTCA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----AATGCCATCTTTGAGTAATTCAAAATGTTTAGAATTGGCAAAATTGGACTTCA
kyaraTXSwhole	GCAACAGAAATGCCATCTTTGAGTAATTCAAAATGTTTAGAATTGGCAAAATTGGACTTCA *****

TaxusmediaTXSmRNA	ATATCGTACAATCTTTGCATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTACAAGATGGT-----
TaxusbaccataTXSmRNA	ATATCGTACAATCTTTGCATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTACAAGATGGT-----
kyaraTXSwhole	ATATCGTACAATCTTTGCATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTACAAGGTGGT GATAAATT ***** **
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	GTCATACCTTCTCAATTTATTCAAACCTAATTTTTGGGGAGGAGAACATGAAGTAATG
TaxusmediaTXSmRNA	-----GGAAGGAATCTGGCATGGCAGA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----GGAAGGAATCCGGCATGGCAGA
kyaraTXSwhole	ATCTACTAACATTATGGTTTTTGGTCATAAGATGGT GGAAGAATCCGGCATGGCAGA **** *****
TaxusmediaTXSmRNA	TATAAATTTCACTCGACACCGAGTGGCGGAGGTTTATTTTCATCAGCTACATTTGAACC
TaxusbaccataTXSmRNA	TATAAATTTCACTCGACACCGAGTGGCGGAGGTTTATTTTCATCAGCTACATTTGAACC
kyaraTXSwhole	TATAAATTTCACTCGACACCGAGTGGCGGAGGTTTATTTTCATCAGCTACATTTGAACC *****
TaxusmediaTXSmRNA	CGAATATTCTGCCACTAGAATTGCTTTCACAAAAATTGGTTGTTTACAAGTCCTTTTTGA
TaxusbaccataTXSmRNA	TGAATATTCTGCCACCAGAATTGCCTTTCACAAAAATTGGTTGTTTACAAGTCCTTTTTGA
kyaraTXSwhole	CGAATATTCTGCCACTAGAATTGCCTTTCACAAAAATTGGTTGTTTACAAGTCCTTTTTGA *****
TaxusmediaTXSmRNA	TGATATGGCTGACATCTTTGCAACACTAGATGAATTGAAAAGTTTCACTGAGGGAGTAAA
TaxusbaccataTXSmRNA	TGATATGGCTGACATCTTTGCAACACTAGATGAATTGAAAAGTTTCACTGAGGGAGTAAA
kyaraTXSwhole	TGATATGGCTGACATCTTTGCAACACTAGATGAATTGAAAAGTTTCACTGAGGGAGTAAA *****
TaxusmediaTXSmRNA	GAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	GAG-----
kyaraTXSwhole	GAGGT GATTCTTTAATTTACCAATTTTTTAATTTAAACATTGAAATCTTGAATAAC ***
TaxusmediaTXSmRNA	-----ATGGGATACATCTTTGC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ATGGGATACATCTTTGC
kyaraTXSwhole	ATATACATAATAGGACCTAACTGAACATTGTGGTAACTTTT AGATGGGATACATCTTTGC *****
TaxusmediaTXSmRNA	TACATGAGATTCCAGAGTGTATGCAAACCTGCTTTAAAGTTTGGTTCAAATTAATGGAAG
TaxusbaccataTXSmRNA	TACATGAGATTCCAGAGTGTATGCAAACCTGCTTTAAAGTTTGGTTCAAATTAATGGAAG
kyaraTXSwhole	TACATGAGATTCCAGAGTGTATGCAAACCTGCTTTAAAGTTTGGTTCAAATTAATGGAAG *****

TaxusmediaTXSmRNA	AAGTAAATAATGATGTGGTTAAGGTACAAGGACGTGACATGCTCGCTCACATAAGAAAAC
TaxusbaccataTXSmRNA	AAGTAAATAATGATGTGGTTAAGGTACAAGGACGTGACATGCTCGCTCACATAAGAAAAC
kyaraTXSwhole	AAGTAAATAATGATGTGGTTAAGGTACAAGGACGTGACATGCTCGCTCACATAAGAAAAC *****
TaxusmediaTXSmRNA	CC-----
TaxusbaccataTXSmRNA	CT-----
kyaraTXSwhole	CCGTAAGTAATCAAATTTTAAATGCAACACAATTGAGAATTTTATAGTTTAGATGCAT *
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kyaraTXSwhole	TTCTTTTAAAGTAAAAACACCATTGGTACTCACAAAACATCGTGTATGATTGGAATAG
TaxusmediaTXSmRNA	TGGGAGTTGACTTCAATTGTTATGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCTGGGTATATA
TaxusbaccataTXSmRNA	TGGGAGTTGACTTCAATTGTTACGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCTGGGTATATA
kyaraTXSwhole	TGGGAGTTGACTTCAATTGTTATGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCTGGGTATATA *****
TaxusmediaTXSmRNA	CCAACCTTTGAAGGACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGGCCTGGACCGTGTACC
TaxusbaccataTXSmRNA	CCAACCTTTGAAGGACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGGCCTGGACCGTGTACC
kyaraTXSwhole	CCAACCTTTGAAGGACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGGCCTGGACCATGTACC *****
TaxusmediaTXSmRNA	CTACAACCAATACTACTGATGGGTGAGCTTGTGAAAGATGATGTTGTTGAGAAAGTGCAC
TaxusbaccataTXSmRNA	CTACAACCAATACTACTGATGGGTGAGCTTGTGAAAGATGATGTTGTTGAGAAAGTGCAC
kyaraTXSwhole	CTACAACCAATACTACTAATGGGTGAGCTTGTGAAAGATGATGTTGTTGAGAAAGTGCAC *****
TaxusmediaTXSmRNA	TATCCCTCAAATATGTTTGAGCTTGTATCCTTGAGCTGGCGACTAACA AAGGACACCAAA
TaxusbaccataTXSmRNA	TATCCCTCAAATATGTTTGAGCTTGTATCCTTGAGCTGGCGACTAACA AAGGACACCAAA
kyaraTXSwhole	TATCCCTCAAATATGTTTGAGCTTGTATCCTTGAGCTGGCGACTAACA AAGGACACCAAA *****
TaxusmediaTXSmRNA	ACATATCAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	ACATATCAG-----
kyaraTXSwhole	ACATATCAGTGCATTTTGAATATAATTTTTTTCTATATATAGAAACATGCCACTAAAT *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----GCTGAA AAGGCTC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----GCTGAA AAGGCTC
kyaraTXSwhole	GTCTTCATAATATGCTAACCTATTTATGTTTCTACTTGGTGAAGGCTGAA AAGGCTC *****

```

TaxusmediaTXSmRNA      GAGGACAACAAGCCTCAGGCATAGCATGCTATATGAAGGATAATCCAGGAGCAACTGAGG
TaxusbaccataTXSmRNA    GAGGACAACAAGCCTCAGGCATAGCATGCTATATGAAGGATAATCCAGGAGCAACTGAGG
kyaraTXSwhole          GAGGACAACAAGCCTCAGGCATAGCATGCTATATGAAGGATAATCCAGGAGCAACTGAGG
*****
TaxusmediaTXSmRNA      AAGATGCCATCAAGCACATATGTCGTGTTGTTGACCGGGCCTTGAAAGAAGCAAGCTTTG
TaxusbaccataTXSmRNA    AAGATGCCATCAAGCACATATGTCGTGTTGTTGACCGGGCCTTGAAAGAAGCAAGCTTTG
kyaraTXSwhole          AAGATGCCATCAAGCACATATGTCGTGTTGTTGACCGGGCCTTGAAAGAAGCAAGCTTTG
*****
TaxusmediaTXSmRNA      AATATTTCAAACCATCCAATGATATCCCAATGGGTTGCAAGTCCTTTATTTTAACTTA
TaxusbaccataTXSmRNA    AATATTTCAAACCATCCAATGATATCCCAATGGGTTGCAAGTCCTTTATTTTAACTTA
kyaraTXSwhole          AATATTTCAAACCATCCAATGATATCCCAATGGGTTGCAAGTCCTTTATTTTAACTTA
*****
TaxusmediaTXSmRNA      GATTGTGTGCCAAATCTTTACAAGTTTATAGATGGGTACGGAATCGCCAATGAGGAGA
TaxusbaccataTXSmRNA    GATTGTGTGCCAAATATTTACAAGTTTATAGATGGGTACGGAATCGCCAATGAGGAGA
kyaraTXSwhole          GATTGTGTGCCAAATCTTTACAAGTTTATAGATGGGTACGGAATCGCCAATGAGGAGA
*****
TaxusmediaTXSmRNA      TTAAGGATTATATAAGAAAAGTTTATATTGATCCAATTCAAGTATGATATATCATGTAAA
TaxusbaccataTXSmRNA    TTAAGGATTATATAAGAAAAGTTTATATTGATCCAATTCAAGTATGATATATCATGTAAA
kyaraTXSwhole          TTAAGGATTATATAAGAAAAGTTTATATTGATCCAATTCAAGTATGATATATCATGTAAA
*****
TaxusmediaTXSmRNA      ACCTCTTTTTCATAAATAATTGACTTATTATTGTATTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
TaxusbaccataTXSmRNA    ACCTTTTTTTCATAAATAATTGACTTATTATTGTATTGGCA-----
kyaraTXSwhole          ACCTTTTTTTCATAAATAATTGACTTATTATTGTATTGGCA-----
**** *****

```

図 13 TXS 遺伝子配列 アライメント

Fig.13 Genome sequence alignment of TXS entire sequences

(紫の間) 部分はイントロン 赤は開始コドン、緑は終止コドン 下線はポリ A 付加配列
開始コドン上流: 5'非翻訳領域 終止コドン下流: 3'非翻訳領域

Regions between purple boxes are introns. Red box is start codon. Green box is stop codon. Upper stream from start codon is 5' untranslated region. Down stream from stop codon is 3' untranslated.

赤字部分はテルペン環化酵素で保存性の高い配列

緑字は基質の入るポケットの蓋となる部分 活性を有するために必要な部分

Red letters are DD×D motif and (N,D)D×(S,T)××E motif conserved in terpenoid cyclase.

The role of Green letters is to 'cap' the active site and this part is necessary for catalytic activity

相同性 Taxus x media taxadiene synthase,mRNA 2610/2643(99%)

Taxus baccata taxadiene synthase,mRNA 2611/2643(99%)

kyaraTXS	MAQLSFNAALKMNALGNKAIHDPTNCRAKSEGQMMWVCSKSGRTRVKMSRSGGGPGPVVM
TaxuscuspidataTXS	MAQLSFNAALKMNALGNRAIHNPTNCRAKSEGQMMWVCSKSGRTRVKMSRSGGGPGPVVM
TaxusmediaTXS	MAQLSFNAALKMNALGNKAIHDPTNCRAKSEGQMMWVCSKSGRTRVKMSRSGGGPGPVVM *****:***:*****
kyaraTXS	MSSSTGTSKVVSETSSTIVDDIPRLSANYHGDLWHHNVIQTLETPFRESSTYQERADELV
TaxuscuspidataTXS	MSSSTGTSKVVSETSSTIVDDIPRLSANYHGDLWHHNVIQTLETPFRESSTYQERADELV
TaxusmediaTXS	MSSSTGTSKVVSETSSTIVDDIPRLSANYHGDLWHHNVIQTLETPFRESSTFQERADELV *****:*****
kyaraTXS	VKIKDMFNALGDGDISPSAYDTAWVARVATISSDGSEKPRFPQALNWVFNQLQDGSWGI
TaxuscuspidataTXS	VKIKDMFNALGDGDISPSAYDTAWVARAATISSDGSEKPRFPQALNWVFNQLQDGSWGI
TaxusmediaTXS	VKIKDMFNALGDGDISPSAYDTAWVARVATVSSDGSEKPRFPQALNWVFNQLQDGSWGI *****. ** :*****:*****
kyaraTXS	ESHFSLCDRLNNTNSVIALSVWKTGHSQVEQGTEFIAKNLKLNEEDELSPDFEIIFFPA
TaxuscuspidataTXS	ESHFSLCDRLNNTNSVIALSVWKTGHSQVEQGTEFIAENLRLNEEDELSPDFEIIFFPA
TaxusmediaTXS	ESHFSLCDRLNNTNSVIALSVWKTGHSQVEQGTEFIAENLRLNEEDELSPDFEIIFFPA ***** *****:***:*****
kyaraTXS	LLQKAKALGINLPYNLPIKSLSTTREARLTDVCAAADNIPANMLNALEGLEEVIDWNKI
TaxuscuspidataTXS	LLQKAKALGINLPYDLPIKSLSTTREARLTDVSAAADNIPANMLNALEGLEEVIDWNKI
TaxusmediaTXS	LLQKAKALGINLPYDLPIKSLSTTREARLTDVSAVADNIPANMLNALEGLEEVIDWNKI *****:*****. *. *****
kyaraTXS	MRFQSKDGSFLSSPASTACVLMNTGDEKCFTLNLLDKFGGCVPCMYSIDLLERLSLVD
TaxuscuspidataTXS	MRFQSKDGSFLSSPASTACVLMNTGDEKCFTLNLLDKFGGCVPCMYSIDLLERLSLVD
TaxusmediaTXS	MRFQSKDGSFLSSPASTACVLMNTGDEKCFTLNLLDKFGGCVPCMYSIDLLERLSLVD *****:*****
kyaraTXS	NIEHLGIGRHFQKEIKGALDYVYRHWSESGIGWGRDSLVPDLNTTALGLRTLRTHGVDVS
TaxuscuspidataTXS	NIEHLGIGRHFQKEIKGALDYVYRHWSESGIGWGRDSLVPDLNTTALGLRTLRTHGVDVS
TaxusmediaTXS	NIEHLGIGRHFQKEIKVALDYVYRHWSESGIGWGRDSLVPDLNTTALGLRTLRTHGVDVS ***** *****
kyaraTXS	SDVLNFKDENGRFFSSAGQTHVELRSVVNLFASDLAFPDEGAMDDARKFAEPYLRDAL
TaxuscuspidataTXS	SDVLNFKDENGRFFSSAGQTHVELRSVVNLFASDLAFPDEGAMDDARKFAEPYLRDAL
TaxusmediaTXS	SDVLNFKDENGRFFSSAGQTHVELRSVVNLFASDLAFPDEGAMDDARKFAEPYLRDAL *****
kyaraTXS	ATKISTNTKLFKEIEYVVEYPWHMSIPRLEARSYIDSYDDYVWQRKTLYRMPSLSNSKC
TaxuscuspidataTXS	ATKISTNTKLFKEIEYVVEYPWHMSIPRLEARSYIDSYDDYVWQRKTLYRMPSLSNSKC
TaxusmediaTXS	ATKISTNTKLYKEIEYVVEYPWHMSIPRLEARSYIDSYDDYVWQRKTLYRMPSLSNSKC *****:*****

kyaraTXS	L ELAKLDFNIVQSLHQEELKLLTRWGKESGMADINFTRHRVAEVYFSSATFEPEYSATRI
TaxuscuspidataTXS	L ELAKLDFNIVQSLHQEELKLLTRWWKESGMADINFTRHRVAEVYFSSATFEPEYSATRI
TaxusmediaTXS	L ELAKLDFNIVQSLHQEELKLLTRWWKESGMADINFTRHRVAEVYFSSATFEPEYSATRI

kyaraTXS	AFTKIGCLQVLFDDMADIFATLDELKSFTEGVKRWDTSLLEIPECMQTCFKVWFKLMEE
TaxuscuspidataTXS	AFTKIGCLQVLFDDMADIFATLDELKSFTEGVKRWDTSLLEIPECMQTCFKVWFKLMEE
TaxusmediaTXS	AFTKIGCLQVLFDDMADIFATLDELKSFTEGVKRWDTSLLEIPECMQTCFKVWFKLMEE

kyaraTXS	VNNDVVKVQGRDMLAHIRKPWELYNFCYVQEREWLEAGYIPTFEEYLKTYAISVGLGPCT
TaxuscuspidataTXS	VNNDVVKVQGRDMLAHIRKPWELYNFCYVQEREWLEAGYIPTFEEYLKTYAISVGLGPCT
TaxusmediaTXS	VNNDVVKVQGRDMLAHIRKPWELYNFCYVQEREWLEAGYIPTFEEYLKTYAISVGLGPCT

kyaraTXS	LQPIILMGELVKDDVVEKVHYPNSMFEVLSLWRLTNDTKTYQAEKARGQQASGIACYMK
TaxuscuspidataTXS	LQPIILMGELVKDDVVEKVHYPNSMFEVLSLWRLTNDTKTYQAEKARGQQASGIACYMK
TaxusmediaTXS	LQPIILMGELVKDDVVEKVHYPNSMFEVLSLWRLTNDTKTYQAEKARGQQASGIACYMK

kyaraTXS	DNPGATEEDA IKHI CRVVDRALKEASFEYFKPSNDIPMGCKSFIFNLRLCVQIFYKFIGD
TaxuscuspidataTXS	DNPGATEEDA IKHI CRVVDRALKEASFEYFKPSNDIPMGCKSFIFNLRLCVQIFYKFIGD
TaxusmediaTXS	DNPGATEEDA IKHI CRVVDRALKEASFEYFKPSNDIPMGCKSFIFNLRLCVQIFYKFIGD

kyaraTXS	YGIANEEIKDYIRKVYIDPIQV
TaxuscuspidataTXS	YGIANEEIKDYIRKVYIDPIQV
TaxusmediaTXS	YGIANEEIKDYIRKVYIDPIQV

図 14 TXS アミノ酸配列 アライメント

Fig.14 Deduced amino acid sequence alignment of TXS

赤字部分はテルペン環化酵素で保存性の高い配列

青字は基質との水素結合に関わるアミノ酸

緑字は基質の入るポケットの蓋となる部分 活性を有するために必要な部分

Red letters are DD××D motif and (N,D)D××(S,T)×××E motif conserved in terpenoid cyclase.

Blue letters are necessary amino acids to make hydrogen bond with substrate.

The role of Green letters is to ‘cap’ the active site and this part is necessary for catalytically activity

```

TaxuscupidataBAPTmRNA -----
TaxusmediaBAPTmRNA      TTATTATAAGCAGGTATAACAGCAGAGTATGCGGGGATCTTATTTTCTGA
kyaraBAPTwhole          -----

TaxuscupidataBAPTmRNA -----ATGAAGAAGACAGGTTG
TaxusmediaBAPTmRNA      AAGCTTAATCCGCTCTGTTCTGAATACTTAGAGATGAAGAAGACAGGTTG
kyaraBAPTwhole          -----ATGAAGAAGACAGGTTG
                               *****

TaxuscupidataBAPTmRNA      GTTTCAGAGTTCATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGT
TaxusmediaBAPTmRNA      GTTAGCAGAGTTCATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGT
kyaraBAPTwhole          GTTAGCAGAGTTCATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGT
                               *** *****

TaxuscupidataBAPTmRNA      GCCTGCCTTGGCCAAAACAATCCTCCCTCTCTCGCCATTGACAACATG
TaxusmediaBAPTmRNA      GCCTGCCTTGGCCAAAACAATCCTCCCTCTCTCGCCATTGACAACATG
kyaraBAPTwhole          GCCTGCCTTGGCCAAAACAATCCTCCCTCTCTCGCCATTGACAACATG
                               *****

TaxuscupidataBAPTmRNA      GCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAG
TaxusmediaBAPTmRNA      GCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAG
kyaraBAPTwhole          GCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAG
                               *****

TaxuscupidataBAPTmRNA      AGTCTCTGCAGATCCTGAAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGGTGC
TaxusmediaBAPTmRNA      AGTCTCTGCAGATCCTGAAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGGTGC
kyaraBAPTwhole          AGTCTCTGCAGATCCTGAAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGGTGC
                               *****

TaxuscupidataBAPTmRNA      TGGTTTATTATTACCCTTTTGTGGGGGCTCAGAAATAAGAAAATGGG
TaxusmediaBAPTmRNA      TGGTTTATTATTACCCTTTTGTGGGGGCTCAGAAATAAGAAAATGGG
kyaraBAPTwhole          TGGTTTATTATTACCCTTTTGTGGGGGCTCAGAAATAAGAAAATGGG
                               *****

TaxuscupidataBAPTmRNA      GAACTTGAAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCAT
TaxusmediaBAPTmRNA      GAACTTGAAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCAT
kyaraBAPTwhole          GAACTTGAAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCAT
                               *****

TaxuscupidataBAPTmRNA      GGCTGACAGCGACCTTTTCAGTCTTAACAGATCTGGATAACTACAATCCAT
TaxusmediaBAPTmRNA      GGCTGACAGCGACCTTTTCAGTCTTAACAGATCTGGATAACTACAATCCAT
kyaraBAPTwhole          GGCTGACAGCGACCTTTTCAGTCTTAACAGATCTGGATAACTACAATCCAT
                               ***** *****

```

Taxus cuspidata BAPTmRNA	CGTTTCAGCAGTTGATTTTTTCTCTACCACAGGATACAGATATTGAGGAC
Taxus media BAPTmRNA	CGTTTCAGCAGTTGATTTTTTCTCTACCACAGGATACAGATATTGAGGAC
kyara BAPTwhole	CGTTTCAGCAGTTGATTTTTTCTCTACCACAGGATACAGATATTGAGGAC *****
Taxus cuspidata BAPTmRNA	CTCCATCTCTTGATTGTTTCAG-----
Taxus media BAPTmRNA	CTCCATCTCTTGATTGTTTCAG-----
kyara BAPTwhole	CTCCATCTCTTGATTGTTTCAGGATTATATGGCTGGTTTGATATTGGG *****
Taxus cuspidata BAPTmRNA	-----
Taxus media BAPTmRNA	-----
kyara BAPTwhole	TAACTTGAATGATGTCTCTATTAATGGTTACATACGTGTTTCTATTGAC
Taxus cuspidata BAPTmRNA	-----GTAACTCGTT
Taxus media BAPTmRNA	-----GTAACTCGTT
kyara BAPTwhole	AGCATGCTTGTGTTCTTTGTTGCATGTCTTTTATGCAGGTAACTCGTT *****
Taxus cuspidata BAPTmRNA	TTACATGTGGGGTTTTGTTGTGGGAGCGAATGTGTATGGTAGTGCATGC
Taxus media BAPTmRNA	TTACATGTGGGGTTTTGTTGTGGGAGCGAATGTGTATGGTAGTGCATGC
kyara BAPTwhole	TTACATGTGGGGTTTTGTTGTGGGAGCGAATGTGTATGGTAGTGCATGC *****
Taxus cuspidata BAPTmRNA	GATGCAAAGGATTTGGCCAGTTTCTTCAAAGTATGGCAGAGATGGCGAG
Taxus media BAPTmRNA	GATGCAAAGGATTTGGCCAGTTTCTTCAAAGTATGGCAGAGATGGCGAG
kyara BAPTwhole	GATGCAAAGGATTTGGCCAGTTTCTTCAAAGTATGGCAGAGATGGCGAG *****
Taxus cuspidata BAPTmRNA	AGGAGAGGTTAAGCCCTCGATTGAACCGATATGGAATAGAGA ACTGGTGA
Taxus media BAPTmRNA	AGGAGAGGTTAAGCCCTCGATTGAACCGATATGGAATAGAGA ACTGGTGA
kyara BAPTwhole	AGGAGAGGTTAAGCCCTCGATTGAACCGATATGGAATAGAGA ACTGGTGA *****
Taxus cuspidata BAPTmRNA	AGCTAGA A CATTGTATGCCCTTCCGGATGAGTCATCTTCAAATTATACAT
Taxus media BAPTmRNA	AGCTAGA A CATTGTATGCCCTTCCGGATGAGTCATCTTCAAATTATACAC
kyara BAPTwhole	AGCTAGA A CATTGTATGCCCTTCCGGATGAGTCATCTTCAAATTATACAC *****
Taxus cuspidata BAPTmRNA	GCACCTGTAATTGAGGAGAAATTTGTTCAAACATCTCTGTTATAAACTT
Taxus media BAPTmRNA	GCACCTGTAATTGAGGAGAAATTTGTTCAAACATCTCTGTTATAAACTT
kyara BAPTwhole	GCACCTGTAATTGAGGAGAAATTTGTTCAAACATCTCTGTTATAAACTT *****

TaxuscupidataBAPTmRNA	TGAGATAATAAATCATATCAGACGACGCATCATGGAAGAACGCAAAGAAA
TaxusmediaBAPTmRNA	TGAGATAATAAATCATATCAGACGACGCATCATGGAAGAATGCAAAGAAA
kyaraBAPTwhole	TGAGATAATAAATCATATCAGACGACGCATCATGGAAGAATGCAAAGAAA *****
TaxuscupidataBAPTmRNA	GTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAGCATTGGTTTGGCTAGCAAAGATA
TaxusmediaBAPTmRNA	GTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAGCATTGGTTTGGCTAGCAAAGATA
kyaraBAPTwhole	GTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAGCATTGGTTTGGCTAGCAAAGATA *****
TaxuscupidataBAPTmRNA	AAGGCTTTCAAATTCACATAGTGAGAATGTGAAGCTCTTTTTGCAAT
TaxusmediaBAPTmRNA	AAGGCTTTCAAATTCACATAGTGAGAATGTGAAGCTCTTTTTGCAAT
kyaraBAPTwhole	AAGGCTTTCAAATTCACATAGTGAGAATGTGAAGCTCTTTTTGCAAT *****
TaxuscupidataBAPTmRNA	GGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCCTCTCCACATGGATACTATGGCA
TaxusmediaBAPTmRNA	GGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCCTCTCCACATGGATACTATGGCA
kyaraBAPTwhole	GGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCCTCTCCACATGGATACTATGGCA *****
TaxuscupidataBAPTmRNA	ATGCCTTTGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGT
TaxusmediaBAPTmRNA	ATGCCTTTGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGT
kyaraBAPTwhole	ATGCCTTTGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGT *****
TaxuscupidataBAPTmRNA	GGATCTCTTTTGC GCACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTT
TaxusmediaBAPTmRNA	GGATCTCTTTTGC GCACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTT
kyaraBAPTwhole	GGATCTCTTTTGC GCACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTT *****
TaxuscupidataBAPTmRNA	ACACAAAGAACTCAACTCAAAAACCGTGATGAGCTCATCTGTAGTAGATG
TaxusmediaBAPTmRNA	ACACAAAGAACTCAACTCAAAAACCGTGATGAGCTCGTCTGTAGTAGATG
kyaraBAPTwhole	ACACAAAGAACTCAACTCAAAAACCGTGATGAGCTCGTCTGTAGTAGATG *****
TaxuscupidataBAPTmRNA	TCAATACGAAGTTTGAAGATGTAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCT
TaxusmediaBAPTmRNA	TCAATACGAAGTTTGAAGATGTAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCT
kyaraBAPTwhole	TCAATACGAAGTTTGAAGATGTAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCT *****
TaxuscupidataBAPTmRNA	ATATATTATGAAGTGGACTTTGGGTGGGGAGATGCAATGAACGTGAGCAC
TaxusmediaBAPTmRNA	ATATATTATGAAGTGGACTTTGGGTGGGGAGATGCAATGAACGTGAGCAC
kyaraBAPTwhole	ATATATTATGAAGTGGACTTTGGGTGGGGAGATGCAATGAACGTGAGCAC *****

TaxuscuspidataBAPTmRNA	TATGCTACAACAACAGGAGCAGGAGAAATCTCTGCCAACTTATTTTTCTT
TaxusmediaBAPTmRNA	TATGCTACAACAACAGGAGCAGGAGAAATCTCTGCCAACTTATTTTTCTT
kyaraBAPTwhole	TATGCTACAACAACAGGAGCAGGAGAAATCTCTGCCAACTTATTTTTCTT *****
TaxuscuspidataBAPTmRNA	TCCTACAATCTACTAAGAACATGCCAGATGGAATCAAGATGCTAATGTTT
TaxusmediaBAPTmRNA	TCCTACAATCTACTAAGAACATGCCAGATGGAATCAAGATGCTAATGTTT
kyaraBAPTwhole	TCCTACAATCTACTAAGAACATGCCAGATGGAATCAAGATGCTAATGTTT *****
TaxuscuspidataBAPTmRNA	ATGCCTCCATCAAACACTGAAAAATTCAAATGAAATAGAAGCTATGAT
TaxusmediaBAPTmRNA	ATGCCTCCATCAAACACTGAAACATTCAAATGAAATAGAAGCTATGAT
kyaraBAPTwhole	ATGCCTCCATCAAACACTGAAACATTCAAATGAAATAGAAGCTATGAT ***** *****
TaxuscuspidataBAPTmRNA	AAAAAATATGTGACTAAAGTGTGTCGGTCAAAGTTATGA-----
TaxusmediaBAPTmRNA	AAACAAATATGTGACTAAAGTGTGTCGGTCAAAGTTATGAATGTGTGAC
kyaraBAPTwhole	AAACAAATATGTGACTAAAGTGTGTCGGTCAAAGTTATGAATGTGTGAC *** *****
TaxuscuspidataBAPTmRNA	-----
TaxusmediaBAPTmRNA	TAGAAAACAATATTCTTGACTTTATGTATTCCGATTTCCAATAACATCTA
kyaraBAPTwhole	TAGAAAACAATATTCTTGACTTTATGTATTCCGATTTCCAATAACATCTA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	-----
TaxusmediaBAPTmRNA	GCCACGTTTAATAGCAATATATTTTTCGTGTTTACAAAAAAAAAAAAAAAA
kyaraBAPTwhole	GCCACGTTTAATAGCAATATATTTTTCGTGTTT-----
TaxuscuspidataBAPTmRNA	-----
TaxusmediaBAPTmRNA	AAAAAAAAAAAAAAAA
kyaraBAPTwhole	-----

図 15 BAPT 遺伝子配列 アライメント 赤字：アシル基転移酵素で保存性の高い配列

Fig.15 Genome sequence alignment of BAPT entire sequences Red letters are gene sequences
corresponding to conserved motif in acyl transferase

(紫の間) 部分はイントロン 赤は開始コドン、緑は終止コドン 下線はポリ A 付加配列
開始コドン上流：5'非翻訳領域 終止コドン下流：3'非翻訳領域

Regions between purple boxes are introns. Red box is start codon. Green box is stop codon. Upper
stream from start codon is 5' untranslated region. Down stream from stop codon is 3' untranslated.

Taxus x media phenylpropanoyltransferase (BAPT) mRNA, complete cds.

前半 exon 部分 440/440 (100%) 後半 exon 部分 903/903 (100%)

Taxus cuspidata phenylpropanoyltransferase mRNA, complete cds.

前半 exon 部分 438/440 (99%) 後半 exon 部分 895/903 (99%)

```

kyaraBAPT      MKKTGSLAEFHVNMIERVMVRPCLPSPKTIPLSAIDNMARAFSNVLLVYAANMDRVSAD
TaxusmediaBAPT MKKTGSLAEFHVNMIERVMVRPCLPSPKTIPLSAIDNMARAFSNVLLVYAANMDRVSAD
TaxuscuspidataBAPT MKKTGSAEFHVNMIERVMVRPCLPSPKTIPLSAIDNMARAFSNVLLVYAANMDRVSAD
*****:*****
kyaraBAPT      PAKVIREALSKVLVYYYPFAGRLRNKENGEELECTGGGVLFLEAMADSDLSVLTDLNDY
TaxusmediaBAPT PAKVIREALSKVLVYYYPFAGRLRNKENGEELECTGGGVLFLEAMADSDLSVLTDLNDY
TaxuscuspidataBAPT PAKVIREALSKVLVYYYPFAGRLRNKENGEELECTGGGVLFLEAMADSDLSVLTDLNDY
*****
kyaraBAPT      NPSFQQLIFSLPQDIEDLHLLIQVTRFTCGGFVVGANVYGSTCDAKFGGFLQGMAE
TaxusmediaBAPT NPSFQQLIFSLPQDIEDLHLLIQVTRFTCGGFVVGANVYGSTCDAKFGGFLQGMAE
TaxuscuspidataBAPT NPSFQQLIFSLPQDIEDLHLLIQVTRFTCGGFVVGANVYGSACDAKFGGFLQSMAE
*****:*****
kyaraBAPT      MARGEVKPSIEPIWNRELVKLEDCMPFRMSHLQIIHAPVIEEKVQTSLVINFEIINHIR
TaxusmediaBAPT MARGEVKPSIEPIWNRELVKLEDCMPFRMSHLQIIHAPVIEEKVQTSLVINFEIINHIR
TaxuscuspidataBAPT MARGEVKPSIEPIWNRELVKLEHDCMPFRMSHLQIIHAPVIEEKVQTSLVINFEIINHIR
*****
kyaraBAPT      RRIMEECKESLSSFEIVAALVWLAKIKAFQIPHSENVKLLFAMDLRFSNPPLPHGYGN
TaxusmediaBAPT RRIMEECKESLSSFEIVAALVWLAKIKAFQIPHSENVKLLFAMDLRFSNPPLPHGYGN
TaxuscuspidataBAPT RRIMEERKESLSSFEIVAALVWLAKIKAFQIPHSENVKLLFAMDLRFSNPPLPHGYGN
*****
kyaraBAPT      AFGIACAMDNVHDLLSGSLLRTIMI IKKSKFSLHKELNSKTMSSSVVDVNTKFEDVVS I
TaxusmediaBAPT AFGIACAMDNVHDLLSGSLLRTIMI IKKSKFSLHKELNSKTMSSSVVDVNTKFEDVVS I
TaxuscuspidataBAPT AFGIACAMDNVHDLLSGSLLRTIMI IKKSKFSLHKELNSKTMSSSVVDVNTKFEDVVS I
*****
kyaraBAPT      SDWRHSIYYEVDDFGWGDAMNVSTMLQQQEHEKSLPTYFSFLQSTKNMPDGIKMLFMPPS
TaxusmediaBAPT SDWRHSIYYEVDDFGWGDAMNVSTMLQQQEHEKSLPTYFSFLQSTKNMPDGIKMLFMPPS
TaxuscuspidataBAPT SDWRHSIYYEVDDFGWGDAMNVSTMLQQQEHEKSLPTYFSFLQSTKNMPDGIKMLFMPPS
*****
kyaraBAPT      KLKTFKIEIEAMINKYVTKVCP SKL
TaxusmediaBAPT KLKTFKIEIEAMINKYVTKVCP SKL
TaxuscuspidataBAPT KLKFKIEIEAMIKKYVTKVCP SKL
***.*****:*****

```

図 16 BAPT アミノ酸配列アライメント 赤字はアシル基転移酵素に保存性の高い配列

Fig.16 Deduced amino acid sequence alignment of BAPT.

Red letters are conserved motif in acyl transferase

AAAAAAAAAATTCCCTTGTCTGGTGTTTTAAAAATGGGGATGTTACACTTGTGAGTTGATAITAGGTTTTTAATAAT
 CTCAAAATGAACCGAATATATTTCCCATATTAAGGGGTATAGGGGTTAAAGAATAAAGGTTTTTAAAAACATATT
 GGGGGTGGGTTACGTGAGTGGTATGAAGGAGGGATGAGGAATCGTGGAGATGAGGAATCGTGGAGCAGATGAATA
 AGCCCTAAATTTACATCATTTTCATTGTGTGTGTTTTTCAAAGCTGTGACATGGTTTCTAGAGAAGCTATATATTTCTT
 CATAGTAATGGCACTAGCTAACTCGCAATAGCTAGGACATCTTTCATAGTATCAATTTTAAGGTATATTTTTTGTGATT
 TGATTCAATTTTTGTAGGAGAATGGATGTCATGAAGATTAATAAAATTTAACTGACAAGAATGCAGCCACACTTGACCT
 TTACCGTTACTATACAGAGTTTGATTAGTGTGACAAATATAAGATAAGGAAAAGGAAGAGAGACATCAAATTACACA
 TATTAAGGGTATCTACCTTTCAAGTCCAATATGATTTGCATCAAGTTTTAAAGTGGAGTTACATAATTAATAATTTGTG
 AAAATGTAAAGATATTAAATAAAGACTGAAGAGGTGGACATAAAGAGGGTATAATAAATGTCATAAGAAAATGAGTA
 GTTTGATATGTGGTAAAATAAGGAGTATTTAATAATTGAAAATTTGTATTGGTCGTGGGTGTGACTTTTTAAAGATT
 GAGATAGATTTGAAAATATGAGTATTATTAATATCCTGTGAATGCATATGATAGCAATAATTTGATAGCGAA
 TCCCTCGTGACTTTTCAAGTTATCTTCAAAGTCCAATGCCTCAAGAATATGTGCATCACCCCTTTCTCTTTCAAAGG
 TTCATAAAATGACAAGTGTCCGTATGTGACTAACTAGAAAGAAAGACGTTGAGCTACGATCCATCCAAAT
 TCTCTACCATTGAAAATTCATGCTTCAACCCCTTCTTGTACCCTACTTCTTGTCAATGTTTCAACTTCACACCT
 TTAACTTAACTTAACTTAACTTCTTCAATGCCTCCCTATCAACATATCCATTACATTGCTTTGATCTAATTGCTAATA
 TCTATAACTCTCTAAAAATATAGTGGTGAACGACGAAGATCATGTTATGCATCAACAACACGCCACTACCAATCTT
 CATCGTCCACTATCTACTTTGAAAATACCTCTCAACACAAAATAAGCAATAACAAGCACGAGTGCCACTAAAAGA
 GCGCCTAGACCATAAAAAGTATAAAAAATAACGCATTAAGAATTAAAAACGATTTGTTTGTAGTAATTACCTAAA
 ATAGAAACGAGTCAAGAGGGAATCTTTTTGGATTTTTCGAGACAATAACTATTGTTTTATATAACTATTTAAAT
 ATTTTCTCTCTCGAAAAGTGTCTAAAAACGTGATGTTTTAAGAGGGGAAGATGGAACGTTGGAAAATGCTGCGG
 GCAAGTGAATGGGCGTCGTCAGATCAAAAATGAATATCTGATTAACACGTGATGCGCCTGCCCTGACTTA
 CTTCACTCACTGCCACCTTATTTAAAGTGGTCTCCATACCATTGAAGACGTGTCCAACCTCAGCATTGATTGGCAT
 TTGCAATTTGGAATTCGTAATTCAGTAGTCCCTGCCTCTCTGCAGAA

図 10 TXS 遺伝子上流配列と転写調節シス因子分析

Fig.10 The 5'-flanking sequence of TXS and prediction of cis element

下線:TATA Box Under line:TATA Box

GATABOX 配列:GATA 光応答性配列 sequence:GATA light response cis element

GT1cosensus 配列 配列:GRWAAW R=A/G; W=A/T 光応答性
sequence:GRWAAW light response cis element

ABRE=EBOX 配列:ACGTG アブシジン酸応答配列
sequence:ACGTG abscisic acid response cis element

GCCBOX 配列 GCCGCC エチレン応答配列
sequence:GCCGCC ethylene response cis element

WBOX 配列 TTGAC 病害抵抗性 エリシターとサリチル酸応答性
sequence:TTGAC disease resistance pathgene elicitor salicylic acid response cis element

CAATBOX 配列 CAAT 転写調節 sequence: CAAT transcription regulatory element

GACCA **ACGTG** **AGAAAAACCA** AATAATCACCATCTATTTTGTAAGCAGTTTTGCAAGGTTCTTACT
 CTCATAGATTAATAAACAGAATGTTTCGGGAACTGTGCTAAACGGAGCTCTCGCTAATAACCGTCTA
 AAAAT **CAAT**GCCAACAAACA **GATAAA** TCTATAACCCTCATTTTACTATATGCAAATTAATTGATTGGGA
 TTTGTATCTGTATCTGAAGCGGGTT **CAAT** TGTCTCTAAGAGG **AAACCA** CTGCCTGTCCTGTTTGGATTG
ACGCTAAAACATTTCCCGCGGCCAGGTCAGGGCACAGTTACGCC **ACGTG**GGTCTGTCTGGCTAGGGAG
 GAGGGAATGCTCCACGTTGCAACATTTATTGGATTTCATATTCCTGTTTTTATC **GGTAAT**AGAGTTCGAAG
 TGTATTTATAGGTTTGTGTTTGT **GAAAAA**ATAACTATGCGTCAAATTATTTCCACGCAAATTATGCCTAT
 TCACATTCCTATTGACAAATAATAATATTAATCAAGCACATGAAGCTGTTTTTTAATTATTTAATTCTA
 AATTGTGTGTTTTT **GAAAAATGAAAAAT**TTCAACCTA **GGAAAAAT**TTATTGTTTTAAATTATATAGCTAGCTA
 TATAATAATTATTTTTCTAAAATAGATTTAAAGTACTTAAATTAACAAAAAACATAATTATGTTGTT **C**
AATTGTATCTGAATGCTCCACATTACAACATTTATTAGATTTATATCCCCTTTTATCCGTTTTTCTTTTG
 TGATA **CAT** **CAAT**TCTCTTGATCTAATTTTTCTTCTCCGTTGCATCCCTTCAACATTCACATCATACT
 AACATACTATTGCTAATTCTTAGTCTTGTGAATACATCTGTGATCCATCTTCTGAATAAATGAATCACAT
 AGTGTC **CAAT**CGTCCGTAATGAGCATTAAACAAAAGTTT **GGAAAAAT**GGTAAATTTAATATATAATTCTG
GAAAAACTGTTAACGTCCTCCGGTTGAATATGGGGCCTCCATCGTTTCTTAATTTGGCTGTTTCGCTGAT
 GGAATATAGACACATGTGAGTAATCACTGGCCCATGTT **CAAT**GTATCATTTCCCTACATAAA **CAATTA**
 TCCAGCTGCT **CAAT**TCCCATCC TATTTTCTGAAAGCTTT **TCCTCTGTTCTGAATACTTAGAG**

図 11 BAPT 遺伝子上流配列と転写調節シス因子分析

Fig.11 The 5'-flanking sequence of BAPT and prediction of *cis*-acting element

下線:イニシエーター配列 Under line:Initiator sequence

GATABOX 配列:GATA 光応答性配列 sequence:GATA light response *cis*element

GT1cosensus 配列:GRWAAW R=A/G; W=A/T 光応答性
 sequence:GRWAAW light response *cis* element

ABRE=EBOX 配列:ACGTG アブシジン酸応答配列
 sequence:ACGTG abscisic acid response *cis*element

MYB 結合領域 配列 WAACCA 水ストレス脱水応答配列
 sequence:WAACCA dehydration response element

WBOX 配列 TTGAC 病害抵抗性 エリシターとサリチル酸応答性
 sequence:TTGAC disease resistance pathgene elicitor salicylic acid response *cis* element

CAATBOX 配列 CAAT 転写調節 sequence: CAAT transcription regulatory element

参考文献

Brown R.L., Kazan K., McGrath K.C., Maclean D.J., Manners J.M. (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 132:1020-1032

Cao, R. et al. (2010) Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold. *Proteins Struct.Funct. Bioinf.* 78: 2417–2432 .

Chang W.C., Lee T.Y., Huang H.D., Huang H.Y., Pan R.L. (2008) PlantPAN (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/gene_group/index.php) ; plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene group. *BMC Genomics* 9:561

Christianson D.W. (2006) Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* 106: 3412–3442

Christianson, D.W. (2008) Unearthing the roots of the terpenome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12: 141–150

Deraporta S.L., Wood J., Hicks J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1(4): 19-21.

Hampel D., Christopher J.D., Mau R.B., Croteau R. (2009) Taxol biosynthesis: Identification and characterization of two acetyl CoA:taxoid-O-acetyl transferases that divert pathway flux away from Taxol production. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 487 : 91–97

Hefner J., Ketchum R.E.B., Croteau R. (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production. *Arch. Biochem. Biophys.* 360:62–74.

Jennewein S., Rithner C., Williams R., Croteau R. (2001) Taxol biosynthesis: taxane 13a-hydroxylase is a cytochrome P450- dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13595–13600.

Jin Q., Williams D. C., Hezari, M., Croteau R., Coates R. M. (2005) Stereochemistry of the macrocyclization and elimination steps in taxadiene biosynthesis through deuterium labelling. *J. Org. Chem.* 70: 4667–4675

Koksal M., Jin Y., Coates R.M., Croteau R., Christianson D.W. (2011) Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature* 469:116-120

Lam E., Chua N.H. (1989) ASF-2: A factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in cab promoters. *Plant Cell* 1:1147-1156

Lesburg C.A., Zhai G., Cane D.E., Christianson D.W. (1997) Crystal structure of pentalenene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* 277: 1820–1824

Lin X., Hezari M., Koeppe A.E., Floss H.G., Croteau, R. (1996) Mechanism of taxadiene synthase, a diterpene cyclase that catalyzes the first step of Taxol biosynthesis in Pacific yew. *Biochemistry* 35: 2968–2977

NaWarathne I.N., Walker K.D. (2009) Point Mutations (Q19P and N23K) Increase the Operational Solubility of a 2 α -O-Benzoyltransferase that Conveys Various Acyl Groups from CoA to a Taxane Acceptor. *J. Nat.Prod.*73:151-159

Schoendorf A., Rithner C.D., Williams R.M., Croteau R. (2001) Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1501–1506.

Simpson S.D., Nakashima K., Narusaka Y., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* 33: 259-270

Stalberg K., Ellerstom M., Ezcurra I., Ablov S., Rask L. (1996) Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta* 199:515-519

Starks C.M., Back K., Chappell J., Noel J.P. (1997) Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-*epi*-aristolochene synthase. *Science* 277, 1815–1820

Steele C.L., Chen Y., Dougherty B.A., Li W., Hofstead S., Lam K.S., Xing Z., Chiang S.J. (2005) Purification, cloning, and functional expression of phenylalanine aminomutase: the first committed step in Taxol side-chain biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 438 (1):1-10

田村隆明 (1997) 遺伝子工学実験ノート(上) 羊土社:pp64

Terzaghi W.B., Cashmore A.R. (1995) Light-regulated transcription *Annu. Rev. Plant. Physiol Plant Mol Biol* 46:445-474

Walker K., Croteau R. (2000a) Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA:taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13591–13596.

Walker K., Schoendorf A., Croteau R. (2000b) Molecular cloning of a taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α -ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 374:371–380.

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. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:12715–12720.

Walker K., Klettke K., Akiyama T., Croteau R. (2004) Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. *J Biol Chem* 279:53947–53954.

Wendt K.U., Schulz G.E. (1998) Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure* 6: 127–133

Wendt K.U., Poralla K., Schulz G.E. (1997) Structure and function of a squalene cyclase. *Science* 277: 1811–1815

Wendt K.U., Schulz G.E., Corey E.J., Liu D.R. (2000) Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 2812–2833

Whittington D.A. et al. (2002) Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99:15375–15380.

Wildung M.R., Croteau R. (1996) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem* 271:9201–9204

Williams D.C. et al. (2000) Heterologous expression and characterization of a 'pseudomature' form of taxadiene synthase involved in paclitaxel (Taxol) biosynthesis and evaluation of a potential intermediate and inhibitor of the multistep diterpene cyclization reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 379: 137–146

Williams D.C. et al. (2000) Intramolecular proton transfer in the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to the taxadiene precursor of taxol catalyzed by recombinant taxadiene synthase. *Chem. Biol.* 7: 969–977

第3章 タキソイド生成能を有する 新規植物の探索

第3章 タキソイド生成能を有する新規植物の探索

3-1 緒言

タキソールを始めとしたタキソイド類はこれまでイチイ属樹木特有の二次代謝物と考えられてきた。そのため、タキソールの供給のためにイチイが乱獲され、その保全が問題となることもあった。そこで、タキソイドを生産する新規植物を探索することで、タキソールおよび前駆物質 **Baccatin III** の供給源の選択性を高めることは大変意義深いと考えられる。特に、日本での供給を堅固なものとするを考えれば、日本の生育環境に適した日本特有の樹木が望ましい。

そこで、イチイ属以外で唯一のイチイ科樹木であり、日本固有の樹木であるカヤ(*Torreya nucifera*)に着目し、生合成関連酵素遺伝子の解析並びに代謝物の解析に基づき、そのタキソイド生成能について調べた。

3-2 実験

3-2-1 カヤのタキソール生成関連酵素遺伝子の存在確認

植物材料

本研究では、試料として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カヤの葉を使用した。

ゲノム DNA の調製

材料として用いたカヤの葉を材料として、2-2-1 の場合と同様に **Phytopure plant DNA extraction kit**(GEヘルスケア社)を用いて、メーカーの標準プロトコールにしたがい、ゲノム抽出を行った。

プライマーの設計及び PCR 条件

現在推定されているタキソール生合成経路を Fig. 1 に示した。またその生合成経路上で既知のタキソイド生成関連酵素のうち GGPPS(geranylgeranyldiphosphatesynthase), TXS(taxadienesynthase), TaH(taxadiene 13 α -hydroxylase), BAPT(3-amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transeferase) の計 4 種類の酵素遺伝子のプライマーを、塩基配列既知の *Taxus x media*、*Taxus brevifolia* の塩基配列を基に作成した(Hefner ら 1998, Wildung and Croteau 1996, Jennwein ら 2001, Walker ら 2002a)。DNA polymerase は ExTaq DNA polymerase(Takara 社)を用い、PCR 反応槽は Gene Amp2700(ABI 社)を使用した。温度サイクルは、94°C-2'-(94°C-30"、各アニール温度にて-30"、72°C-2') \times 30 サイクル-72°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。

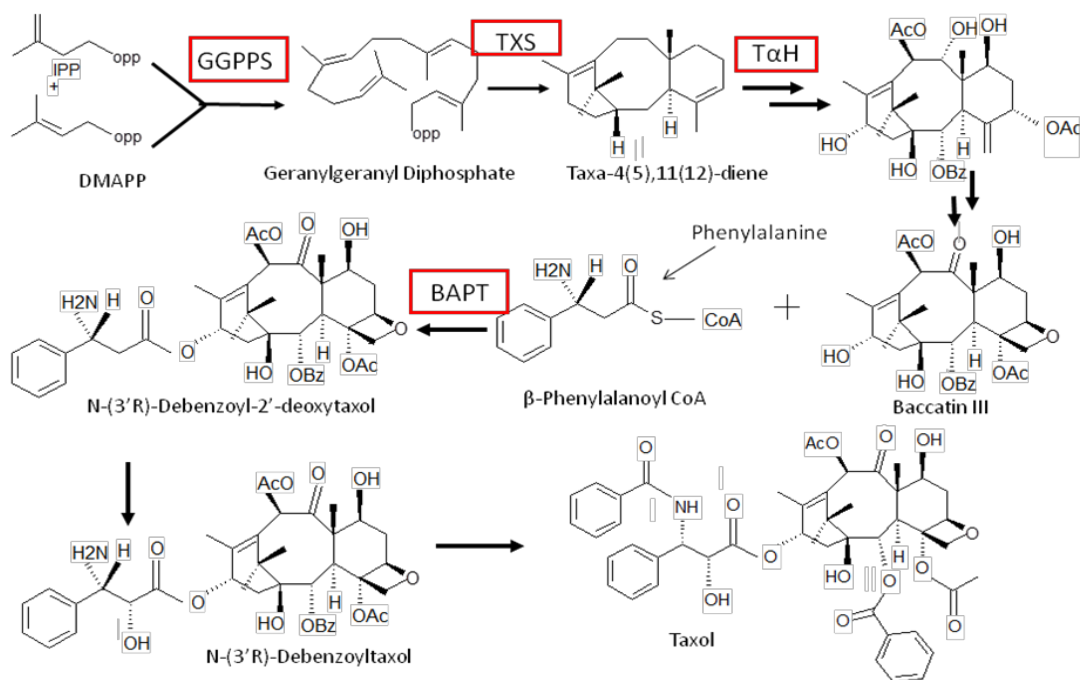


図 1 タキソール生合成経路と今回調べたタキソール生成酵素

Fig. 1 Taxol biosynthetic pathway and enzymes

GGPPS(geranylgeranyl diphosphate synthase)

TXS(taxadiene synthase)

TαH (taxadiene 13α-hydroxylase)

BAPT(3-amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transferase)

表 1 プライマー配列とアニール温度

Table 1 Primer sequences and annealing temperature

酵素名 Enzyme name	配列 Primer sequence	アニール温度 Annealing temperature
GGPPS F	agcccacaaatcacaaggtc	56°C
GGPPS R	ccgaattctcgcaatctcat	
TXS F	agcactggcactagcaaggt	53°C
TXS R	attcgatacccatgatcca	
BAPT F	atccgctctgttctgaatac	53°C
BAPT R	ggtcctcaatatctgtatcc	
Tα H F	ggtaaaagacctcgtcttccgctcg	57°C
Tα H R	tctcctgtccgccagtgaattcc	

F:forward,R:reverse

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

2章の場合と同様に、PCR産物をアガロースゲル電気泳動確認後、TAクローニングを行い、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、陽性クローンの絞り込みを行った。陽性クローンでは、プリズム310DNA解析装置(ABI社)を用いて塩基配列の解析を行った。また、得られた塩基配列に対してDDBJ(DNA Data Base of Japan)のBLAST検索を用いて、既知のものとの相同性を調べた。

ドットブロットハイブリダイゼーション

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ブロットハイブリダイゼーションを行った。

カヤの葉から抽出したDNA溶液をナイロントランスファーマンブレンHybond-N+(Amersham社)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ヘルスケア社)を用いて、*Taxus brevifolia*の塩基配列をもとに作成したTXSのプローブ(Table 2)にアルカリホスホターゼを標識し、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、CDP-Star化学発光薬品を用いて、ジオキセタン誘導体基質とプローブに標識したアルカリホスホターゼの反応を検出するため、一晚露光して、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ヘルスケア社)を用いた。

表2 ドットブロットハイブリダイゼーションに用いたプローブ

Table 2 Sequences of probe for dot blot hybridization

TXS1	aatgcagcgcctgaagatgaatgcattggggaacaaggcaatccacgatccaa(52bp)
TXS2	cgaattgcagagccaaatctgaggggcaaatgatgtgggtttgtccaaatcagggcgaaccagagtaaaa atgtcgagaggaagtgggtgctctgggtcc(100bp)
TXS3	tgctgtaatg atgagcagta gcaactggcac tagcaaggtg gtttccgaga cttccagtac(60bp)

サザンブロットハイブリダイゼーション

カヤの葉から抽出した 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×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、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)のプロトコールに従い、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、Table3 に示したプライマー(BAPT 遺伝子由来のプライマーに関しては F1,R1 の組み合わせのみ)を用いて PCR を行い、その PCR 産物(TXS 遺伝子 877bp、BAPT 遺伝子 444bp、TαH 遺伝子 311bp) 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。

ゲル抽出と PCR 解析

カヤの葉から抽出した DNA を *Hind*III と *Eco*R 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、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、Table3 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。

次に得られた 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* DH5α(TAKARA 社)を用い、アンピシリン(100μg/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)に委託して配列を取得した。

表 3 プローブ作成およびゲル抽 PCR に用いたプライマー

Table 3 Primers specific for taxol biosynthetic enzymes

TXSF1	agcactggcactagcaaggt
TXSR2	attcgataccatgatcca
TXSF2	atgcatcga ttgcttaaac
TXSR2	tccagcagat cgatggaatac
BAPTF1	atccgctctg ttctgaatac
BAPTR1	ggctctcaat atctgatcc
BAPTF2	acgacgcatc atggaagaat
BAPTR2	agtgctcacg ttattgcat

F: forward, R: reverse

GenomeWalker Universal kit を用いたクローニング

2章の場合と同様に、カヤの DNA を *Dra* I, *Eco*R V, *Pvu*II, *Stu* I の 4 種類の平滑末端制限酵素で切断し、GenomeWalker Universal kit を用いて、Fig.2 に示すアダプターを付加したのち、アダプタープライマーと TXS, BAPT の部分配列より作製した特異的なプライマーを用いて、Fig.3 の条件で PCR を行った。この PCR 産物の結果を電気泳動で確認し、オペロン社のシーケンス解析サービスに委託してその配列を取得した。



図 2 アダプター配列 アンダーラインは AP1 配列 ()内配列が AP2 配列

Fig.2 Sequence of the adaptor and adaptor primers

AP1, AP2 の PCR の条件 :	94°C	25sec	} × AP1 7cycle
	72°C	3min	
	94°C	25sec	} × AP1 36cycle
	67°C	3min	
	67°C	7min	
	4°C	∞	

図 3 Genome Walker kit の PCR 条件

Fig.3 Condition of PCR cycle for Genome Walker kit

3-2-2 カヤの葉の成分分析

タキソールの存在を確認するために、カヤの葉のから成分を抽出して HPLC で分析を行った。また、イチイ属樹木のイチイとキャラボクの成分分析も同様に行い、比較検討の対象とした。

分析サンプル調整

採取してきたイチイ、キャラボク、カヤの葉をシリカゲル入りのナイロンバッグに入れ乾燥させた。乾燥した葉を液体窒素で凍結させたのち、乳鉢・乳棒で粉末状にして、1g に対して 6ml のメタノールに浸漬した。その後、9500rpm で 5 分間遠心分離を行い、メタノール層を回収し、エバポレーターを用いて、デシケーター内でメタノールを飛ばした。次に、乾固させたサンプルを滅菌水 500 μ l とクロロホルム 500 μ l で溶出し、クロロホルム層を回収した。先ほどと同様にデシケーター内でクロロホルムを飛ばして、サンプルを 500 μ l のメタノールに溶解して、Systech 株式会社の C18Maxi-Clean カートリッジに通したものをサンプルとして HPLC で分析を行った。また、フナコシ株式会社より購入した Taxol と SIGMA 社より購入した BaccatinIII を標品として使用した。

HPLC の条件

JASCO のオートサンプラー AS-2057Plus、ポンプ PU-2089Plus、UV 検出器 UV-2098Plus を使い、カラムには SHISEIDO の C18 系の MG II Type (粒径 3 μ m ϕ 4.6mm \times 150mm) を用いた。

測定にはサンプル 3 μ l 使用した。移動相は、流量 0.5ml/min で、MeOH : H₂O = 70:30 から 25 分間で MeOH : H₂O = 100:0 に変化させた。その後 7 分間 MeOH : H₂O = 100:0 で流した。検出器は、UV 検出器を用い、波長は 228nm で検出した。

また上記の UV 測定器によって、主要なピークのスペクトルを取り、物質同定の手掛かりとした。

3-3 結果

3-2-1 カヤのタキソール生成関連酵素遺伝子の存在確認

PCR 法によって読めたタキソイド生成関連酵素遺伝子の BAPT 遺伝子、T α H 遺伝子、一般的なジテルペン合成酵素である GGPPS 遺伝子の 3 つの 酵素をコードしていると思われる部分配列を得た。BLAST 検索を用いて、今回読めたカヤの GGPPS 遺伝子配列と、他の植物の GGPPS 遺伝子配列との相同性を調べたところ、イチイ属のものと 92%の相同性を示して最も高く、次にトウヒ属、モミ属という順番であった。この 3 つの属の GGPPS 遺伝子配列とのアライメント図を Fig. 4 に示した。次に、今回読めた BAPT 遺伝子と T α H 遺伝子を BLAST 検索にかけたところ、イチイ属で既知の配列と 98%以上の高い相同性を示し、カヤはこれら 2 つの酵素遺伝子を有している可能性が示された。BAPT 遺伝子、T α H 遺伝子とイチイ属で既知の配列とのアライメント図を Fig. 5, 6 に示した。BAPT 遺伝子、T α H 遺伝子はもちろん、GGPPS 遺伝子もカヤ属では報告がなく、今回が初めての報告例となった。

```

PiceaabiesGGPPS      AGCCTACAAACCACAAGGTCTTTGGTGAAGGCACCGCTGTTCTTGCAGGGGATGCACTGC
AbiesgrandisGGPPS    AGCCTACAAACCACAAGGTCTTCGGGAAGGCACTGCTATTCTTGCAGGGGATGCACTGC
kayaGGPPS            AGCCACAAATCACAAGGTCTTTG-AGAGGACACTGCTGTTCTTGCAGGGGATGCTCTGC
TaxusmediaGGPPS      AGCCAACAAATCACAAGGTCTTTGGAGAGGACACTGCTGTTCTTGCAGGGGACGCCCTGC
                      ****  *****  *****  *  **  *  ***  **  *****  **  ****
PiceaabiesGGPPS      TTTCAATTTGCATTTGAACACATTGCAGTGTCCACAAGCAAAGTGTGGGGAGTGATAGGA
AbiesgrandisGGPPS    TTTCAATTTGCATTTGAACACATTGCAGTATCCACAAGCAAATCTGTGGGGACTGATAGGA
kayaGGPPS            TTTCAATTTGCATTTGAACACATTGCAGTGTCCACAAGCAAATCTGTGGGGACTGATAGGA
TaxusmediaGGPPS      TTTCAATTTGCATTTGAACACATTGCAGTGTCCACAAGCAAATCTGTGGGGACTGATAGGA
                      *****  *****  **  *****  *  *****  ****  *  *****
PiceaabiesGGPPS      TTTTGAAGGTGGTATCTGAATTGGGTAGAACAATAGGCTCTCAAGGGCTCGTGGGTGGGC
AbiesgrandisGGPPS    TTTTGAAGGTGGTATCTGAATTGGGTAGAACAATAGGCTCCAAGGGCTTGTGGGTGGGC
kayaGGPPS            CTTTGAAGGTGATATCTGAATTGGGTAGAACAATAGGCTCTCAAGGGCTTGTAGGGGGAC
TaxusmediaGGPPS      CTTTGAAGGTGATATCTGAATTGGGTAGAACAATAGGCTCTCAAGGGCTTGTAGGGGGAC
                      ***  *****  *****  *****  *****  *****  **  **  *  *
PiceaabiesGGPPS      AGGTTGCTGATATTACGAGTGAGGGGAATGCTTCTGTTGACCTTGATACTCTG-GAATGG
AbiesgrandisGGPPS    AGGTTGCTGATATTACGAGTGAGGGGATGCTTCTGTTGACCTTGATACTCTG-GAATGG
kayaGGPPS            AGGTTGTTGATATTACATGTGAGGGGGATACTGCTGTTGACCTGAAAACCTGTGGAATGG
TaxusmediaGGPPS      AGGTTGTTGATATTACATCCGAGGGGGATGCTAATGTGGACCTGAAAACCCTG-GAATGG
                      ****  *  *****  *****  **  **  ***  *****  *  **  ***  *****
PiceaabiesGGPPS      ATTCACATTCATAAGACTGCAGTGCTTTGGAGTGCTCAGTTGTGTGGGGCGATCATC
AbiesgrandisGGPPS    ATTCACATTCATAAGACTGCAGTGCTATTGGAGTGCTCAGTTATGTGTGGGGCGATCATT
kayaGGPPS            ATTCATGTACACAAGACTG--GTGCTCTTGAATGTTGAGTTGTGAGTGGAGGGATCCTT
TaxusmediaGGPPS      ATTCATATACACAAGACTGCTGTGCTCTTGAATGTTGAGTTGTGAGTGGAGGGATCCTT
                      *****  *  **  *****  *****  *****  **  *****  **  *****  *  ****  *
PiceaabiesGGPPS      AGTGGTGCTTCAGAGAATGAGATTGAGAGATTAAA
AbiesgrandisGGPPS    AGTGGTGCTTCAGACAATGAGATTGAGAGAATTCAA
kayaGGPPS            GGTGGTGCTACAGAGGATGAGATTG-GAGAATTCGG
TaxusmediaGGPPS      GGTGGTGCTACAGAGGACGAGATTGCGAGAATTCGG
                      *****  ****  *  *****  ****  **

```

図 4 GGPPS 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 4 Genome sequence alignment of GGPPS partial sequences Under line : primer site

相同性	Taxus x media geranylgeranyl diphosphate synthase(898-1232bp)	311/336 (92%)
homology	Picea abies geranylgeranyl diphosphate synthase (548-871bp)	281/336 (84%)
	Abies grandis geranylgeranyl diphosphate synthase(609-940bp)	277/335 (83%)

TaxusmediaBAPT	ATCCGCTCTGTTCTGAATACTTAGAGATGAAGAAGACAGGTTGTTAGCAGAGTTCATG
TaxuscuspidataBAPT	-----ATGAAGAAGACAGGTTGTTGCGAGAGTTCATG
kayaBAPT	<u>ATCCGCTCTGTTCTGAATACTTAGAGATGAAGAAGACAGGTTGTTAGCAGAGTTCATG</u>

TaxusmediaBAPT	TGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCC
TaxuscuspidataBAPT	TGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCC
kayaBAPT	TGAATATGATTGAGCGGGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCC

TaxusmediaBAPT	CTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGGTCTACGCTG
TaxuscuspidataBAPT	CTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGGTCTACGCTG
kayaBAPT	CTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATTGCTGTCTACGCTG

TaxusmediaBAPT	CCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGG
TaxuscuspidataBAPT	CCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGG
kayaBAPT	CCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAGTGATTGAGAGGCTCTCTCCAAGG

TaxusmediaBAPT	TGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTG
TaxuscuspidataBAPT	TGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTG
kayaBAPT	TGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTG

TaxusmediaBAPT	AAGTGGAGTGACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTT
TaxuscuspidataBAPT	AAGTGGAGTGACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTT
kayaBAPT	AAGTGGAGTGACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTT

TaxusmediaBAPT	CAGTCTTAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTCTCTAC
TaxuscuspidataBAPT	CAGTCTTAACAGATCTGGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTCTCTAC
kayaBAPT	CAGTCTTAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTCTCTAC

TaxusmediaBAPT	CACAGGATACAGATATTGAGGACC
TaxuscuspidataBAPT	CACAGGATACAGATATTGAGGACC
kayaBAPT	<u>CACAGGATACAGATATTGAGGACC</u>

図 5 BAPT 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 5 Genome sequence alignment of BAPT partial sequences Under line : primer site

相同性 Taxus x media phenylpropanoyltransferase (BAPT) mRNA(58-501bp) 441/444 (99%)
 homology Taxus cuspidata phenylpropanoyltransferase (BAPT) mRNA(1-418bp) 413/418(98%)


```

kayaT αH      GGTAAAAGACCTCGTCTTCTCCGTCGCAAGCCGCTTGTTTTTTGGTATAACTGAGGAG
TaxusmediaT αH  GGTAAAAGACCTCGTCTTCTCCGTCGCAAGCCGCTTGTTTTTTGGTATAACTGAGGAG
TaxuschinensisT αH GGTAAAAGACCTCGTCTTCTCCGTCGCAAGCCGCTTGTTTTTTGGTATAACTGAGGAG
*****
kayaT αH      CACCTGCAGGAGCAACTTCATAACTTGTGGAAAGTTATTCTTGTGGGATCTTTTTCTGTT
TaxusmediaT αH  CACCTGCAGGAGCAACTTCATAACTTGTGGAAAGTTATTCTTGTGGGATCTTTTTCTGTT
TaxuschinensisT αH CACCTGCAGGAACAACCTTCATAACTTGTGGAAAGTTATTCTTGTGGGATCTTTTTCTGTT
*****
kayaT αH      CCACTCAACATTCCCGGATTCAAGTACCATAAAGCGATTCAAGCAAGGGCCACCCTCGCT
TaxusmediaT αH  CCACTCAACATTCCCGGATTCAAGTACCATAAAGCGATTCAAGCAAGGGCTACCCTCGCT
TaxuschinensisT αH CCACTCAACATTCCCGGATTCAAGTACCATAAAGCGATGCAGGCAAGGGCCACCCTCGTT
*****
kayaT αH      GACATCATGACCTCTTTGATAGAAAAGAGGAGAAATGAGCTGCGTGCAGGCACTGCATCT
TaxusmediaT αH  GACATCATGACCTCTTTGATAGAAAAGAGGAGAAATGAGCTGCGTGCAGGCACTGCATCT
TaxuschinensisT αH GACATCATGACCTCTTTGATAGAAAAGAGGAGAAATGAGCTGCGTGCAGGCACTGCATCT
*****
kayaT αH      GGAATCAAGATTTGATCTCTGTTTTGCTCACTTTCACTGACGAAAGGGGAATTCACTG
TaxusmediaT αH  GAGAATCAAGATTTGCTCTCTGTTTTGCTCACTTTCACTGACGAAAGGGGAATTCACTG
TaxuschinensisT αH GAGAATCAAGATTTACTCTCTGTTTTGCTCACTTTCACTGACGAAAGGGGAATTCACTG
* *****
kayaT αH      GCGGACAAGGAGA
TaxusmediaT αH  GCGGACAAGGAGA
TaxuschinensisT αH GCGGACAAGGAGA
*****

```

図 6 T α H 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 6 Genome sequence alignment of T α H partial sequences Under line :primer site

相同性	Taxus x media taxane 13-alpha-hydroxylase(618-930bp)	310/313(99%)
homology	Taxus chinensis taxane 13-alpha-hydroxylase(532-844bp)	307/313(98%)

次に、ドットブロットハイブリダイゼーションの結果を Fig. 7 に示す。
この結果、カヤの DNA 部分にイチイの DNA の場合と同様のスポットを確認
ことができ、TXS の存在可能性が示された。

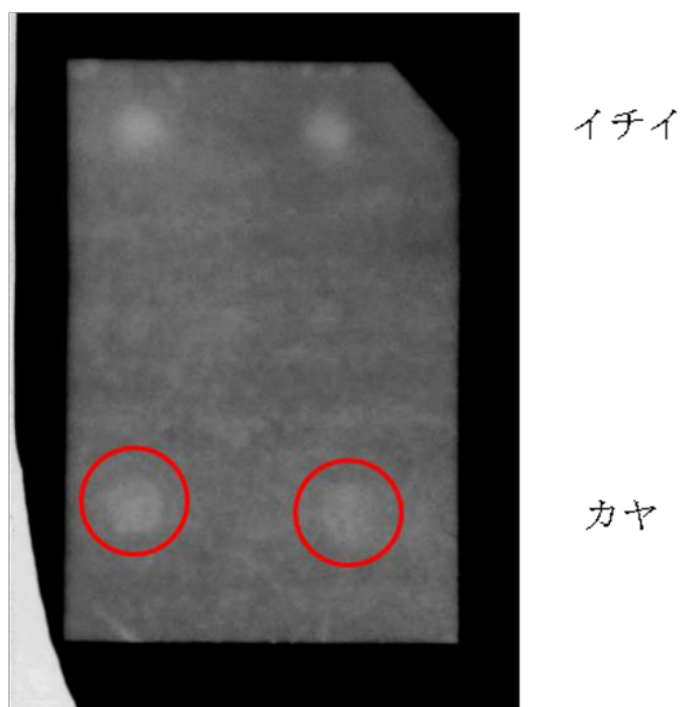


図 7 ドットブロットハイブリダイゼーション結果
Fig.7 Dot blot hybridization analysis.

PCR 法とドットブロットハイブリダイゼーションの結果を受けて、タキソール生産のキーエンザイムである TXS 遺伝子と BAPT 遺伝子の存在可能性をより強めるために、サザンハイブリダイゼーションを行った。

その結果を、Fig. 8 に示す。

このサザンブロットハイブリダイゼーションで、はっきりとしたバンドは見られなかった。しかし、DNA 自体にドットブロットの場合よりも強いシグナルを示し、制限酵素処理したサンプルに関してスメアながら、9kb~4kb のあたりに TXS をコードする遺伝子と 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。次に、この部分をゲル抽出したものをテンプレートとして、Table3 に記載したサザンブロットハイブリダイゼーションに用いるプローブを作るのに使用したプライマーを用いて PCR を行った。その結果を Fig. 9 に示す。

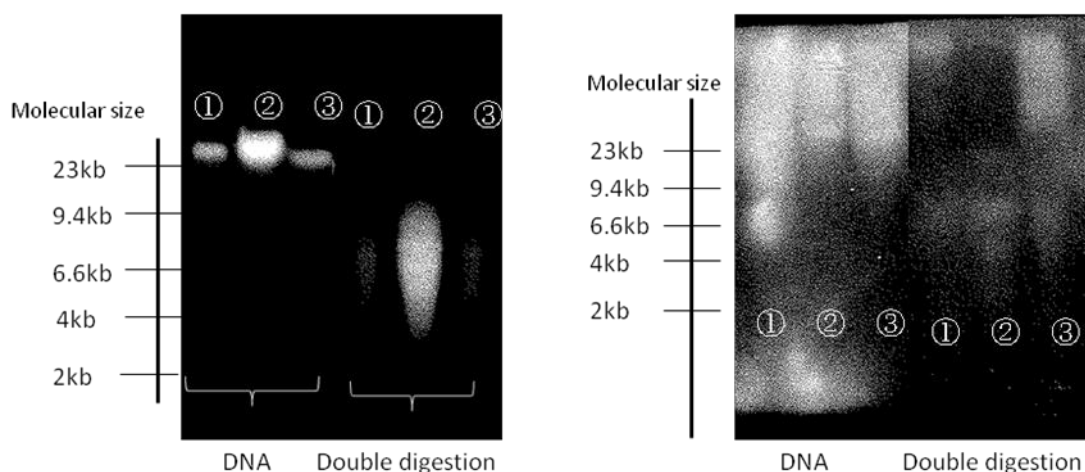


図 8 カヤ(*Torrey nucifera*) のサザンハイブリダイゼーション結果

Fig. 8 Result of Southern hybridization

a:プローブ TXS1 (プライマーF1R1 set),b:プローブ BAPT 1 (プライマーF1R1 set)

各図左より：①:イチイ、②：カヤ、③キャラボクの DNA

それら 3 サンプルの *Hind*III と *Eco*R I による double digest 処理サンプル

左はマーカサイズ

Southern hybridization analysis. genomic DNA was double digested with *Hind*III and *Eco*R I .

a : TXS1 (primerF1R1 set) b : BAPT 1 (primerF1R1 set)

①: *Taxus cuspidata*, ② : *Torrey nucifera*, ③ *Taxus cuspidata* var. *nana*

これまで PCR がかからなかった TXS において、初めて PCR 産物がはっきりと確認できた。これは、サザンハイブリダイゼーションでシグナルが見られた部分をゲル抽出してテンプレートとしたため、余計な DNA 部分が少なく、プライマーがアニーリングしやすかったためと考えられる。

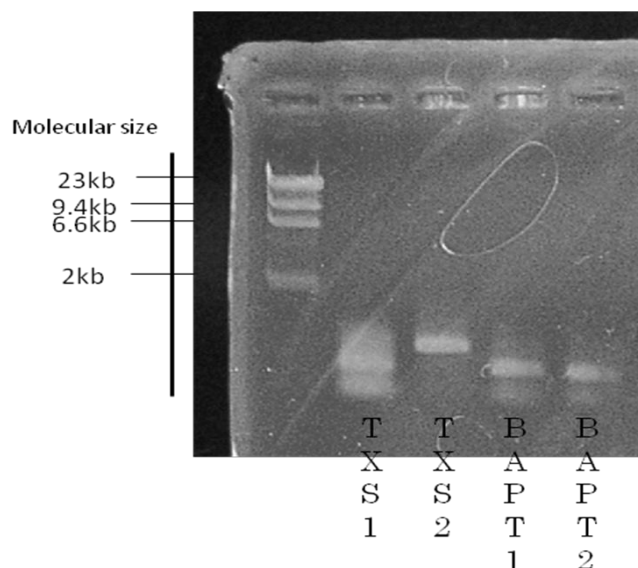


図 9 ゲル抽出 PCR の電気泳動図

Fig. 9 Electrophoretogram of gel extraction PCR products

左から TXS1, TXS2, BAPT1, BAPT2

上記のバンドの配列から上向き(5'末端に向かう方向)と下向き(3'末端に向かう方向)のプライマーを作成し、ゲノムウォーキングを行った。

ゲル抽出 PCR と Genome walker kit(Clontech 社)を用いて読めた配列(Fig. 10, 11)を章末に記載し、それらをまとめた図を Fig. 12 に示した。

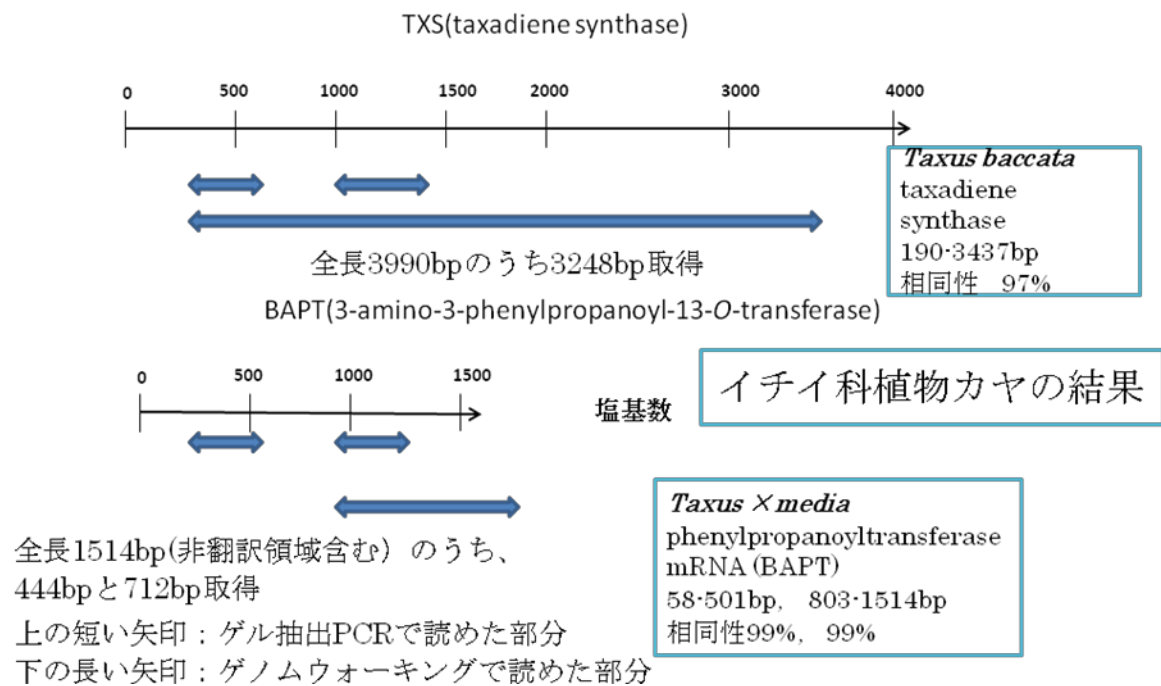


図 12 ゲル抽出 PCR とゲノムウォーキングで読めた配列のまとめ

Fig. 12 Results of TXS and BAPT sequence by gel extraction PCR and Genome Walking

Fig. 12 に示したように、TXS 遺伝子に関しては全長 3990bp の内 3248bp の配列情報を取得した。この中には、2 章で言及した TXS の活性に必要なだと考えられている 80~93 残基の部分と、テルペン環化に重要な DD××D というモチーフををコードしていると思われる部分が含まれていた。BAPT 遺伝子に関しては、全長 1514bp の mRNA 配列の内 444bp と 712bp の遺伝子情報を取得した。

3-2-2 カヤの葉の成分分析

まず標品のタキソールと Baccatin III のクロマトグラムとスペクトル図を Fig.13-16 に示す。

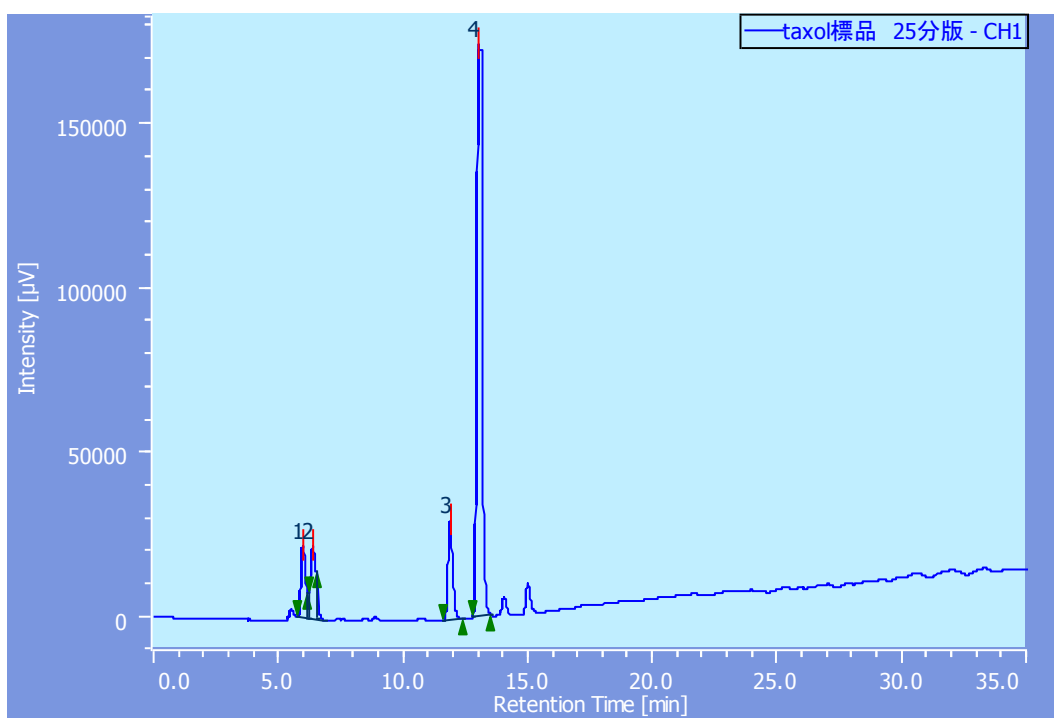
この結果、Fig. 13 および Fig. 15 に示すように、Taxol のリテンションタイム(tR) は 13.0min、BaccatinIII の tR は 6.2min であることが分かった。また、Fig. 14 に示すように Taxol の極小波長は 216nm、極大波長は 232nm であり、Fig. 16 に示すように BaccatinIII の極小波長は 214nm、極大波長は 232nm であることが分かった。

また Fig. 14, 16 のように、220nm あたりに極小値を取り、228~237nm の間で極大値を示すのが、タキソイド類に共通の特徴であることが報告されている (Ketchum1993)。

次に、イチイ、キャラボク、カヤのクロマトグラムを Fig. 17-19 に示す。その結果、3 つに共通して tR7.0min の付近にピークを確認することができた。

この tR7.0min のピークのスペクトルを測定し、Fig. 20-22 に示した。Fig. 20-22 に示したように、ピークの高さに差はあるものの、どれも 220nm あたりに極小値を取り、228~237nm の間で極大値を示す物質であり、タキソイド類縁体の可能性が高いと考えられる。(イチイ抽出物 tR7.0min 極小値 216nm 極大値 237nm、キャラボク抽出物 tR7.0min 極小値 222nm 極大値 236nm、カヤ抽出物 tR7.0min 極小値 220nm 極大値 237nm)

その他のピークに関してもスペクトルを調べてみたが、どれもタキソイド特有の波形を示さなかった。



ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height	面積% Area%	高さ% Height%
1	6.0	292000	22000	8.50	8.88
2	6.4	286000	22300	8.31	9.01
3	11.9	400000	29900	11.6	12.1
4	13.0	2460000	173000	71.6	70.0

図 13 タキソール標品 クロマトグラム

Fig. 13 HPLC analysis of authentic preparation Taxol

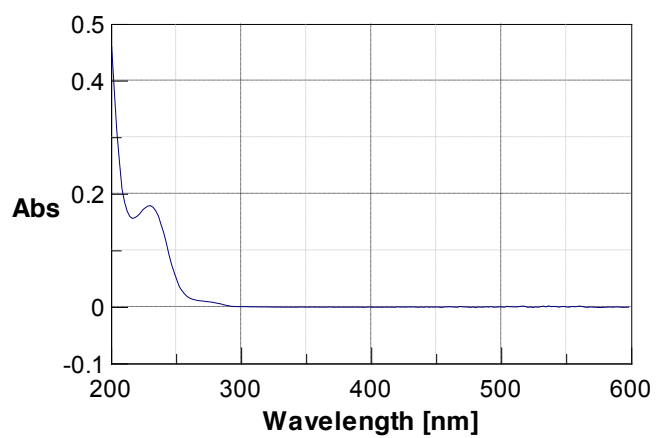
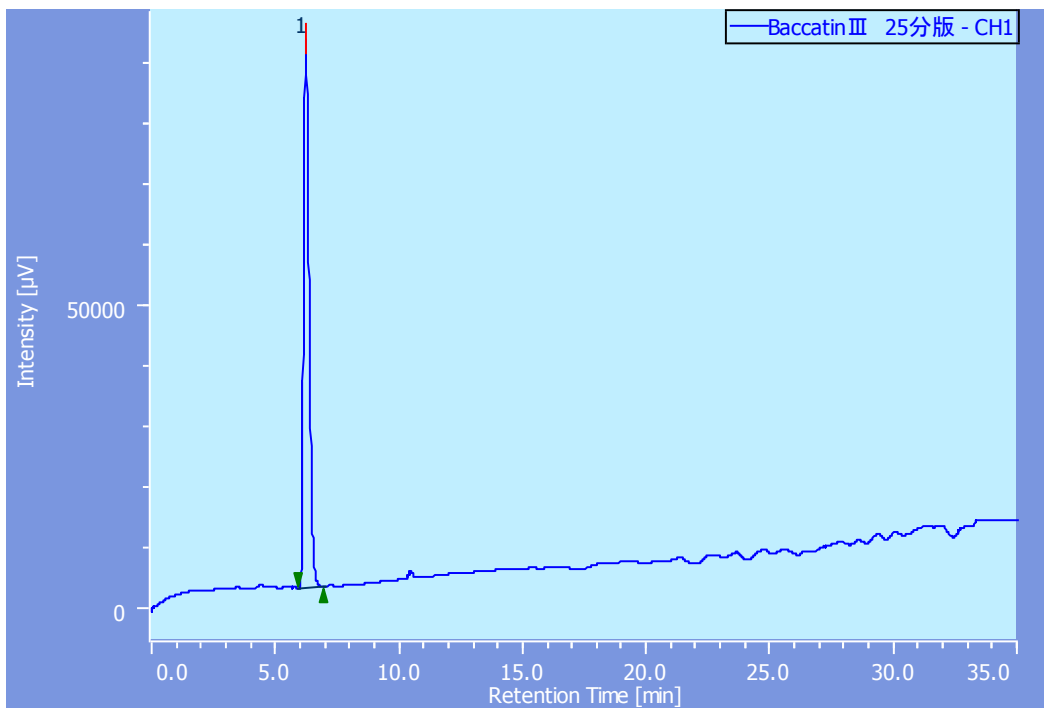


図 14 タキソール標品のスペクトル

Fig. 14 Absorption spectrum of Taxol



ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height
1	6.2	1380000	90300

図 15 Baccatin III 標品クロマトグラム

Fig. 15 HPLC analysis of authentic preparation Baccatin III

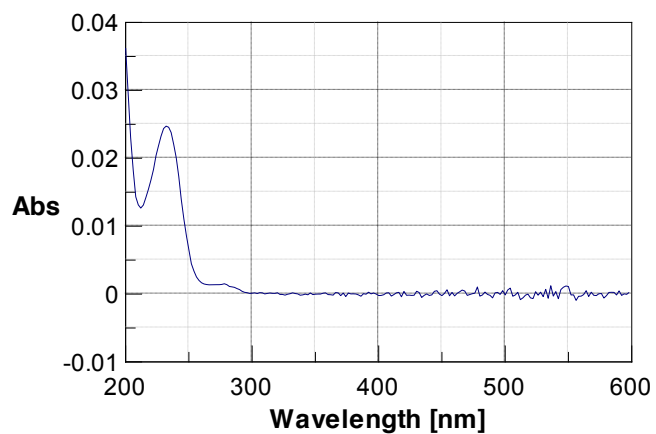
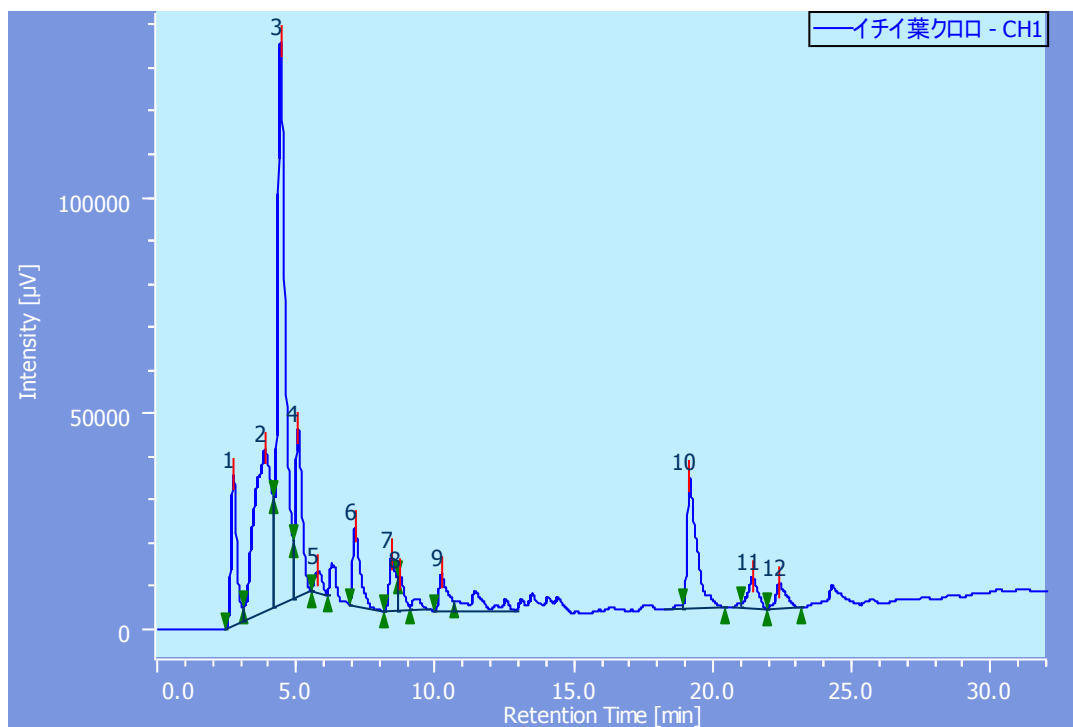


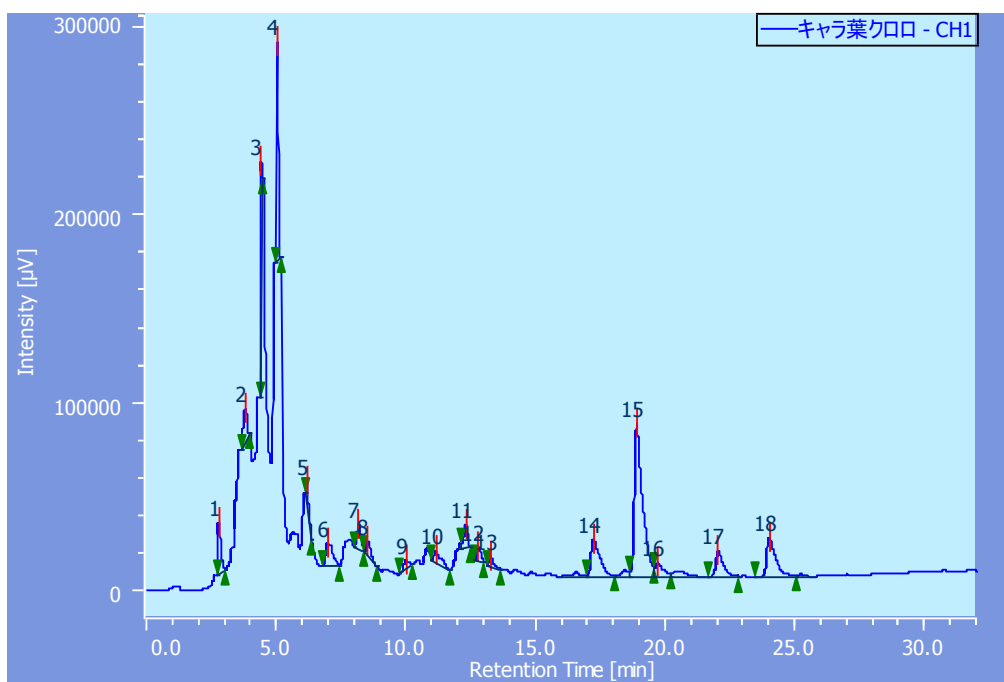
図 16 Baccatin III スペクトル

Fig. 16 Absorption spectrum of Baccatin III



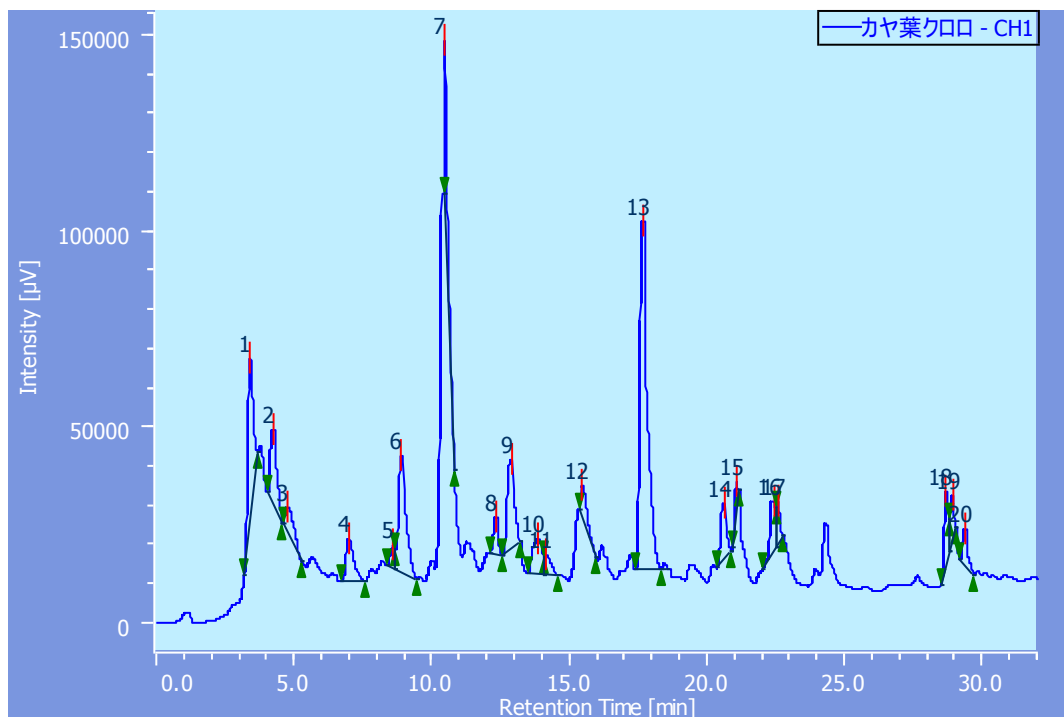
ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height	面積% Area%	高さ% Height%
1	2.7	491000	34500	6.70	10.2
2	3.9	1641000	37600	22.6	11.2
3	4.4	2490000	130000	34.2	38.6
4	5.0	652000	39000	8.96	11.5
5	5.8	102000	5200	1.40	1.55
6	7.0	331000	18000	4.55	5.38
7	8.4	195000	12700	2.68	3.78
8	8.7	131000	8200	1.80	2.44
9	10.2	187000	8600	2.57	2.54
10	19.1	729000	30200	10.0	8.95
11	21.4	179000	7270	2.46	2.15
12	22.3	149000	6030	2.04	1.79

図 17 イチイの葉の抽出成分 HPLC 分析クロマトグラムとピークデータ
 Fig. 17 HPLC analysis of Extracts from *Taxus cuspidate* leaf and peak table



ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height	面積% Area%	高さ% Height%
1	2.8	261000	27500	4.71	6.01
2	3.8	176000	17000	3.17	3.72
3	4.4	408000	75100	7.35	16.4
4	5.0	481000	118000	8.67	25.7
5	6.2	51300	8760	0.925	1.92
6	7.0	228000	11900	4.10	2.60
7	8.2	147000	12200	2.65	2.67
8	8.5	85800	7130	1.55	1.56
9	10.0	72700	5030	1.31	1.10
10	11.1	113000	6100	2.03	1.33
11	12.3	128000	12300	2.30	2.69
12	12.8	88300	7500	1.59	1.64
13	13.2	55900	5010	1.01	1.10
14	17.2	480000	19900	8.65	4.35
15	18.9	1800000	81500	32.5	17.8
16	19.7	164000	7470	2.96	1.64
17	22.0	280000	14100	5.04	3.09
18	24.0	529000	21000	9.53	4.61

図 18 キャラボクの葉の抽出成分の HPLC クロマトグラムとピークデータ
 Fig. 18 HPLC analysis of Extracts from *Taxus cuspidate* var. *nana* leaf and peak table



ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height	面積% Area%	高さ% Height%
1	3.4	553000	42000	9.66	11.0
2	4.3	291000	18400	5.07	4.85
3	4.8	161000	6370	2.81	1.68
4	7.0	221000	10800	3.86	2.84
5	8.6	63200	5380	1.10	1.42
6	8.9	557000	29000	9.72	7.65
7	10.5	305000	43600	5.33	11.5
8	12.3	123000	9300	2.15	2.45
9	12.9	418000	22000	7.30	5.81
10	13.9	218000	8980	3.80	2.36
11	14.2	81400	5050	1.42	1.33
12	15.5	121000	7690	2.11	2.02
13	17.6	1690000	88900	29.5	23.4
14	20.6	214000	14200	3.73	3.73
15	21.0	44700	6410	0.780	1.69
16	22.4	169000	12500	2.95	3.29
17	22.5	96300	10400	1.69	2.73
18	28.6	181000	18500	3.16	4.88
19	28.9	105000	11500	1.84	3.02
20	29.3	117000	9000	2.04	2.37

図 19 カヤの葉の抽出成分の HPLC クロマトグラムとピークデータ
 Fig. 19 HPLC analysis of Extracts from *Torreya nucifera* leaf and peak table

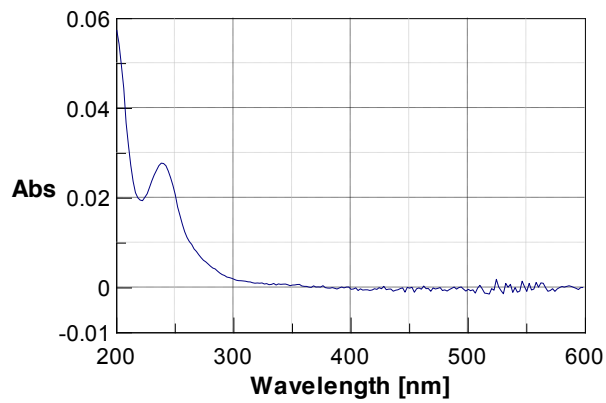


図 20 カヤの葉の成分分析 tR7.0 ピークのスペクトル

Fig. 20 Absorption spectrum of tR7.0 product from *Torreya nucifera* leaf

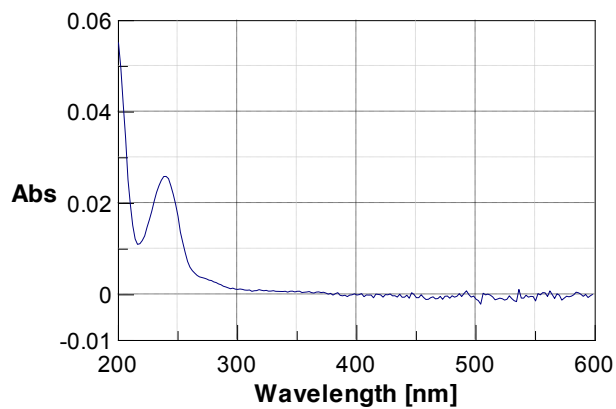


図 21 イチイの葉の成分分析 tR7.0 ピークのスペクトル

Fig. 21 Absorption spectrum of tR7.0 product from *Taxus cuspidata*

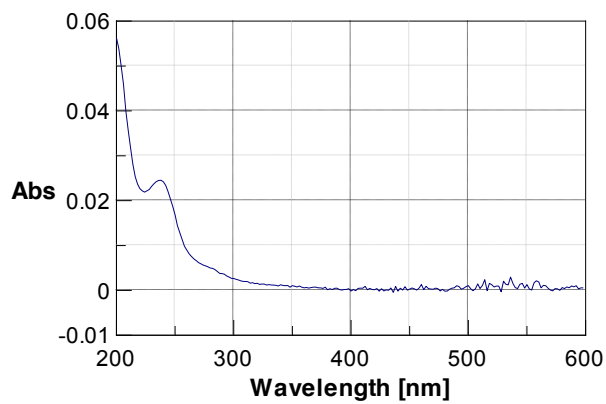


図 22 キャラボクの葉の成分分析 tR7.0 ピークのスペクトル

Fig. 22 Absorption spectrum of tR7.0 product from *Taxus cuspidate var. nana*

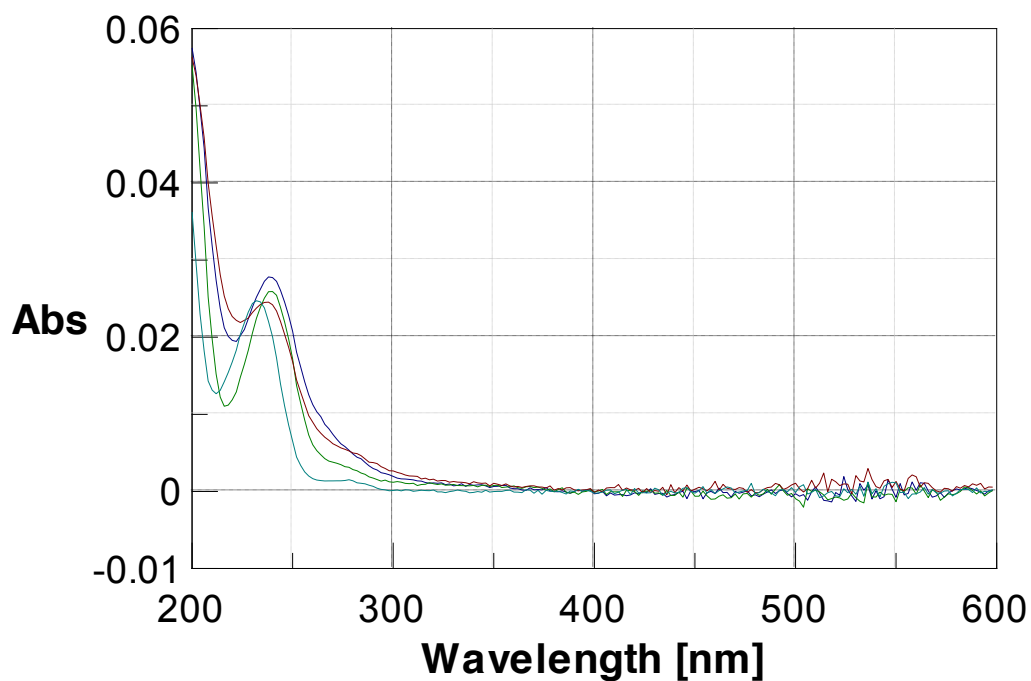


図 23 イチイ、キャラボク、カヤの抽出成分 tR7.0min の物質のスペクトルと Baccatin III のスペクトルの比較

Fig. 23 Compariso Absorption spectrum

緑：イチイの抽出成分

茶色：キャラボクの抽出成分

青：カヤの抽出成分

水色：Baccatin III

Green line: Spectrum of tR7.0min product extracted from *Taxus cuspidata*

Brown line: Spectrum of tR7.0min product extracted from *Taxus cuspidate. var. nana.*

Blue line: Spectrum of tR7.0min product extracted from *Torreya nucifera*

Light-Blue line: Spectrum of Baccatin III

3-4 考察

イチイ科植物のカヤにおいて、GGPPS 遺伝子、TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子、TαH 遺伝子の部分配列を読むことができた。

一般的なジテルペンであるゲラニルゲラニル二リン酸の生成酵素遺伝子である GGPPS 遺伝子の相同性は、イチイ科の *Taxus x media* とは 92% という高い相同性を示し、*Picea abies* とは 84%、*Abies grandis* とは 83% の相同性となり、同じイチイ科のイチイ属とは相同性が高く、マツ科とは比較的低い相同性を示した。

PCR 法、ゲル抽出 PCR 法、ゲノムウォーキング法により配列を確認することができた TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子、TαH 遺伝子の相同性は全て 95% 以上の高い値を示した。また、TXS に関しては、Fig. 8 に示したように、2 章で言及した TXS の活性に必要なだと考えられている 80~93 残基の部分と、テルペン環化に重要な DD××D というモチーフをコードしていると思われる部分が含まれていた。このことから、この部分は TXS の機能を有していることが期待される。

これまで、イチイ属を除いてタキソイドの生産が報告されている樹木は西洋ハシバミしか報告がなかった(Bestoso ら 2006)。しかし、その西洋ハシバミもタキソイド生成関連酵素遺伝子に関する記述はない。今回の発見はイチイ属樹木以外でタキソイド生成関連酵素遺伝子を持つ植物の最初の報告である。

また、このことから、タキソイド骨格という非常に特殊な構造のためか、タキソイド生成関連酵素の遺伝子配列は非常に高い保存性を有していることが分かった。

次に、成分分析の結果を見ていくと、キャラボクの葉からの抽出成分の HPLC 分析結果において、Baccatin III と同じリテンションタイムである tR6.2min にピークが確認された。しかし、スペクトルを比較した結果、Baccatin III ではなかった。

また、カヤの葉からの抽出成分の HPLC 分析結果において、Taxol と近いリテンションタイムである tR12.9min にピークが確認されたが、スペクトルを比較した結果、Taxol ではなかった。

今回は、イチイ、キャラボク、カヤ全ての葉の抽出物からタキソールおよび Baccatin III の存在を確認することはできなかった。ポジティブコントロールとなるべきイチイやキャラボクからもタキソールと Baccatin III の存在が確認できなかったのは、タキソールおよび Baccatin III の含有量が非常に少ないためと考えられるので、存在を確認するためには、これまでの研究を参考にメチルジャスモン酸などで誘導をかける必要があったと考えられる。

しかし、その中で、イチイ、キャラボク、カヤの成分分析クロマトグラムで共通して見られた tR7.0min のスペクトルを確認したところ、それぞれのピークの大きさの違いはみられるものの、3つ全てで、タキソイドの特徴である 220nm あたりに極小値を取り、228~237nm の間で極大値を示すスペクトルが確認できた。このことから、カヤの葉にタキソイド関連物質が存在している可能性を示した。

今回の研究結果によって、タキソイド生成関連酵素遺伝子セットを有していることが示唆された。また、タキソイド類縁体の存在の可能性も示唆され、遺伝子と生成物両方の側面からカヤのタキソイド生成能を裏付けることができ、これまでイチイ属樹木特有の二次代謝物だと考えられてきたタキソイドの存在がイチイ科樹木へと広がっていることが明らかとなった。

TaxusmediaTXSmRNA	TCCTGGTCCTGTCGTAATGATGAGCAGTAGCACTGGCACTAGCAAGGTGG-TTTCCGAGA
TaxusbaccataTXSmRNA	TCCTGGTCCTGTCGTAATGATGAGCAGTAGCACTGGCACTAGCAAGGTGG-TTTCCGAGA
kayaTXSpa r t i a l	-----AGCACTGGCACTAGCAAGGTNGGTTTCCGAGA ***** * *****
TaxusmediaTXSmRNA	CTTCCAGTACCATTGTGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGT
TaxusbaccataTXSmRNA	CTTCCAGTACCATTGTGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGT
kayaTXSpa r t i a l	CTTCCAGTACCATTGCGATGATATCCCGCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGT ***** ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	GGCACCACAATGTTATACAACTCTGGAGACACCATTTCTGTGAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	GGCACCACAATGTTATACAACTCTGGAGACACCATTTCTGTGAG-----
kayaTXSpa r t i a l	GGCACCACAATGTTATACAACTCTGGAGACACCATTTCTGTGAGGTAGGGAAAAGTAGAA *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpa r t i a l	AACAGTTTAAACGGATTTAATGGGTAGATTTAGTCGTTTCATATTTGTAGGCTGACATTTC
TaxusmediaTXSmRNA	-----AGTTCTACTTTCCAAGAACGGGCAGACGAGCTGGTTGTGAAAATTA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----AGTTCTACTTTCCAAGAACGGGCAGACGAGCTGGTTGTGAAAATTA
kayaTXSpa r t i a l	TGTGAACTGCAGAGTTCTACTTACCAAGAACGGGCAGATGAGCTGGTTGTGAAAATTA ***** ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	GATATGTTCAATGCGCTCGGAGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGG
TaxusbaccataTXSmRNA	GATATGTTCAATGCGCTCGGAGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGG
kayaTXSpa r t i a l	GATATGTTCAATGCGCTCGGAGACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGG *****
TaxusmediaTXSmRNA	GTGGCGAGGGTGGCGACCGTTTCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCTCAGGCC
TaxusbaccataTXSmRNA	GTGGCGAGGGTGGCGACCGTTTCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCTCAGGCC
kayaTXSpa r t i a l	GTGGCGAGGGTGGCGACCATTTCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCTCAGGCC ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	CTCAACTGGGTTTTAAACAACCAGCTCCAAGATGGATCATGGGGTATCGAATCGCACTTT
TaxusbaccataTXSmRNA	CTCAACTGGGTTTTAAACAACCAGCTCCAAGATGGATCATGGGGTATCGAATCGCACTTT
kayaTXSpa r t i a l	CTCAACTGGGTTTTCAACAACCAGCTCCAGGATGGATCATGGGGTATCGAATCGCACTTT ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	AGTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGGTCAATTCTGTTATCGCCCTCTCGGTTTGGAAA
TaxusbaccataTXSmRNA	AGTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGGTCAATTCTGTTATCGCCCTCTCGGTTTGGAAA
kayaTXSpa r t i a l	AGTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGACCAATTCTGTTATCGCCCTCTCGGTTTGGAAA ***** *****

TaxusmediaTXSmRNA	ACAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	ACAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAG-----
kayaTXSpa r t i a l	ACAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAGGTTAGAAATCATGGCATTGGGAAAAAACAGTG *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpa r t i a l	TTGAAGGTTTACTGGTCAATCAACTAATGTTTTGTTTCTCATTTTTGGGGTGGATTTAT
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpa r t i a l	CATTGGTTGGTTGATCAGTCAGCCTTGCAAATATATGTGATGTTAAGCGCCAAATCTGT
TaxusmediaTXSmRNA	-----GTACTGAGTTTATTGCAGAGAATCTA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----GTACTGAGTTTATTGCAGAGAATCTA
kayaTXSpa r t i a l	TGTCTCATTATTTCTATTTTTCTCCACAG---GTACTGAGTTTATTGCAGGGAATCTA *****
TaxusmediaTXSmRNA	AGATTACTCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCGGATTTCGAAATAATCTTT-CCTGCTCT
TaxusbaccataTXSmRNA	AGATTACTCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCGGATTTCGAAATAATCTTT-CCTGCTCT
kayaTXSpa r t i a l	AGATTACTCAATGAGGAAGATGAGCTGTCCCGGATTTCGAAATAATCTTTCTGCTCT * *****
TaxusmediaTXSmRNA	GCTGCAAAAAGGCAAAAAGCGTTGGGGATCAATCTTCCTTACGATCTTCCATTTATCAAATC
TaxusbaccataTXSmRNA	GCTGCAAAAAGGCAAAAAGCGTTGGGGATCAATCTTCCTTACGATCTTCCATTTATCAAATC
kayaTXSpa r t i a l	GCTGCAAAAAGGCAAAAAGCGTTGGGGATCAATCTTCCTTACGATCTTCCATTTATCAAATC *****
TaxusmediaTXSmRNA	TTTGTGACAACACGGGAAGCCAGGCTTACAGA-----
TaxusbaccataTXSmRNA	TTTGTGACAACACGGGAAGCCAGGCTTACAGA-----
kayaTXSpa r t i a l	TTTGTGACAACACGGGAAGCCAGGCTTACAGAGTGAGTGAAAACCTCTGTTACTGTTTT *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpa r t i a l	AAAAAAAAAACTGGTAATCATGTTCTGGATTTGTAATTTGTTCTTTTTGGCCATTGCAG
TaxusmediaTXSmRNA	TGTTTCTGCGGTAGCAGACAATATTCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAGGGTCTGGA
TaxusbaccataTXSmRNA	TGTTTCTGCGGCAGCAGACAATATTCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAGGGTCTGGA
kayaTXSpa r t i a l	TGTTTCTGCGGCAGCAGACAATATTCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAGGGTCTCGA *****

TaxusmediaTXSmRNA	GGAAGTTATTGATTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAG
TaxusbaccataTXSmRNA	GGAAGTTATTGATTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAG
kayaTXSpartial	GGAAGTTATTGACTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAG *****
TaxusmediaTXSmRNA	CTCCCCTGCCTCCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCT
TaxusbaccataTXSmRNA	CTCCCCTGCCTCCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCT
kayaTXSpartial	CTCCCCTGCCTCCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTTT ***** *
TaxusmediaTXSmRNA	TCTCAACAATCTGCTGGACAAATTCGGCGGCTGCG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	TCTCAACAATCTGCTGGACAAATTCGGCGGCTGCG-----
kayaTXSpartial	TCTCAACAATCTGCTGGACAAATTCGGCGGCTGCGGTATGATTGTTTTTAACAAGAAA *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpartial	TTCTTTGTGTGCGTGCTGATTCCAACAATGCATTCAAGTGATTAATAATGTTACGAA
TaxusmediaTXSmRNA	-----TGCCCTGTATGTATTCCATCGATCTGCTGGA-ACGCCTTTCGCTGGT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----TGCCCTGTATGTATTCCATCGATCTGCTGGA-ACGCCTTTCGCTGGT
kayaTXSpartial	CTGTGAATTACAGTGCCCTGTATGTATTCCATCGATCTGCTGGAGACGCCTTTCGCTGGT *****
TaxusmediaTXSmRNA	TGATAACATTGAGCATCTCGGAATCGGTGCCATTTCAAACAAGAAATCAAAGTAGCTCT
TaxusbaccataTXSmRNA	TGATAACATTGAGCATCTCGGAATCGGTGCCATTTCAAACAAGAAATCAAAGTAGCTCT
kayaTXSpartial	TGATAACATTGAGCATCTCGGAATCGGTGCCATTTCAAACAAGAAATCAAAGGAGCTCT *****
TaxusmediaTXSmRNA	TGATTATGTCTACAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	TGATTATGTCTACAG-----
kayaTXSpartial	TGATTATGTCTACAGGTAACCACTGTTTCTTCTTAACACTCGATTTTCTCTTTTTCC *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----ACATTGGAGTGAAAGGGGCATC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ACATTGGAGTGAAAGGGGCATC
kayaTXSpartial	TTCCCTACTTGATATAATTTGCTGGAATGGGCAACATTGGAGTGAAAGGGGCATC *****
TaxusmediaTXSmRNA	GGTTGGGGCAGAGACAGCCTTGTTCCAGATCTCAACACAACAGCCCTCGGCCTGCGAACT
TaxusbaccataTXSmRNA	GGTTGGGGCAGAGACAGCCTTGTTCCAGATCTCAACACAACAGCCCTCGGCCTGCGAACT
kayaTXSpartial	GGTTGGGGCAGAGACAGCCTCGTTCCAGATCTCAACACAACAGCCCTCGGCCTGCGAACT *****

TaxusmediaTXSmRNA	CTTCGCACGCACGGATACGATGTTTCTTCAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	CTTCGCACGCACGGATACGATGTTTCTTCAG-----
kayaTXSpa r t i a l	CTTCGCACGCACGGATACGATGTTTCTTCAGGT CAGAAGATCAGAAATAATGAAAATAAA *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpa r t i a l	AGAAACTGGTTTTACTGTCTCATAGGCTATTCTTTAGCCTCGTGGACGTCAAAAAGTTT
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpa r t i a l	TCATTTCAATTCATTTGTTTTATCAGATCTCAAGACTGTAAATTGTTTGCCATTTGTA
TaxusmediaTXSmRNA	-----ATGTTTTGAATAATTTCA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ATGTTTTGAATAATTTCA
kayaTXSpa r t i a l	AAAATTCTTTGTGCTGATATGGAACAAAAATATGAAAGCAGATGTTTTGAATAATTTCA *****
TaxusmediaTXSmRNA	AAGATGAAAACGGGCGGTTCTTCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTCGAATTGAGAAGCG
TaxusbaccataTXSmRNA	AAGATGAAAACGGGCGGTTCTTCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTCGAATTGAGAAGCG
kayaTXSpa r t i a l	AAGATGAAAACGGGCGGTTCTTCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTCGAATTGAGAAGCG *****
TaxusmediaTXSmRNA	TGGTGAATCTTTTCAGAGCTCCGACCTTGCAATTCCTGACGAAGGAGCTATGGACGATG
TaxusbaccataTXSmRNA	TGGTGAATCTTTTCAGAGCTCCGACCTTGCAATTCCTGACGAAGGAGCTATGGACGATG
kayaTXSpa r t i a l	TGGTGAATCTTTTCAGAGCTCCGACCTTGCAATTCCTGACAAAGGAGCTATGGACGATG ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	CTAGAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGACGCACTTGCAACGAAAATCTCAACCAATA
TaxusbaccataTXSmRNA	CTAGAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGACGCACTTGCAACGAAAATCTCAACCAATA
kayaTXSpa r t i a l	CTAGAAAATTTGCTGAACCGTATCTTAGAGACGCACTTGCAACAAAAATCTCAACCAATA ***** ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	CAAACTATACAAAGAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	CAAACTATACAAAGAG-----
kayaTXSpa r t i a l	CAAACTATTCAAAGAGTTTAGTACAATTTATTTTATTAACAAAAATATATCAATAATT ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpa r t i a l	CTACCAACATAATTAGGAGTAAACCTAAAGTTTTCTATTATATGTAGTTAGAAATCAAGG

TaxusmediaTXSmRNA	-----ATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATG
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATG
kayaTXSpartial	TTTCTAATATGATGGATCATTTCAGATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATG *****
TaxusmediaTXSmRNA	AGTATCCCACGCCTAGAAGCCAGAAGTTATATTGATTGATGACGACGATTATGTATGG
TaxusbaccataTXSmRNA	AGTATCCCACGCCTAGAAGCTAGAAGTTATATTGATTGATGACGACGATTATGTATGG
kayaTXSpartial	AGTATCCCACGTCTAGAAGCCAGAAGTTATATTGATTGATGACGATGATTATGTATGG ***** ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	CAGAGGAAGACTTTATACAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	CAGAGGAAGACTCTATACAG-----
kayaTXSpartial	CAGAGGAAGACTCTATACAGGTGAGTTCAAATATAATCACATTACCCTTCAATTTATAT ***** *****
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpartial	AGAATTTATGAGCCGTTGTTGTATCGATTGCTATCTTTTCTCAGTATTGAGTTATAATC
TaxusmediaTXSmRNA	-----AATGCCATCTTTGAGTAATCAAATGTTTAGAATTGGCAAAATTGGACT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----AATGCCATCTTTGAGTAATCAAATGTTTAGAATTGGCAAAATTGGACT
kayaTXSpartial	CGTGCAACAGAAATGCCATCTTTGAGTAATCAAATGTTTAGAATTGGCAAAATTGGACT *****
TaxusmediaTXSmRNA	TCAATATCGTACAATCTTTGCATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTAACAAGATGGT-----
TaxusbaccataTXSmRNA	TCAATATCGTACAATCTTTGCATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTAACAAGATGGT-----
kayaTXSpartial	TCAATATCGTACAATCTTTGCATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTAACAAGGTGGTGATAA ***** **
TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpartial	ATTGTCATACCTTCTCAATTTATCAAACCTAATTTTTGGGGAGGAGAACATGAAGTA
TaxusmediaTXSmRNA	-----GGAAGGAATCTGGCATGGC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----GGAAGGAATCCGGCATGGC
kayaTXSpartial	ATGATCTACTAACATTATGGTTTTTTGGTCATAAGATGGTGGAAAGAATCCGGCATGGC **** *****
TaxusmediaTXSmRNA	AGATATAAATTTCACTCGACACCGAGTGGCGGAGGTTATTTTTCATCAGCTACATTTGA
TaxusbaccataTXSmRNA	AGATATAAATTTCACTCGACACCGAGTGGCGGAGGTTATTTTTCATCAGCTACATTTGA
kayaTXSpartial	AGATATAAATTTCACTCGACACCGAGTGGCGGAGGTTATTTTTCATCAGCTACATTTGA *****

TaxusmediaTXSmRNA	ACCCGAATATTCTGCCACTAGAATTGCTTTCACAAAATTGGTTGTTTACAAGTCCTTTT
TaxusbaccataTXSmRNA	ACCTGAATATTCTGCCACCAGAATTGCCTTCACAAAATTGGTTGTTTACAAGTCCTTTT
kayaTXSpartial	ACCCGAATATTCTGCCACTAGAATTGCCTTCACAAAATTGGTTGTTTACAAGTCCTTTT
	*** *****
TaxusmediaTXSmRNA	TGATGATATGGCTGACATCTTTGCAACACTAGATGAATTGAAAAGTTTCACTGAGGGAGT
TaxusbaccataTXSmRNA	TGATGATATGGCTGACATCTTTGCAACACTAGATGAATTGAAAAGTTTCACTGAGGGAGT
kayaTXSpartial	TGATGATATGGCTGACATCTTTGCAACACTAGATGAATTGAAAAGTTTCACTGAGGGAGT

TaxusmediaTXSmRNA	AAAGAG-----
TaxusbaccataTXSmRNA	AAAGAG-----
kayaTXSpartial	AAAGAGGTGATTCTTTAATTTACCAATTTTTTAATTTAACATTGAAATCTTGTAAAT

TaxusmediaTXSmRNA	-----ATGGGATACATCTT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ATGGGATACATCTT
kayaTXSpartial	AACATATACATAATAGGACCTAACTGAACATTGTGGTAACTTTTAGATGGGATACATCTT

TaxusmediaTXSmRNA	TGCTACATGAGATTCCAGAGTGTATGCAAACCTTGCTTTAAAGTTTGGTTCAAATTAATGG
TaxusbaccataTXSmRNA	TGCTACATGAGATTCCAGAGTGTATGCAAACCTTGCTTTAAAGTTTGGTTCAAATTAATGG
kayaTXSpartial	TGCTACATGAGATTCCAGAGTGTATGCAAACCTTGCTTTAAAGTTTGGTTCAAATTAATGG

TaxusmediaTXSmRNA	AAGAAGTAAATAATGATGTGGTTAAGGTACAAGGACGTGACATGCTCGCTCACATAAGAA
TaxusbaccataTXSmRNA	AAGAAGTAAATAATGATGTGGTTAAGGTACAAGGACGTGACATGCTCGCTCACATAAGAA
kayaTXSpartial	AAGAAGTAAATAATGATGTGGTTAAGGTACAAGGACGTGACATGCTCGCTCACATAAGAA

TaxusmediaTXSmRNA	AACCC-----
TaxusbaccataTXSmRNA	AACCT-----
kayaTXSpartial	AACCCGTAAAGTAATTCAAATTTAAATGCAACACAATTGAGAATTTTATAGTTTAGATG

TaxusmediaTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
kayaTXSpartial	CATTTCTTTTTAAGGTAAAAACACCATTGGTACTCACAAAACATCGTGTATGATTGGAA
TaxusmediaTXSmRNA	---TGGGAGTTGACTTCAATTGTTATGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCTGGGTAT
TaxusbaccataTXSmRNA	---TGGGAGTTGACTTCAATTGTTACGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCTGGGTAT
kayaTXSpartial	TAGTGGGAGTTGACTTCAATTGTTATGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCTGGGTAT

```

TaxusmediaTXSmRNA      ATACCAACCTTTGAAGAGTACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGGCCTTGGACCGTGT
TaxusbaccataTXSmRNA    ATACCAACTTTTGAAGAGTACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGGCCTTGGACCGTGT
kayaTXSpartial         ATACCAACTTTTGAAGAGTACTTAAAGACTTATGCTATAT-----
                        *****

```

図8 ゲル抽 PCR と Genome Walker kit を用いて読めた TXS 遺伝子部分配列(3248bp) アライメント

Fig.8 Genome sequence alignment of TXS partial sequence(3248bp) of *Torreya nucifera* by gel extraction PCR and Genome Walking

(紫の間) 部分はイントロン

Regions between purple boxes are introns.

赤字部分はテルペン環化酵素で保存性の高い配列

緑字は基質の入るポケットの蓋となる部分 活性を有するために必要な部分

Red letters are DD××D motif conserved in terpenoid cyclase.

Green letters are gene sequences corresponding to the necessary part to cap the active site for catalytically activity

相同性 Taxus x media taxadiene synthase,mRNA(269-2216)	1915/1948 (98%)
Taxus baccata taxadiene synthase,mRNA(190-2137)	1913/1948 (98%)

kayaBAPTpartial	ACGACGCATCATGGAAGAATGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTG
TaxusmediaBAPTmRNA	ACGACGCATCATGGAAGAATGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTG
TaxuscupidataBAPTmRNA	ACGACGCATCATGGAAGAACGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTG

kayaBAPTpartial	TAGCAGCATTGGTTTGGCTAGCAAAGATAAAGGCTTTTCAAATTCCACAT
TaxusmediaBAPTmRNA	TAGCAGCATTGGTTTGGCTAGCAAAGATAAAGGCTTTTCAAATTCCACAT
TaxuscupidataBAPTmRNA	TAGCAGCATTGGTTTGGCTAGCAAAGATAAAGGCTTTTCAAATTCCACAT

kayaBAPTpartial	AGTGAGAATGTGAAGCTTCTTTTGCAATGGACTTGAGGAGATCATTTAA
TaxusmediaBAPTmRNA	AGTGAGAATGTGAAGCTTCTTTTGCAATGGACTTGAGGAGATCATTTAA
TaxuscupidataBAPTmRNA	AGTGAGAATGTGAAGCTTCTTTTGCAATGGACTTGAGGAGATCATTTAA

kayaBAPTpartial	TCCCCCTCTTCCACATGGATACTATGGCAACGCCTTGGTATTGCATGTG
TaxusmediaBAPTmRNA	TCCCCCTCTTCCACATGGATACTATGGCAATGCCTTGGTATTGCATGTG
TaxuscupidataBAPTmRNA	TCCCCCTCTTCCACATGGATACTATGGCAATGCCTTGGTATTGCATGTG

kayaBAPTpartial	CAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGTGGATCTCTTTGCGCACTATA
TaxusmediaBAPTmRNA	CAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGTGGATCTCTTTGCGCACTATA
TaxuscupidataBAPTmRNA	CAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGTGGATCTCTTTGCGCACTATA

kayaBAPTpartial	ATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACAAAGAACTCAACTCAA
TaxusmediaBAPTmRNA	ATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACAAAGAACTCAACTCAA
TaxuscupidataBAPTmRNA	ATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACAAAGAACTCAACTCAA

kayaBAPTpartial	AACCGTGATGAGCTCGTCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGTTTGAAGACG
TaxusmediaBAPTmRNA	AACCGTGATGAGCTCGTCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGTTTGAAGATG
TaxuscupidataBAPTmRNA	AACCGTGATGAGCTCATCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGTTTGAAGATG

kayaBAPTpartial	TAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTG GACTTT
TaxusmediaBAPTmRNA	TAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTG GACTTT
TaxuscupidataBAPTmRNA	TAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTG GACTTT

kayaBAPTpartial	GGGTGGGA GATGCAATGAACGTGAGCACTATGCTACAACAACAGGAGCA
TaxusmediaBAPTmRNA	GGGTGGGA GATGCAATGAACGTGAGCACTATGCTACAACAACAGGAGCA
TaxuscupidataBAPTmRNA	GGGTGGGA GATGCAATGAACGTGAGCACTATGCTACAACAACAGGAGCA

kayaBAPTpartial	CGAGAAATCTCTGCCAACTTATTTTTCTTTCCTACAATCTACTAAGAACA
TaxusmediaBAPTmRNA	CGAGAAATCTCTGCCAACTTATTTTTCTTTCCTACAATCTACTAAGAACA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	CGAGAAATCTCTGCCAACTTATTTTTCTTTCCTACAATCTACTAAGAACA *****
kayaBAPTpartial	TGCCAGATGGAATCAAGATGCTAATGTTTATGCCTCCATCAAACTGAAA
TaxusmediaBAPTmRNA	TGCCAGATGGAATCAAGATGCTAATGTTTATGCCTCCATCAAACTGAAA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	TGCCAGATGGAATCAAGATGCTAATGTTTATGCCTCCATCAAACTGAAA *****
kayaBAPTpartial	ACATTCAAAATTGAAATAGAAGCTATGATAAACAATATGTGACTAAAGT
TaxusmediaBAPTmRNA	ACATTCAAAATTGAAATAGAAGCTATGATAAACAATATGTGACTAAAGT
TaxuscuspidataBAPTmRNA	AAATTCAAAATTGAAATAGAAGCTATGATAAAAAATATGTGACTAAAGT * *****
kayaBAPTpartial	GTGTCCGTCAAAGTTATGAAATGTGTGACTAGAAAACAATATTCTTGACT
TaxusmediaBAPTmRNA	GTGTCCGTCAAAGTTATGAAATGTGTGACTAGAAAACAATATTCTTGACT
TaxuscuspidataBAPTmRNA	GTGTCCGTCAAAGTTATGA----- *****
kayaBAPTpartial	TTATGTATTGGATTTC <u>CAATAAC</u> ATCTAGCCACGTTTAAATAGCAATATA
TaxusmediaBAPTmRNA	TTATGTATTGGATTTC <u>CAATAAC</u> ATCTAGCCACGTTTAAATAGCAATATA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	-----
kayaBAPTpartial	TTTTTCGTGTTTCC-----
TaxusmediaBAPTmRNA	TTTTTCGTGTTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	-----

図9 ゲル抽 PCR と Genome Walker kit を用いて読めた BAPT 遺伝子部分配列(712bp) アライメント

Fig.9 Genome sequence alignment of BAPT partial sequence(712bp) of *Torreya nucifera* by gel extraction PCR and Genome Walking

(紫の間) 部分はイントロン、緑は終止コドン 下線はポリ A 付加配列
終止コドン下流：3'非翻訳領域 赤字：アシル基転移酵素で保存性の高い配列

Regions between purple boxes are introns. Green box is stop codon. Under line is poly-A additional signal. Down stream from stop codon is 3' untranslated. Red letters are gene sequences corresponding to conserved motif in acyl transferase

Taxus x media phenylpropanoyltransferase mRNA(803-1516bp)709/712 (99%)

Taxus cuspidata phenylpropanoyltransferase mRNA(720-1338bp) 614/619 (99%)

参考文献

Bestoso F., Ottaggio L., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Degan P., Mazzei M., Cavalli F., Ledda B., Miele M. (2006) In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. BMC BIOTECHNOLOGY 6 (45) DOI: 10.1186/1472-6750-6-45

Deraporta S.L., Wood J., Hicks J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1(4): 19-21.

Hefner J., Ketchum R.E.B., Croteau R. (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for Taxol production. Arch. Biochem. Biophys. 360:62–74.

Jennewein S., Rithner C., Williams R., Croteau R. (2001) Taxol biosynthesis: taxane 13a-hydroxylase is a cytochrome P450- dependent monooxygenase. Proc Natl Acad Sci USA 98:13595–13600.

Ketchum R.E.B., Gibson D.M. (1993) Rapid isocratic reversed-phase HPLC of Taxanes on new columns developed specifically for Taxol analysis. Journal of Liquid Chromatography. 16(12): 2519-2530

Walker K., Fujisaki S., Long R., Croteau R. (2002a) Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. Proc Nat Acad Sci USA 99:127:15–12720.

Wildung M.R., Croteau R. (1996) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. J. Biol. Chem. 271:9201–9204

第4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

第4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

4-1 緒言

植物内生菌の多く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いる。タキソールを生産する菌に関しては、1993年に、太平洋イチイ(*Taxus brevifolia*)内生菌 *Taxomyces andreanae* がタキソールを生産すると報告されたのが最初である。それ以後、*Taxus brevifolia* だけでなく *Taxus baccata* などからも数種類の Taxol-producing fungi が発見されてきた。タキソール生成能を有しているのはイチイ属樹木だけではなく、イチイ属樹木の内生菌の中にも、タキソール生産能を有する菌株が存在している可能性が考えられた。そこで、イチイ科植物のイチイ(*Taxus cuspidata*)とカヤ(*Torreya nucifera*)から内生菌を単離し、その遺伝子解析を行うことでタキソイド生成能を調べ、新たなタキソール供給資源となりうる内生菌を探索することを目的とした。また、これまでに発見されてきた Taxol-producing fungi の遺伝子解析については例がなく、今回の研究では Taxol-producing fungi のタキソイド生成関連酵素遺伝子についてまとめることを目的とした。

4-2 実験

4-2-1 イチイ科樹木内生菌の単離と同定

植物材料

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4月に採取した。

単離

試料表面の殺菌を以下のように行い、植物内の内生菌の単離を試みた。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。

同定

種間レベルで変異が検出しやすい 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。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、Fig. 1に示すように 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 ITS1f-F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') と
 ITS4-R(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3')を用いて PCR を行った (杉山ら
 2003)。PCR はサーマルサイクラーVeriti200(ABI 社)を用いて、94°C-1 分-(94°C-20
 秒,45°C -20 秒,72°C-2 分)×35 サイクル-72°C-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™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 データバンク (DDBJ) の BLAST 検索を
 用いて菌種を同定した。

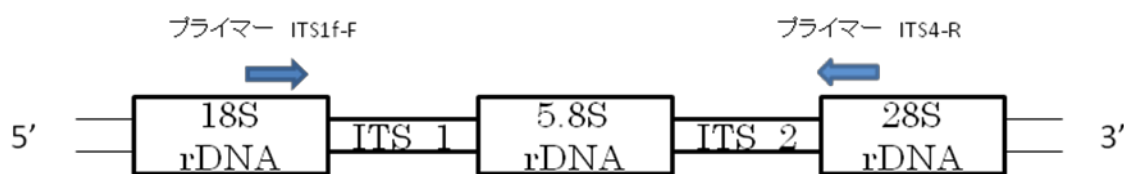


図 1 菌種同定 PCR 増幅領域とプライマー結合位置

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

4-2-2 内生菌のタキソール生成能の検討

ドットブ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ブロットハイブリダイゼーションを行った。菌種の同定を行った場合と同様に DNeasy Plant Maxi kit を用いて 11 種の内生菌から抽出した DNA を 10 μ 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 cuspidata* をコントロールとした)。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 (taxadiene synthase)、BAPT (3-amino-3-phenylpropanoyl-13-O-transeferase)、T α H (taxadiene 13 α -hydroxylase) という 3 つの酵素遺伝子 (Fig. 2) から作製した (OPERON 社) 50~100bp の連続した DNA 断片をプローブ (Table 1) とした (Wildung and Croteau 1996, Jennwein ら 2001, Walker ら 2002a)。市販の AlkPhos Direct (GE ヘルスケア社) のプロトコールに従い、プローブにアルカリホスホターゼを標識し、55 $^{\circ}$ C で一晚ハイブリダイゼーションを行った。65 $^{\circ}$ C で洗浄を繰り返して、ノイズが小さくなったと判断したところで、CDP-Star 化学発光薬品を用いて、ジオキセタン誘導体基質とプローブに標識したアルカリホスホターゼの反応を検出するため、一晚露光して、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 ヘルスケア社) を用いた。

このドットブ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。

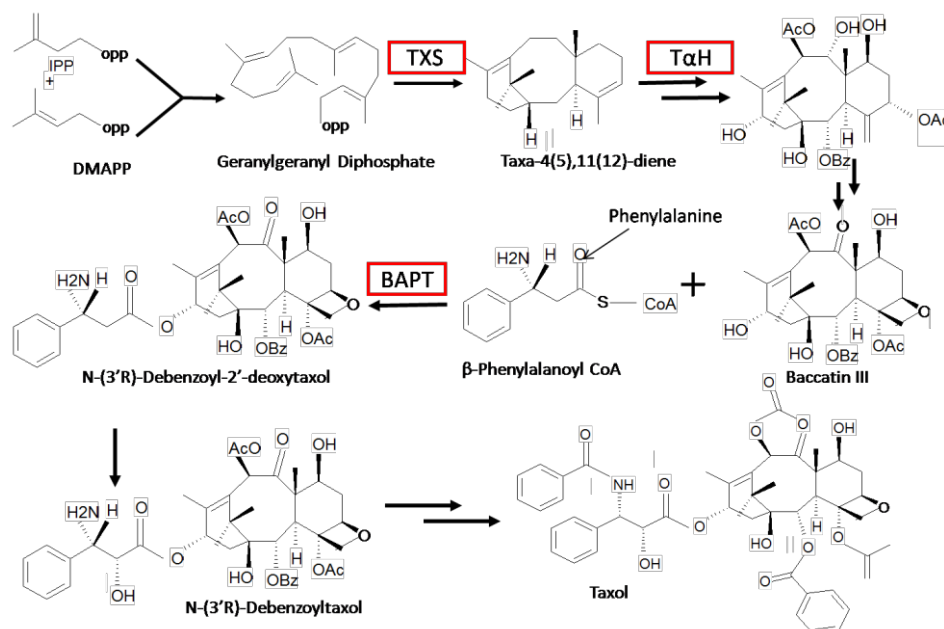


図 2 タキソール生合成経路図

Fig. 2 Overview of the taxol biosynthetic pathway and enzymes

表 1 ドットブロットに使用したプローブ配列

Table 1 Sequences of probe for dot blot hybridization

TXS1	aatgcagcgctgaagatgaatgcattggggaacaaggcaatccacgatcaa(52bp)
TXS2	cgaattgcagagccaaatctgaggggcaaataatgatgtgggtttgtccaaatcagggcgaaccagagtaaaa atgtcgagaggaagtgggtgctctggtcc(100bp)
TXS3	tgctgtaatg atgagcagta gcaactggcac tagcaagggtg gtttccgaga cttccagtac(60bp)
BAPT1	cccttttctgggcggtcagaaataaagaaaatggggaacttgaagtggagtgcacagggcagggt gttctgtttctggaagccatggctgacagcgac (100bp)
BAPT2	ctttcagtcttaacagatctcgataactacaatccatcgtttcagcagttgatttttctctaccacagg(70bp)
BAPT3	atacagatattgaggacctccatctcttgattgttcaggttaactcgttttacatgtgggggtttgt tgt(70bp)
T α H	ggtaaaagacctcgtctctccgctcgaagccgctgtttttggtataactgagga (57bp)

サザンブロットハイブリダイゼーション

ドットブロットハイブリダイゼーションの 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×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、ドットブロットハイブリダイゼーションの場合と同様に 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)のプロトコールに従い、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、Table 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 α 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。

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	atgcatcga ttgcttaaac
TXSR	tccagcagat cgatggaatac
BAPTF1	atccgctctg ttctgaatac
BAPTR1	ggctctcaat atctgtatcc
BAPTF2	acgacgcacg atggaagaat
BAPTR2	agtgctcacg ttcatgcat
TaHF	ggtaaaagacc tegtcttctccgtcg
TaHR	tctccttgte cgccagtgaattcc

F: forward, R: reverse

ゲル抽出と PCR 解析

3章の場合と同様に、内生菌から抽出した DNA を *Hind*III と *Eco*R 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からフラグメント DNA を抽出し、その DNA をテンプレートにして、Table 2 のプライマーを用いて PCR を行った。次にその PCR 産物を、TA クローニングをし、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) に委託して配列を解析した。

GenomeWalker Universal kit を用いたクローニング

2章、3章の場合と同様に、内生菌から抽出した DNA を *Dra* I, *Eco*R V, *Pvu*II, *Stu* I の4種類の平滑末端制限酵素で切断し、GenomeWalker Universal kit を用いて、アダプターを付加したのち、アダプタープライマーと TXS, BAPT の部分配列より作製した特異的なプライマーを用いて、PCR を行った。この PCR 産物の結果を電気泳動で確認し、オペロン社のシーケンス解析サービスに委託してその配列を取得した。

4-2-3 カヤ内生菌 *Cordyceps dipterigene* とイチイ内生菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の成分分析

C.gloeosporioides と *C.dipterigene* の成分分析を行うために、まず液体培養を行い、菌体量を増やした。その際の培地は(potato 4g/l, sucrose 40g/l, peptone 0.5g/l, yeast extracts 0.8g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g/l, KH_2PO_4 2g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, phenylalanine 0.01g/l) という組成の培地を使用した(Liu ら 2009)。培地 150ml に 1cm 四方の菌体片を 5 つ植菌し、液体が菌糸で充満するまで培養を続けた。(*C.gloeosporioides* は約 7 日と *C.dipterigene* は約 10 日)

抽出

培養後のカルチャーを 8000g で 5 分間の遠心分離を行い、培地と菌糸に分離した。ナス型フラスコに入れた菌糸と培地を液体窒素で予備凍結したのち、凍結乾燥器を用いて -80°C で凍結乾燥した。乾燥させた菌糸は乳鉢・乳棒で粉碎後、サンプル 1g に対して 10ml の MeOH に浸漬させた。

その後、エバポレーターを用いてデシケーター内で MeOH を飛ばして乾燥させ、残渣を $500\mu\text{l}$ ずつのクロロホルムと蒸留水に溶解させ、クロロホルム層を回収した。最後に、クロロホルムを飛ばして $500\mu\text{l}$ の MeOH に溶解し、Systech 株式会社の C18Maxi-Clean カートリッジに通したものをサンプルとして HPLC で分析した。培地の方は、乾燥させた粉末を 5ml の水に溶かし、等量のクロロホルムを加えて成分を分離し、クロロホルム層を回収した。その後は、菌体の場合と同じようにクロロホルムを飛ばして $500\mu\text{l}$ の MeOH に溶解し、Systech 株式会社の C18Maxi-Clean カートリッジに通したものをサンプルとして HPLC で分析した。また、フナコシ株式会社より購入した Taxol と SIGMA 社より購入した Baccatin III を標品として使用した。

HPLC の条件

JASCO のオートサンプラー AS-2057Plus、ポンプ PU-2089Plus、UV 検出器 UV-2098Plus を用い、カラムには SHISEIDO の C18 系の MG II Type(粒径 $3\mu\text{m}$ $4.6\text{mm} \times 150\text{mm}$)を用いた。

測定にはサンプル $1\mu\text{l}$ 使用した(イチイ内生菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の培地サンプルのみ $10\mu\text{l}$ 使用した)。移動相は、流量 $0.5\text{ml}/\text{min}$ で MeOH : $\text{H}_2\text{O} = 70:30$ から 25 分間で MeOH : $\text{H}_2\text{O} = 100:0$ に変化させた。その後 7 分間 MeOH : $\text{H}_2\text{O} = 100:0$ で流して、データを取り込んだ。UV 検出器の波長は 228nm で検出した。

また上記の UV 測定器によって、主要なピークのスペクトルを取り、物質同定の手掛かりとした。

4-3 結果

4-3-1 イチイ科樹木内生菌の単離と同定

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 とその間の ITS 領域の部分塩基配列を決定して BLAST 検索を行った結果、それぞれの菌株は Table3 に示した菌種と非常の近い菌種(近縁種)であることを確認した。

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。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 microdiplodia*)、カヤ内生菌のうち 2 種類(*Sordariomycete* sp., *Xylaria venosula*)は、これまでの研究から既に、イチイ属樹木(*Taxus chinensis*, *Taxus × media* など)から単離され、タキソール生産性が報告されているものであった。(緑色の表記)

これらのことから、イチイ属樹木の種類が異なり、生育環境が異なっても、樹木内部に生息している内生菌には共通点があることが示唆された。

また、これまでイチイ属樹木からしか発見されていなかったタキソール生産性内生菌が、イチイ属樹木ではないカヤの中にも存在していることが初めて示唆された。

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

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

Torreya nucifera

菌株 Strain	菌種名 Names of fungi identified
A	<i>Cordyceps dipterigene</i>
B	<i>Hypoxylon</i> sp.
C	<i>Hypoxylon</i> sp. unidentified <i>Xylarialean</i>
D	<i>Hypoxylon</i> sp. unidentified <i>Xylarialean</i>
E	Not identified
F	<i>Hypoxylon</i> sp. unidentified <i>Xylarialean</i>
G	<i>Xylaria</i> sp.
H	<i>Sordariomycete(xylaria)</i>
I	<i>Xylaria hypoxylon</i>
J	<i>Xylaria venosula</i>
K	<i>Phomopsis amygdali</i>
L	<i>Phomopsis amygdali</i> <i>Phomopsis fukusii</i>
M	Not identified

4-3-2 内生菌のタキソール生成能の検討

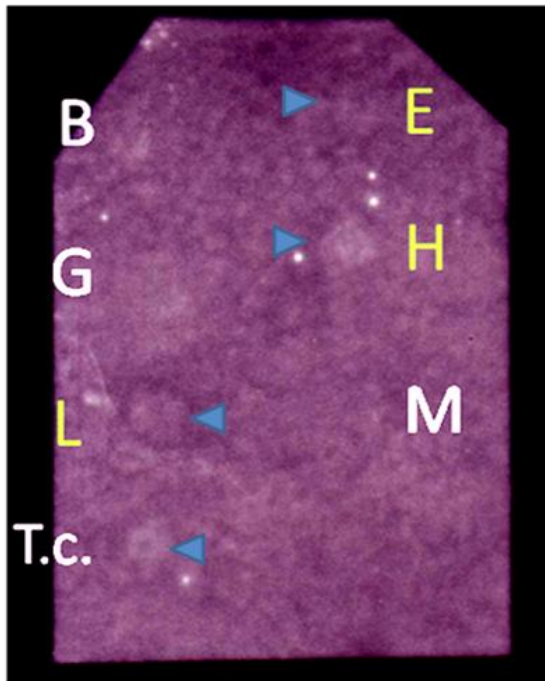
ドットブロットハイブリダイゼーション

4-3-1 で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 遺伝子、TαH 遺伝子、BAPT 遺伝子を有するかどうかをドットブロットハイブリダイゼーションで調査した。

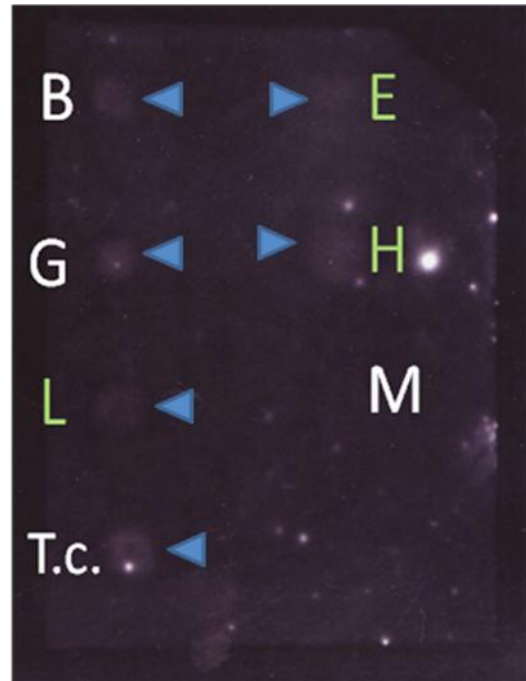
イチイ内生菌では、タキソール生産性が報告されていた菌種以外は、1 種類しか単離されてこなかった *Phyllosticta papayae* と *Phomopsis* 属のうち固体培地で成長の早い 2 種を選抜した。カヤ内生菌では、菌種名が同定しきれないものが多かったが、タキソール生産性が報告されている 2 種に近く、成長の早い *Xylaria* 属 3 種と *hypoxylon* 属 1 種を選抜した。

3 種(TXS、TαH、BAPT)の酵素遺伝子をプローブとして行ったドットブロットの結果を Fig. 3 および 4 と Table 4 に示した。

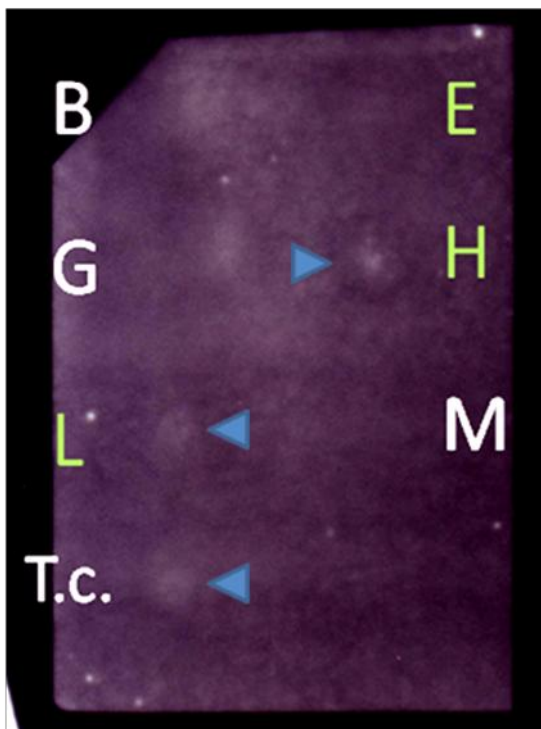
今回のハイブリダイゼーションの結果として、イチイ内生菌 H [*Colletotrichum gloeosporioides*]、L [*Paraconiothyrium microdiplodia*]、カヤ内生菌 A [*Cordyceps dipterigene*]、H [*Sordariomycete* sp.] の 4 種において、TXS、TαH、BAPT 3 つすべての酵素遺伝子のプローブでハイブリダイズし、これらの酵素の遺伝子配列を有する可能性が示唆された。4 種のうち 3 種はタキソール生産性が報告されているものであったが、カヤ内生菌 A [*Cordyceps dipterigene*] 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 つの酵素のプローブでハイブリダイズしていた。今回のプローブでは 3 つ全てを検出できなかつただけで、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。



Probe TXS



Probe T α H



Probe BAPT

図 3 イチイ内生菌ドットブロットハイブリダイゼーション結果

Fig. 3 Dot blot hybridization analysis of endophytic fungi from *Taxus cuspidata*

B: *Phomopsis phyllanthicola*

E: *Phomopsis phaseolorum*

G: *Phomopsis vccinill*

H: *Colletotrichum gloeosporioides*

L: *Paraconiothyrium microdiplodia*

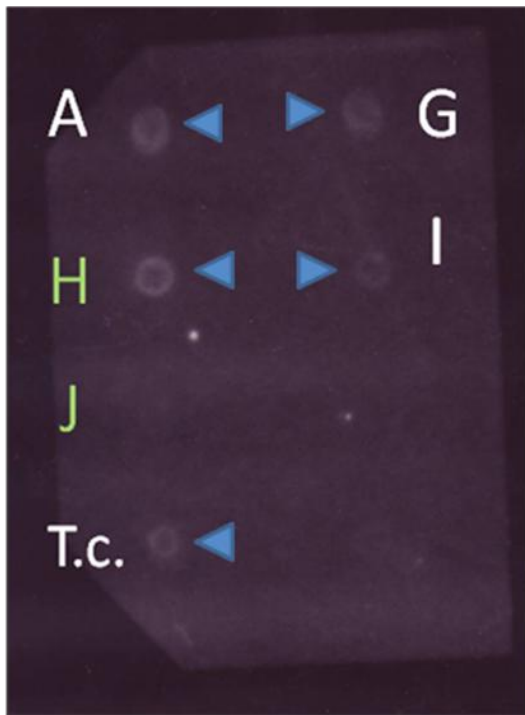
M: *Phyllosticta papayae*

▲:Hybridization signal

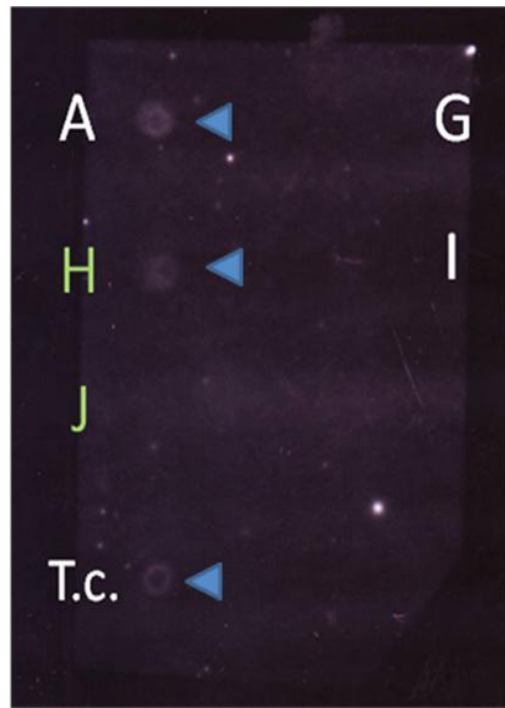
shaded alphabets: endophytic fungi reported

taxol production

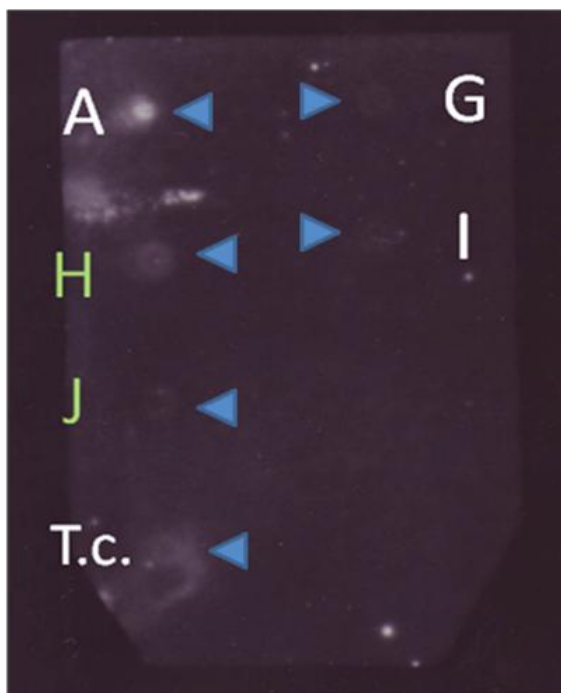
T.c.: *Taxus cuspidata*



Probe TXS



Probe T α H



Probe BAPT

図4 イチイ内生菌ドットブロットハイブリダイゼーション結果

Fig.4 Dot blot hybridization analysis of endophytic fungi from *Torreya nucifera*

A: *Cordyceps dipterigene*

G: *Xylaria* sp.

H: *Sordariomycete* sp.

I: *Xylaria hypoxylon*

J: *Xylaria venosula*

▲:Hybridization signal

shaded alphabets: endophytic fungi reported taxol production

T.c.: *Taxus cuspidate*

表 4 内生菌とハイブリダイゼーション結果

Table4 Summary of dot blot hybridization analysis using genomic DNA from endophytic fungi.

Taxus cuspidata

	Names of fungi	TXS	TαH	BAPT
B	<i>Phomopsis phyllanthicola</i>	×	○	×
E	<i>Phomopsis phaseolorum</i>	○	○	×
G	<i>Phomopsis vccinill</i>	×	○	×
H	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	○	○	○
L	<i>Paraconiothyrium microdipodia</i>	○	○	○
M	<i>Phyllosticta papayae</i>	×	×	×

Torreya nucifera

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

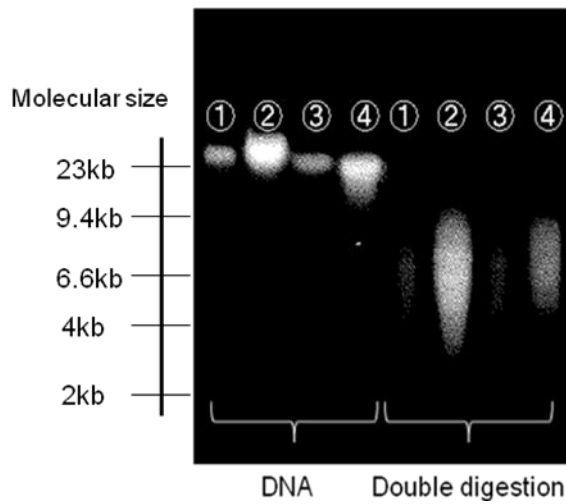
サザンハイブリダイゼーションとゲル抽出 PCR、ゲノムウォーキング法による遺伝子配列解析

ドットプロットハイブリダイゼーションで調査した 3 種の酵素遺伝子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、よりプローブ長の長いキャラボクの 3 遺伝子の部分配列をプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。TXS ならびに BAPT1 のサザンハイブリダイゼーションの結果を Fig. 5 に示した。この結果、*Cordyceps dipterigene* の DNA を *Hind*III と *Eco*R 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 をゲル抽出したものを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解析した。その結果を Fig. 6-9 に示した。Fig.6 に示したように、イチイ属由来の既知の TXS 遺伝子と 95% の相同性を示す 877bp の DNA 断片を確認した。また、Fig.7 に示したようにイチイ属由来の TαH 遺伝子と 98% 以上の高い相同性を示す 195bp の DNA 断片を確認した。また、Fig. 8 および 9 に示したように、イチイ属由来の BAPT 遺伝子とほぼ 100% の相同性を示す 431bp と 444bp の DNA 断片を確認した。

これらのことから、*Cordyceps dipterigene* が TXS 遺伝子、TαH 遺伝子、BAPT 遺伝子という 3 つのタキソイド生成関連酵素遺伝子と相同性の高い配列の存在明らかとした。

a:



b:

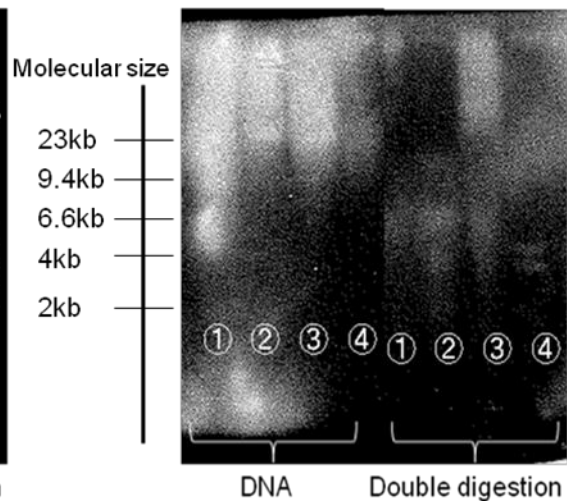


図5 *Cordyceps dipterigene* のサザンハイブリダイゼーション結果

Fig.5 Result of Southern hybridization

a : プローブ TXS b : プローブ BAPT 1

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 *Eco*RI による double digest 処理サンプル
左はマーカーサイズ

Southern hybridization analysis. *Cordyceps dipterigene* genomic DNA was double digested with *Hind*III and *Eco*R I .

a : TXS b : BAPT 1(プライマー-F1R1 set)

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

```

TaxusbaccataTXSgene      TGGGATCGATTGCTTAACACGGTCAATTCTGTTATCGCCCTCTCGGTTTGGAAAACAGGGCA
TaxusbrevifoliaTXSgene  TGGGATCGATTGCTTAACACGACCAATTCTGTTATCGCCCTCTCGGTTTGGAAAACAGGGCA
C. dTXSpartial          TGGGATCGATTGCTTAGCAGACCAATTCTGTTATCTCCCTCTCGGTTGCAAAAACAGGGCA
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      CAGCCAAGTAGAACAAGGT CAGAATCATGGCATTGTTGGGAAAAAAAAAATAGTGTGAAGGT
TaxusbrevifoliaTXSgene  CAGCCAAGTACAACAAGGT CAGAAACATGGCATTGTTGGGAAAAAAAAAATTAGTGTGCGAAA-T
C. dTXSpartial          CAGCCAAGTACAACAAGGT TAGAATCATGGCATTGTTGGGAAAAAAAAA-CAGTGTGAAGGT
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      TTAGCTGGTCAATCAACTAATGTTTTGTTTATCATTGTTGGGTTGATTATCATTGGTTGG
TaxusbrevifoliaTXSgene  TTAGCTGGTCAATCAACTAATGTTTACCATTGTTAAGTGGATTATCATTGGTTGG
C. dTXSpartial          TTAGCTGGTCAATCAACTAATGTTTTGTTTCTCATTGTTGGGGGGATTATCATTGGTTGG
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      TTGACCAGTCAGCCTTGCAAACATATGTGATGTTAAGCC-----CCAAATCTGTTGTC
TaxusbrevifoliaTXSgene  TTGACCAGTCAGCCTTGCAAACATATGTCATGTTAAGCTGAGCTTGCCAAATTTGTTGTC
C. dTXSpartial          TTGACCAGTCAGCCTTGCAAATATTTGTGATGTTAAGCG-----CCAAATCTGTTGTC
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      TCATTATTTTCTGTTTTTCTCCACAGGTGCTGAGTTATTGCAGAGAATCTAAGATTAC
TaxusbrevifoliaTXSgene  TCATTATTTTCTGTTTTTCTCCACAGGTGCTGAGTTATTGCAGAGAATCTAAGATTAC
C. dTXSpartial          TCATTATTTTCTATTTTTTCTCCACAGATACTGAGTTATTGCAGAGAATCTA-GATTAC
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      TCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCGGATTTGAAATAATCTTCCTGCTCTGCTGCAAAAG
TaxusbrevifoliaTXSgene  TCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCGGATTTGAAATAAT CTTCCTGCTCTGCTGCAAAAG
C. dTXSpartial          TCAATGAGGAAGATGAGCTGTCCCGGATTTGAAATAATCTTCCTGCTCTGTTGCAAAAG
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      GCAAAAGCGTTGGGGATCAATCTTCCTTACGATCTTCATTATCAAATCTTTGTGACAAC
TaxusbrevifoliaTXSgene  GCAAAAGCGTTGGGGATCAATCTTCCTTACGATCTTCATTATCAAATATTTGTGACAAC
C. dTXSpartial          GNAAAAGCGTTGGGGGTCAATCTTCCTTACGATCTTCATTATCAAATTTTTGTGACAAC
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      ACGGGAAGCCAGGCTTACAGAGT GAGTGAAAACCTGTTACTGTTTTCTTTTTCAAAA-CT
TaxusbrevifoliaTXSgene  ACGGGAAGCCAGGCTTACAGAGT GAGTGAAAACCTGCTACTGTTTTTAAAAAAAACCT
C. dTXSpartial          ACGGGAAGCCAGGCTTACAGAGT GAGTGAAAACCTGTTACTGTTTTTAAAAAAAACCT
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      GGGC ATCATGTTCTGGATTGTAATTTGTTATTTTTGCCATTGCAGTGTCTGCGGCAGC
TaxusbrevifoliaTXSgene  GGGC ATCATGTTCTGGATTCAAATTTGTTCTTTTTGGCCATTGCAGTGTCTGCGGCAGC
C. dTXSpartial          GGTA ATCATGTTCTGGATTGTAATTTGTTCTTTTTGGCCATTGCAGTGTCTGCGGCAGC
                          *****

```

```

TaxusbaccataTXSgene      AGACAATATTCCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAAGGTCTCGAGGAAGTTATTGACTG
TaxusbrevifoliaTXSgene  AGACAATATTCCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAAGGTCTCGAGGAAGTTATTGACTG
C. dTXSpartial          AGACAATATTCCAGCCAACATGTTGAATGCGTTGGAGGTCTCGAGGAAGTTATTGACTG
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      ACTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCTCCCCTGCCT
TaxusbrevifoliaTXSgene  ACTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCTCCCCTGCCT
C. dTXSpartial          ACTGGAACAAGATTATGAGGTTTCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCTCCCCTGCCT
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      CCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCTTCTCAACAATC
TaxusbrevifoliaTXSgene  CCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCTTCTCAACAATC
C. dTXSpartial          CCACTGCCTGTGTACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCTTCTCAACAATC
                          *****
TaxusbaccataTXSgene      TGCTGGACAAATTCGGCGGCTGCGGTATGATTTGTTTTTACCAAGAAATCTTTGTGTG
TaxusbrevifoliaTXSgene  TGCTCGACAAATTCGGCGGCTGCGGTATGATTTGTTTTTACAAGAAATCTTTGTGTG
C. dTXSpartial          TGCTGGACAAATTCGGCGGCTGCGGTATGATTTGTTTTTACAAGAAATCTTTGTGTG
                          **** *****
TaxusbaccataTXSgene      CGTGCTGATTCCACCAAT-GCATTCAAGTGATTAATTAATGTTACGAAGTGTGAATTA
TaxusbrevifoliaTXSgene  CGTGCTGATTCCAACAT-GGATTCAAGTGATTAATTAATGTTACAAAGTGTGAATTA
C. dTXSpartial          CGTGCTGATTCCAACATTAGCATTCAAGTGATTAATTAATGTTACGAAGTGTGAATTA
                          ***** ** * * *****
TaxusbaccataTXSgene      CAGTGCCTGTATGTATTCCATCGATCTGCTGGA
TaxusbrevifoliaTXSgene  CAGTGCCTGTATGTATTCCATCGATCTGCTGGA
C. dTXSpartial          CAGTGCCTGTATGTATTCCATCGATGAGCTGGC
                          *****

```

図 6 *Cordyceps dipterigene* の TXS 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 6 Genome sequence alignment of TXS partial sequences from *Cordyceps dipterigene*

相同性 Taxus baccata tasy gene for taxadiene synthase(647-1524bp) 836/877 (95%)

homology Taxus brevifolia taxadiene synthase gene(672-1557bp) 820/880 (94%),

Under line:primer site

C. dT α Hpartial	GGGATCTTTTTCTGTTCCACTCAACATTCCCGGATTCAGTTACCATAAAGCGATTGAGGC
TaxusmediaT α H	GGGATCTTTTTCTGTTCCACTCAACATTCCCGGATTCAGTTACCATAAAGCGATTGAGGC
TaxuschinensisT α H	GGGATCTTTTTCTGTTCCACTCAACATTCCCGGATTCAGTTACCATAAAGCGATGCAGGC

C. dT α Hpartial	AAGGGCCACCCTCGCTGACATCATGACCTCTTTGATAGAAAAGAGGAGAAATGAGCTGCG
TaxusmediaT α H	AAGGGCTACCCTCGCTGACATCATGACCTCTTTGATAGAAAAGAGGAGAAATGAGCTGCG
TaxuschinensisT α H	AAGGGCCACCCTCGTTGACATCATGACCTCTTTGATAGAAAAGAGGAGAAATGAGCTGCG
	***** ***** *****
C. dT α Hpartial	TGCAGGCACTGCATCTGAGAATCAAGATTTGCTCTCTGTTTTGCTCACTTTCCTGACGA
TaxusmediaT α H	TGCAGGCACTGCATCTGAGAATCAAGATTTGCTCTCTGTTTTGCTCACTTTCCTGACGA
TaxuschinensisT α H	TGCAGGCACTGCATCTGAGAATCAAGATTTACTCTCTGTTTTGCTCACTTTCCTGACGA
	***** *****
C. dT α Hpartial	AAGGGGAATTCACT
TaxusmediaT α H	AAGGGGAATTCACT
Taxuschinensis T α H	AAGGGGAATTCACT

図 7 *Cordyceps dipterigene* の T α H 遺伝子のアライメント

Fig. 7 Genome sequence alignment of T α H partial sequences from *Cordyceps dipterigene*

相同性 Taxus x media taxane 13-alpha-hydroxylase mRNA(722-916bp) 194/195
(99%)

homology Taxus celebica taxane 13 alpha-hydroxylase mRNA(636-830bp) 193/195
(98%)

C. dBAPT1	<u>ATCCGCTCTGTTCTGAATACT</u> TAGAGATGAAGAAGACAGGTTTCGTTAGCAGAGTTCC
TaxusmediaBAPTmRNA	ATCCGCTCTGTTCTGAATACTTAGAGATGAAGAAGACAGGTTTCGTTAGCAGAGTTCC
TaxuscuspidataBAPTmRNA	-----ATGAAGAAGACAGGTTTCGTTTGCAGAGTTCC *****
C. dBAPT1	ATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAA
TaxusmediaBAPTmRNA	ATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	ATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAA *****
C. dBAPT1	TCCTCCCTCTCTCCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTCTAACGTATTGCTGG
TaxusmediaBAPTmRNA	TCCTCCCTCTCTCCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTCTAACGTATTGCTGG
TaxuscuspidataBAPTmRNA	TCCTCCCTCTCTCCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTCTAACGTATTGCTGG *****
C. dBAPT1	TCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAGTGATTCGGGAGG
TaxusmediaBAPTmRNA	TCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAGTGATTCGAGAGG
TaxuscuspidataBAPTmRNA	TCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAGTGATTCGAGAGG *****
C. dBAPT1	CTCTCTCCAAGGTGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAG
TaxusmediaBAPTmRNA	CTCTCTCCAAGGTGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAG
TaxuscuspidataBAPTmRNA	CTCTCTCCAAGGTGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCTGGGCGGCTCAGAAATAAAG *****
C. dBAPT1	AAAATGGGAACTTG AAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCC
TaxusmediaBAPTmRNA	AAAATGGGAACTTG AAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCC
TaxuscuspidataBAPTmRNA	AAAATGGGAACTTGAAGTGGAGTGCACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCC *****
C. dBAPT1	ATGGCTGAC AGCGACCTTTCAGTCTTAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTT
TaxusmediaBAPTmRNA	ATGGCTGACAGCGACCTTTCAGTCTTAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTT
TaxuscuspidataBAPTmRNA	ATGGCTGACAGCGACCTTTCAGTCTTAACAGATCTGGATAACTACAATCCATCGTT *****
C. dBAPT1	TCAGCAGTTAATTTTTCTCTACCACAGGATACAGATATTGAGGACC
TaxusmediaBAPTmRNA	TCAGCAGTTGATTTTTCTCTACCACAGGATACAGATATTGAGGACC
TaxuscuspidataBAPTmRNA	TCAGCAGTTGATTTTTCTCTACCACAGGATACAGATATTGAGGACC *****

図 8 *Cordyceps dipterigene* の BAPT1 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 8 Genome sequence alignment of BAPT 1partial sequences from *Cordyceps dipterigene* Under line: primer site

相同性 Taxus x media phenylpropanoyltransferase (BAPT)mRNA(58-501bp) 442/444 (99%)

homology Taxus cuspidata phenylpropanoyltransferase mRNA(1-418bp) 414/418 (99%)

C. dBAPT2	GACGACGCATCATGGAAGAATGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAG
TaxusmediaBAPTmRNA	GACGACGCATCATGGAAGAATGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAG
TaxuscuspidataBAPTmRNA	GACGACGCATCATGGAAGAACGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAG *****
C. dBAPT2	CATTGGTTTGGCTAGCAAAGATAAAGGCTTTTCAAATCCACATAGTGAGAATGTGA
TaxusmediaBAPTmRNA	CATTGGTTTGGCTAGCAAAGATAAAGGCTTTTCAAATCCACATAGTGAGAATGTGA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	CATTGGTTTGGCTAGCAAAGATAAAGGCTTTTCAAATCCACATAGTGAGAATGTGA *****
C. dBAPT2	AGCTTCTTTTGAATGGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCTCTCCACATGGAT
TaxusmediaBAPTmRNA	AGCTTCTTTTGAATGGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCTCTCCACATGGAT
TaxuscuspidataBAPTmRNA	AGCTTCTTTTGAATGGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCTCTCCACATGGAT *****
C. dBAP2	ACTATGGCAATGCCTTTGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGCCATGACCTTCTAA
TaxusmediaBAPTmRNA	ACTATGGCAATGCCTTTGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGCCATGACCTTCTAA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	ACTATGGCAATGCCTTTGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGCCATGACCTTCTAA *****
C. dBAPT2	GTGGATCTCTTTTGGCACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACA
TaxusmediaBAPTmRNA	GTGGATCTCTTTTGGCACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACA
TaxuscuspidataBAPTmRNA	GTGGATCTCTTTTGGCACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACA *****
C. dBAPT2	AAGAACTCAACTCAAAAACCGTGATGAGCTCGTCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGT
TaxusmediaBAPTmRNA	AAGAACTCAACTCAAAAACCGTGATGAGCTCGTCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGT
TaxuscuspidataBAPTmRNA	AAGAACTCAACTCAAAAACCGTGATGAGCTCATCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGT *****
C. dBAPT2	TTGAAGATGTAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTGGACT
TaxusmediaBAPTmRNA	TTGAAGATGTAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTGGACT
TaxuscuspidataBAPTmRNA	TTGAAGATGTAGTTTCAATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTGGACT *****
C. dBAPT2	TTGGGTGGGGAGATGCAATGAACGTGAGCACT
TaxusmediaBAPTmRNA	TTGGGTGGGGAGATGCAATGAACGTGAGCACT
TaxuscuspidataBAPTmRNA	TTGGGTGGGGAGATGCAATGAACGTGAGCACT *****

図9 *Cordyceps dipterigene* の BAPT2 遺伝子のアライメント 下線はプライマー部分

Fig. 9 Genome sequence alignment of BAPT 2 partial sequences from *Cordyceps dipterigene* Under line: primer site
 相同性 Taxus x media phenylpropanoyltransferase (BAPT) mRNA(802-1232bp) 431/431 (100%)
 homology Taxus cuspidata phenylpropanoyltransferase mRNA(719-1149bp) 429/431 (99%)

次にこれらの断片から作製したプライマーを用いてゲノムウォーキングを行い、遺伝子配列を解析していった。

また、ゲル抽出 PCR の結果から、タキソイド生合成酵素の遺伝子は種を超えて保存性が高いことが示唆されたので、先のドットプロットハイブリダイゼーションで 3 つの酵素プローブでシグナルを示した種の中から最も成長の早かった *Colletotrichum gloeosporioides* についても、ゲノムウォーキングを行った。その際に 2 章のキャラボクのゲノムウォーキング、3 章のカヤのゲノムウォーキングで使用したプライマーを使用した。

Fig.10 にゲノムウォーキングで読めた *Cordyceps dipterigene* のアライメント図を示した。この Fig.10 に示したように、1268bp の BAPT 遺伝子断片を取得することができ、その内部でキャラボクと同じ位置に 119bp のイントロン部分が確認された。また、このイントロン部分を除いたエキソン部分において、既知のイチイ属由来の BAPT の mRNA と 99% という高い相同性を示した。

また、上流配列を 230bp 程度解析することができ、PlantPAN(Chang ら 2008)を用いて転写調節領域解析を行った。その結果を Fig.11 に示した。Fig.11 に示したように、上流 100bp まではキャラボクの上流配列と高い相同性を示したが、それより上流の相同性は 40%以下であった。また、*Cordyceps dipterigene* の BAPT 遺伝子上流配列には、キャラボクと同じく CTATTT というイニシエーター配列を有していたため、ここが転写出発点となる可能性が高い。

また、キャラボクの BAPT の上流配列にはなかった脱水反応の配列 CATGT (Simpson ら 2003)と水ストレス応答配列 CCWACC (W=A/T) (Grotewold ら 1994)が存在していることが分かった。

C. dBAPTpartial	ATGAAGAAGACAGGTTGTTAGCAGAGTTCATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATG
TaxusmediaBAPTmRNA	ATGAAGAAGACAGGTTGTTAGCAGAGTTCATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATG
TaxuscupidataBAPTmRNA	ATGAAGAAGACAGGTTGTTGCAGAGTTCATGTGAATATGATTGAGCGAGTCATG

C. dBAPTpartial	TGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCCCTCTCTCGCCATTGACAAC
TaxusmediaBAPTmRNA	TGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCCCTCTCTCGCCATTGACAAC
TaxuscupidataBAPTmRNA	TGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATCCTCCCTCTCTCGCCATTGACAAC

C. dBAPTpartial	ATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGATTGCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTC
TaxusmediaBAPTmRNA	ATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGATTGCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTC
TaxuscupidataBAPTmRNA	ATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGATTGCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTC

C. dBAPTpartial	TCTGCAGATCCTGCAAAGTGATTCGGGAGGCTCTCTCCAAGGTGCTGGTTATTAT
TaxusmediaBAPTmRNA	TCTGCAGATCCTGCAAAGTGATTCGAGAGGCTCTCTCCAAGGTGCTGGTTATTAT
TaxuscupidataBAPTmRNA	TCTGCAGATCCTGCAAAGTGATTCGAGAGGCTCTCTCCAAGGTGCTGGTTATTAT
	***** **
C. dBAPTpartial	TACCCTTTTCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTGAAGTGGAGTGC
TaxusmediaBAPTmRNA	TACCCTTTTCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTGAAGTGGAGTGC
TaxuscupidataBAPTmRNA	TACCCTTTTCTGGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGAACTTGAAGTGGAGTGC

C. dBAPTpartial	ACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTTCAGTCTTA
TaxusmediaBAPTmRNA	ACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTTCAGTCTTA
TaxuscupidataBAPTmRNA	ACAGGGCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTTCAGTCTTA

C. dBAPTpartial	ACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTAATTTTTCTCTACCACAG
TaxusmediaBAPTmRNA	ACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTAATTTTTCTCTACCACAG
TaxuscupidataBAPTmRNA	ACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTAATTTTTCTCTACCACAG

C. dBAPTpartial	GATACAGATATTGAGGACCTCCATCTCTTGATTGTTGAGTTGATTATATGGCTGGTT
TaxusmediaBAPTmRNA	GATACAGATATTGAGGACCTCCATCTCTTGATTGTTGAGTTGATTATATGGCTGGTT
TaxuscupidataBAPTmRNA	GATACAGATATTGAGGACCTCCATCTCTTGATTGTTGAGTTGATTATATGGCTGGTT

C. dBAPTpartial	TGATATTTGGGTAACCTTGAATGATGTCTCTATTAATGGTTACATACATGTTTCTAT
TaxusmediaBAPTmRNA	-----
TaxuscupidataBAPTmRNA	-----


```

C. dBAPTpartial      TGACAGCATGCTTGTGTTCTTTGTTGCATGCTTTTATGCAGGTAACCTCGTTTT
TaxusmediaBAPTmRNA  -----GTAACCTCGTTTT
TaxuscupidataBAPTmRNA -----GTAACCTCGTTTT
                                                                *****

C. dBAPTpartial      ACATGTGGGGGTTTTGTTGTGGGAGCGAATGTGTATGGCAGTACATGCGATGCAAAA
TaxusmediaBAPTmRNA  ACATGTGGGGGTTTTGTTGTGGGAGCGAATGTGTATGGTAGTACATGCGATGCAAAA
TaxuscupidataBAPTmRNA ACATGTGGGGGTTTTGTTGTGGGAGCGAATGTGTATGGTAGTGCATGCGATGCAAAA
                                                                *****

C. dBAPTpartial      GGATTTGGCCAGTTTCTTCAAGGTATGGCAGAGATGGCGAGAGGAGAGGTTAAGCCC
TaxusmediaBAPTmRNA  GGATTTGGCCAGTTTCTTCAAGGTATGGCAGAGATGGCGAGAGGAGAGGTTAAGCCC
TaxuscupidataBAPTmRNA GGATTTGGCCAGTTTCTTCAAAGTATGGCAGAGATGGCGAGAGGAGAGGTTAAGCCC
                                                                *****

C. dBAPTpartial      TCGATTGAACCGATATGGAATAGAGAACTGGTGAAGCTAGAAGATTGTATGCCCTTC
TaxusmediaBAPTmRNA  TCGATTGAACCGATATGGAATAGAGAACTGGTGAAGCTAGAAGATTGTATGCCCTTC
TaxuscupidataBAPTmRNA TCGATTGAACCGATATGGAATAGAGAACTGGTGAAGCTAGAACATTGTATGCCCTTC
                                                                *****

C. dBAPTpartial      CGGATGAGTC ATCTTCAAATTATACACGCACCTGTAATTGAGGAGAAATTTGTTCA
TaxusmediaBAPTmRNA  CGGATGAGTC ATCTTCAAATTATACACGCACCTGTAATTGAGGAGAAATTTGTTCA
TaxuscupidataBAPTmRNA CGGATGAGTCATCTTCAAATTATACATGCACCTGTAATTGAGGAGAAATTTGTTCA
                                                                *****

C. dBAPTpartial      AACATCTCTTGTTATAAACTTTGAGATAATAAATCATATCAGACGACGCATCATGGA
TaxusmediaBAPTmRNA  AACATCTCTTGTTATAAACTTTGAGATAATAAATCATATCAGACGACGCATCATGGA
TaxuscupidataBAPTmRNA AACATCTCTTGTTATAAACTTTGAGATAATAAATCATATCAGACGACGCATCATGGA
                                                                *****

C. dBAPTpartial      AGAATGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAGCATTGTTTGGCTAGC
TaxusmediaBAPTmRNA  AGAATGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAGCATTGTTTGGCTAGC
TaxuscupidataBAPTmRNA AGAACGCAAAGAAAGTTTATCTTCATTTGAAATTGTAGCAGCATTGTTTGGCTAGC
                                                                *****

C. dBAPTpartial      AAAGATAAAGGCTTTTCAAATTCACATAGTGAGAATGTGAAGCTCTTTTGAAT
TaxusmediaBAPTmRNA  AAAGATAAAGGCTTTTCAAATTCACATAGTGAGAATGTGAAGCTCTTTTGAAT
TaxuscupidataBAPTmRNA AAAGATAAAGGCTTTTCAAATTCACATAGTGAGAATGTGAAGCTCTTTTGAAT
                                                                *****

C. dBAPTpartial      GGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCTCTTCCACATGGATACTATGGCAATGCCTT
TaxusmediaBAPTmRNA  GGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCTCTTCCACATGGATACTATGGCAATGCCTT
TaxuscupidataBAPTmRNA GGACTTGAGGAGATCATTTAATCCCCTCTTCCACATGGATACTATGGCAATGCCTT
                                                                *****

```

```

C. dBAPTpartial      TGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGTGGATCTCTTTTGGC
TaxusmediaBAPTmRNA   TGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGTGGATCTCTTTTGGC
TaxuscupidataBAPTmRNA TGGTATTGCATGTGCAATGGATAATGTCCATGACCTTCTAAGTGGATCTCTTTTGGC
*****
C. dBAPTpartial      CACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACAAAGAAGTCAACTCAAA
TaxusmediaBAPTmRNA   CACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACAAAGAAGTCAACTCAAA
TaxuscupidataBAPTmRNA CACTATAATGATCATAAAGAAATCAAAGTTCTCTTTACACAAAGAAGTCAACTCAAA
*****
C. dBAPTpartial      AACCGTGATGAGCTCGTCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGTTTGAAGATGTAGTTTC
TaxusmediaBAPTmRNA   AACCGTGATGAGCTCGTCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGTTTGAAGATGTAGTTTC
TaxuscupidataBAPTmRNA AACCGTGATGAGCTCATCTGTAGTAGATGTCAATACGAAGTTTGAAGATGTAGTTTC
*****
C. dBAPTpartial      AATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTGACTTTGGGTGGGGAATGATGC
TaxusmediaBAPTmRNA   AATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTGACTTTGGGTGGGGAATGATGC
TaxuscupidataBAPTmRNA AATTAGTGATTGGAGGCATTCTATATATTATGAAGTGACTTTGGGTGGGGAATGATGC
*****
C. dBAPTpartial      AATGAACGTGAGCACTA
TaxusmediaBAPTmRNA   AATGAACGTGAGCACTA
TaxuscupidataBAPTmRNA AATGAACGTGAGCACTA
*****

```

図 10 BAPT 遺伝子部分配列(1268bp) アライメント

Fig. 10 Genome sequence alignment of BAPT partial sequence(1268bp) of *Cordyceps dipterigene* by gel extraction PCR and Genome Walking

紫の間部分はイントロン 赤は開始コドン 赤字：アシル基転移酵素で保存性の高い配列

Region between purple boxes is intron. Red box is start codon. Red letters are gene sequences coresponding to conserved motif in acyl transferase

Taxus x media phenylpropanoyltransferase (BAPT) mRNA(84-1233bp) 1147/1150 (99%)

Taxus cuspidata phenylpropanoyltransferase mRNA(1-1150bp) 1139/1150 (99%)

```

kyaraBAPTflanking      AATATATAATTCCTGGAAAACGTGTTAACGTCCTCCGGTTGAATATGGGGCCTCCATCGT
C. dBAPTflanking      -AAATTTGTGTTGATAACAATCCATGTGGAAATTGAAAGCCAAAATATAGA-TAAGTATC
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
kyaraBAPTflanking      TTCTTAATTTGGCTGTTTCGC-TGATGGAATATAGACACATGTG-AGTAATCACTGGCCC
C. dBAPTflanking      CACGTGAAACAGTAACCACACATGAAAAAGTAACCACAGGGAAACAGTAAACA CCAACCC
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
kyaraBAPTflanking      ATGTTCAATGTATCATTTTCCCTACATAA---ACAATTATCCAGCTGCTCAATCCCATC
C. dBAPTflanking      AGTTCACTGCATCATTTTCCCTACATAATTAACAATTATCTAGCTGCTCAATCCCATC
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
kyaraBAPTflanking      CTATTTTCTGAAAGCTTTTTCC--TCTGTTCTGAATACTTAGAG
C. dBAPTflanking      CTATTTTCTGAAAGCTTAATCCGCTCTGTTCTGAATACTTAGAG
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

図 11 *Cordyceps dipterigene* の BAPT 遺伝子上流配列と転写調節因子解析結果
 Fig. 11 Genome sequence alignment of the 5'-flanking sequence of BAPT from *Cordyceps dipterigene* and prediction of *cis*-acting element

GATABOX 配列:GATA 光応答性配列 sequence:GATA light response *cis* element

GT1consensus 配列 配列:GRWAAW R=A/G; W=A/T 光応答性
 sequence:GRWAAW light response cis element

MYC 結合配列 配列 CATGT 脱水応答配列
 sequence:CATGT dehydration response element

MYB 結合領域 配列 WAACCA W=A/T 水ストレス脱水応答配列
 sequence:WAACCA W=A/T dehydration response element

Initiator 配列 配列 YYANWYY Y=C/T; W=A/T; N=A/T/G/C 転写開始点
 sequence: YYANWYY start point of transcription

次に、*Colletotrichum gloeosporioides* のゲノムウォーキングの結果を示す。TXS 遺伝子に関しては、3つの DNA 断片を増幅することに成功し、それぞれ TXS 候補遺伝子 1,2 および 3 と名付け、それぞれのアライメント図を Fig. 12, 13,14 に示した。Fig. 12 に示したように、TXS 候補遺伝子 1 は、1154bp の DNA 断片で、既知のイチイ属由来 TXS 遺伝子の 250bp あたりから 1400bp あたりをカバーしている部分と 96%以上の高い相同性が確認された。また、この 1154bp の中に3つのイントロン部分が存在していると考えられた。

Fig.13 に示したように、TXS 候補遺伝子 2 は 952bp の DNA 断片であり、既知のイチイ属由来 TXS 遺伝子の 1800bp から 2800bp あたりをカバーしている部分と 95%以上の高い相同性を示した。また、この 952bp の中に4つのイントロン部分が存在していると考えられた。

Fig.14 に示したのは、193bp の TXS 候補遺伝子 3 のアライメント図であり、その結果から、この部分は既知の TXS 遺伝子の 3250bp から 3450bp の部分の断片であることが示唆された。

BAPT 遺伝子に関しては1つの DNA 断片を増幅することに成功した。その DNA 断片と既知のイチイ属由来 BAPT 遺伝子とのアライメント図を Fig.15 に示した。Fig.15 に示したように、この DNA 断片は 481bp の長さで、BAPT 遺伝子の 5'非翻訳領域と翻訳領域 420bp に相当する部分であることが示唆された。翻訳領域の 420bp に関しては、98%と非常に高い相同性を示したが、5'非翻訳領域に関しては、77%とやや低い値となった。

TaxusbaccataTXSmRNA	TTGTGGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGTGG
TaxusbaccataTXSgene	TTGTGGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGTGG
C. gTXS1	TTGTGGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGTGG
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTGTGGATGATATCCCTCGACTCTCCGCCAATTATCATGGCGATCTGTGG *****
TaxusbaccataTXSmRNA	CACCACAATGTTATACAAACTCTGGAGACACCATTTTCGTGAG-----
TaxusbaccataTXSgene	CACCACAATGTTATACAAACTCTGGAGACACCGTTTCGTGAGGTAGGGAA
C. gTXS1	CACCACAATGTTATACAAACTCTGGAGACACCATTTTCGTGAGGTAGGGAA
TaxusbrevifoliaTXSgene	CACCACAATGTTATACAAACTCTGGAGACACCGTTTCGTGAGGTAGGGAA *****
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSgene	AAGTAGAAAACAGTTAAACGGATTTAATGGGTAGATTTAGTCGTTCATA
C. gTXS1	AAGTAGAAAACAGTTAAACGGATTTAATGGGTAGATTTAGTCGTTCATA
TaxusbrevifoliaTXSgene	AAGTAGAAAACAGTTAAACGGATTTAATGGGTAGATTTAGTCGTTCATA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----AGTTCTACTTTCCAAGAACG
TaxusbaccataTXSgene	TTTGTGGCTGACATTTCTGTGAAGTGCAGAGTTCTACTACCAAGAACG
C. gTXS1	TTTGTAGGCTGACATTTCTGTGAAGTGCAGAGTTCTACTACCAAGAACG
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTTGTGGCTGACATTTCTGTGAAGTGCAGAGTTCTACTACCAAGAACG *****
TaxusbaccataTXSmRNA	GGCAGACGAGCTGGTTGTGAAAATTAAGATATGTTCAATGCGCTCGGAG
TaxusbaccataTXSgene	GGCAGATGAGCTGGTTGTGAAAATTAAGATATGTTCAATGCGCTCGGAG
C. gTXS1	GGCAGATGAGCTGGTTGTGAAAATTAAGATATGTTCAATGCGCTCGGAG
TaxusbrevifoliaTXSgene	GGCAGATGAGCTGGTTGTGAAAATTAAGATATGTTCAATGCGCTCGGAG *****
TaxusbaccataTXSmRNA	ACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGGTGGCGAGGGTG
TaxusbaccataTXSgene	ACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGGTGGCGAGGGTG
C. gTXS1	ACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGGTGGCGAGGGTG
TaxusbrevifoliaTXSgene	ACGGAGATATCAGTCCGTCTGCATACGACACTGCGTGGGTGGCGAGGGTG *****
TaxusbaccataTXSmRNA	GCGACCGTTTCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCTCAGGCCCT
TaxusbaccataTXSgene	GCGACCGTTTCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCTCAGGCCCT
C. gTXS1	GCGACCATTCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCTCAGGCCCT
TaxusbrevifoliaTXSgene	GCGACCATTCTCTGATGGATCTGAGAAGCCACGGTTTCTCAGGCCCT *****
TaxusbaccataTXSmRNA	CAACTGGGTTTTAAACAACCAGCTCCAAGATGGATCATGGGGTATCGAAT

TaxusbaccataTXSgene	CAACTGGGTTTTAAACAACCAGCTCCAGGATGGATCGTGGGGTATCGAAT
C. gTXS1	CAACTGGGTTTTCAACAACCAGCTCCAGGATGGATCGTGGGGTATCGAAT
TaxusbrevifoliaTXSgene	CAACTGGGTTTTCAACAACCAGCTCCAGGATGGATCGTGGGGTATCGAAT
	***** **
TaxusbaccataTXSmRNA	CGCACTTTAGTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGGTCAATTCTGTTATC
TaxusbaccataTXSgene	CGCACTTTAGTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGGTCAATTCTGTTATC
C. gTXS1	CGCACTTTAGTTTATGCGATCGATTGCTTAACGCGACCAATTCTGTTATC
TaxusbrevifoliaTXSgene	CGCACTTTAGTTTATGCGATCGATTGCTTAACACGACCAATTCTGTTATC
	***** ** *****
TaxusbaccataTXSmRNA	GCCCTCTCGGTTTGAAAACAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAG-----
TaxusbaccataTXSgene	GCCCTCTCGGTTTGAAAACAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAGGTCAGAA
C. gTXS1	GCCCTCTCGGTTTGAAAACAGGGCACAGCCAAGTAGAACAAGGTTAGAA
TaxusbrevifoliaTXSgene	GCCCTCTCGGTTTGAAAACAGGGCACAGCCAAGTACAACAAGGTCAGAA

TaxusbaccataTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSgene	TCATGGCATTGTTGGGAAAAAAAAAATAGTGTGAAGGTTTACTGGTCAAT
C. gTXS1	TCATGGCATTGTTGGGAAAAAAAAA-CAGTGTGAAGGTTTACTGGTCAAT
TaxusbrevifoliaTXSgene	ACATGGCATTGTTGGGAAAAAAAAAATTAGTGTGCGAAA-TTGACTGGTCAAT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSgene	CAACTAATGTTTTGTTTATCATTGTTTTGGGGTGGATTTATCATTGGTTGG
C. gTXS1	CAACTAATGTTTTGTTTCTCATTGTTTTGGGGTGGATTTATCATTGGTTGG
TaxusbrevifoliaTXSgene	CAACCAATGGGTTGTTTACCATTGTTTTAAGGTGGATTTATCATTGGTTGG
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSgene	TTGACCAGTCAGCCTTGCAAACATATGTGATGTTTAAGC-----CCC
C. gTXS1	CTGATCAGTCAGCCTTGCAAATATATGTGATGTTTAAGC-----GCC
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTGACCAGTCAGCCTTGCAAACATATGTGATGTTTAAGCTGAGCTTTGCC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----GTACTGAGT
TaxusbaccataTXSgene	AAATCTGTTGTCTCATTATTTTTCTGTTTTTTCTCCACAGGTGCTGAGT
C. gTXS1	AAATCTGTTGTCTCATTATTTTTCTATTTTTTTCTCCACAGGTACTGAGT
TaxusbrevifoliaTXSgene	AAATTTGTTGTCTCATTATTTTTCTGTTTTTTCTCCACAGGTGCTGAGT

TaxusbaccataTXSmRNA	TTATTGCAGAGAATCTAAGATTACTCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCG
TaxusbaccataTXSgene	TTATTGCAGAGAATCTAAGATTACTCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCG
C. gTXS1	TTATTGCAGAGAATCTAAGATTACTCAATGAGGAAGATGAGCTGTCCCG
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTATTGCAGAGAATCTAAGATTACTCAATGAGGAAGATGAGTTGTCCCG *****
TaxusbaccataTXSmRNA	GATTTGAAATAATCTTTCCTGCTCTGCTGCAAAGGCAAAGCGTTGGG
TaxusbaccataTXSgene	GATTTGAAATAATCTTTCCTGCTCTGCTGCAAAGGCAAAGCGTTGGG
C. gTXS1	GATTTGAAATAATCTTTCCTGCTCTGCTGCAAAGGCAAAGCGTTGGG
TaxusbrevifoliaTXSgene	GATTTCAAATAATCTTTCCTGCTCTGCTGCAAAGGCAAAGCGTTGGG *****
TaxusbaccataTXSmRNA	GATCAATCTTCTTACGATCTTCCATTTATCAAATCTTGTGACAACAC
TaxusbaccataTXSgene	GATCAATCTTCTTACGATCTTCCATTTATCAAATCTTGTGACAACAC
C. gTXS1	GATCAATCTTCTTACGATCTTCCATTTATCAAATCTTGTGACAACAC
TaxusbrevifoliaTXSgene	GATCAATCTTCTTACGATCTTCCATTTATCAAATATTTGTGACAACAC *****
TaxusbaccataTXSmRNA	GGGAAGCCAGGCTTACAGA-----
TaxusbaccataTXSgene	GGGAAGCCAGGCTTACAGAGT GAGTGAAAACCTCTGTTACTGTTTTCTTT
C. gTXS1	GGGAAGCCAGGCTTACAGAGT GAGTGAAAACCTTGTACTGTTTTTAA
TaxusbrevifoliaTXSgene	GGGAAGCCAGGCTTACAGAGT GAGTGAAAACCTCTGTTACTGTTTTTTAA *****
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
TaxusbaccataTXSgene	TTCAAAA-CTGGGCATCATGTTCTGGATTTGTAATTTGTTATTTTTGCC
C. gTXS1	AAAAAAAACCTGGTAATCATGTTCTGGATTTGTAATTTGTTCTTTTTGGCC
TaxusbrevifoliaTXSgene	AAAAAAAACCTGGGCATCATGTTCTGGATTTCAAATTTGTTCTTTTTGGCC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----TGTCTGCGGCAGCAGACAATATTCCAGCCAACATGTTGAAT
TaxusbaccataTXSgene	ATTGCAGTGTCTGCGGCAGCAGACAATATTCCAGCCAACATGTTGAAT
C. gTXS1	ATTGCAGTGTCTGCGGCAGCAGACAATATTCCAGCCAACATGTTGAAT
TaxusbrevifoliaTXSgene	ATTGCAGTGTCTGCGGCAGCAGACAATATTCCAGCCAACATGTTGAAT *****
TaxusbaccataTXSmRNA	GCGTTGGAGGTCTCGAGGAAGTTATTGATTGGAACAAGATTATGAGGTT
TaxusbaccataTXSgene	GCGTTGGAAGGTCTCGAGGAAGTTATTGACTGGAACAAGATTATGAGGTT
C. gTXS1	GCGTTGGAGGTCTCGAGGAAGTTATTGACTGGAACAAGATTATGAGGTT
TaxusbrevifoliaTXSgene	GCGTTGGAAGGTCTCGAGGAAGTTATTGACTGGAACAAGATTATGAGGTT *****

```

TaxusbaccataTXSmRNA      TCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCTCCCCTGCCTCCACTGCCTGTG
TaxusbaccataTXSgene      TCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCTCCCCTGCCTCCACTGCCTGTG
C. gTXS1                  TCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCTCCCCTGCCTCCACTGCCTGTG
TaxusbrevifoliaTXSgene   TCAAAGTAAAGATGGATCTTTCCTGAGCTCCCCTGCCTCCACTGCCTGTG
                          *****
TaxusbaccataTXSmRNA      TACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCTTCTCAACAATCTG
TaxusbaccataTXSgene      TACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTCTTCTCAACAATCTG
C. gTXS1                  TACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTTTTCTCAACAATCTG
TaxusbrevifoliaTXSgene   TACTGATGAATACAGGGGACGAAAAATGTTTCACTTTTCTCAACAATCTG
                          *****
TaxusbaccataTXSmRNA      CTGGACAAATTCG
TaxusbaccataTXSgene      CTGGACAAATTCG
C. gTXS1                  CTGGACAAATTCG
TaxusbrevifoliaTXSgene   CTGGACAAATTCG
                          ** *****

```

図 12 TXS1(1154bp)遺伝子のアライメント

Fig. 12 Genome sequence alignment of TXS1(1154bp) partial sequences

緑字は基質の入るポケットの蓋となる部分 活性を有するために必要な部分

Green letters are gene sequences corresponding to the necessary part to cap the active site for catalytically activity

紫の間の部分はイントロン

Regions between purple boxes are introns.

Taxus baccata tasy gene for taxadiene synthase(233-1386bp)	1128/1154 (98%)
Taxus brevifolia taxadiene synthase gene(258-1419bp)	1117/1162 (96%),
Taxus baccata taxadiene synthase mRNA(233-1021bp)	780/789(99%)

TaxusbaccataTXSgene	CGATGTTTCTTCAGGT CAGAAGATCAGAAATAATGAAAATAAAAGAAACT
TaxusbaccataTXSmRNA	CGATGTTTCTTCAG-----
C. gTXS2	CGATGTTTCTTCAGGT CAGAAGATCAGAAATAATGAAAATAAAAGAAACT
TaxusbrevifoliaTXSgene	CAATGTTTCTTCAGGT CAGAAGATCAGAAATAATGAAAATAAAAGAATTT *****
TaxusbaccataTXSgene	GGTTTTACTGTCTTATAGGCTATTCTTTTAGCCTCATGGACGTCAAAAAG
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
C. gTXS2	GGTTTTACTGTCTCATAGGCTATTCTTTTAGCCTCGTGGACGTCAAAAAG
TaxusbrevifoliaTXSgene	GGTTTTACTGTCTCATAAGCTATTCTTTCAGACTCATGGAAGTAAAAAG
TaxusbaccataTXSgene	TTTTCAATT-----GCTTTTATCAGATCTCAAGACTGTT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
C. gTXS2	TTTTCAATTCATTCATTT-----GTTTTTATCAGATCTCAAGACTGTT
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTTTCAATTCATTCATTTTCAGCTGGCTTTTATCAGATCTCAACATTGTT
TaxusbaccataTXSgene	AAATTGTTGCCATTTGAAAAATTCTTTGTGCTGATATGGAAACAAAAA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
C. gTXS2	AAATTGTTGCCATTTGAAAAATTCTTTGTGCTGATATGGAAACAAAAA
TaxusbrevifoliaTXSgene	AAATTGTTGTCATTTGAAAAATTCTTTGCGCTGATATGGAAACAAAAA
TaxusbaccataTXSgene	TATGAAAGCAGATGTTTTGAATAATTTCAAAGATGAAAACGGGCGGTTCT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----AGATGTTTTGAATAATTTCAAAGATGAAAACGGGCGGTTCT
C. gTXS2	TATGAAAGCAGATGTTTTGAATAATTTCATAGATGAAAACGGGCGGTTCT
TaxusbrevifoliaTXSgene	TATGAAAGCAGACGTTTTGAATAATTTCAAAGATGAAAACGGGCGGTTCT **** *****
TaxusbaccataTXSgene	TCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTGCAATTGAGAAGCGTGGTGAATCTT
TaxusbaccataTXSmRNA	TCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTGCAATTGAGAAGCGTGGTGAATCTT
C. gTXS2	TCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTGCAATTGAGAAGCGTGGTGAATCTT
TaxusbrevifoliaTXSgene	TCTCCTCTGCGGGCCAAACCCATGTGCAATTGAGAAGCGTGGTGAATCTT *****
TaxusbaccataTXSgene	TTCAGAGCTTCGACCTTGCAATTCCTGACGAAGGAGCTATGGACGATGC
TaxusbaccataTXSmRNA	TTCAGAGCTTCGACCTTGCAATTCCTGACGAAGGAGCTATGGACGATGC
C. gTXS2	TTCAGAGCTTCGACCTTGCAATTCCTGACGAAGGAGCTATGGACGATGC
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTCAGAGCTTCGACCTTGCAATTCCTGACGAAGGAGCTATGGACGATGC *****

TaxusbaccataTXSgene	TAGAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGACGCACCTTGCAACGAAAATCT
TaxusbaccataTXSmRNA	TAGAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGACGCACCTTGCAACGAAAATCT
C. gTXS2	TAGAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGACGCACCTTGCAACAAAATCT
TaxusbrevifoliaTXSgene	TAGAAAATTTGCAGAACCATATCTTAGAGAGGCACCTTGCAACGAAAATCT

TaxusbaccataTXSgene	CAACCAATACAAACTATACAAAGAGGTTAGTACAATTTATTTTATTAA
TaxusbaccataTXSmRNA	CAACCAATACAAACTATACAAAGAG-----
C. gTXS2	CAACTAATACAAACTATTCAAAGAGGTTAGTACAATTTATTTTATTAA
TaxusbrevifoliaTXSgene	CAACCAATACAAACTATTCAAAGAGGTTAGTACAATTTATTTTGATTAA
	**** *****
TaxusbaccataTXSgene	CAAAAATATATCAATAATTCTACCAACATAATTAGGAGTAAACCTAAAGT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
C. gTXS2	CAAAAATATATCAATAATTCTACCAACATAATTAGGAGTAAACCTAAAGT
TaxusbrevifoliaTXSgene	CAAAAATATATCAATAATTCTACCAACATAATTAGAAGTAAACCTAAAGT
TaxusbaccataTXSgene	TTTCTATTATATGTAGTTAGAAATCAAGGTTTCTCTAATATGATGGATCA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
C. gTXS2	TTTCTATTATATGTAGTTAGAAATCAAGGTTTCTCTAATATGATGGATCA
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTTCTATTAGATGTAATTAGAAATCAAGGTTTCTCTAATATGATGGATCA
TaxusbaccataTXSgene	TCCCAGATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATGAGTATCCCACG
TaxusbaccataTXSmRNA	-----ATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATGAGTATCCCACG
C. gTXS2	TTTCAGATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATGAGTATCCCACG
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTTCAGATTGAGTACGTGGTGGAGTACCCTTGGCACATGAGTATCCCACG

TaxusbaccataTXSgene	CTTAGAAGCCAGAAGTTATATTGATTCATATGACGACGATTATGTATGGC
TaxusbaccataTXSmRNA	CCTAGAAGCTAGAAGTTATATTGATTCGTATGACGACGATTATGTATGGC
C. gTXS2	TCTAGAAGCCAGAAGTTATATTGATTCGTATGACGATGATTATGTATGGC
TaxusmediaTXSmRNA	CCTAGAAGCCAGAAGTTATATTGATTCGTATGACGACGATTATGTATGGC
TaxusbrevifoliaTXSgene	CTTAGAAGCCAGAAGTTATATTGATTCATATGACGACAATTATGTATGGC
	***** *****
TaxusbaccataTXSgene	AGAGGAAGACTCTATACAGGTTGAGTTCAAATATATCCCATTACCCTTTA
TaxusbaccataTXSmRNA	AGAGGAAGACTCTATACAG-----
C. gTXS2	AGAGGAAGACTCTATACAGGTTGAGTTCAAATATAATCACATTACCCTTCA
TaxusbrevifoliaTXSgene	AGAGGAAGACTCTATATAGGTTGAGTTCAAATATGATCACATTACCCTTCA
	***** **** **

TaxusbaccataTXSgene	ATTTTATATAGAATTTATGACCCGTTGTTGTATCGATTGCTATCTTTTCT
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
C. gTXS2	ATTTTATATAGAATTTATGAGCCGTTGTTGTATCGATTGCTATCTTTTCT
TaxusbrevifoliaTXSgene	ATTTTATATAGAATTTATGAGCAGTTGTTGTATCGATTGCTATCTTTTCT
TaxusbaccataTXSgene	CAGTACTGAGGTTATAATTCGTGCAACAGAAATGCCATCTTTGAGTAATTC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----AATGCCATCTTTGAGTAATTC
C. gTXS2	CAGTATTGAGGTTATAATCCGTGCAACAGAAATGCCATCTTTGAGTAATTC
TaxusbrevifoliaTXSgene	CAGTACTGAGGTTATAATCCGTGCAACAGAAATGCCATCTTTGAGTAATTC

TaxusbaccataTXSgene	AAAATGTTTAGAATTGGCAAATTGGACTTCAATATCGTACAATCTTTGC
TaxusbaccataTXSmRNA	AAAATGTTTAGAATTGGCAAATTGGACTTCAATATCGTACAATCTTTGC
C. gTXS2	AAAATGTTTAGAATTGGCAAATTGGACTTCAATATCGTACAATCTTTGC
TaxusbrevifoliaTXSgene	AAAATGTTTAGAATTGGCAAATTGGACTTCAATATCGTACAATCTTTGC

TaxusbaccataTXSgene	ATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTAACAAGGTGGGTGATAAATTGTCATACC
TaxusbaccataTXSmRNA	ATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTAACAAG-----
C. gTXS2	ATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTAACAAGGTGGGTGATAAATTGTCATACC
TaxusbrevifoliaTXSgene	ATCAAGAGGAGTTGAAGCTTCTAACAAGGTGGGTGATAAATTGTCATACC

TaxusbaccataTXSgene	TTCTCAATTTATTCAAACCTAATTTTTTGGGGAGGAGAACATGAAGTAA
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
C. gTXS2	TTCTCAATTTATTCAAACCTAATTTTTTGGGGAGGAGAACATGAAGTAA
TaxusbrevifoliaTXSgene	TTCTCAATTTATTCAAACCTAATTTTTTGGGGAGGAGAACATGAAGTAA
TaxusbaccataTXSgene	TAATCTAC
TaxusbaccataTXSmRNA	-----
C. gTXS2	TGATCTAC
TaxusbrevifoliaTXSgene	TAATCTAC

図 13 TXS2(952bp)遺伝子のアライメント

Fig. 13 Genome sequence alignment of TXS2(952bp) partial sequences

(紫の間) 部分はイントロン

Regions between purple boxes are introns.

Taxus baccata tasy gene for taxadiene synthase(1797-2738bp)	921/952 (96%)
Taxus brevifolia taxadiene synthase gene(1830-2787bp)	917/956 (95%),
Taxus baccata taxadiene synthase mRNA(1248-1691bp)	436/443(98%)

```

C. gTXS3          AATTGAGAATTTTATAGTTTAGATGCATTTCTTTTAAAGGTA AAAACAC
TaxusbaccataTXSmRNA -----
TaxusbaccataTXSgene AATTGAGAATTTTATAGTTTAGATGCATTTCTTTTAAAGGTA AAAACAC
TaxusbrevifoliaTXSgene AGTTGAGAATTTTATAGTTTAGATGCATTTCTTTTAAAGGTA AAAACAC

C. gTXS3          CATTGGTACTCACAAAAACATCGTGTATGATTGGAATAGTGGGAGTTGTA
TaxusbaccataTXSmRNA -----TGGGAGTTGTA
TaxusbaccataTXSgene CATTGGTACTCACAAAAACATCGTGTATGATTGGAATAGTGGGAGTTGTA
TaxusbrevifoliaTXSgene CATTGGTACTCACAAAAACATCGTGTATGATTGGAATAGTGGGAGTTGTA
*****

C. gTXS3          CTTCAATTGTTATGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCTGGGTATATAC
TaxusbaccataTXSmRNA CTTCAATTGTTACGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCTGGGTATATAC
TaxusbaccataTXSgene CTTCAATTGTTATGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCCGGGTATATAC
TaxusbrevifoliaTXSgene CTTCAATTGTTATGTACAAGAAAGGGAGTGGCTTGAAGCCGGGTATATAC
*****

C. gTXS3          CAACTTTTGAAGAGTACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGG
TaxusbaccataTXSmRNA CAACTTTTGAAGAGTACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGG
TaxusbaccataTXSgene CAACTTTTGAAGAGTACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGG
TaxusbrevifoliaTXSgene CAACTTTTGAAGAGTACTTAAAGACTTATGCTATATCAGTAGG
**** *****

```

図 14 TXS3(193bp)遺伝子のアライメント

Fig. 14 Genome sequence alignment of TXS3(193bp) partial sequences

(紫の間) 部分はイントロン

Regions between purple boxes are introns.

Taxus baccata tasy gene for taxadiene synthase(3243-3435bp)	192/193(99%)
Taxus brevifolia taxadiene synthase gene(3291-3483bp)	192/193 (95%),
Taxus baccata taxadiene synthase mRNA(2041-2144bp)	103/104(98%)

TaxusmediaBAPTmRNA	AGAGTATGCGGGGATCTTATTTTCTGAAAGCTTAATCCGCTCTGTTCTGA
TaxuscupidataBAPTmRNA	-----
C. gBAPTpartial	CTGCTCAATTCCCATCCTATTTTCTGAAAGCTTTTTC--CTCTGTTCTGA
TaxusmediaBAPTmRNA	ATACTTAGAGATGAAGAAGACAGGTTGTTAGCAGAGTTCATGTGAATA
TaxuscupidataBAPTmRNA	-----ATGAAGAAGACAGGTTGTTTGCAGAGTTCATGTGAATA
C. gBAPTpartial	ATAATTAGAGATGAAGAAGGCAGATTGTTAGCAGAGTTCATGTGAATA
	***** ** ***** *****
TaxusmediaBAPTmRNA	TGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATC
TaxuscupidataBAPTmRNA	TGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATC
C. gBAPTpartial	TGATTGAGCGAGTCATGGTGAGACCGTGCCTGCCTTCGCCAAAACAATC

TaxusmediaBAPTmRNA	CTCCCTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATT
TaxuscupidataBAPTmRNA	CTCCCTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATT
C. gBAPTpartial	CTCCCTCTCTCGCCATTGACAACATGGCAAGAGCTTTTTCTAACGTATT

TaxusmediaBAPTmRNA	GCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAG
TaxuscupidataBAPTmRNA	GCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAG
C. gBAPTpartial	GCTGGTCTACGCTGCCAACATGGACAGAGTCTCTGCAGATCCTGCAAAAG

TaxusmediaBAPTmRNA	TGATTCGAGAGGCTCTCTCCAAGGTGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCT
TaxuscupidataBAPTmRNA	TGATTCGAGAGGCTCTCTCCAAGGTGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCT
C. gBAPTpartial	TGATTCGAGAGGCTCTCTCCAAGGTGCTGGTTTATTATTACCCTTTTGCT

TaxusmediaBAPTmRNA	GGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGGAACCTGAAGTGGAGTGCACAGG
TaxuscupidataBAPTmRNA	GGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGGAACCTGAAGTGGAGTGCACAGG
C. gBAPTpartial	GGGCGGCTCAGAAATAAAGAAAATGGGGAACCTGAAGTGGAGTGCACAGG

TaxusmediaBAPTmRNA	GCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTTCAGTCT
TaxuscupidataBAPTmRNA	GCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTTCAGTCT
C. gBAPTpartial	GCAGGGTGTCTGTTTCTGGAAGCCATGGCTGACAGCGACCTTTCAGTCT

TaxusmediaBAPTmRNA	TAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTTCT
TaxuscupidataBAPTmRNA	TAACAGATCTGGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTTCT
C. gBAPTpartial	TAACAGATCTCGATAACTACAATCCATCGTTTCAGCAGTTGATTTTTTCT
	***** *****

```

TaxusmediaBAPTmRNA      CTACCACAGGATACAGATATTGAGGACCTC
TaxuscuspidataBAPTmRNA  CTACCACAGGATACAGATATTGAGGACCTC
C. gBAPTpartial         CTACCACAGGATATAGATATTGAGGGACCA
                        *****

```

図 15 BAPT 遺伝子配列 アライメント

Fig. 15 Genome sequence alignment of BAPT partial sequences from *Colletotrichum gloeosporioides* by Genome Walking

赤は開始コドン 開始コドン上流：5'非翻訳領域

Red box is start codon. Upper stream from start codon is 5' untranslated region.

Taxus x media phenylpropanoyltransferase (BAPT)mRNA(24-504bp) 459/481 (95%)

Taxus cuspidata phenylpropanoyltransferase mRNA(1-420bp) 413/420 (98%)

ここまでの研究で得られた部分配列の位置をまとめた模式図を下の Fig. 16, 17 に示した。*Cordyceps dipterigene* に関しては、TXS 遺伝子 877bp, BAPT 遺伝子 1233bp の情報を得た。*Colletotrichum gloeosporioides* では TXS 全長 3990bp のうち 2299bp 分の情報を得た。また BAPT 遺伝子は 481bp 分の遺伝子情報を取得でき、全ての情報でイチイ属由来既知のものと同様に 95%以上の高い相同性を示した。

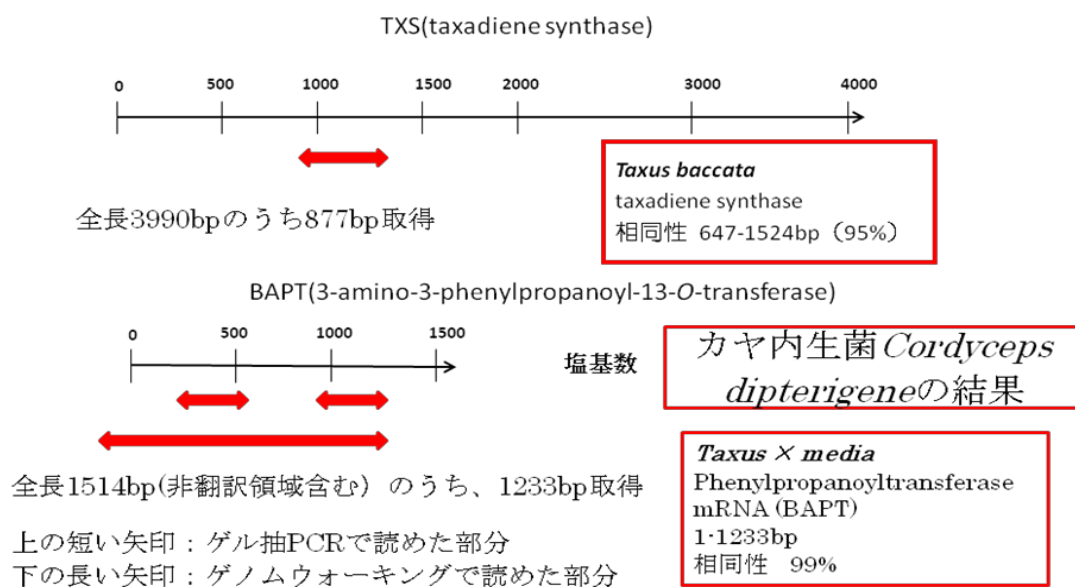


図 16 *Cordyceps dipterigene* のシーケンス結果まとめ

Fig. 16 Results of TXS and BAPT sequences in *Cordyceps dipterigene*

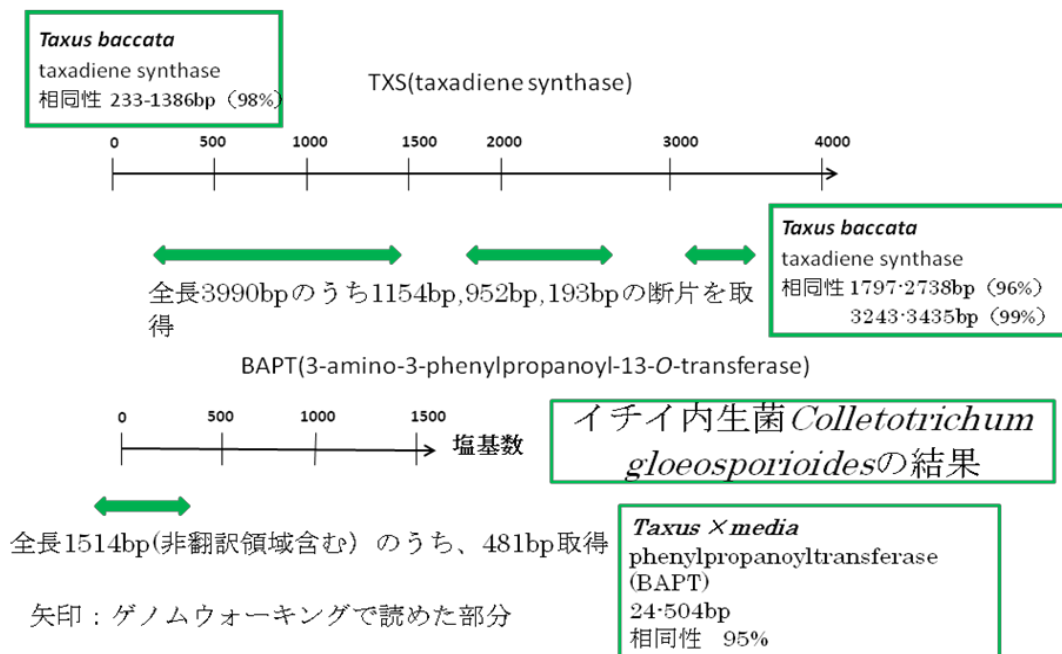
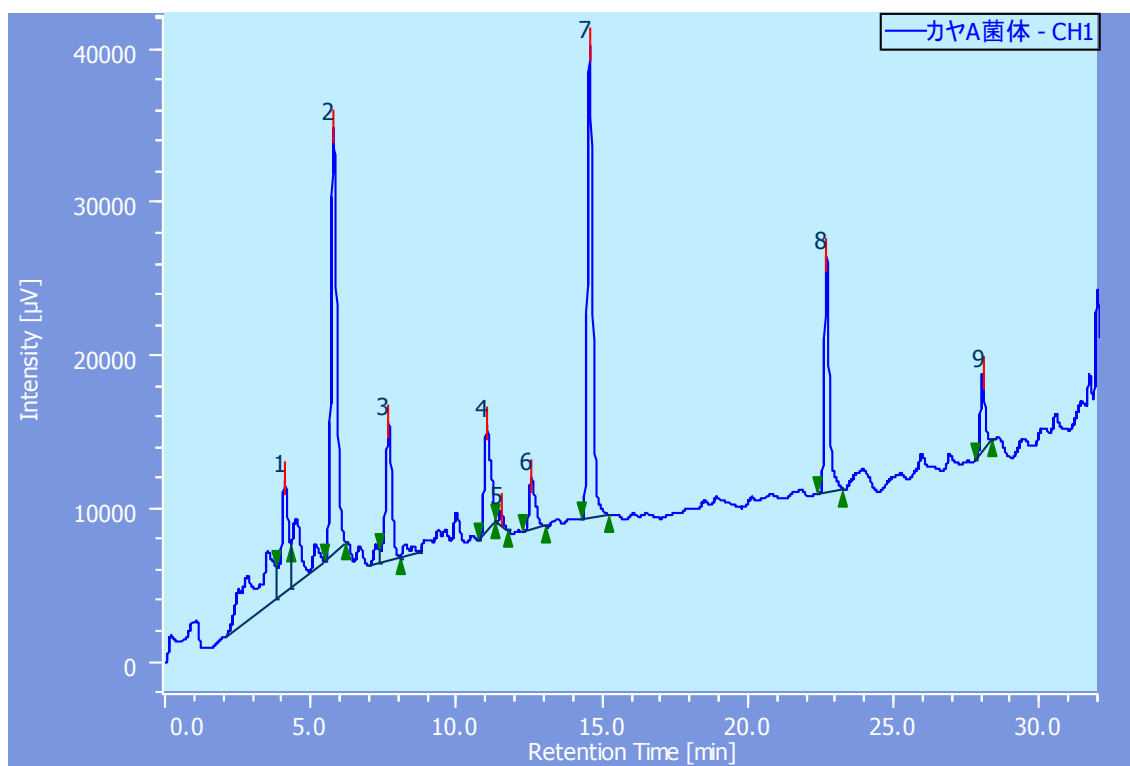


図 17 *Colletotrichum gloeosporioides* のシーケンス結果まとめ

Fig. 17 Results of TXS and BAPT sequences in *Colletotrichum gloeosporioides*

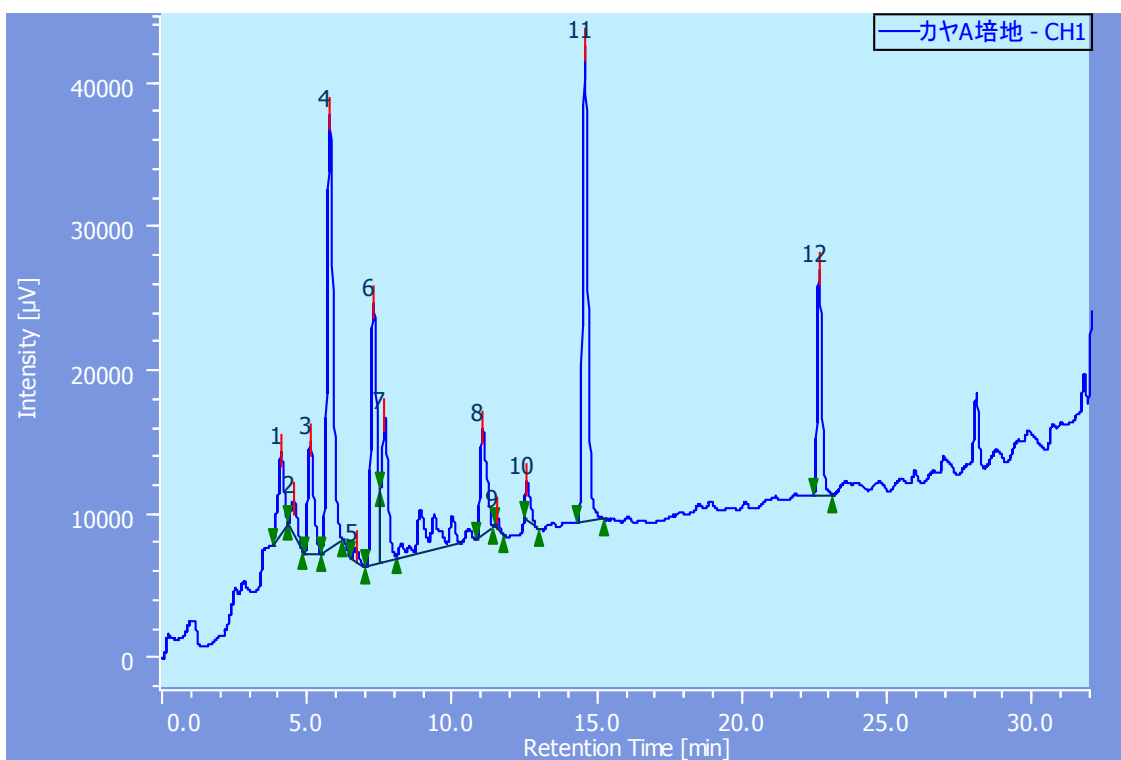
4-3-3 カヤ内生菌 *Cordyceps dipterigene* とイチイ内生菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の成分分析

以下に、*Cordyceps dipterigene* と *Colletotrichum gloeosporioides* の菌体からの抽出成分と液体培地中の成分の HPLC 分析の結果を示す。



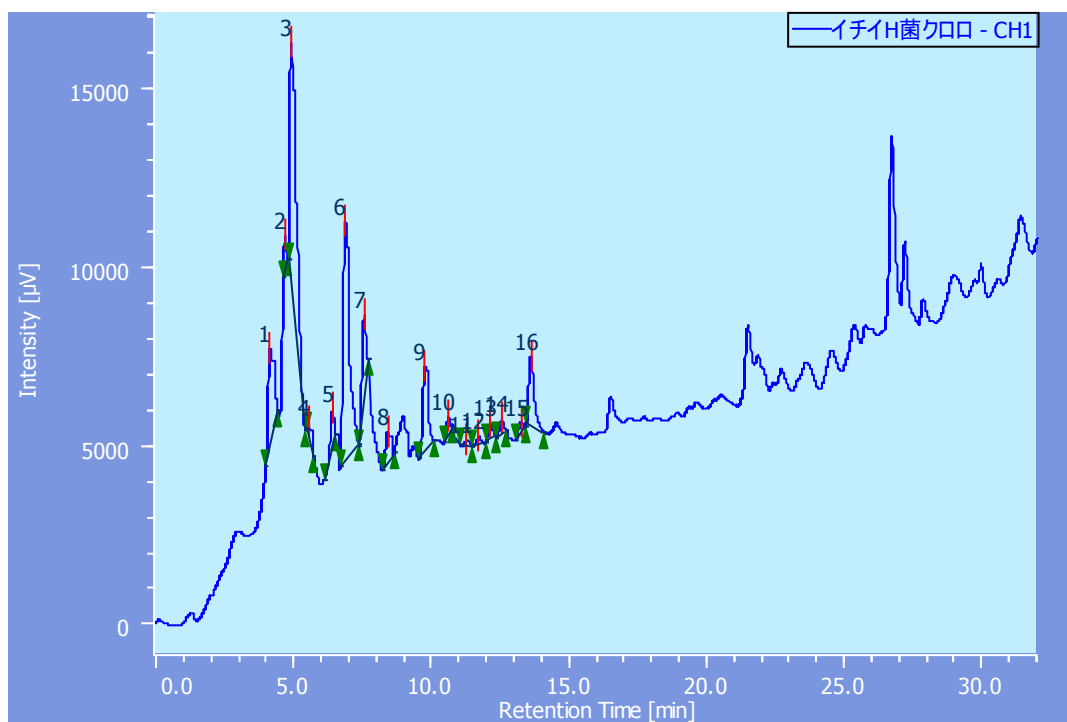
ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height	面積% Area%	高さ% Height%
1	4.1	120000	7390	8.40	6.91
2	5.8	386000	27700	27.1	25.9
3	7.7	135000	9000	9.48	8.48
4	11.0	105000	6990	7.39	6.54
5	11.5	9600	1010	0.672	0.945
6	12.6	50800	3360	3.56	3.15
7	14.5	385000	30900	27.1	28.9
8	22.6	179000	15400	12.5	14.4
9	28.0	53400	5100	3.75	4.77

図 18 *Cordyceps dipterigene* 成分 HPLC 分析クロマトグラムとピークデータ
Fig. 18 HPLC analysis of Extracts from *Cordyceps dipterigene* and peak table



ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height	面積% Area%	高さ% Height%
1	4.1	76700	5570	4.25	4.14
2	4.5	35400	2390	1.96	1.77
3	5.1	107000	7860	5.93	5.84
4	5.8	424000	30000	23.5	22.3
5	6.7	10200	838	0.563	0.622
6	7.3	262000	18200	14.5	13.5
7	7.7	152000	10100	8.42	7.47
8	11.0	113000	7420	6.29	5.51
9	11.5	7430	859	0.412	0.638
10	12.6	34800	2770	1.93	2.06
11	14.6	412000	33100	22.9	24.6
12	22.6	169000	15700	9.39	11.6

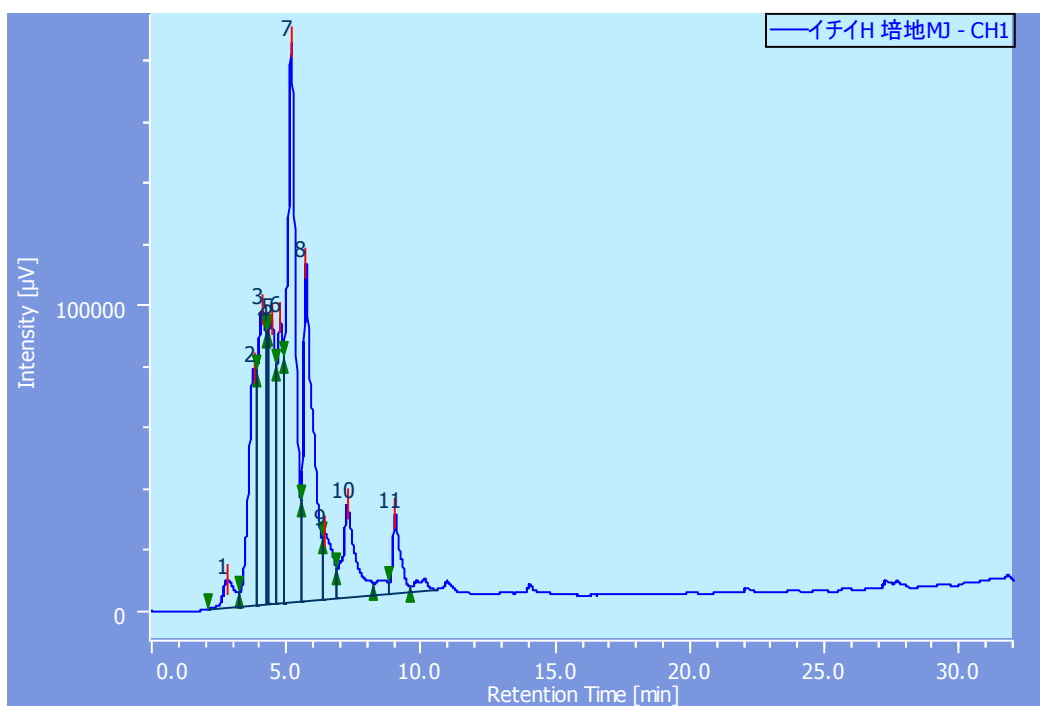
図 19 *Cordyceps dipterigene* 培地の成分 HPLC 分析クロマトグラムとピークデータ
 Fig. 19 HPLC analysis of Extracts from medium of *Cordyceps dipterigene* and peak table



ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height	面積% Area%	高さ% Height%
1	4.1	40700	2750	10.2	9.88
2	4.7	4970	991	1.24	3.56
3	4.9	115000	6810	28.7	24.5
4	5.5	6550	438	1.64	1.58
5	6.4	8880	1010	2.22	3.64
6	6.9	115000	6660	28.6	24.0
7	7.6	20000	2180	5.00	7.84
8	8.4	11100	836	2.78	3.01
9	9.8	34500	2350	8.62	8.47
10	10.6	3460	411	0.865	1.48
11	11.3	1620	161	0.405	0.579
12	11.7	2240	203	0.558	0.731
13	12.1	4870	448	1.26	1.61
14	12.5	3630	383	0.907	1.38
15	13.3	3060	286	0.763	1.03
16	13.6	25300	1880	6.31	6.76

図 20 *Colletotrichum gloeosporioides* 成分の HPLC 分析クロマトグラムとピークデータ

Fig. 20 HPLC analysis of Extracts from *Cordyceps dipterigene* and peak table



ピーク番号 Peak number	tR	面積 Area	高さ Height	面積% Area%	高さ% Height%
1	2.8	276000	8840	1.71	1.07
2	3.8	1490000	77300	9.25	9.35
3	4.1	1850000	95600	11.5	11.6
4	4.3	536000	89700	3.33	10.8
5	4.4	1620000	92600	10.1	11.2
6	4.8	1290000	92700	8.01	11.2
7	5.2	4150000	182000	25.8	22.0
8	5.7	2760000	110000	17.1	13.3
9	6.4	582000	21900	3.62	2.65
10	7.3	1030000	30200	6.40	3.65
11	9.0	512000	25700	3.18	3.11

図 21 *Colletotrichum gloeosporioides* の培地の成分 HPLC 分析クロマトグラムとピークデータ

Fig. 21 HPLC analysis of Extracts from medium of *Cordyceps dipterigene* and peak table

カヤ内生菌 *Cordyceps dipterigene* の成分分析の結果の Fig. 16 と Fig. 17 を比較してみると、菌体成分と培地からの抽出成分が非常に似通っている。つまり、*Cordyceps dipterigene* は生成した物質を培地中に放出していることが示唆された。

また、Fig. 16 および 17 で見られた全てのピークのスペクトルを調べたがタキソイドに特徴的な 220nm あたりに極小値を取り、228~237nm あたりに極大値を取る物質は発見できなかった(Ketchum1993)。

イチイ内生菌 *Colletotrichum gloeosporioides* の成分分析の結果の Fig.18 と Fig.19 を比較してみたが、菌体と培地中の成分に大きな相関はなさそうである。そのため、*Colletotrichum gloeosporioides* は培地中に放出せずに菌体内に蓄えている微量成分が数多く存在することが確認できる。

また、*Cordyceps dipterigene* の場合と同様に、Fig. 18 および 19 で見られた全てのピークでスペクトルを取ったところ、菌体からの抽出成分である Fig.18 の tR6.9min の物質のスペクトルが、タキソイドに特徴的な 220nm あたりに極小値を取り、237nm あたりに極大値を取った。(Fig. 20)

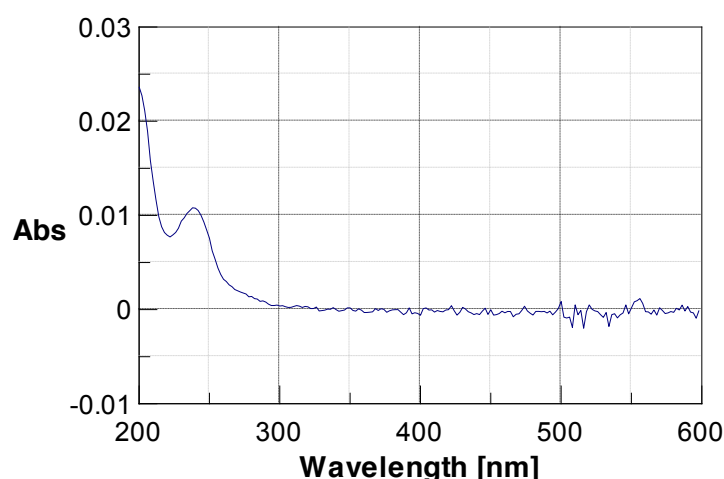


図 22 *Colletotrichum gloeosporioides* 成分分析 tR6.9 ピークのスペクトル
Fig. 22 Absorption spectrum of tR6.9 product from *Colletotrichum gloeosporioides*

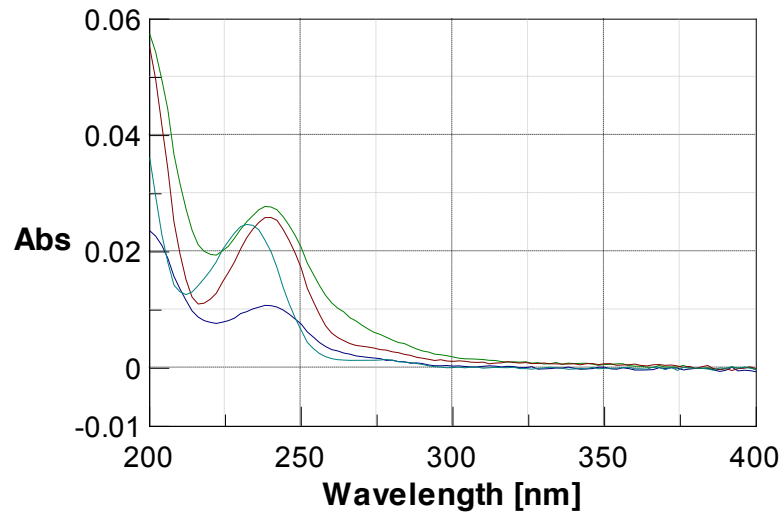


図 23 イチイ、カヤの抽出成分 tR7.0min の物質のスペクトルと、*Colletotrichum gloeosporioides* の抽出成分 tR6.9min の物質のスペクトル、BaccatinⅢのスペクトルの比較

Fig. 23 Compariso Absorption spectrum

緑：カヤの抽出成分

茶色：イチイの抽出成分

青：*Colletotrichum gloeosporioides* の抽出成分

水色：BaccatinⅢ

Green line:Spectrum of tR7.0min product extracted from *Torreya nucifera*

Brown line: Spectrum of tR7.0min product extracted from *Taxus cuspidata*

Blue line:Spectrum of tR6.9min product extracted from *Colletotrichum gloeosporioides*

Light-Blue line: Spectrum of BaccatinⅢ

4-4 考察

イチイ科樹木内生菌の単離と同定

1993年に、太平洋イチイ(*Taxus brevifolia*)内生菌 *Taxomyces andreanae* がタキソールを生産すると報告されて以来、内生菌の利用は非常に魅力的な分野であった。しかし、その後大きな発見がない時期が続いていたが、イチイ属樹木との共培養など新しい試みがされ始め(Li ら 2009)、近年再び研究が活発になってきている。

これまでに発見されたタキソール生産性内生菌はイチイ属樹木の内生菌であることがほとんどであり、その中には今回の研究で単離されてきた *Phomopsis* sp. や *Phylosticta* sp.、*Paraconiothyrium* sp. など含まれている(Strobel ら 1996, Kumaran ら 2009a, Liu ら 2009)。このことからイチイ属樹木は種や生活環境が異なっても、内生菌の種類に共通点が見いだせる。

内生菌のタキソール生成能の検討

これまで、タキソール生産性内生菌の存在は数多く発見されてきたが、タキソール生合成経路に関する知見は皆無であった。しかし、近年、TXS 遺伝子と BAPT 遺伝子、DBAT 遺伝子をタキソール生産性のマーカーとしたという報告がいくつかなされている(Zhour ら 2007, Zhang ら 2008, Miao ら 2009)。しかし、配列情報を載せたものはなかった。しかし2009年に Zhang らによって初めて DBAT 遺伝子の全長配列が、*Taxus media* から単離された *Cladosporium cladosporioides* と *Aspergillus candidus* からクローニングされた(Zhang ら 2009a,b)。その DBAT 遺伝子は、推定のアミノ酸配列においても、既知のイチイ属のものと同様に 97% という非常に高い相同性であった。

今回の研究において、イチイ内生菌の *Colletotrichum gloeosporioides* が TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子、T α H 遺伝子の部分配列を、カヤ内生菌の *Cordyceps dipterigene* が TXS 遺伝子と BAPT 遺伝子の部分配列を有していることを示した。

これは、タキソイド生成関連酵素においては、先の2つの DBAT 遺伝子の報告に次いで3例目、TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子、T α H 遺伝子に関しては初の報告であると思われる。先の Zhang らの報告や、本論文3章で報告したカヤ(*Torreya nucifera*)が有する TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子、そして今回発見した *Colletotrichum gloeosporioides* と *Cordyceps dipterigene* の TXS 遺伝子と BAPT 遺伝子の部分配列が、どれもイチイ属樹木の既知の酵素遺伝子と 95%以上の高い相同性を示したことから、タキソイド生成関連酵素遺伝子は種を超えて保存性が高いことを示しており、タキソイド生成能を有しているかどうかのスクリーニングを行うマーカーとして利用できる信頼性を高めた。

一方、*Cordyceps dipterigene* の BAPT 遺伝子の上流配列がキャラボクのものとは異なっていたことから、イチイ属とは異なる転写制御を受けていることが分かった。

また、今回の研究で、*Colletotrichum gloeosporioides* にタキソイドに特徴的な 220nm あたりに極小値を取り、237nm あたりに極大値を取る物質が存在していることを確認した。この物質の存在と遺伝子の部分配列の存在から、*Colletotrichum gloeosporioides* がタキソイド生成能を有している可能性は高い。

近年ではイチイ属樹木以外の樹木にもタキソール生産性内生菌が存在していることが報告されてきているが(Gangadevi ら 2008, Kumaran ら 2008a,b,Kumaran ら 2009b)、今回のカヤの内生菌にタキソイド類縁体があることと、タキソイド生成関連酵素遺伝子が存在しているという報告は、タキソール生産菌の探索の幅を広げるという意味でも意義深い。

これらのことから、イチイ属樹木以外の内生菌にもタキソール生産菌が存在していることが示唆された。

これまで、イチイ属樹木以外の植物で唯一タキソールの生産が報告されていた西洋ハシバミにおいては(Bestoso ら 2006)、胴枯れ病の研究を行っている際にタキソールが発見された。しかし、それ以後の研究があまり進んでいないこと、タキソールの生産が報告されている *Phomopsis* 属は植物によっては胴枯れ病を引き起こすことなどから、西洋ハシバミから発見されたタキソールは内生糸状菌由来のものであったのかもしれない。

参考文献

- Bestoso F., Ottaggio L., Armirotti A., Balbi A., Damonte G., Degan P., Mazzei M., Cavalli F., Ledda B., Miele M. (2006) In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. *BMC Biothechnology* 6 (45)
- Chang W.C., Lee T.Y., Huang H.D., Huang H.Y., Pan R.L. (2008) PlantPAN; plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene group. *BMC Genomics* 9:561
- Gangadevi V., Muthumary J. (2008) Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 717–724
- Grotewold E., Drummond B.J., Bowen B., Peterson T. (1994) The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76:543-553
- Jennewein S., Rithner C., Williams R., Croteau R. (2001) Taxol biosynthesis: taxane 13a-hydroxylase is a cytochrome P450- dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13595–13600.
- Ketchum R.E.B., Gibson D.M. (1993) Rapid isocratic reversed-phase HPLC of Taxanes on new columns developed specifically for Taxol analysis. *Journal of Liquid Chromatography.* 16(12): 2519-2530
- Kumaran R.S., Muthumary J., Hur B.K. (2008a) Production of Taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Eng. Life Sci.* 8: 438–446
- Kumaran R.S., Muthumary J., Hur B.K. (2008b) Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*. *J. Biosci. Bioeng.* 106:103–106.
- Kumaran R.S., Muthumary J., Kim E.K., Hur B.K. (2009a) Production of taxol from *Phyllosticta dioscoreae*, a leaf spot fungus isolated from *Hibiscus rosa-sinensis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14: 76–83.

Kumaran R.S., Hur B.K. (2009b). Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 54, 21–30

Li Y.C., Tao W.Y., Cheng L. (2009) Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:233-239

Liu K., Ding X., Deng B., Chen W. (2009) Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 36:1171-1177

Miao Z., Wang Y., Yu X., Guo A., Tang K. (2009) New endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45:81–86

Simpson S.D., Nakashima K., Narusaka Y., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* 33: 259-270

Strobel G.A., Hess W.M., Ford E., Sidhu R. S., Yang X. (1996) Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17:417–423

Walker K., Fujisaki S., Long R., Croteau R. (2002a) Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:12715–12720.

Wildung M.R., Croteau R. (1996) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem* 271:9201–9204

Zhang P., Zhou P. P., Yu L. J. (2009a) An endophytic Taxol-producing fungus from *Taxus x media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr. Microbiol.* 59: 227–232

Zhang P., Zhou P.P., Yu L.J. (2009b) An edophytic Taxol-producing fungus from *Taxus x media*, *Aspergillus candidus* MD3. *FEMS Microbiol. Lett.* 293: 55–159

Zhang P., Zhou P.P., Jiang C., Yu H., Yu L.J. (2008) Screening of taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. *Biotechnol. Lett.* 30: 2119–2123

Zhou X. et al. (2007) Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43: 439–443.

第 5 章 総括

第5章 総括

これまでの研究内容を総括する。

2章では、タキソールの主な供給方法であるイチイ属樹木の細胞培養法による供給増加を目指して、イチイ属樹木のタキソイド生成関連酵素遺伝子の転写調節因子に関する知見を得るため、イチイ属樹木で園芸種としても利用されていて栽培しやすいキャラボクの遺伝子解析を行った。

その結果、タキソールの存在は確認されていたものの、タキソール生成関連酵素遺伝子についての情報がほとんどなかったキャラボクに、7つのタキソイド生成酵素遺伝子が存在していることが示された。その中でも特にキーエンザイムと考えられるゲラニルゲラニルニリン酸を環化させタキサジエンを合成する TXS と、タキソールの供給方法の一つとなっている前駆物質 **Baccatin III** からの半合成を触媒する BAPT という2つの酵素遺伝子をクローニングすることに成功した。また、この2つの酵素遺伝子上流配列を読み、その転写調節領域をデータベース PlantPAN を用いて解析した。その結果、TXS 遺伝子上流にはアブシジン酸応答配列とエチレン応答配列があり、これらの存在から、TXS の発現は細胞の枯死によってスタートすることが示唆された。また、BAPT 遺伝子は、TAATBOX の代わりにイニシエーター配列を有しており、転写開始点の位置が分かった。さらに、TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子共通の特徴として光応答性配列が多数存在していることが分かり、光条件をコントロールすることでイチイ樹木の栽培や培養細胞法によるタキソールの供給量を増加させることができる可能性が示唆された。

3章では、タキソール生成能を有する新規植物を発見し、タキソールや前駆物質の供給源の選択性を高めることを目的とし、イチイ属以外で唯一イチイ科に分類されるカヤに着目して、その遺伝子解析および成分分析を行った。まず、カヤのゲノム上にタキソイド生成関連酵素遺伝子配列の有無を PCR を用いて調べた。その結果、ジテルペン合成酵素の GGPPS 遺伝子とタキソイドの13位を水酸化する T α H 遺伝子の部分配列を有していることが分かった。

次に、タキソール生産のキーエンザイムである TXS と BAPT の存在可能性をより正確に調べるために、ハイブリダイゼーションを行った。その結果バンドが確認できたため、ゲル抽出 PCR とゲノムウォーキング法を用いて、TXS 遺伝子と BAPT 遺伝子のクローニングを行った。その結果、TXS 遺伝子では 3248bp の部分配列が、BAPT 遺伝子では 444bp と 712bp の部分配列を読むことができ、これらの酵素遺伝子の存在を確認した。また、これらの相同性が全て 95%以上と非常に高く、タキソイド生成関連酵素遺伝子は属を超えて高い相同性を示す

ことが示唆された。これは、タキソイド骨格という特殊で複雑な構造の物質を基質とするためではないかと考えた。

また、今回取得した 4 つの遺伝子の部分配列情報は、全てカヤでは初めての報告となる。

さらに、MeOH とクロロホルムを用いてカヤの葉から成分抽出し、HPLC で分析した。その結果、標品として用いたタキソールと **Baccatin III** の存在は確認できなかったが、イチイ、キャラボクの葉の抽出物と同じリテンションタイムのところに、タキソイドの特徴である 220nm あたりに極小値を取り、228~237nm の間で極大値を示す物質が存在していることが確認できた。

以上、遺伝子と成分という二つの側面から、カヤがタキソイドを生成できることが示唆され、これまでイチイ属特有の二次代謝物と考えられてきたタキソイドの存在がイチイ科樹木へと広がった。

4 章では、イチイ科植物のイチイ (*Taxus cuspidata*) とカヤ (*Torreya nucifera*) から内生菌を単離し、その遺伝子解析を行うことでタキソイド生成能を調べ、新たなタキソール供給資源となりうる内生菌を探索することを目的とした。また、これまでに発見されてきた Taxol-producing fungi の遺伝子解析については例がなく、今回の研究では、Taxol-producing fungi のタキソイド生成関連酵素遺伝子についてまとめることを目的とした。

まず、イチイとカヤの内生菌を単離し、その rDNA の ITS 領域の配列を調べることで菌種を同定した。その結果、ほぼ同じ場所に生育するイチイとカヤの内生菌の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、カヤ内生菌のうち 2 種類は既にタキソール生産性が報告されているものであり、カヤの中に Taxol-producing fungi が存在していることが初めてわかった。

次に、タキソール生産性内生菌を探索するため、イチイ属樹木において配列既知で、利用性の高い TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子、TαH 遺伝子の配列からプローブを作成して、ドットブロットハイブリダイゼーションを行い、タキソール生産性の一次スクリーニングとした。イチイ内生菌 [*Colletotrichum gloeosporioides*]、 [*Paraconiothyrium microdiplodia*]、カヤ内生菌 [*Cordyceps dipterigenae*]、H [*Sordariomycete* sp.] の 4 種において、TXS、TαH、BAPT 3 つすべての酵素遺伝子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 [*Cordyceps dipterigenae*] は新規の菌であった。また、この他の菌においても、1 つないしは 2 つの酵素のプローブでハイブリダイズしており、今回のプローブでは 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。

次にドットプロットの結果で TXS、T α H、BAPT 3 つすべての酵素遺伝子のプローブでハイブリダイズした 4 種の内、比較的成長の早いイチイ内生菌 *Colletotrichum gloeosporioides* と、新規のカヤ内生菌 *Cordyceps dipterigene* の遺伝子解析を行った。サザンハイブリダイゼーション、ゲル抽 PCR、ゲノムウォーキング法を用いてタキソイド生成関連酵素遺伝子の存在確認を行った。

その結果、カヤ内生菌 *Cordyceps dipterigene* では TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子、T α H 遺伝子の部分配列を有していることが分かり、既知のイチイ属のものと高い相同性を示した。また、*Colletotrichum gloeosporioides* に関しては TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子の部分配列を有しており、やはり、既知のイチイ属樹木のものと 95%以上の相同性を示した。

Cordyceps dipterigene の BAPT 遺伝子に関しては上流配列を読むことができ、2 章で読めたキャラボクのものと比較したが、開始コドンの上流 100bp 程度はほぼ同じ配列であったが、それより上流配列は相同性がほとんどなかった。*Cordyceps dipterigene* の上流配列にはキャラボクの場合にはなかった水ストレスや脱水応答の配列が存在しており、イチイ属とは異なる転写制御を受けていることが分かった。

また、カヤの場合と同様に MeOH とクロロホルムを用いて成分を抽出し、HPLC で分析を行ったが、タキソールと Baccatin III の存在は確認できなかったが、タキソイドの特徴である 220nm あたりに極小値を取り、228~237nm の間で極大値を示す物質が存在していることが確認できた。

これらのことから、イチイ内生菌 *Colletotrichum gloeosporioides* とカヤ内生菌 *Cordyceps dipterigene* がタキソイドを生産できることが示された。また、生成関連酵素遺伝子の TXS 遺伝子、BAPT 遺伝子に関する報告は世界で初めてである。

本研究を通して、これまでイチイ属樹木特有の二次代謝物であると考えられてきたタキソイドがイチイ科樹木とその内生菌に広く分布している可能性が示唆された。また、その生成関連酵素遺伝子は種を超えて保存性が高いことがわかったが、その転写調節因子に関しては、保存性はあまりなく、異なる発現制御を受けていることが示唆された。

今までは生産性が低くあまり実用的でなかった内生菌であるが、生成関連酵素遺伝子の相同性が高いという結果から、これらの遺伝子の有無によってタキソイド生成能を有する内生菌の網羅的なスクリーニングが可能となり、より簡便により生産性の高い種の発見が期待される。また、キャラボクは園芸種で樹高

も高くなく、他のイチイ属樹木よりプランテーションに向いていることから、今回得られた上流配列の情報を生かして、乾燥条件や日照条件を調節して育てることで、従来の細胞培養法だけにこだわるのではなく原植物をタキソールの供給源として利用できる可能性が考えられる。

また、これまでカヤの培養細胞を利用した研究はほとんど行われておらず、今回の結果から、イチイ属の他にカヤの細胞培養が新たな供給源となりうる可能性が示された。

今回の結果から、キャラボク、カヤ、内生菌への期待が大きく膨らんだ。

謝辞

本研究を行うにあたり、様々な有益なご助言、ご協力をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻森林化学研究室の鮫島正浩教授に御礼申し上げます。実験に関する適切なアドバイスだけでなく、進路に関する相談にもものっていただいた五十嵐圭日子准教授に心より御礼申し上げます。

また、日々の素晴らしい実験環境を整えてくださり、この5年間の研究生活を一から築いてくださりました寺田珠実助教に大変感謝しております。他研究室との交流や森林に関する様々な知見を学ぶ機会を下さった東京大学大学院農学生命科学研究科樹芸研究所の嶋田重裕准教授に御礼申し上げます。実験の試料を快く分譲してくださいました東京大学理学部附属小石川植物園のみなさまにも深く感謝しております。

また、毎日の研究の中に笑いと癒しをくれた研究室の先輩、後輩の皆さまには大変感謝しております。

そして、わがままな自分を支え続けてくれた家族に感謝しています。

業績リスト

<論文>

- 1.著者:石野貴久、会沢栄志、寺田珠実、鮫島正弘、鴨田重裕
題名:「日本産イチイ科植物におけるタキソイド生成能」
掲載雑誌:『東京大学演習林報告』第百二十号 pp45-52
発行年: 2009年 発行所: 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林
- 2.著者:石野貴久、会沢栄志、寺田珠実、鮫島正弘、鴨田重裕
題名:「日本産イチイ科植物内生菌のタキソイド生成能の検討」
掲載雑誌:『東京大学演習林報告』第百二十六号 pp45-58
発行年: 2011年 発行所: 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林

略歴

学		歴	
平成	15年	3月31日	洛南高等学校卒業
平成	15年	4月1日	東京大学理科Ⅱ類入学
平成	17年	4月1日	東京大学農学部環境共生システム学専修進学
平成	19年	3月23日	東京大学農学部環境共生システム学専修卒業
平成	19年	4月1日	東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学 専攻 修士課程入学
平成	21年	3月23日	同上修了
平成	21年	4月1日	東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学 専攻 博士課程進学