

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06686

研究課題名(和文) イチイ科植物タキサジエン代謝系遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes involved in taxadiene metabolism from yew

研究代表者

草野 博彰 (Kusano, Hiroaki)

京都大学・生存圏研究所・研究員

研究者番号：80447929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イチイが産生するタキサジエン系化合物には抗がん薬として利用されるパクリタキセルやその類縁薬品の原料となる中間体化合物が含まれる。この化合物群の生合成の仕組みについては未解明な部分が多く、目下パクリタキセルの安定供給を目指す研究開発の主要な障壁となっている。本研究では細胞内区画の利用に関わる輸送体や生合成酵素をコードする遺伝子の同定を目的とした。生物情報学と合成生物学を駆使した手法で輸送体3種と新規酵素遺伝子2種を同定し、酵母での反応系を大幅に改善した。これらの成果は、新たに開発した解析手法の有効性を示したと同時に、合成生物学的な技術開発に資すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タキサジエン系化合物の生合成に関する未解明部分は抗がん薬パクリタキセルの持続的供給を目指す研究開発の障壁となっている。イチイは遺伝子研究が困難な木本植物であるため、研究基盤の整備が重要な課題であるほか、異種生物での生合成の再現が主な研究目的として想定される研究対象である。本研究ではゲノム・メタボローム等の大規模情報とその解析ツール群を開発し、酵母で機能する遺伝子セットの解明と、反応系の最適化に成功した。これらの成果は今後の遺伝子同定研究に大きなヒントを与えるほか、パクリタキセルの合成生物学的生産技術開発に資する成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Taxadiene-derived compounds, made in yew tree, contain anti-cancer drug paclitaxel and the synthetic intermediates of related drugs. The natural biosynthesis system has been largely unknown, and it made synthetic biology approaches impossible to complete the construction of paclitaxel biosynthetic pathway in microorganisms. This matter is a major problem to develop the basic technology for sustainable supply of taxadiene-derived anti-cancer drugs to the world. This research project aimed to identify genes encoding biosynthesis enzymes and transmembrane transporters involved in the biosynthesis system of taxadiene-derived compounds. As the results, novel two enzyme genes and three transporter genes were identified and improved yeast-mediated synthesis system greatly. These results indicated efficiency of the research strategy and may contribute synthetic biology approaches to develop biosynthesis pathway in microorganisms.

研究分野：植物合成生物学

キーワード：二次代謝 メタボローム解析 トランスクリプトーム解析 NPF輸送体 BAHDアシル基転移酵素 イチイ  
タキサジエン系化合物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

イチイはタキサジエンを出発物質とする一連の二次代謝物群を産生しており、世界中で抗がん薬として広く利用されているパクリタキセルや、その生合成中間体などを含有している。その生合成の仕組みにはテルペン合成酵素に属するタキサジエン合成酵素遺伝子、タキサジエン骨格に酸素を付与する P450 遺伝子群、O-アシル基を付与する BAHD アシル転移酵素遺伝子群が関わることが知られている。しかし、社会的に最も重要とされるパクリタキセルの生合成経路についてさえ全貌は未だ明らかでなく、酵素や中間体化合物の多くは未だ発見されていないと考えられている。また、イチイについてはゲノム、トランスクリプトームなど遺伝子に関する情報基盤が未整備であり、メタボロミクス研究技術には未同定化合物の取り扱いを想定したものがほとんど無かった。以上のことはパクリタキセルおよび類縁抗がん薬の安定供給を目指す研究開発の主な障壁となっている。また、近年、植物二次代謝物の生合成における細胞内区画の利用についての報告がなされ、膜輸送体遺伝子の重要性が示唆されていた。このような状況について研究代表者は、独自にトランスクリプトーム・メタボローム解析技術を開発し、新規に膜輸送体遺伝子を見出した。この膜輸送体遺伝子は、酵母で生合成反応の一部を再現することを可能にした。以上の研究基盤は、新規な生合成酵素をコードする遺伝子の同定と、合成生物学的な利用に資すると考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、イチイ遺伝子に関する情報基盤と解析技術を発展させてタキサジエン系化合物の生合成に関わる遺伝子を見出し、酵母におけるパフォーマンスを含めてその機能を明らかにすることを目的とした。また、得られる情報や解析ツールはさらなるイチイ研究に資するため研究基盤として一般公開し、主な成果については論文にまとめて紹介することを目指した。

## 3. 研究の方法

メチルジャスモン酸の投与でタキサジエン系化合物の生合成をオン/オフできるイチイの培養細胞を利用して、遺伝子発現と化合物生産の変化に関する一連のオミックス情報を得た。これによりタキサジエン系化合物の生産に関連する遺伝子を選抜・単離し、分子生物学的な機能解析に供することでその性質を評価した。遺伝子に関する情報についてはゲノムの解読と発現量の測定を行い、化合物については未同定化合物を想定したメタボローム解析技術を開発した。機能解析では酵母でのパフォーマンスを含めた解析を実施し、生成化合物の解析には独自に開発したメタボローム解析技術を駆使した。

## 4. 研究成果

### (1) 主な成果

イチイ培養細胞のメタボローム解析と解析ツールの開発・公開

イチイ培養細胞にメチルジャスモン酸を投与し経時的に LC-MS 解析を実施した。得られたデータを解析するために 3次元 GUI を基盤とするクロマトグラフィー解析ツール GrassHopper を開発、GitHub を通じて公開した。GrassHopper は LC-MS 測

定データに色を割り当てて3次元CG空間上に同時に表示することで、化合物の量的な差をピークの模様として可視化するツールであり、ユーザーがカーソルを操作することで同定情報の有無に関わらず任意の化合物の量的変動データを取得することができる。解析の結果、イチイの培養細胞ではアセチル基を多く持つタキサジエン系化合物が主に蓄積しており、メチルジャスモン酸の投与直後から化合物生産の減少がみられるまで蓄積化合物種が変化しつづけ、疎水性の強いものから親水性の強いものへと変わっていくことが明らかとなった。

#### イチイ細胞のトランスクリプトーム解析

メチルジャスモン酸の投与から経時的に total RNA を採取し第2世代の次世代シーケンサーを用いた解読を行った。塩基配列の復元と遺伝子機能情報の付与、および各遺伝子における発現量を測定し、共発現解析、GO エンリッチメント解析などを実施した。その結果、タキサジエン合成酵素と似た発現を示す遺伝子を選抜すると NPF 型輸送体遺伝子が最も強いエンリッチメントを示すことがわかり、本研究計画の根幹とした輸送体遺伝子もこれに含まれることがわかった。

#### イチイのゲノム解読

イチイの培養細胞からゲノム DNA を抽出し、第3世代の次世代シーケンサーによる解読を実施した。第2世代の次世代シーケンサーから得たデータを利用したエラー修正を実施し、遺伝子の構造を解析したところ、BAHD 遺伝子についてシングルエキソン化の現象が起こっていたことがわかった。また、本研究期間中にチュウゴクイチイのゲノム塩基配列のアセンブル結果が公開されたので、これを利用したところシングルエキソン化した遺伝子はゲノム上で非常に近接した位置に座乗していたことがわかった。

#### 酵母における遺伝子機能解析

シングルエキソン化した BAHD 遺伝子を含め、輸送体遺伝子との共発現ベクターを構築した。これを導入した酵母に基質化合物として 10-デアセチルバッカチン III を与え、培養物を LC-MS で測定・解析したところ、シングルエキソン化が見られた BAHD 遺伝子はバッカチン III を含む複数種の類縁化合物を生成していたことがわかった。既知酵素遺伝子である DBAT は同じ系で専らバッカチン III のみを生成したことから、バッカチン III 以外の生成物は新規な活性によるものと考えられた。これらの新規 BAHD 遺伝子を導入した酵母と、DBAT を導入した酵母を混合培養した結果で新たな生成物が認められなかったことから、これらの酵素は DBAT と同じ 10 位の水酸基を標的としており、DBAT よりも多くの種類のアシル基供与体を利用できることが示唆された。

## (2) 国内外における位置づけとインパクト

タキサジエン系化合物の天然の生合成経路については細胞内区画がどのように利用されているのかが全く明らかにされてこなかった。本研究はイチイから単離されたタキサジエン系化合物の輸送体遺伝子の性質を解析した世界初の例である。また、この輸送体遺伝子を利用することで酵母における生合成反応が大幅に促進されることが本研究で明らかとなった。本研究の成果はその産業的利用価値を伴って植物二次代謝研究に空間の概念という新たな視点をもたらしたといえる。また、本研究で新たに開発したメタボローム解析ツールは化合物研究一般に汎用できるものであり、特に未

知の化合物を多く含む生合成系の研究において威力を発揮するため、これを公開したことで同分野の研究を促進する効果が期待できる。また、本研究で同定された輸送体遺伝子そのものも、パクリタキセルの代替的生産技術を開発しようとする合成生物学研究の新たな要素技術として利用可能で、また生合成系を促進する効果により産業的に貢献することが期待できる。

### (3) 今後の展望

パクリタキセル経路を含めて、タキサジエン系化合物の生合成酵素や輸送の仕組みには重要な未解明部分がある。本研究の戦略は、この未解明部分の中核を成すであろう遺伝子の同定に有効であることが、本研究を実施したことで証明された。今後はタキサジエン系化合物の生合成に関する国内外の研究促進に資するため、本研究の成果を含めた一連の研究成果を論文に取りまとめ発表する。また、取得したデータと開発したツールを新たな研究材料として学术界に提供するため、整備・公開する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takeuchi Ami, Ohnuma Mariko, Teramura Hiroshi, Asano Kenji, Noda Takahiro, Kusano Hiroaki, Tamura Koji, Shimada Hiroaki	4. 巻 38
2. 論文標題 Creation of a potato mutant lacking the starch branching enzyme gene &lt;i>&lt;/i>StSBE3&lt;/i> that was generated by genome editing using the CRISPR/dMac3-Cas9 system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 345 ~ 353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0727a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mutsuro-Aoki Hiromi, Teramura Hiroshi, Tamukai Ryoko, Fukui Miho, Kusano Hiroaki, Schepetilnikov Mikhail, Ryabova Lyubov A., Shimada Hiroaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Dissection of a rice OsMac1 mRNA 5' UTR to uncover regulatory elements that are responsible for its efficient translation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0253488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0253488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyazaki Kaho, Ohkubo You, Yasui Hiroto, Tashiro Ryoka, Suzuki Rintaro, Teramura Hiroshi, Kusano Hiroaki, Shimada Hiroaki	4. 巻 38
2. 論文標題 Overexpression of rice OsLEA5 relieves the deterioration in seed quality caused by high-temperature stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 367 ~ 371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0603a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Teramura Hiroshi, Yamada Kazuma, Ito Kahori, Kasahara Keisuke, Kikuchi Tsubasa, Kioka Naoya, Fukuda Masato, Kusano Hiroaki, Tanaka Katsunori, Shimada Hiroaki	4. 巻 96
2. 論文標題 Characterization of novel SUMO family genes in the rice genome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 25 ~ 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.20-00034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Nonoka, Kihira Miho, Matsushita Ryoko, Kaneko Chihiro, Ishii Yohei, Yin Yong-Gen, Kawachi Naoki, Teramura Hiroshi, Kusano Hiroaki, Shimada Hiroaki	4. 巻 84
2. 論文標題 AtFLL2, a member of the FLO2 gene family, affects the enlargement of leaves at the vegetative stage and facilitates the regulation of carbon metabolism and flow	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2466 ~ 2475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1812374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izuishi Yuki, Isaka Natsumi, Li Hao, Nakanishi Kohei, Kageyama Joji, Ishikawa Kazuya, Shimada Tomoo, Masuta Chikara, Yoshikawa Nobuyuki, Kusano Hiroaki, Yazaki Kazufumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Apple latent spherical virus (ALSV)-induced gene silencing in a medicinal plant Lithospermum erythrorhizon	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70469-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Honda Chika, Ohkawa Kaoru, Kusano Hiroaki, Teramura Hiroshi, Shimada Hiroaki	4. 巻 38
2. 論文標題 A simple method for in planta tomato transformation by inoculating floral buds with a sticky Agrobacterium tumefaciens suspension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 153 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.20.0707a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 草野博彰、南洋、加藤嘉博、金沢香織、李豪、杉山暁史、多葉田誉、矢崎一史
2. 発表標題 新規LC-MSデータ解析ツールGrassHopperを用いた植物代謝物の解析
3. 学会等名 第38回日本バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 竹内亜美、浅野賢治、野田高弘、草野博彰、大沼万里子、高橋史憲、田村浩二、島田浩章
2. 発表標題 ジャガイモのアミロペクチン合成に関わるデンブン枝つけ酵素遺伝子欠損変異体の作出と形質の評価
3. 学会等名 第38回日本バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 草野博彰、南洋、加藤嘉博、金沢香織、李豪、杉山暁史、多葉田誉、矢崎一史
2. 発表標題 新しいILC-MSデータ解析ツールGrassHopperを用いた植物代謝物の解析
3. 学会等名 第31回イソプレノイド研究会例会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Kusano Hiroaki, Minami Hiroshi, Kato Yoshihiro, Kanazawa Kaori, Sugiyama Akifumi, Tabata Homare, Yazaki Kazufumi
2. 発表標題 A metabolomic approach for the functional analysis of taxane compound transporters from yew
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草野博彰
2. 発表標題 生データの目視でメタボロミクスをするためのツールGrassHopperのご紹介
3. 学会等名 質量分析インフォマティクス研究会・第7回ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 草野博彰、南洋、加藤義博、金沢香織、李豪、飛松裕基、杉山暁史、多葉田誉、矢崎一史
2. 発表標題 イチイ培養細胞と酵母を使ったタキサン化合物生合成系の開発
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 イチイ属の毛状根の製造方法	発明者 南洋、草野博彰、矢崎一史、加藤義博、多葉田誉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/031802	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

LC-MSデータ解析ツールGrassHopper <a href="https://github.com/kusano-kyotouniv/GrassHopper">https://github.com/kusano-kyotouniv/GrassHopper</a>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------