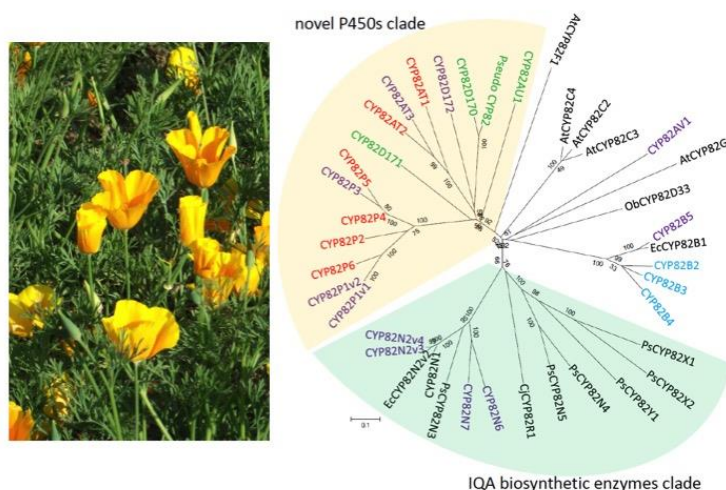


ハナビシソウゲノムの解読から見えてきた イソキノリンアルカロイド生合成酵素遺伝子の進化 —植物が有用物質生産系を進化させる仕組みの解読—

概要

植物は様々な有用な二次代謝産物を産生しますが、どのようにその生合成系が進化発展してきたかは、まだ十分には解明されておられません。堀健太郎 生命科学研究科教務補佐員、山田泰之 同特定研究員、Ratmoyo Purwanto 同博士課程学生、佐藤文彦 同教授らの研究グループは、国立遺伝学研究所およびかずさ DNA 研究所と共同で、北米原産の園芸植物であり、かつ、薬用植物でもあるケシ科のハナビシソウのゲノム配列を解読し、そのゲノム情報をもとに、ハナビシソウが作り出す有用二次代謝産物イソキノリンアルカロイドの生合成酵素遺伝子、特に、アルカロイドの多様性を生み出すチトクロム P450 遺伝子の構造と機能を解析しました。その結果、チトクロム P450 遺伝子群のうち、CYP82 ファミリーがハナビシソウにおいて多様化するとともに機能分化し、ハナビシソウのイソキノリンアルカロイドの多様化に貢献していることが明らかになりました。これらの知見は、薬用植物を含む植物の二次代謝系の多様化の分子機構の解明とともに、現在は発現していないが、将来新たな生合成系の展開の可能性を持つ遺伝子の推定につながるものであり、合成生物学的手法による新たな創薬資源の創出につながるものと期待されます。

本研究成果は 2017 年 12 月 29 日に *Plant and Cell Physiology* 誌にオンライン掲載されました。



ハナビシソウと多様な P450(CYP82)遺伝子ファミリー
California poppy has diversified cytochrome P450
CYP82 family

1. 背景

植物は様々な二次代謝産物を産生しますが、その中でも、含窒素化合物であるアルカロイドは、顕著な生理活性を示し、モルヒネやビンブラスチン等医薬品としても用いられるものが多く存在します。これらのアルカロイドの中で、チロシンから生合成されるイソキノリンアルカロイドは、モルヒネの他に、ベルベリン等の有用医薬品を含むとともに、その構造の多様性が知られています（図1）。また、アルカロイドは、植物の二次代謝産物として知られているカロチノイド等のテルペノイドやアントシアニン等のフェニルプロパノイドとは異なり、植物種特異性が高く、その進化について、興味を持たれるところです。アルカロイド、特に、イソキノリンアルカロイドの生合成系については、京都大学、ドイツ／アメリカ、カナダの研究グループを中心に、生合成酵素、さらには、生合成酵素遺伝子の単離と解析等が精力的に進められ、多くの生合成酵素遺伝子の同定が進んでいます。また、これらの知見をもとに、植物における代謝工学のみならず、微生物による合成生物学的生産等が可能となってきました。

（過去のプレスリリース「モルフィナンアルカロイド生産のための微生物プラットフォームの確立」

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/uploads-images/sites/2/2016/02/20160218sato.pdf> を参照ください）

これまでの研究において、何故（また、どのように）、植物はこれらの多様な代謝産物を合成するのかということが大きな謎でした。我々は、こうした疑問を解くために、イソキノリンアルカロイド生合成系のモデル植物であるケシ科のハナビシソウのゲノムを解読し、解析することとしました。

2. 研究手法・成果

ハナビシソウは、北米原産の園芸植物であるとともに、その根に含まれるイソキノリンアルカロイドの一種ベンゾフェナンスリジン型サンギナリンが抗菌性物質として有用であることが知られています。一方、地上部に含まれるパビン型は鎮静作用をもつ生薬として使われることも、知られています（図1）。このように、同一の植物に複数のイソキノリンアルカロイド生合成系を有するという生合成系の多様性、また、比較的容易に形質転換が可能であるという利点から、イソキノリンアルカロイド生合成系のモデル植物として研究開発されてきました。また、上記のように多くの生合成酵素遺伝子の同定が進んでいることから、ゲノムの解読により、どのように生合成酵素遺伝子がゲノム中に存在し、また機能しているかを知る良い材料と考えられました。

我々は、新学術研究「ゲノム支援」の支援、具体的には国立遺伝学研究所の豊田敦博士らの協力をえて、表1に示すように、ハナビシソウのゲノム DNA の解読を行いました。用いた材料が園芸品種であり、純系ではなかったということもあり、多くの未解読の配列を含むものでありましたが、502Mb（メガベース：100 万塩基）と推定されているハナビシソウの約 97%に及ぶ DNA 配列情報を決定しました。また、決定された配列に対して、これまでに解読されている RNA 情報を検索しましたところ、これらの遺伝子の 90%以上が存在しており、また、これまでに単離同定されたイソキノリンアルカロイド生合成酵素遺伝子はすべて含まれていることが明らかになりました（表2）。従いまして、決定された DNA 配列は解析に十分な情報を含むものと考え、さらに解析をすすめました。なお、ゲノム中の構造遺伝子等の解析には、かずさ DNA 研究所の平川英樹博士の協力を得ました。

まず、麻薬ケシに存在することが知られているモルヒネやノスカピン生合成酵素遺伝子がハナビシソウゲノムにも存在するかを調べましたが、これらの遺伝子は存在せず、モルヒネやノスカピンの生合成系は、麻薬ケ

シに特徴的な遺伝子であることがわかりました。また、生合成酵素遺伝子が微生物ゲノムで一般的な遺伝子クラスターを形成しているかを検索しましたが、一連の生合成遺伝子が遺伝子クラスターを形成していることは認められませんでした。

一方、二次代謝の多様性において重要な役割を担うチトクロム P450 について、その存在を検索した結果、ハナビシソウのゲノムには、イソキノリンアルカロイド生合成系に関与することが知られている P450 ファミリーである CYP80, CYP82, CYP719 ファミリーがモデル植物であるシロイヌナズナに比べ、著しく多く存在することが明らかとなりました（表 3）。特に、CYP82 ファミリーは、28 遺伝子と極めて多く、かつ、多くの機能未同定遺伝子を含むものでした。

そこで、これらの遺伝子機能を推定するために、遺伝子の組織別、あるいは、細胞特異的発現を解析し（図 2、3）、特定のアルカロイド生合成と関連を持つと推定される P450 を絞り込み、解析しました。その結果、CYP82P2 と CYP82P3 という非常に配列がよく似た遺伝子とともに、dihydrosanguinarine 10-水酸化酵素活性をもつが（図 4）、その基質認識性、発現様式に違いがあり、その結果、細胞株におけるアルカロイド組成に違いが生じていることが明らかになりました（図 5）。また、これらの遺伝子は遺伝子クラスターを作っており、その一部は、見かけ上発現していないようであり、今後の代謝系の拡張の可能性を有することが明らかになりました（図 6）。

3. 波及効果、今後の予定

以上の知見は薬用植物を含む植物の二次代謝系の多様化・進化の分子機構の解明とともに、現在は発現していないが、将来新たな生合成系の展開の可能性を持つ遺伝子の推定につながるものであり、合成生物学的手法による新たな創薬資源の創出につながるものと期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究成果は、日本学術振興会科学研究費補助金 [基盤研究 (S) (26221201)] の支援を受けて行われました。また、ゲノム解読については、新学術領域研究「ゲノム支援」(221S0002)の支援を受けて行われました。

<用語解説>

イソキノリンアルカロイド：窒素を含む一群の低分子有機化合物（アルカロイド）のうち、アミノ酸チロシンから生合成され、モルヒネやベルベリンなど、有用医薬品として利用されているものが含まれる。

チトクロム P450：一原子酸素を有機化合物の炭素に添加する反応を触媒するモノオキシゲナーゼであり、水酸化反応が一般的であるが、エポキシ化、(O-または、N-)脱アルキル化、カップリング等の反応を行い、二次代謝生合成系、あるいは、外来物質の代謝分解を行う。特に、植物において多様化している。

遺伝子クラスター：微生物では、その産生する二次代謝産物の生合成系に関与する遺伝子が比較的短いゲノム領域に連続して存在していることが知られている。一方、植物には、このような遺伝子クラスターは存在しないと考えられていたが、近年、植物でも一部の二次代謝産物、特に、植物病原菌に対する抗菌性化合物（ファイトアレキシン）生合成系の遺伝子が遺伝子クラスターを形成することが明らかになっている。

<論文タイトルと著者>

タイトル : Mining of the uncharacterized cytochrome P450 genes involved in alkaloid biosynthesis in California poppy using a draft genome sequence

著者 : Kentaro Hori¹ (堀健太郎) , Yasuyuki Yamada¹ (山田泰之) , Ratmoyo Purwanto¹, Yohei Minakuchi² (水口洋平) , Atsushi Toyoda² (豊田敦) Hideki Hirakawa³ (平川英樹) , and Fumihiko Sato¹ (佐藤文彦)

¹Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, 606-8502, Japan (京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻)

² National Institute for Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan (国立遺伝学研究所)

³ Kazusa DNA Research Institute, 2-6-7 Kazusa-kamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan (かずさDNA 研究所)

掲載誌 : *Plant and Cell Physiology* <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx210> (Open Access)

ハナビシソウのゲノム遺伝子情報については、以下の URL で検索が可能です : Eschscholzia Genome DataBase (<http://eschscholzia.kazusa.or.jp>)

<参考図表>

表1 ハナビシソウゲノムの解読

<i>Eschscholzia californica</i> draft genome assembly statistics		Draft genome sequence (ECA r1.0)	<u>Predicted genes</u>	
			(ECA_r1.0_cds_braker1)	(ECA_r1.0_cds)
Total	Number of sequences	53,253	93,339	41,612
	Total length (b)	489,064,912	86,538,158	42,739,276
	Average (b)	9,184	927	1,027
	Maximum (b)	4,249,866	16,281	16,281
	Minimum (b)	300	30	150
	N50 (b)	752,971	1,263	1,329
	G + C%	36.5	41.2	40.9
≧ 500 b	Number of sequences	37,795	59,645	30,683
	Total length (b)	482,984,812	74,697,139	38,761,101
	Average (b)	12,779	1,252	1,263
≧ 1 kb	Number of sequences	15,580	29,617	16,617
	Total length (b)	467,061,688	53,254,023	28,552,063
	Average (b)	29,978	1,798	1,718
≧ 5 kb	Number of sequences	2,223	199	141
	Total length (b)	444,303,297	1,266,048	935,853
	Average (b)	199,867	6,362	6,637

表2 決定されたゲノム配列には、これまでに解読された生合成遺伝子が全て含まれていた。

	Query	Accession number	Function	Location (gene no)
	Ec6OMT	BAM37634.1	putative norcoclaurine 6- <i>O</i> -methyltransferase	Eca_sc194712.1_g1010.1
	CjCNMT	BAB71802.1	coclaurine <i>N</i> -methyltransferase	Eca_sc011375.1_g0250.1
	EcCYP80B1	AAC39453.1	(<i>S</i>)- <i>N</i> -methylcoclaurine 3'-hydroxylase	Eca_sc000252.1_g1280.1
	Ec4OMT	BAM37633.1	3'-hydroxy- <i>N</i> -methylcoclaurine-4'- <i>O</i> -methyltransferase	Eca_sc007259.1_g0850.1
	Ec7OMT	BAE79723.1	reticuline 7- <i>O</i> -methyltransferase	Eca_sc004515.1_g0040.1
	EcBBE	AAC39358.1	berberine bridge enzyme	Eca_sc194677.1_g0150.1
	EcCYP719A5	BAG75113.1	cheilanthifoline synthase	Eca_sc001365.1_g0730.1
	EcCYP719A2	ACO90219.1	stylophine synthase	Eca_sc194371.1_g0100.1
	EcCYP719A3	BAD98249.1	stylophine/canadine synthase	Eca_sc007505.1_g0100.1
	EcTNMT	ACO90222.1	tetrahydroprotoberberine <i>N</i> -methyltransferase	Eca_sc0031885.1_g0280.1
	EcCYP82N5	-	(<i>S</i>)- <i>N</i> -methylstylophine 14-hydroxylase	Eca_sc001139.1_g1890.1
	EcCYP82N2v2	BAK20464.1	protopine 6-hydroxylase	Eca_sc194758.1_g0720.1
	EcSARED1	ADE41047.1	sanguinarine reductase	Eca_sc003017.1_g0750.1
	PsADOX5 (DBOX)	AGL443341.1	tetrahydroprotoberberine oxidase	Eca_sc001563.1_g1610.1
	G3OMT	LC171865	scoulerine/reticuline <i>O</i> -methyltransferase	Eca_sc194701.1_g0110.1
	G11OMT	LC171864	10-hydroxydihydrosanguinarine <i>O</i> -methyltransferase	Eca_sc001053.1_g0120.1

表3 ハナビシソウゲノムには、特定のチトクロム P450 遺伝子が多く存在した。

ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成酵素としては、CYP80, CYP82, CYP719 がこれまでに同定されている。

	<i>A</i>	<i>E</i>		<i>A</i>	<i>E</i>
<i>CYP51</i>	2	1	<i>CYP96</i>	14	11
<i>CYP71</i>	53	27	<i>CYP97</i>	3	1
<i>CYP72</i>	10	2	<i>CYP98</i>	3	2
<i>CYP73</i>	1	2	<i>CYP701</i>	1	1
<i>CYP74</i>	2	6	<i>CYP702</i>	6	0
<i>CYP75</i>	1	1	<i>CYP703</i>	1	1
<i>CYP76</i>	8	1	<i>CYP704</i>	3	0
<i>CYP77</i>	5	4	<i>CYP705</i>	30	0
<i>CYP78</i>	6	10	<i>CYP706</i>	7	0
<i>CYP79</i>	8	11	<i>CYP707</i>	4	4
<i>CYP80</i>	0	2	<i>CYP708</i>	3	0
<i>CYP81</i>	16	4	<i>CYP709</i>	3	0
<i>CYP82</i>	5	28	<i>CYP710</i>	4	1
<i>CYP83</i>	2	1	<i>CYP711</i>	1	0
<i>CYP84</i>	1	12	<i>CYP712</i>	2	0
<i>CYP85</i>	1	0	<i>CYP714</i>	2	0
<i>CYP86</i>	10	23	<i>CYP715</i>	1	0
<i>CYP87</i>	2	2	<i>CYP716</i>	2	1
<i>CYP88</i>	2	1	<i>CYP718</i>	1	3
<i>CYP89</i>	7	1	<i>CYP719</i>	0	6
<i>CYP90</i>	4	1	<i>CYP720</i>	1	2
<i>CYP91</i>	2	0	<i>CYP721</i>	1	1
<i>CYP92</i>	0	4	<i>CYP722</i>	1	0
<i>CYP93</i>	1	1	<i>CYP724</i>	1	1
<i>CYP94</i>	6	7	<i>CYP734</i>	1	1
			<i>CYP735</i>	2	1

図1 ハナビシソウが産生する多様なイソキノリンアルカロイドと生合成酵素

図に示すように、ハナビシソウのベンジルイソキノリンアルカロイド生合成には、多くの P450 遺伝子ที่เกี่ยวข้องしている

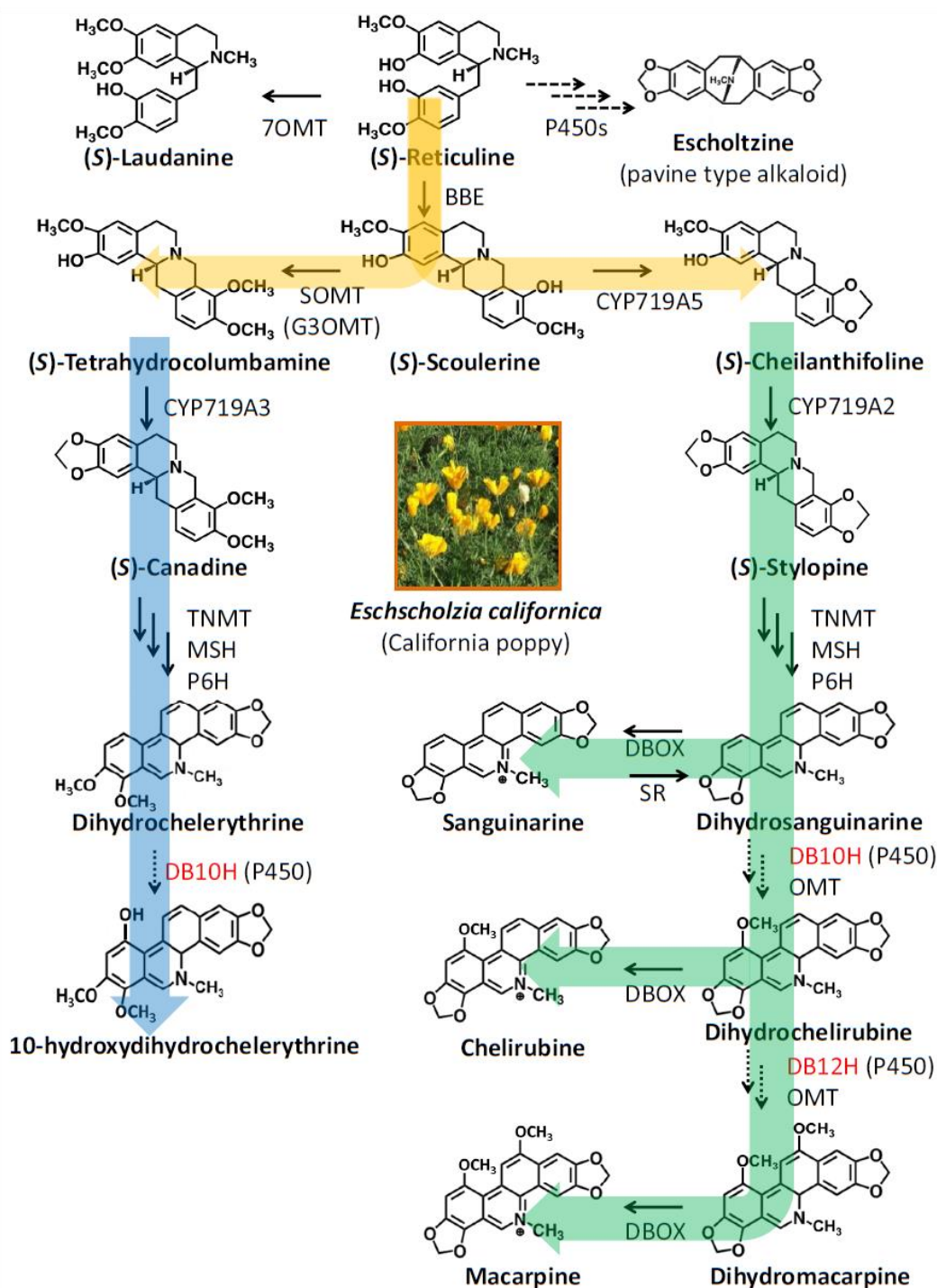
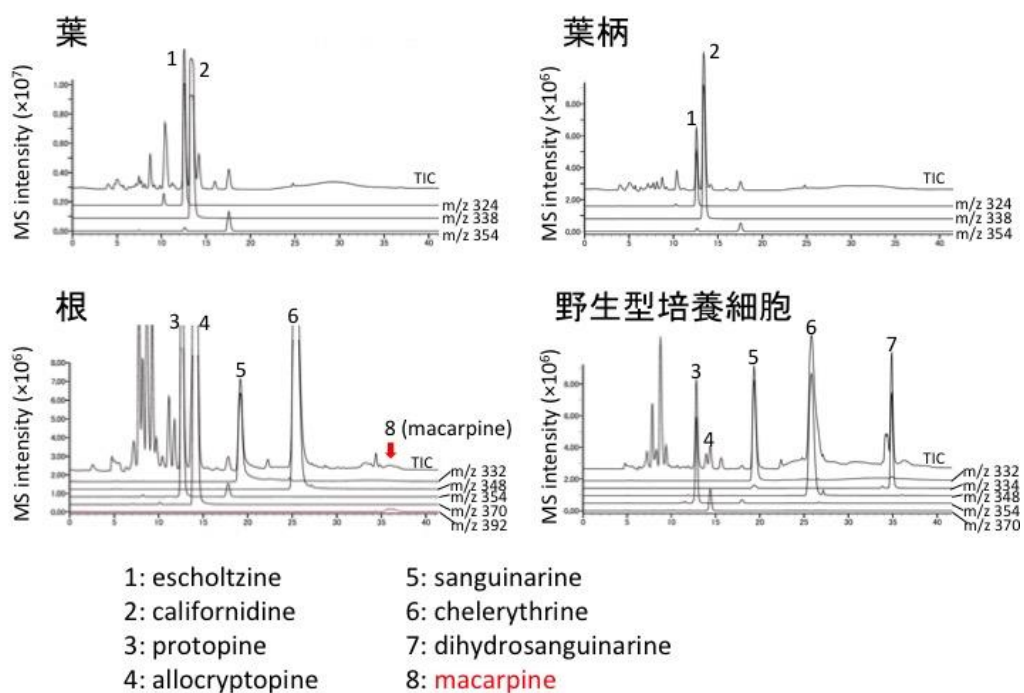


図2 植物組織におけるアルカロイドプロファイルとそれぞれの組織における機能未同定 P450(CYP82)遺伝子の発現

【植物組織別のアルカロイドプロファイル】



【新規 P450 の植物組織別発現解析】

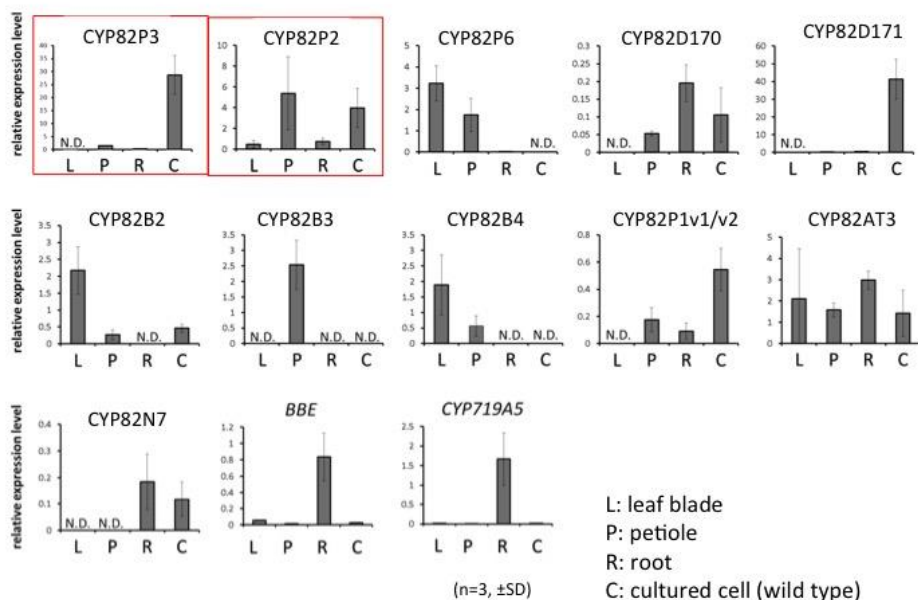


図3 異なるアルカロイドプロファイルを持つ培養細胞株と、細胞株における機能未同定 P450(CYP82)遺伝子の発現

【培養細胞のアルカロイドプロファイルと新規 P450 の発現解析】

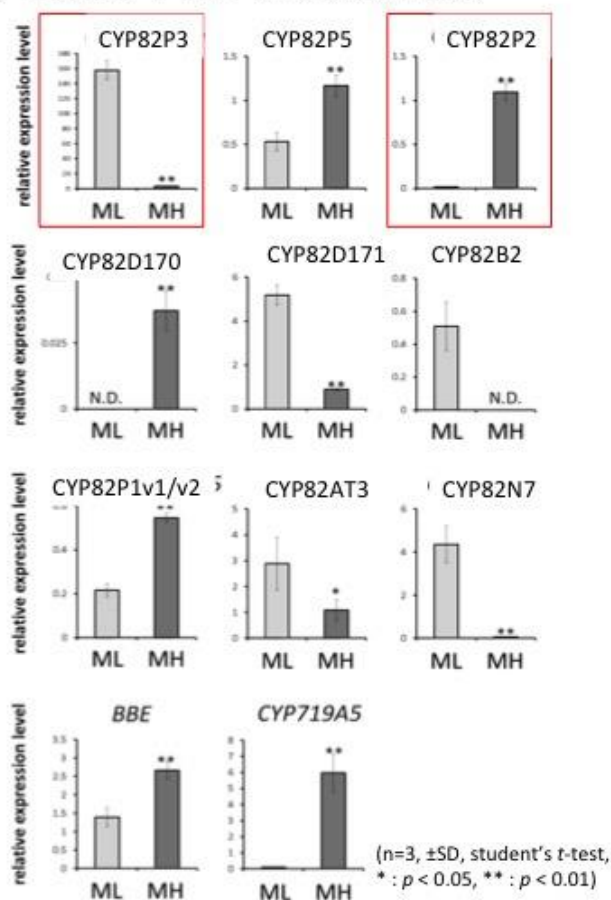
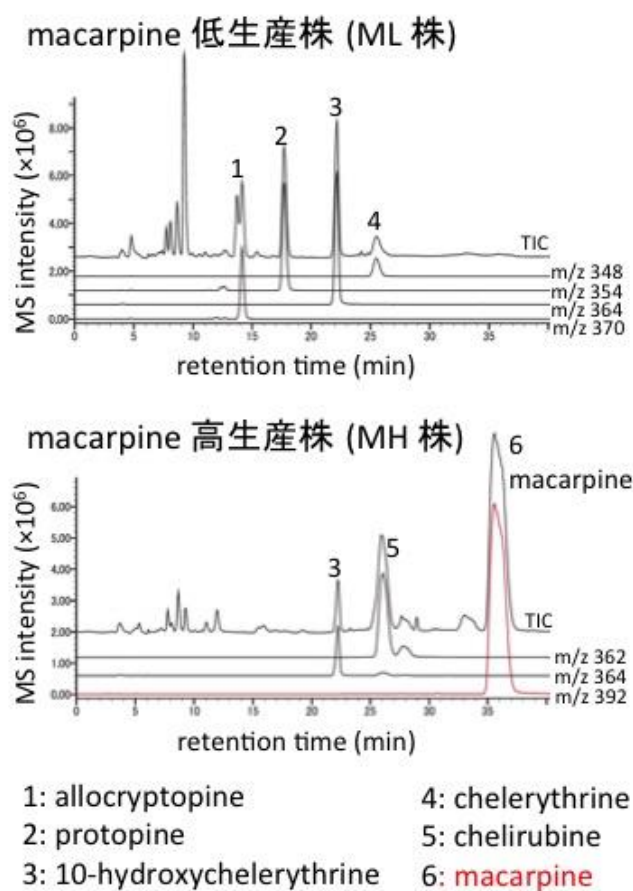
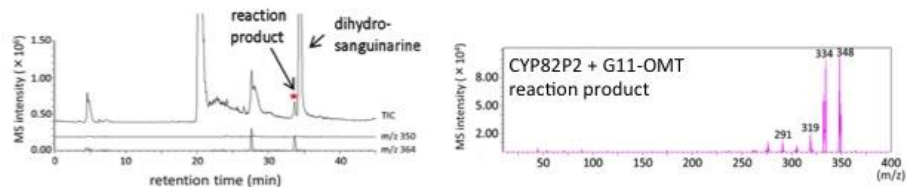


図4 CYP82P2 ならびに CYP82P3 の酵素活性

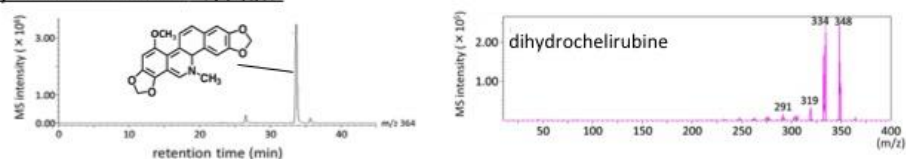
【G11-OMT との共反応によるCYP82P2反応産物の同定】

G11-OMT: MH 株から単離されたO-メチル化酵素

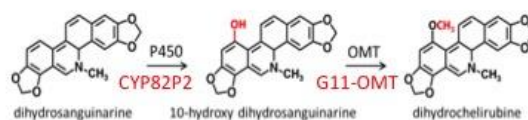
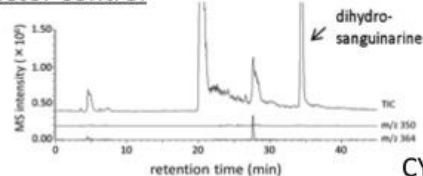
CYP82P2/G11-OMT 発現酵母 共培養 + dihydrosanguinarine



dihydrochelirubine (標品)



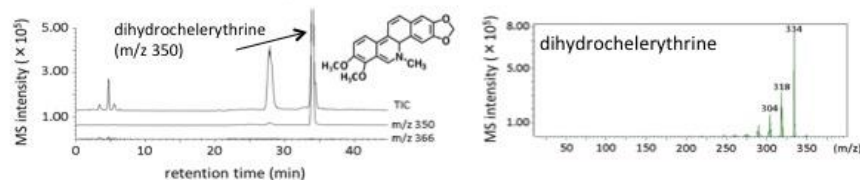
Vector control



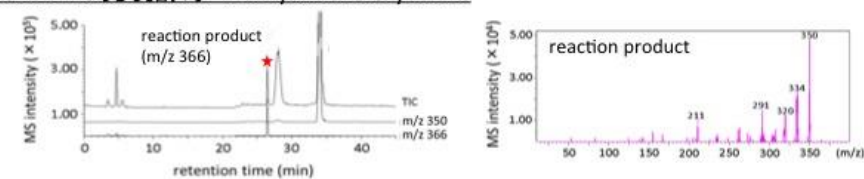
CYP82P2: dihydrosanguinarine 10-hydroxylase 活性

【CYP82P3 のdihydrochelerythrine水酸化活性】

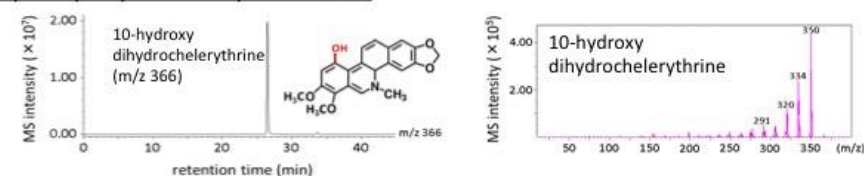
Vector control + dihydrochelerythrine



CYP82-1 like 発現酵母 + dihydrochelerythrine



10-hydroxydihydrochelerythrine 標品



CYP82P3: dihydrochelerythrine 10-hydroxylase 活性

図5 P450 (CYP82 ファミリー) の分子系統樹

CYP82P2 と CYP82P3 は高い相同性を有し、10 位水酸化酵素としての機能を有するが、異なる基質を認識し、その発現の違いによって、細胞におけるアルカロイド組成が異なることが明らかになってきた (図4 参照)。

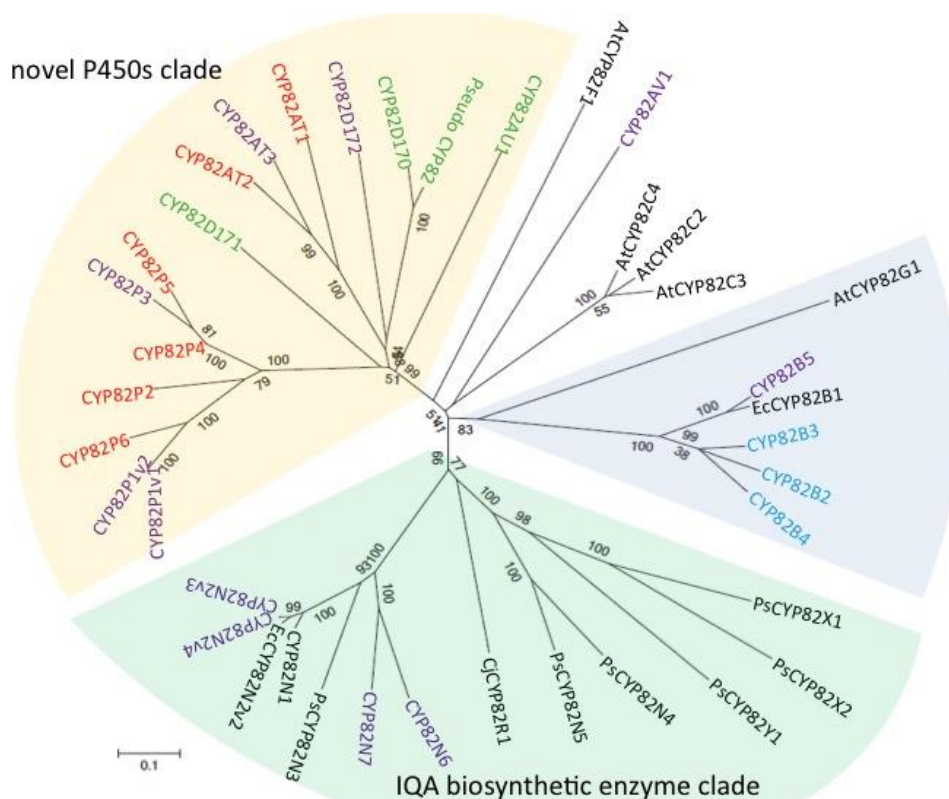


図6 ハナビシソウゲノムにおいて CYP82 ファミリー遺伝子は遺伝子クラスターとして存在した。これらの遺伝子のうち、いくつかのもの (CYP82AT1, AT2, AU1) は、分析した条件下では、発現を示さず、将来の二次代謝系の拡張のために、準備されているものと推測された。

