

## タキサジエンの 10 位を水酸化する新規シトクロム P450 遺伝子の単離と機能解析

○小森 彩<sup>1</sup>、竹村 秀史<sup>1</sup>、久保 崇<sup>2</sup>、石井 純<sup>5</sup>、町田 雅之<sup>3</sup>、近藤昭彦<sup>6</sup>、播本 孝史<sup>1</sup>、鈴木 宗典<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸天然物化学、<sup>2</sup>高機能遺伝子デザイン技術研究組合、<sup>3</sup>産総研・生プロ、<sup>4</sup>神戸大・自科・研究環、<sup>5</sup>神戸大院・工・応化)

**【要旨】** パクリタキセルは、イチイ樹木が生産する優れた抗腫瘍活性を持つジテルペノイドである。パクリタキセルの生合成は、ジテルペノイド共通の前駆体であるゲルニルゲラニルニリン酸 (GGPP) より約 18 ステップの反応が関与すると予想されているが、酸化反応を含む複数ステップに関与する酵素遺伝子が明らかにされていない。本研究では、イチイ樹木の地上部・地下部の代謝産物の比較ならびに遺伝子発現解析を行い、シトクロム P450 (P450) をターゲットとして新規パクリタキセル生合成関連酵素遺伝子の単離を試みた。

ニホンイチイ樹木の地上部および地下部の代謝産物分析を行った結果、地上部に比べ地下部においてパクリタキセルならびにその生合成中間体が多く蓄積していた。この結果は、既知生合成関連酵素遺伝子の RT-PCR 結果とも一致した。そこで、地上部および地下部における RNA シーケンス解析を行い、地下部で多く発現している遺伝子配列の抽出を行った。さらに、タキサン類を酸化する既知 P450 はお互いに高いアミノ酸配列相同性を持つことから、地下部で多く発現する候補遺伝子配列から既知 P450 と相同性が高い配列を選定、単離した。単離した 19 種の推定新規 P450 遺伝子それぞれを GGPP 合成酵素遺伝子、タキサジエン合成酵素遺伝子、NADPH-シトクロム P450 還元酵素遺伝子とともにファルネシルニリン酸高生産大腸菌に導入し、その代謝産物を GC/MS を用いて分析した。その結果、19 種中 1 種においてタキサジエン酸化物と推定される新たなピークが確認された。さらに、コドンが大腸菌に最適化した配列を用いて N 末端配列の改変を行った結果、改変前と比べ培養液当たりの新規産物が約 10 倍増加した。得られた新規産物は、各種スペクトルによる構造解析の結果から、タキサジエン 10 位の水酸化物であることがわかった。

パクリタキセル生合成関連酵素遺伝子として、これまで複数の P450 が報告されている。しかし、パクリタキセル生合成出発物質であるタキサジエンを基質とする酸化酵素の報告はタキサジエン 5 位水酸化酵素のみであった。今回タキサジエン 10 位水酸化酵素を発見したことにより、タキサジエンから分岐する新たな経路の存在が予想された。

RNA シーケンスデータ解析を行うに当たり、解析ソフトの改良等のご協力を賜りましたインシリコバイオロジー株式会社に心より感謝いたします。また、この研究は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施されました。

**【キーワード】** Paclitaxel, Cytochrome P450, Diterpenoid