

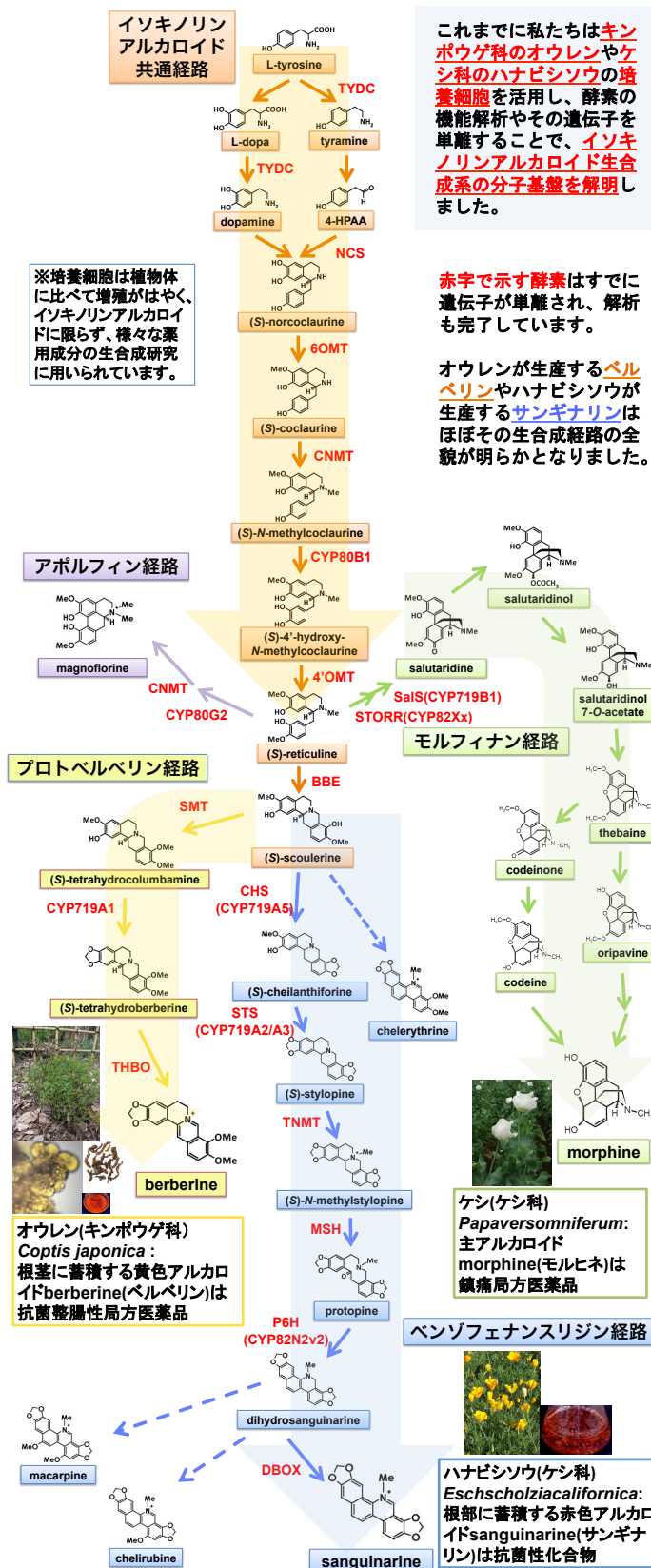
ゲノムの中から薬づくりの道具を探す

生命科学研究科全能性統御機構学分野

1. 研究の目的

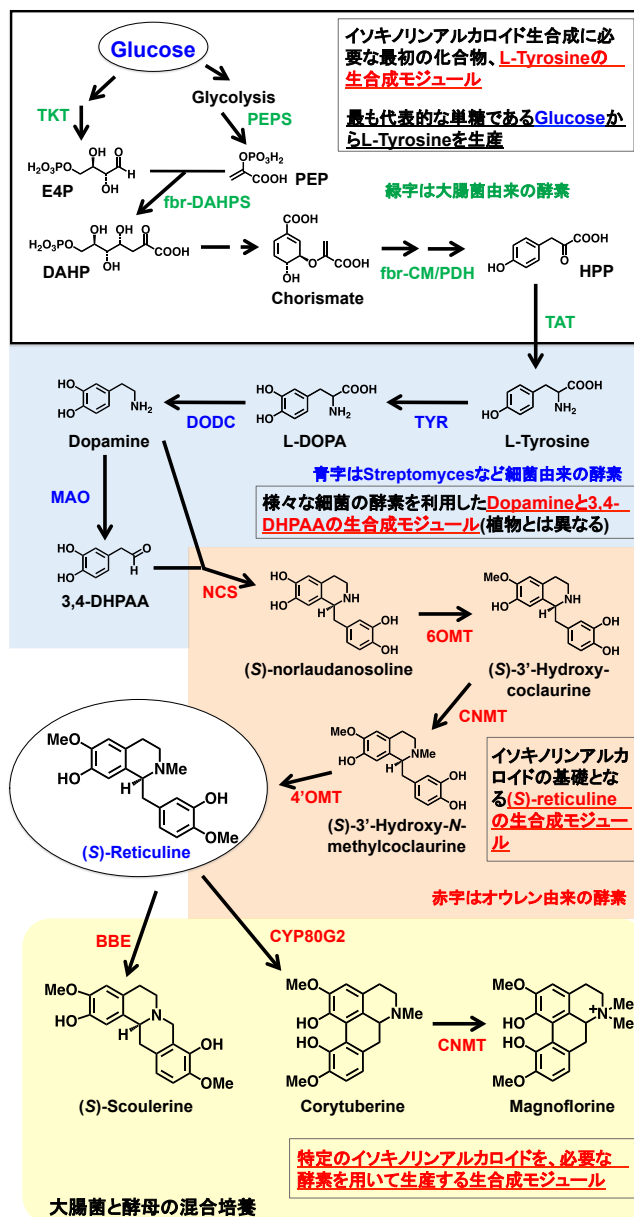
植物が生産する有用な医薬品、実際には、ケシやオウレンが産生するイソキノリンアルカロイドの生合成経路を解明し、遺伝子工学技術を用いて効率よく薬をつくる手法を開発しています。植物そのものの改変とともに、培養植物細胞や、微生物を用いた物質生産など、様々な方法を検討しています。

2. イソキノリンアルカロイド生合成経路



3. 微生物における生合成系の再構築

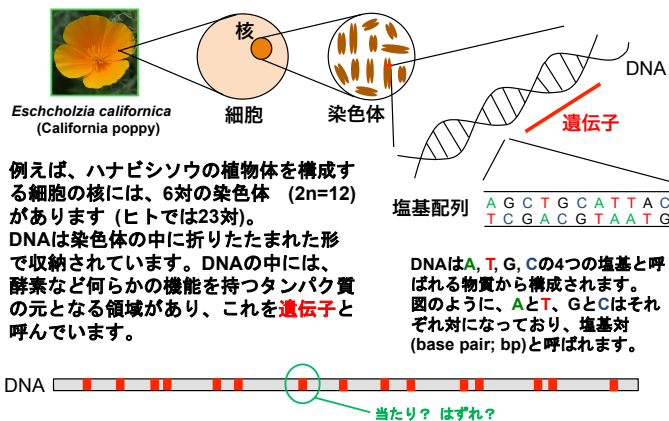
合成生物学により、植物や微生物の酵素を組み合わせることで生合成経路を微生物内に再構築させることで、目的の化合物を生産することが可能となり、昨年のアカデミックデーで紹介しました。現在は、より多くの医薬品を合成できるよう、多様な化合物の生合成酵素遺伝子の単離を行っています。



植物がつくる有用物質の生合成に関わる酵素遺伝子は、これまで様々な手法(大量の材料から酵素を精製する、すでに知られている酵素遺伝子と似ているかどうかから推定するなど)を用いて行われてきました。今回我々は、**ゲノムからの遺伝子の推定**という課題に挑戦し研究を進めてきたので、その内容について紹介します。

4. ゲノムとは？

生物がもつ遺伝情報のすべてをまとめてゲノムといいます。



多数の遺伝子の中から有用物質の生合成に関わる遺伝子を見つけ出すにはどうすればよいか…？

5. 生合成酵素遺伝子の単離のための戦略

ある程度生合成経路の解明が進むと、様々な既知のデータから、生合成に関わる遺伝子を推定することも可能となってきました。

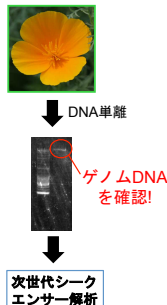
しかし、我々はさらにその先を目指して、塩基配列の並びから生合成遺伝子を推定できないかと研究しています。

➡ DNAの塩基配列情報をたくさん集めることが重要！

我々はまず、研究材料をハナビシソウに決定し、植物体からゲノムDNAを単離し、適当なサイズに分画したあと、次世代シーケンサーと呼ばれる高効率な塩基配列を決定する装置で、配列を決定しました。

今回、解析に用いたハナビシソウは、ゲノムサイズが約500 Mb (5億塩基) と、比較的小型のゲノムをもつ植物です (ヒトの約6分の1、モデル植物といわれるシロイヌナズナの約4倍)。

※1 b = 1塩基



6. ドラフトゲノム配列の推定と発現する転写産物とのマッピング解析

シーケンサーで解読される配列は数百塩基ですが、ゲノムサイズの500倍倍することで、ゲノム全体をカバーし、それをコンピューターで繋ぎあわせることにより、15,668本の連続する塩基配列 (Scaffold) が得られました。この配列長は、ゲノムサイズの約90% (467 Mb) となり、最も長い配列は4 Mb、また、中央値は約800 kbというものでした。

注) contigは、ギャップのない配列断片で、scaffoldはギャップを想定したものです。

build	scaffold/contig	Total seq. (bp)	Gap size	clone numbers	Longest seq. (bp)	N50(bp)
140527	scaffold	467,213,076	46,226,860	15,668	4,249,866	796,788
	contig	418,912,965	0	43,738	339,872	21,362

ハナビシソウでは、発現するRNAの解読が進んでいたことより、これらの解読情報をデータベース (NCBI and PhytoMetaSyn) から入手し、今回得られたゲノム情報と比較することにより、ゲノム情報がどれ位全体をカバーしているかを検討しました。その結果、解読されたRNA配列の90%に対してカバー率50%以上であることが分かり、十分な精度をもつことが推定されました。

7. ゲノム配列の中からの生合成遺伝子の発掘

我々が今着目していることは、生合成に関わる遺伝子がクラスターを作っているのではないかとことです。

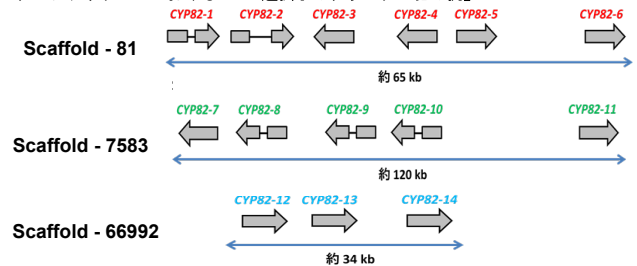
クラスターとは？

例えば、ケシが作るノスカピンと呼ばれる二次代謝産物の生合成遺伝子は、染色体のある場所に固まって存在していることが知られています。これを遺伝子クラスターと呼んでいます。



ハナビシソウでも遺伝子クラスターの存在を検討しましたが、残念ながら、類似したアルカロイド生合成系の遺伝子クラスターは見いだせませんでした。しかし、いくつかの生合成酵素、特に、シトクロムP450 (CYP) と呼ばれる遺伝子のいくつか、特定の場所に密集していることを見出しました。

【ハナビシソウゲノムにおけるP450 遺伝子のクラスター化の例】



8. ゲノム配列の中からの生合成遺伝子の発掘

2の生合成経路図にも見られるように、シトクロムP450 (CYPと書かれた) 酵素群はイソキノリンアルカロイドの生合成において非常に重要な反応を担っています。そこで、これらのP450ファミリーの分布をモデル植物であるシロイヌナズナと比較したところ、イソキノリンアルカロイドに特徴的な CYP80, CYP82, CYP719といったファミリーの数がハナビシソウで明らかに多いことが分かりました。特に、CYP82ファミリーはその数が多く、特定の場所に密集している点と合わせて、我々は注目しています。現在は、dihydrosanguinarineの水酸化に関与するCYP82酵素の同定に成功しており、また、それ以外の遺伝子の機能の解明も現在進めています。

9. まとめと展望

● ハナビシソウのゲノム遺伝子配列を決定することにより、生合成酵素が遺伝子クラスターを作っている可能性が低いことが分かりました。

● 一方、ハナビシソウゲノムには、イソキノリンアルカロイドの生合成に関与すると考えられるP450遺伝子ファミリー (CYP80, CYP82, CYP719) が多く存在し、その一部は、特定の場所に集中していることが明らかになりました。

● 機能が分かっていないCYP82の中から、イソキノリンアルカロイドの生合成に関与する遺伝子を同定することができ、ゲノム解読が生合成遺伝子単離の新しい可能性を秘めていることが判明しました。

● ゲノムの中に見いだされた生合成関連遺伝子のなかには、発現していないものも認められました。これらの遺伝子は、今後のイソキノリンアルカロイド生合成系の進化に関与するのではないかと期待し、その機能解析を進めています。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費基盤研究(S)の支援を受けて行ったものです。また、ゲノム解読にあたっては、新学術研究「ゲノム支援」の協力を得て行われました。遺伝研究所の豊田敦博士には特に配列解読にあたりご支援いただきましたことを感謝申し上げます。