

るオニゲシだけではなく、オニゲシとケシ等のケシ属植物の交配種についても研究材料としてモルヒナンアルカロイド生合成経路の酵素遺伝子群の解析を行い、オリパピンをはじめとするアヘンアルカロイドの生産制御に関する知見を得るアプローチが独創的であり、また特色である。

B. 研究方法

De novo トランスクリプトーム解析に供したケシ属植物無菌培養物

今回、トランスクリプトーム解析に供したケシ属植物各系統の特徴は、それぞれ下記のとおりである。括弧中の数値は葉中の主なアルカロイドの含有量(重量%)を示す。

- (1) POL2 1-1HO^{*1}: オニゲシ高オリパピン系統 (オリパピン *ca.* 0.35%)
- (2) PsIK♀xPO♂ 2-8M^{*1}: ケシ×オニゲシ交配株 高モルヒネ系統 (モルヒネ >0.25%)
- (3) PsIK♀xPO♂ 2-2M^{*1}: ケシ×オニゲシ交配株 高モルヒネ系統 (モルヒネ >0.2%)
- (4) PsIK♀xPO♂ 1-5HT^{*1}: ケシ×オニゲシ交配株 高テバイン系統 (テバイン >0.5%)
- (5) PsIK♀xPO♂ 2-7HO^{*1}: ケシ×オニゲシ交配株 高オリパピン系統 (オリパピン >0.3%)
- (6) PO♀xPsIK♂ 2MOT^{*1}: オニゲシ×ケシ交配株 高モルヒネ, 高オリパピン, 高テバイン系統 (モルヒネ >0.25%, オリパピン *ca.* 0.3%, テバイン *ca.* 0.3%)
- (7) PO♀xPsIK♂ 2-6M^{*1}: オニゲシ×ケシ交配株 高モルヒネ系統 (モルヒネ *ca.* 0.3%)
- (8) PsIK^{*2}: ケシ (一貫種) [参考値: モルヒネ 10.9% (乳液中)]
- (9) PsM1-2LN^{*2}: ケシ T-DNA 挿入変異体 [高テバイン型変異体, 乳液参考値: テバイン 16.3% (乳液中)]

無菌培養物の培養条件は下記のとおり。温度 20℃, 明期 14 時間, MS 培地 [Murashige & Skoog 培地 (M0222, Duchefa), Sucrose 3%, Gelrite 0.25%]. 各培養物の写真を図 2 に示す。

ケシ属植物無菌培養物からの total RNA 調製

ケシ属植物からの total RNA 調製には RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用した。ケシ属植物無菌培養物の葉を主とした地上部約 250 mg を採集し、液体窒素中で乳鉢・乳棒により粉碎したものに、上記キットの RLT buffer 900 μL 及び β-メルカプトエタノール 9 μL を加え、以後、キットのプロトコルに準拠して操作を行い、最終的に 65 μL (1 回目 30 μL, 2 回目 35 μL) の RNase free water により溶出し total RNA 溶液を得た (1 サンプルにつきカラム 2 本を使用した)。

得られた total RNA 溶液の 2 μL を Nanodrop ND1000 による濃度及び吸光スペクトルの解析に、また、3 μL をアガロース電気泳動解析に供し、品質の確認を行った。これらの total RNA は -80℃ で保存し、冷凍下かずさ DNA 研究所に輸送した。

なお、かずさ DNA 研究所より提示された次世代シーケンサーによる解析に必要な total RNA の品質については、下記のとおりである。

- 解析に必要な RNA 量は 1 μg 程度 / 1 解析。
- RNA は nuclease-free water (DEPC-treated water は不可) に溶解されていること。
- 濃度 100-500 ng/μL 程度であること。
- RNA Integrity Number (RIN 値) 7.0 以上 (Agilent 2100 バイオアナライザーで解析)。

トランスクリプトーム解析の概要

ケシ属植物無菌培養物試料のトランスクリプトーム解析は、かずさ DNA 研究所において実施した。De novo RNA シーケンスの概要を図 3 に示す。

C. 研究結果

ケシ属植物のトランスクリプトーム解析

センターで調製したケシ属植物無菌培養物の total RNA は、濃度、吸光スペクトル、アガロースゲル電気泳動の各種品質確認において、いずれも問題がないことが確認された。これらのデー

タを表 1 及び図 4 に示す。

一部試料においては、アガロース電気泳動によりゲノム DNA 由来のものと考えられるバンドが認められたが、次世代シーケンサー用サンプル調製においては RNA を選択的に精製するプロトコルを使用しているため、問題とはならなかった。

なお、これらの total RNA サンプルについては、次世代シーケンサー用サンプル調製に先立ち、かずさ DNA 研究所においても 2100 Bioanalyzer (Agilent) を用いた品質チェックに供され、いずれも品質に問題がないことが確認された。

上記サンプルについて、次世代シーケンサー HiSeq1500 (illumina) による Paired-End 100 bp の run は正常に完了し、現在、EST データ、contig データ、RPKM 値*データ、blastx による機能アノテーションデータの各種データの取得を進めているところである。

*RPKM 値: Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads. 各遺伝子に対するシーケンス配列 (read) 数を遺伝子発現量として換算する際、総 read 数が 100 万 (one million) かつ各遺伝子の配列長を 1,000 塩基 (one kilobase) として正規化した値であり、各 contig の発現量の目安となる。

D. 考察

EST 及びトランスクリプトーム研究においては、取得するデータが発現遺伝子の情報であるため、試料のサンプリング時の生育状況、栽培条件等がデータの変動する要因として重要になる。今回は純系統の株と交配株との間で、アルカロイド生合成経路に関わる遺伝子群の発現差異について俯瞰的に解析するため、交配株の系統数を増やし、それぞれ各 1 系統 (株) についてデータの取得を行った。今回の解析の結果、顕著な遺伝子の発現変異等が明らかになった場合は、それぞれの系統について反復数を増やし、それらが統計的に有意な変動であるか解析する必要が

ある。

次年度は、オニゲシ、ケシ及びこれらの交配種等を材料としたトランスクリプトーム解析、並びに EST ライブラリーの解析を進め、それらの情報を利用して、オニゲシの生産するアルカロイド類の生合成に関わる遺伝子群の塩基配列並びに遺伝子発現に関する情報を収集・解析する。これらの情報は、アルカロイド生合成に関わる酵素遺伝子群の各種性状の解明並びに、オニゲシと他のケシ属植物との遺伝子レベルでの簡便な鑑別法の開発の基盤情報となると期待される。

E. 結論

本年度は、オリパビンの生合成に関わる基盤情報を整備する上で重要となる、生合成酵素遺伝子群の網羅的な発現遺伝子情報を取得するため、センターで作出され、維持されているオニゲシ、ケシ及び、アルカロイド生産能に変異を生じたこれらの植物間の交配種等を含む無菌培養物、合計 9 系統を材料として、次世代シーケンサー (HiSeq1500) を用いた *de novo* トランスクリプトーム解析並びに、発現する全遺伝子の情報集積である EST (expressed sequence tag) ライブラリーの構築に着手した。これらのアヘンアルカロイド生産能の異なる植物試料群のトランスクリプトーム情報を用いて発現遺伝子群の比較解析を行うことにより、オリパビン等のアヘンアルカロイドの生合成制御に関する新たな知見が得られるものと期待される。

F. 参考文献

- 1) 吉松ら, 日本生薬学会第 54 回年会 (名古屋) 講演要旨集 p. 260 (2P-C29) (2007)
- 2) Kawano, N., Kiuchi, F., Kawahara, N., Yoshimatsu, K., *Pharmaceuticals*, 5(2), 133-154 (2012).

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(図表)

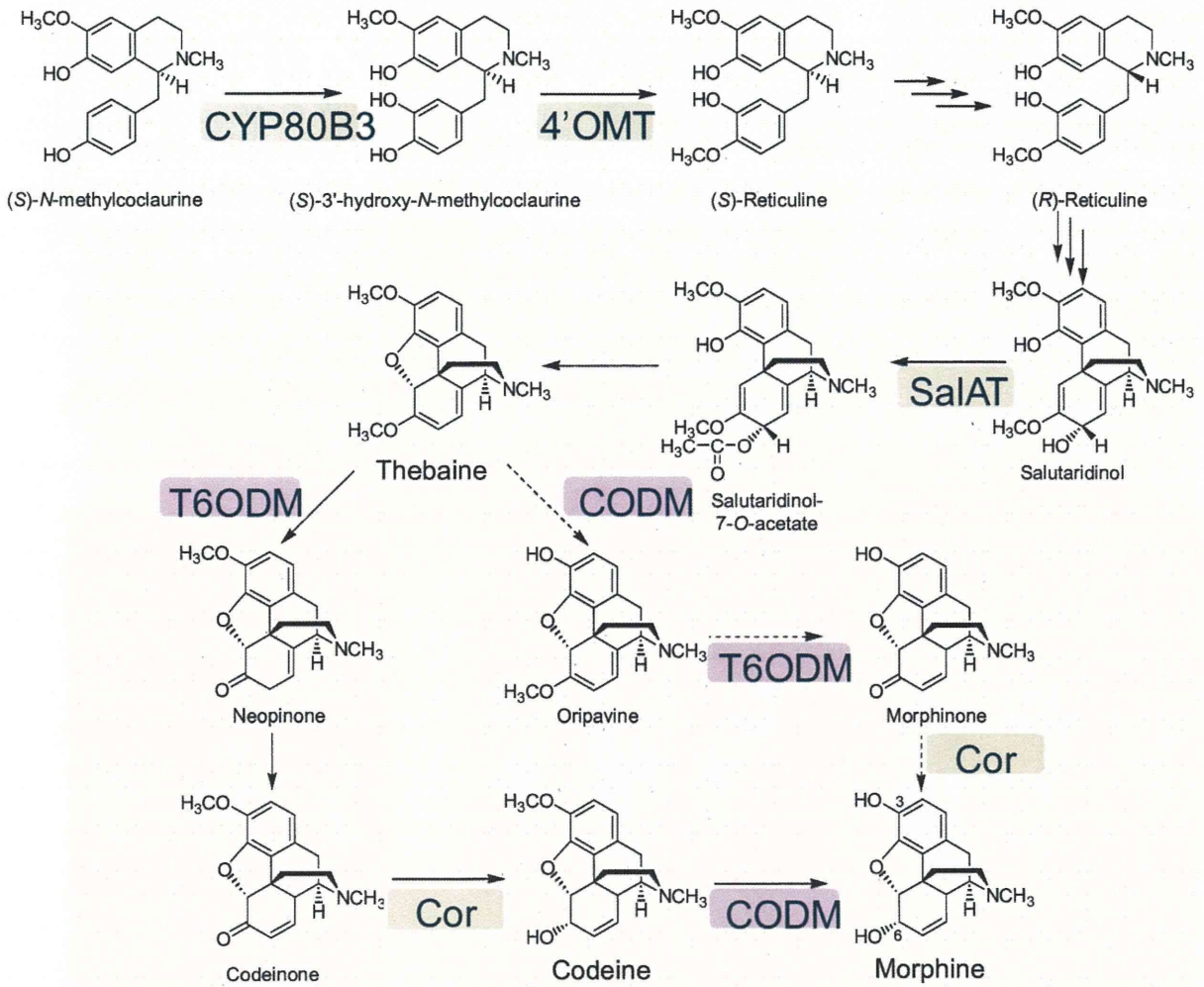


図1. ケシにおけるモルヒネの生合成経路 (S)-N-methylcoclaurine以降を示す



(1) POL2 1-IHO



(2) PsIK♀xPO♂ 2-8M



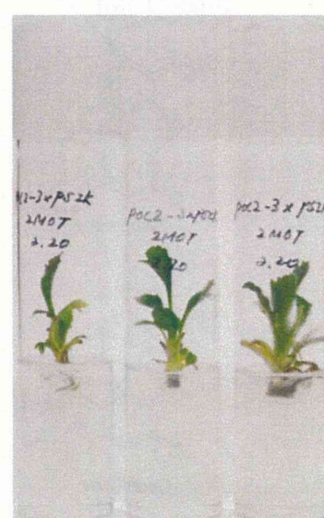
(3) PsIK♀xPO♂ 2-2M



(4) PsIK♀xPO♂ 1-5HT



(5) PsIK♀xPO♂ 2-7HO



(6) PO♀xPsIK♂ 2MOT



(7) PO♀xPsIK♂ 2-6M



(8) PsIK



(9) PsM1-2LN

図 2. 本研究においてトランスクリプトーム解析に供した、ケシ、ケシ×オニゲシ交配株及びケシ形質変異体の無菌培養物

RNA調製・次世代シーケンサー用サンプル調製



Hiseq1500 (Illumina) ペアエンド(2×100bp)リード



Qualityおよびlength (49 base cut) によるtrimin

Hiseqデータ 50~100b長のPaired又はsingle read
及び、公開ESTデータ



De novo アセンブリ

(同一植物種・複数系統の場合はリードを混合してcontig作製)



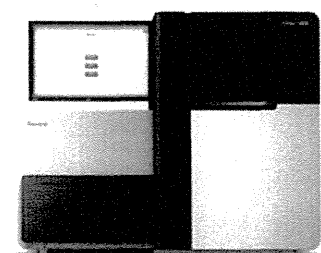
⇒ Unmapped ⇒ 解析から除外

Contig群



公開ESTデータを含む配列以外は除外
塩基長による選抜 (150 bp cut)

ユニークな配列 (unigene) ⇒ RPKM値の算出・blast検索(blastx)



Hiseq1500 (Illumina)
かずさDNA研

図3. かずさDNA研究所におけるde novoトランスクリプトーム解析の概要

表1. 本研究に供試したケシ属培養物のtotal RNA収量及び吸光度情報

Sample ID	Line	conc. [ng/ul]	vol. [μl]	A260	A280	260/280	260/230
tube#1	POL2 1-1HO	322.69	60	8.07	3.83	2.11	2.29
tube#2		331.95	60	8.30	3.94	2.11	2.13
tube#3	PSN8IK2 x POL2 2-7HO	399.98	60	10.00	4.72	2.12	2.36
tube#4		353.22	60	8.83	4.13	2.14	2.18
tube#5	PSN5IK4 x POL2 1-5HT	465.27	60	11.63	5.61	2.07	2.32
tube#6		415.79	60	10.40	4.96	2.10	2.36
tube#7	POL2-3 x PSIK 2MOT	283.18	60	7.08	3.30	2.14	2.32
tube#8		306.54	60	7.66	3.58	2.14	2.29
tube#9	POL2-3 x PSIK 2-6M	417.47	60	10.44	4.96	2.10	2.38
tube#10		372.95	60	9.32	4.41	2.11	2.35
tube#11	PSN5IK4 x POL2 2-2M	409.26	60	10.23	4.87	2.10	2.22
tube#12		453.97	58	11.35	5.48	2.07	2.26
tube#13	PSN1K4 x POL2 2-8M	461.08	60	11.53	5.58	2.07	2.29
tube#14		541.62	60	13.54	6.34	2.14	2.33
tube#15	PsIK	267.28	60	6.68	3.15	2.12	2.24
tube#16		168.57	60	4.21	1.96	2.15	2.26
tube#17	PsM1-2LN	299.82	60	7.50	3.52	2.13	2.01
tube#18		285.80	60	7.15	3.37	2.12	2.35

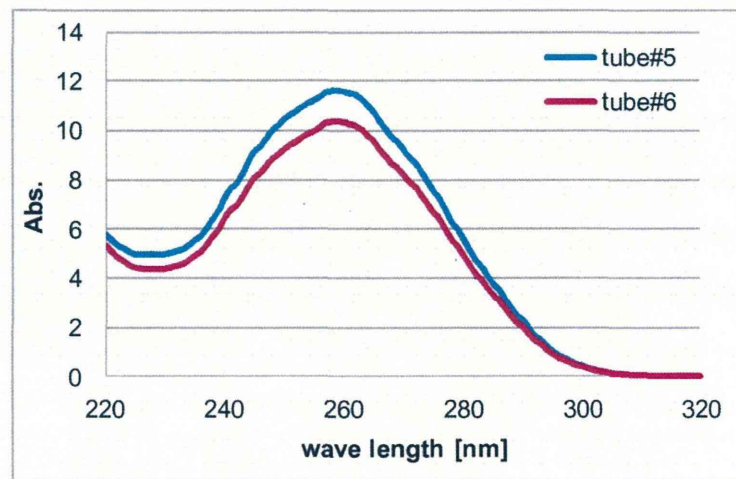
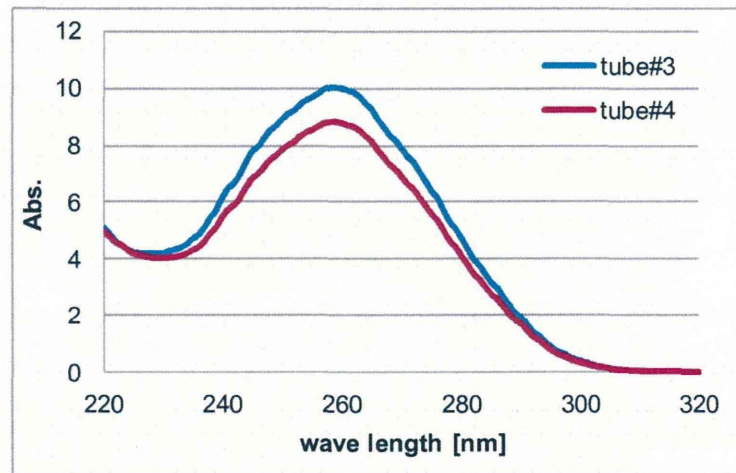
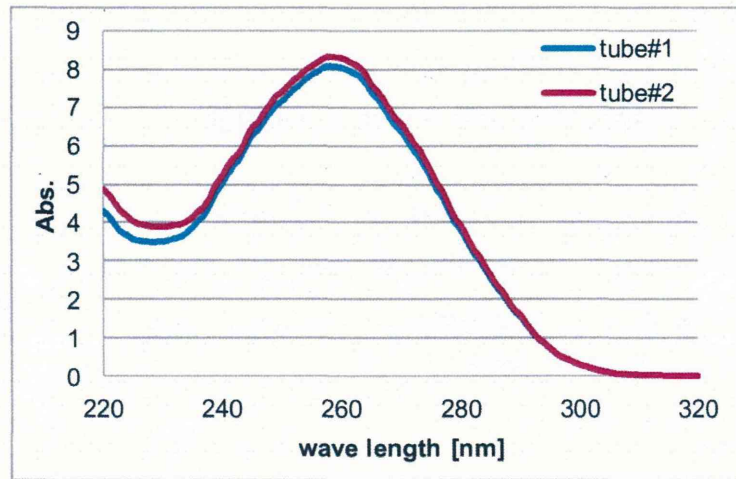


図4. ケン属植物無菌培養物より調製したtotal RNAの品質データ(その1)

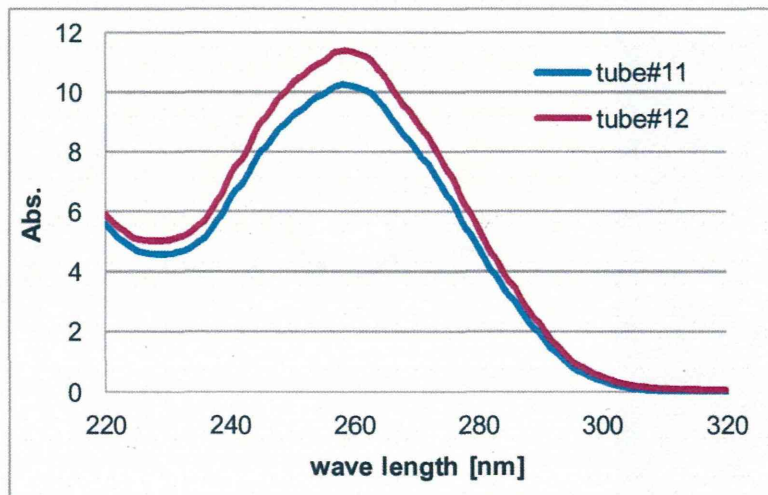
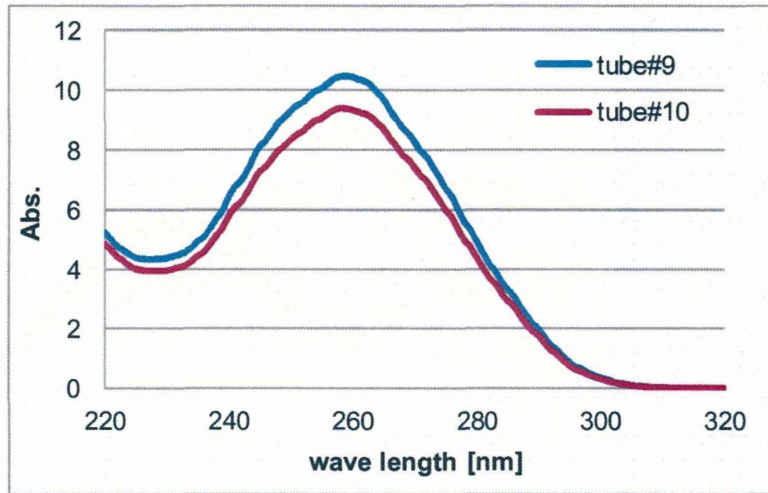
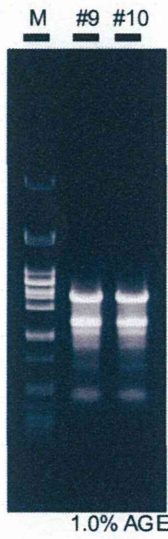
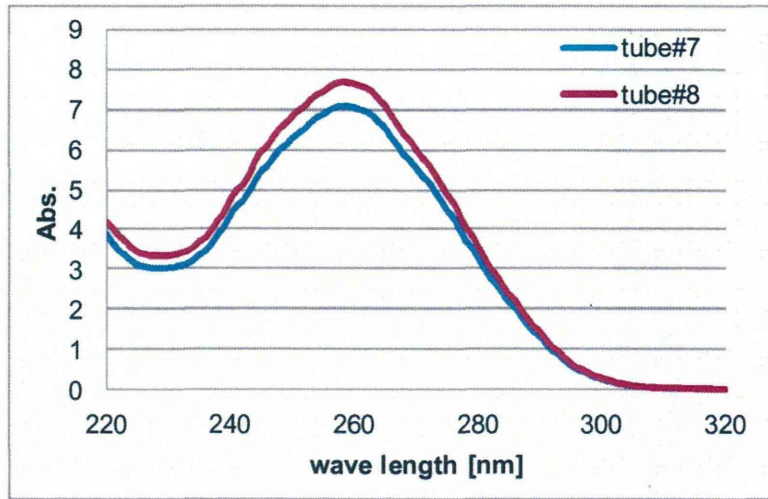


図4. ケシ属植物無菌培養物より調製したtotal RNAの品質データ(その2)

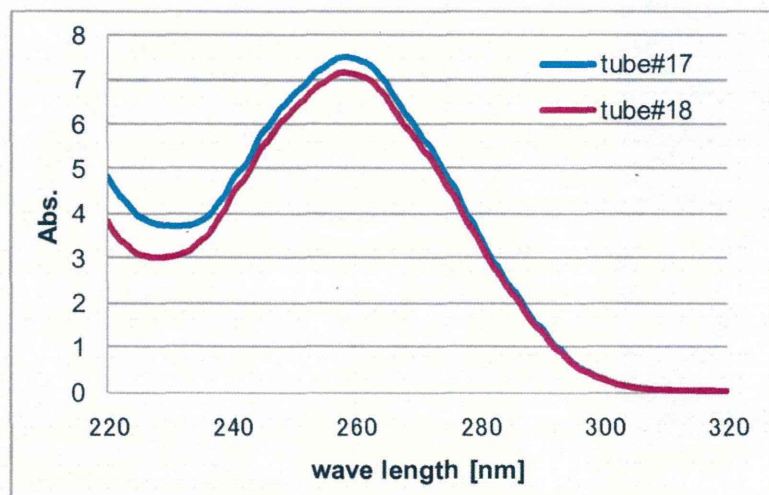
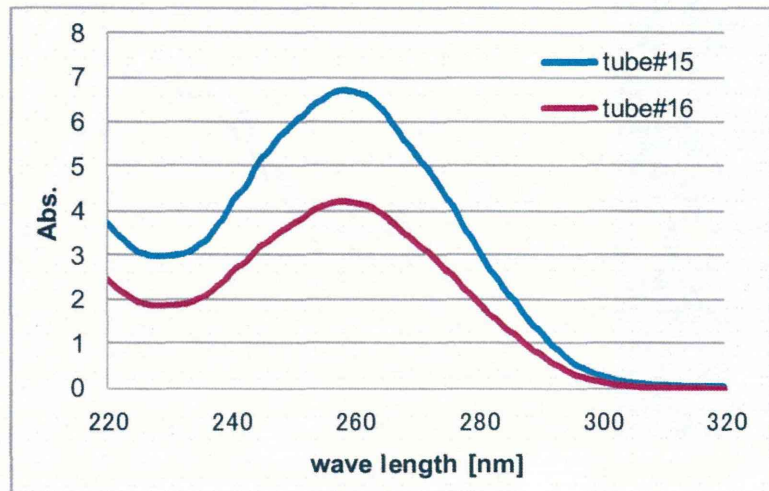
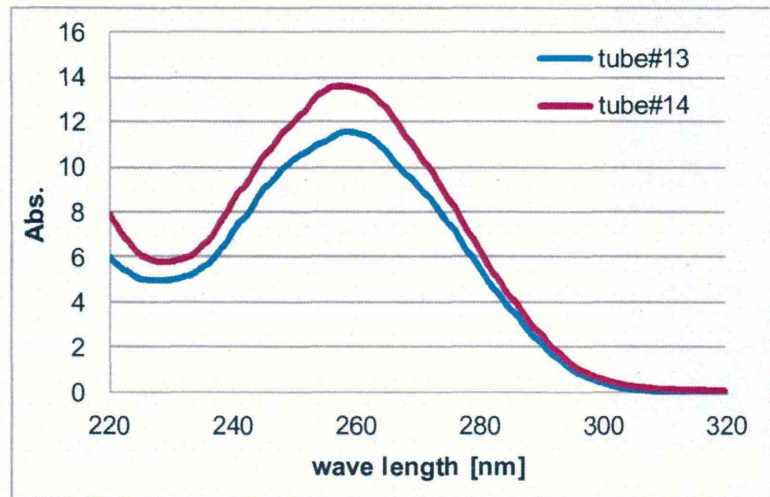


図4. ケシ属植物無菌培養物より調製したtotal RNAの品質データ(その3)

