

であり、また、将来的にオリパビン含有する植物そのものが法規制の対象となった場合においてもその栽培及び研究への使用に対応できることから、本研究をセンターで実施する意義は大きい。

本研究においては、オリパビン生産植物であ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、オリパビ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

ケシ属植物の *de novo* トランスクリプトーム解析の概要

H25 年度に下記のケシ属植物より構築した EST ライブラリー及び取得したトランスクリプトーム情報を各種解析に用いた。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。

POL2 1-1HO: オニゲシ高オリパビン系統 (オリパビン *ca.* 0.35%)¹⁾

PsIK: ケシ(一貫種)[参考値:モルヒネ 10.9%(乳液中)]²⁾

*De novo*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 2 に示す。

オニゲシ EST ライブラリーにおける *DIOX* 相同遺伝子の検索

オニゲシの *in vitro* 培養物 POL2 1-1HO より構築した EST ライブラリーより、テバインからオリパビンへの変換に関わると推定される、*2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase (DIOX)* 酵素遺伝子³⁾の相同遺伝子を探索するため、blastx の上位 20 位の検索結果 excel file を“DIOX”または“oxoglutarate”のキーワードを

query として検索した。

オニゲシの遺伝子鑑別用プライマーの開発

オニゲシ EST ライブラリー及びトランスクリプトーム情報の解析結果から、ケシと比較し、オニゲシにおいて高発現していると推定される contig を選択し、これらについてゲノム DNA を PCR 増幅するためのプライマーを表 1 のとおり設計した。これらのプライマーについてオニゲシ、ケシをはじめとするケシ属植物より調製したゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、増幅効率、交叉反応性等を検討し、オニゲシ特異的な識別が可能か否か検討した。

設計したプライマーの交叉反応性試験等に供試したオニゲシ、ケシ、ハカマオニゲシ等のケシ属植物は、センター筑波研究部において導入・保存・栽培されているものである。

ケシ属植物からのゲノム DNA の調製には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用した。新鮮葉約 100 mg を、2 ml 容チューブに 4.8 mm 径ステンレスボール 2 個、及びキットの AP1 バッファー 500 µl と共に入れ、破砕機 MS-100 (TOMY) で 4,500 rpm、1 分間、2 回粉碎を行い、以後キットのプロトコルに従い調製した。最終溶出はキット添付の AE buffer 100 µl で行った。

PCR 条件は下記のとおりである。

[KOD-plus (Toyobo) を使用したプライマーの特異性確認]

PCR reaction mixture: KOD-plus (TOYOBO) 1 µl, KOD-plus buffer 5 µl, dNTP mixture 5 µl, MgSO₄ 2 µl, sense & antisense primers (100 µM) 0.5 µl each, genome DNA 1 µl, water 35 µl (reaction volume: 50 µl)

PCR condition: 94°C 2 min. - (94°C 15 sec. - 58°C 30 sec. - 68°C 90 sec.) x 30 - 4°C ∞, iCycler (BioRad)

[GoTaq Green Master Mix (Promega) を使用した

交叉反応性試験]

PCR reaction mixture: GoTaq Green Master Mix (Promega) 3 μ l, sense & antisense primers (2.5 μ M) 1 μ l each, genome DNA 1 μ l (reaction volume: 6 μ l)

PCR condition: 94°C 5 min. - (94°C 30 sec. - 58°C 30 sec. - 72°C 1 min.) x 30 - 72°C 10 min. - 4°C ∞ , iCycler (BioRad)

得られた増幅産物はアガロース電気泳動で解析した。

C. 研究結果

ケシ属植物のトランスクリプトーム解析

オニゲシ及びケシの total RNA サンプルより調製した次世代シーケンサー解析用サンプルについて、次世代シーケンサー HiSeq1500 (illumina) による Paired-End 100 bp の run を行い、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を取得した。オニゲシ及びケシの EST ライブラリーの品質情報並びに、トランスクリプトーム解析においてマッピングに使用したリード数の情報を表 2 に示す。

*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。

オニゲシ EST ライブラリーにおける DIOX 相同遺伝子の検索

オニゲシの *in vitro* 培養物 POL2 1-1HO より構築した EST ライブラリーより、テバインからオリパビンへの変換に関わると推定される、DIOX 酵素遺伝子の相同遺伝子を探索するため、blastx の

上位 20 位の検索結果 excel file を“DIOX”または“oxoglutarate”のキーワードを query として検索した結果、表 3 に示す 16 個の contig が抽出された。

これらの contig について、植物試料 POL2 1-1HO における RPKM 値と、ケシ(一貫種) *in vitro* 培養物 PsIK より構築した EST ライブラリーのリードをマッピングしたものと RPKM 値の差が大きいものから順位をつけ、グラフ化したものが図 3 である。このグラフの x 軸において、左側の contig が両試料間の RPKM 値の差が大きい。すなわち、左側に配置された contig がケシよりもオニゲシにおいて発現量が高い遺伝子である。

本研究では、オニゲシにおいて生産されるオリパビンの生合成酵素遺伝子に着目しており、上記の結果を受け、オニゲシにおいて発現量が高く、ケシにおける発現量との差が大きい、#25434、#1495、#17742、#1603 の 4 contig について以降の解析を進めた。

オニゲシ高発現遺伝子のゲノム DNA の PCR 増幅

はじめに #17742 の contig 配列を元に、配列中 3 か所の増幅領域を設定し、それぞれを増幅するプライマーを設計し、オニゲシとケシのゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。その結果、616S+875A 及び 939S+1253A の 2 つのセットがオニゲシのみに特異的なバンドを与えることが判明した (図 4)。そこで、これらの 2 プライマーセットの交叉反応性を 4 種 (オニゲシ #13-95、ケシ(一貫種) PsIK、ハカマオニゲシ #624-79 #1、同 #14-95 #1、同 #14-95 #2) の各ケシ属植物由来ゲノム DNA を鋳型として確認したところ、939S+1253A のセットは PsIK に加え #14-95 #1 において増幅産物を与えなかった (図 5)。

続いて #1495、#1603、#25434 の 3 contig について、それぞれ特異的な PCR プライマーを設計

し、これらを用いそれぞれに対応するオニゲシのゲノム DNA の増幅を試みた。

その結果、先に検討した#17742 に加え、#1495、#1603 の 2 contig 特異的プライマーにおいて特異的とみられる増幅産物が得られた(図 6)。これらについて、オニゲシ、ケシ(一貫種)、ハカマオニゲシの計 5 検体について交叉反応性を確認したところ、それぞれ異なる反応性を示した(図 7)。

これらのうち、#1603 特異的プライマーを用い、さらに検体種を拡大して交叉反応性を検討したところ、オニゲシのほか、ハカマオニゲシとして導入され維持されている植物試料のなかに陽性となるものがあつた(図 8)。これらについては、形態的にオニゲシと異なるものも含まれており、この原因については検討を要する。

以上のように、ケシと比較してオニゲシにおいて発現量が高いと推定された contig の塩基配列情報を元に、オニゲシに特異性の高いプライマーの設計に成功した。

D. 考察

今年度は、オニゲシの EST ライブラリーより抽出された *DIOX* 相同遺伝子の contig に相当するゲノム DNA の対象領域が、PCR により増幅が可能であることを確認し、それらがオニゲシと他のケシ属植物との遺伝子識別に利用できる可能性を示した。しかしながら、これらの遺伝子がオニゲシで発現しているか、また実際にオリパビンの生合成に関与しているか否かは不明である。したがって、これらの遺伝子のオニゲシにおける発現の有無や、それらの機能についてさらなる知見を得るため、mRNA レベルでの発現の確認並びに、発現部位及び発現量の解析が必要と考えられる。

また、今回はオリパビンを生産するオニゲシ及び、オリパビン非生産のケシ一貫種の各 *in vitro* 培養物より構築した EST ライブラリーならびにトラ

ンスクリプトーム情報について解析を行ったが、アヘンアルカロイドを多量に含む、圃場栽培植物の乳液を生産する開花後の未熟果実等、植物の部位別のトランスクリプトーム解析を行うことにより、*DIOX* 相同遺伝子群等の機能についてより詳細な情報が得られると期待される。

本年度は *DIOX* 相同 contig16 配列のうち、4 配列について解析を開始したが、残る 12 の未解析配列についてもひきつづき検討が必要である。とくに、ケシ(一貫種)においてオニゲシよりも発現量が高いと推定される contig の機能には興味を持たれる。

E. 結論

本研究においては、これまでにオニゲシ及びケシ、そしてこれらの交配株を材料とした EST (expressed sequence tag)ライブラリーの構築を進めている。本年度は、これらのケシ属由来 EST ライブラリーについて、既報のモルヒナンアルカロイド生合成経路の酵素群のうち、テバインからコデインまたはオリパビンを経て、モルヒネへの変換に関わる酵素遺伝子に着目し、オリパビンの生合成、とくにテバイン以降の変換に関わると推定される酵素遺伝子の配列 16 種を、テバイン脱メチル化酵素(T6ODM)やコデイン脱メチル化酵素 (CODM) に代表される 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase (*DIOX*)との相同性解析等により取得した。

これらの遺伝子の発現量の推定値をオニゲシとケシの間で比較検討し、オニゲシにおいて発現量が高い遺伝子 4 種について、それぞれの特異的プライマーを設計し PCR 増幅を試みた。その結果、オニゲシにおいては 3 遺伝子で増幅産物が得られた。これらのプライマーセットはケシにおいては増幅産物を与えず、オニゲシ他ケシ属植物の遺伝子鑑別に使用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

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. Genetic and Phenotypic Analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA Insertional Mutant with Altered Alkaloid Composition, *Pharmaceuticals*, **5(2)**, 133-154 (2012).
3. Hagel, J.M. and Facchini, P.J., Dioxygenases catalyze the *O*-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 273-275 (2010)

(図表)

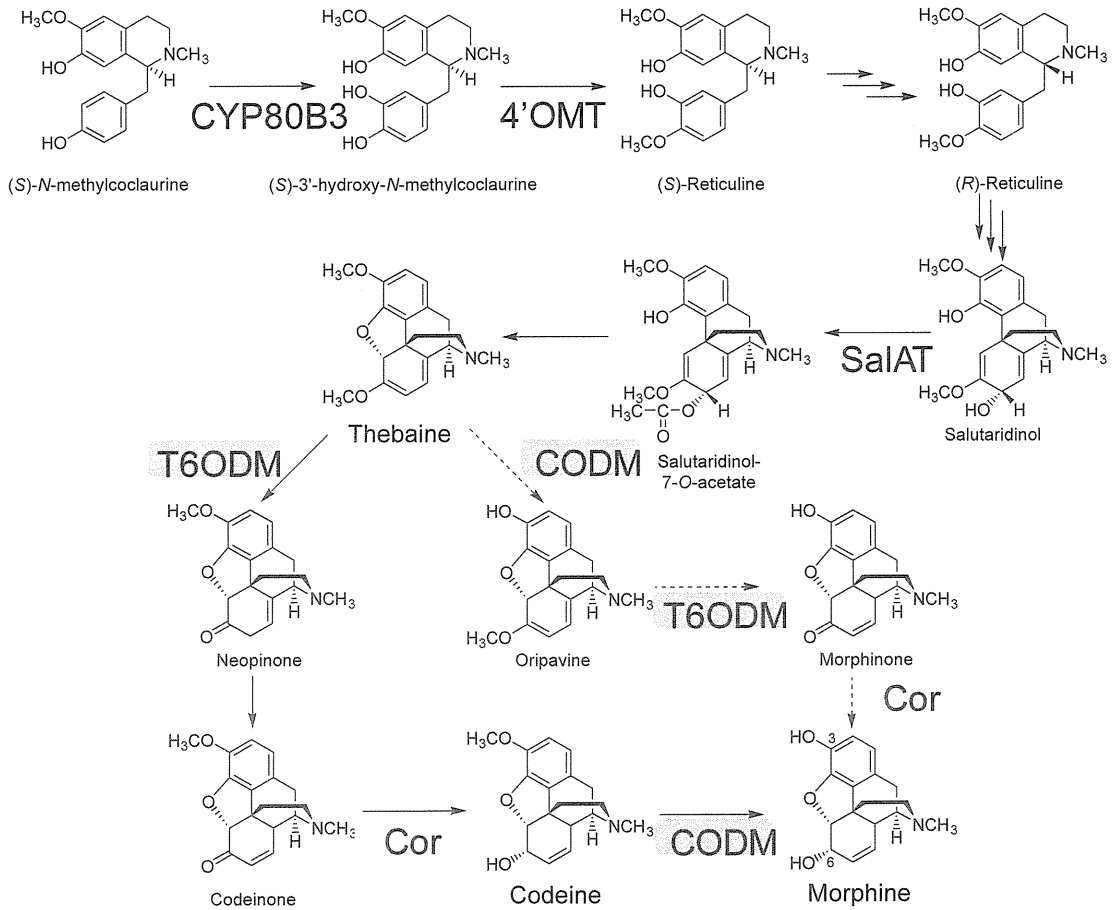


図1. ケンにおけるモルヒネの生合成経路 (*S*)-*N*-methylcoclaurine以降を示す (オリパピンを経る経路は国産の一貫種系統には存在しないと考えられる.)

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triming

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

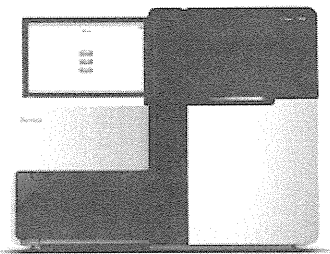
(同一植物種・複数系統の場合はリードを混合してcontig作製)

Unmapped 解析から除外

Contig群

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2. 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. 本研究で設計し使用したオニゲシDIOX相同遺伝子特異的プライマー

Contig ID	Primer ID	Primer sequence (5' to 3')	Orientation
#1495	110S	gga gaa tca cat ttt gca agc	sense
	416A	cac acc gtg att gat aac atg	antisense
#1603	818S	agt aga tgg att aga gat tcg	sense
	1051A	tct ggt gtg atc atg ctg acc	antisense
#17742	394S	atc ttt caa tgg atg aga agc	sense
	696A	caa aca act ctg aca atg cac	antisense
	616S	tag cct tgg ctc tta ttg gtt	sense
	875A	ggg tag agg ttt aat ggg aag	antisense
	939S	atg gag cac aga gta aca gtg	sense
#25434	1253A	cag gaa gtt tga tat ggt gac	antisense
	8S	gtt aat tca aag aag gat agg	sense
	318A	gag ctt tgt aca aca aat cag	antisense

表2. オニゲシ及びケシのESTライブラリー及びトランスクリプトーム解析の情報

	オニゲシ POL2 1-1HO	ケシ PsIK
File Name	Papaver25	Papaver27
Reads	33,689,676	32,303,819
Contig measurements		
N50 (bp)	1,039	1,002
Average (bp)	912	857
Contigs	43,638	57,272

Mapping statistics

Total Fragment counting

	POL2 1-1HO	PsIK
Counted fragments	19,721,929	15,124,943
- uniquely	19,671,166	14,984,197
- non-specifically	50,763	140,746
Uncounted fragments	13,967,747	17,178,876
Total fragments	33,689,676	32,303,819

表3. オニゲシESTライブラリーより抽出されたDIOX相同遺伝子

Contig ID	Length (bp)	BlastX result (best hit)	Score	e-value
Papaver25_contig00001347	1174	ref XP_006492604.1 PREDICTED: probable 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenase-like [Citrus sinensis]	319	1.00E-84
Papaver25_contig00001495	453	ref XP_007042329.1 2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein [Theobroma cacao] gi 508706264 gb EOX98160.1 2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein [Theobroma cacao]	83.6	3.00E-14
Papaver25_contig00001602	833	gb AGL52587.1 2-oxoglutarate/Fe2+-dependent dioxygenase [Papaver somniferum]	441	e-121
Papaver25_contig00001603	731	gb AGL52587.1 2-oxoglutarate/Fe2+-dependent dioxygenase [Papaver somniferum]	356	5.00E-96
Papaver25_contig00004386	1145	sp D4N502.1 DIOX3_PAPSO RecName: Full=Codeine O-demethylase gi 291264192 gb ADD85331.1 codeine O-demethylase [Papaver somniferum]	481	e-133
Papaver25_contig00008207	462	gb AGL52587.1 2-oxoglutarate/Fe2+-dependent dioxygenase [Papaver somniferum]	106	3.00E-21
Papaver25_contig00013240	734	ref XP_002323963.2 hypothetical protein POPTR_0017s07630g [Populus trichocarpa] gi 550319717 gb EEF04096.2 hypothetical protein POPTR_0017s07630g [Populus trichocarpa]	249	5.00E-64
Papaver25_contig00016123	555	gb AGL52587.1 2-oxoglutarate/Fe2+-dependent dioxygenase [Papaver somniferum]	270	1.00E-70
Papaver25_contig00017425	879	sp D4N502.1 DIOX3_PAPSO RecName: Full=Codeine O-demethylase gi 291264192 gb ADD85331.1 codeine O-demethylase [Papaver somniferum]	70.5	8.00E-10
Papaver25_contig00017742	1070	gb AGL52587.1 2-oxoglutarate/Fe2+-dependent dioxygenase [Papaver somniferum]	380	e-103
Papaver25_contig00025434	505	gb EXB63677.1 Naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase [Morus notabilis]	109	3.00E-22
Papaver25_contig00027600	850	ref XP_007013606.1 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein [Theobroma cacao] gi 508783969 gb EOY31225.1 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein [Theobroma cacao]	232	2.00E-58
Papaver25_contig00028330	465	gb AGL52586.1 2-oxoglutarate/Fe2+-dependent dioxygenase [Papaver somniferum]	134	1.00E-29
Papaver25_contig00029926	910	ref XP_007013606.1 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein [Theobroma cacao] gi 508783969 gb EOY31225.1 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein [Theobroma cacao]	238	2.00E-60
Papaver25_contig00033147	424	ref XP_002304108.2 hypothetical protein POPTR_0003s02450g [Populus trichocarpa] gi 550342226 gb EEE79087.2 hypothetical protein POPTR_0003s02450g [Populus trichocarpa]	68.9	7.00E-10
Papaver25_contig00035926	1056	ref XP_007204370.1 hypothetical protein PRUPE_ppa007337mg [Prunus persica] gi 462399901 gb EMJ05569.1 hypothetical protein PRUPE_ppa007337mg [Prunus persica]	456	e-126

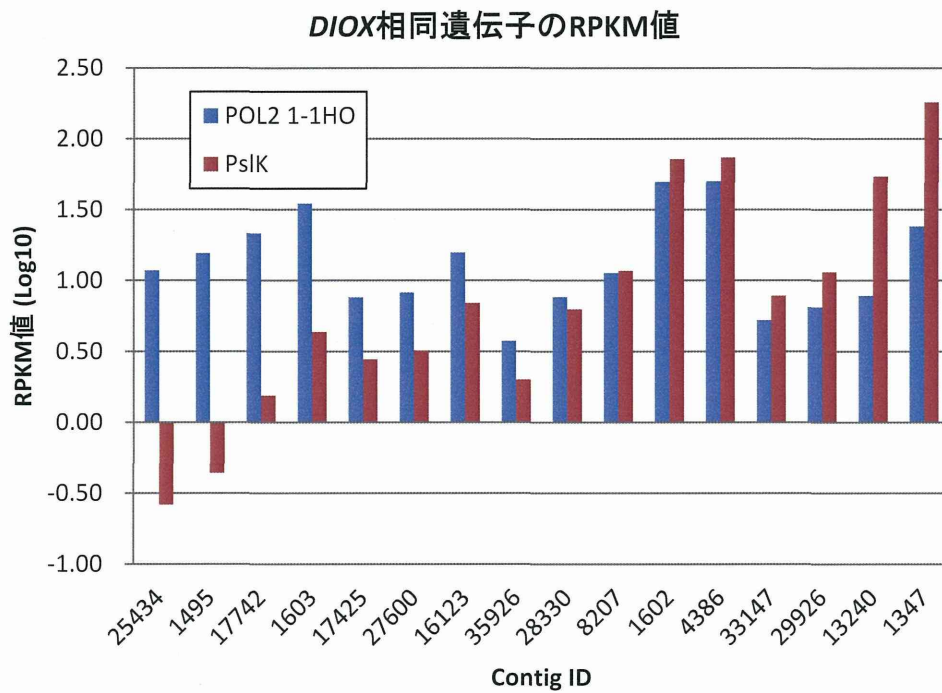


図3. オニゲシDIOX相同遺伝子のケシとのRPKM値の比較

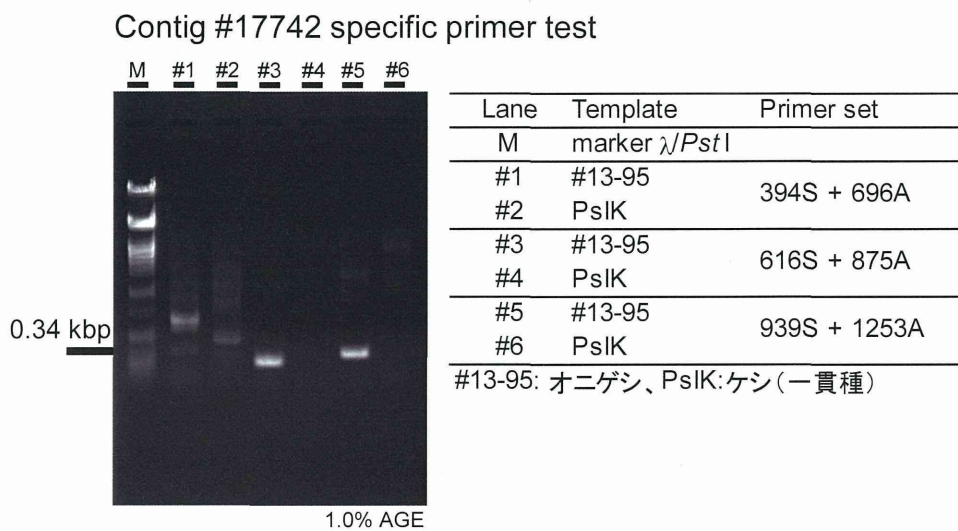


図4. オニゲシDIOX相同contig #17742について設計したプライマーセット3種の増幅効率及び交叉反応性試験

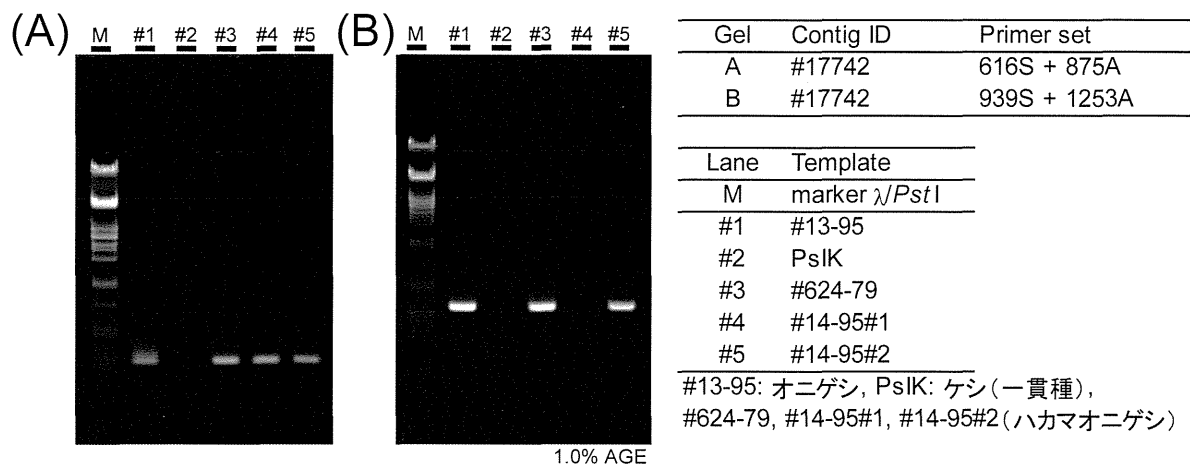


図5. オニゲシDIOX相同contig #17742について設計したプライマーセット2種の交叉反応性試験

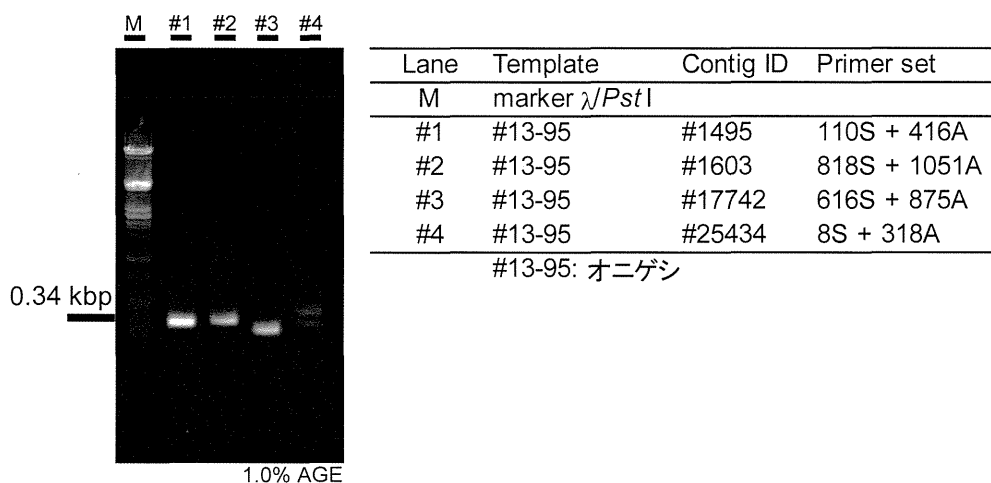


図6. オニゲシDIOX相同contig 4種より設計したプライマーの反応性試験

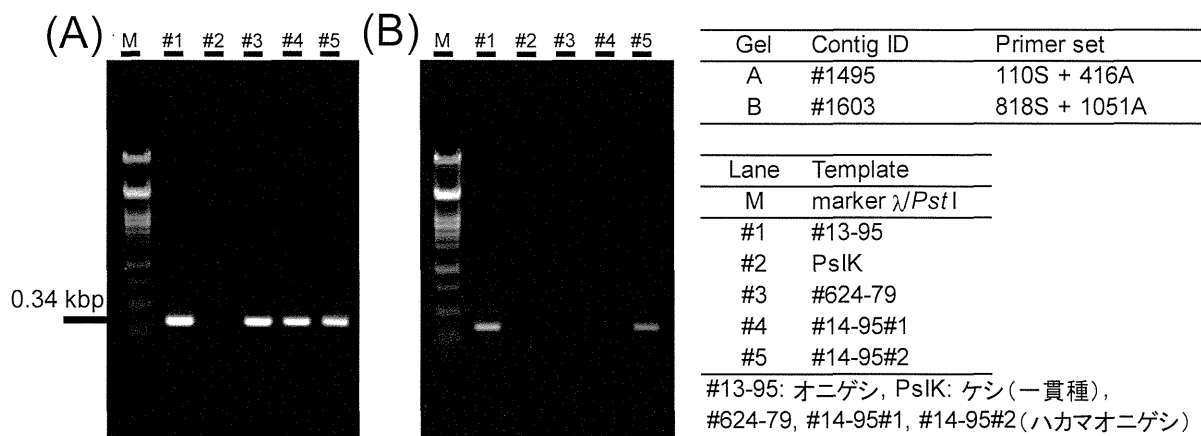


図7. オニゲシDIOX相同contig #1495, #1603について設計したプライマーセットの交叉反応性試験

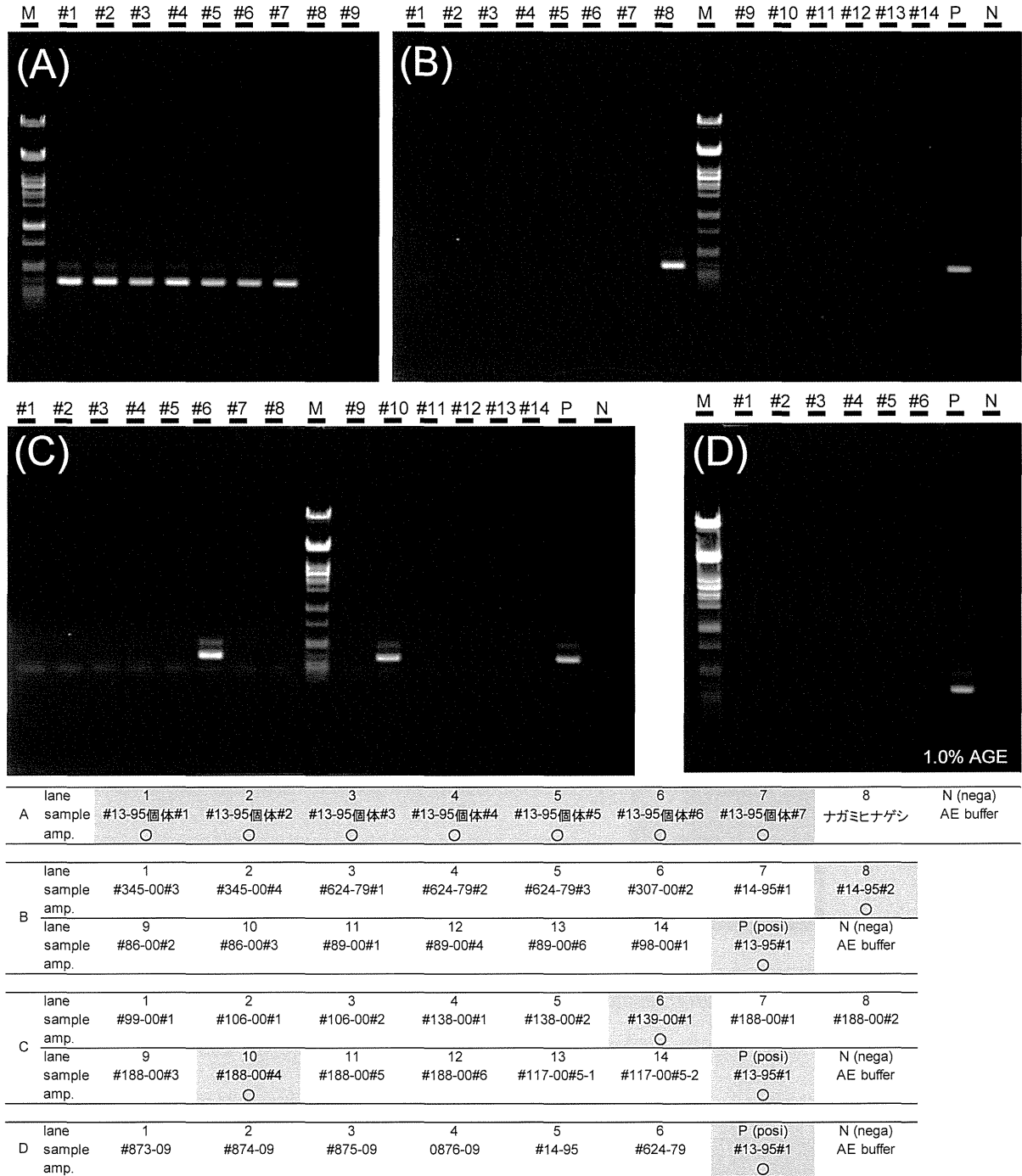


図8. オニゲシDIOX相同contig #1603について設計したプライマーの
ケシ属植物との交叉反応性試験結果

B, C, Dで供試した導入番号#13-95以外の試料はいずれもハカマオニゲシとして導入・維持されているものである。M: λ /PstI marker.

研究成果の刊行に関する一覧表

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻, 号	ページ	年
1	内山奈穂子, 花尻(木倉)瑠理, 袴塚高志	薬物簡易スクリーニングキットを用いた危険ドラッグ成分である合成カンナビノイドの識別法の検討	薬学雑誌	135(3)	535-541	2015
2	津村ゆかり	危険ドラッグの分析	ぶんせき	in press		

