

分担研究課題:法規制植物の基原種の分子生物学的同定法に関する研究

研究分担者:緒方 潤 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

—大麻テルペン合成酵素遺伝子配列情報を用いた識別法の検討—

研究要旨: 大麻の花の独特の香りを担う化合物としてさまざまなモノテルペン, セスキテルペンが存在する。これら合成酵素であるテルペン合成酵素の DNA 配列情報が近年報告されている。そこでこれら合成酵素遺伝子がカンナビノイド合成酵素による DNA 型判別法と同様に利用可能かどうか検討する。今回は, 大麻8種を用い, テルペン合成酵素遺伝子の取得を行った。既報のプライマーセットを用い2種のテルペン合成酵素遺伝子断片を取得した。それぞれの合成酵素はイントロン領域に多くの変異が見られ, 大きく2つの型に分けられた。

A. 研究目的

大麻樹脂には, さまざまなモノテルペンとセスキテルペンが含まれており, 大麻の花の香りの多くを担い, 大麻製品に独特の香りを与える。セスキテルペンである β -カリオフィレンは哺乳類のカンナビノイド受容体と相互作用し [1], テルペンは, 抗不安作用, 抗菌作用, 抗炎症作用, および鎮静作用に寄与する可能性が示唆されている [2]。植物におけるテルペン生合成には, 2つの生合成経路, メチルエリスリトールリン酸経路およびメバロン酸経路が関与する。これらの経路は, 最終的にテルペン合成酵素 (TPS) に様々な基質を提供する。植物 TPS 遺伝子ファミリーは 6 種のサブファミリーに分類され, 多くの TPS は, 同じ基質から複数の産物を合成する。大麻樹脂のテルペン組成は, 遺伝的, 環境的および発達段階で大幅に異なる [3,4]。大麻テルペンの化学的多様性は, 大麻 TPS 酵素の多様性を反映している。 β -カリオフィレンおよび α -フムレンは, ほとんどの大麻栽培種に存在する。その他に, モノテルペンの α -ピネン, リモネン, リナロール, セスキテルペンのピサボロール, (*E*)- β -ファルネセンなどがある [5]。大麻

“Purple Kush”ゲノムおよびトランスクリプトームの最近の解析により, 30 を超える異なる TPS 遺伝子が特定され, “Finola”で花の毛状突起で高度に発現する 9 つの TPS の生化学的機能が特定された [5]。一方, 大麻に含まれるさまざまなテルペンの多くを担う TPS は, まだ明確にはない [6]。

本研究では, テルペン合成酵素遺伝子の配列情報を用いた大麻種 (品種, 栽培種) の判別法を検討するために遺伝子を取得し, 配列情報の調査を行う。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1. 分析試料

- ・メキシコ産系統種子 (1 粒) (M)
- ・繊維用栽培種トチギシロ種子 (1 粒) (T)
- ・大津産トチギシロ種子 (1 粒) (O)
- ・大麻品種 “Hindu kush” (HK), “MAZER” (MZ), “Ultra skunk” (US), “SHARMAN” (SN), “Orange Bud” (OB) (各1粒)

2. 実験方法

各果実 1 粒を用いた。MM 300 (Qiagen) により粉砕した。粉砕した各種子は Maxwell 16 Tissue DNA purification kit (Promega) 中の溶出液に溶解し、Maxwell 16 (Promega) を用い DNA を抽出・精製した。回収 DNA 溶液各 300 mL 中の 1 mL を PCR 反応に用いた。

実験に用いたプライマーセットは Booth ら[5]記載のものをを用いた(表1)。反応溶液として、酵素には 0.05 mL Ex Taq Hot start version (Takara), PCR 反応試薬には、5mL Ampdirect plus (Shimadzu), 各プライマー 10 pmol とし、全量 10 mL で PCR 反応を行った(95°C 3min; 98°C 10sec, 57°C 30sec, 72°C 120sec, 35cycles ; 72°C 10min)。アガロースゲル(0.8%)電気泳動によりすべてのサンプルでバンドを確認されたもののみ、ダイレクトシーケンスを行った。ダイレクトシーケンスにより良好な結果が得られない場合は、PCR 反応溶液をポリエチレングリコール沈殿後、Mighty TA-cloning Kit(Takara) を用い、塩基配列を決定した。シーケンス反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems) を用い、解析は Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer を使用した。

C. 研究結果

各分析試料(8種)から抽出した DNA を用い、表1に示すプライマーセットを用い PCR を行った(図1)。すべての分析試料でバンド(PCR 産物)が同サイズで確認できたもののみ塩基配列を調べ、それらの類似性を検索した。プライマーセット CsTPS7FN および CsTPS9FN で、すべての試料から産物が得られた。

CsTPS7FN で得られた PCR産物のアライメント(60~407bp)を図2に示す。イントロン領域に大きな変異がみられ(図2)、2種のタイプの類似配列がメキシコ産系統以外から得れ(A タイプ, B タイプ)。大きくは 2 タイプに分けられ本遺伝子のヘテロ接合度は高い結果であった(図3)。

CsTPS9FN で得られた PCR 産物のアライメント

(78~520bp)を図 4 に示す。イントロン領域に大きな変異がみられ(図4)、2種のタイプの類似配列が4種から得られた(図4, 5)。

D. 考察

本研究では大麻のテルペン合成酵素遺伝子の多様性に着目し、その配列の違いによる大麻種の判別法の検討を行った。既報[5]のプライマーセット8種(表1)を用い、PCR を行ったがすべての試料から産物が得られたのは2種(図3, 5)のみであった。カンナビノイド合成酵素に比べ、大麻のテルペン合成酵素の DNA 情報が少なく、縮重プライマーの作成ができなかった点がある。一方で、今回得られた配列は Finola で得られた9種のテルペン合成酵素が基になっているが、テルペン合成酵素 Finola_TPS7 は Finola_TPS8 (類似度 92%)と類似しており、今回の結果においても Finola_TPS7 類似配列として示したが(図3, 4)、Finola_TPS8 とも類似している点は詳細に調査する必要がある。これらはカンナビノイド合成酵素(THCAS, CBDAS, CBCAS)と類似した点である。近年、大麻のゲノム解析、量的形質遺伝子座解析においてカンナビノイド合成とテルペン合成は同一の遺伝子座に位置していることが指摘されている[7]。大麻のカンナビノイドの多様性はこの染色体位置に依存した遺伝子重複によって起こっていることが指摘されており、同様のことがテルペン合成にも起こっていると示唆される。それはテルペン合成酵素のコピー数[5]とリンクしていると考えられる。コピー数の多さは、その遺伝子の配列情報を用いた遺伝子型判別法に不利である。近年、大麻のマリファナ/ヘンプ判別法として報告されている遺伝子型判別法では EU における認定ヘンプ種子の 35%がマリファナと判定されると報告されている[8]。一方で、カンナビノイド合成酵素とテルペン合成酵素の DNA 配列の大きな違いはイントロンの有無であり、イントロンを有するテルペン合成酵素はより多くの多様性を許容でき、大麻種だけでなく産地などにおける多様性をその DNA

情報に反映でき、判別法には有効とも考えられた。

E. 結論

大麻8試料(品種, 栽培種)から2種のテルペン合成酵素遺伝子断片を単離し, その配列比較を行った。各遺伝子はイントロン領域に大きく違いが見られ, それぞれ2つのタイプに分離された。

F. 参考文献

- 1) Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen JZ, Xie XQ, Altmann KH, Karsak M, Zimmer A, *PNAS*, **105**, 9099-104 (2008).
- 2) Russo EB, *British Journal of Pharmacology*, **163**, 1344-64 (2011).
- 3) Fishedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R, *Phytochemistry*, **71**, 2058-73 (2010).
- 4) Hazekamp A, Fishedick JT, *Drug Testing and Analysis*. 4, 660-7 (2012).
- 5) Booth JK, Page JE, Bohlmann J, *PLoS ONE* **12**, e0173911 (2017).
- 6) Booth JK, Bohlmann J, *Plant Science*, **284**, 67-72 (2019).
- 7) Woods P, Campbell BJ, Nicodemus TJ, Cahoon EB, Mullen JL, McKay JK, *Genetics*,

219, iyab099 (2021).

- 8) Borroto FE, Peterseil V, Hackl G, Menges S, de Meijer E, Staginnus C, *J Forensic Sci*, **65**, 715-21 (2020).

G. 健康危険情報
特になし。

H. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
なし

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
なし

表 1. 本研究に用いたプライマーセット[5]

Gene ID	F primer	Tm	R primer	Tm2
CsTPS2FN	ATGCATTGCATGGCT	44	TTATAAAGGAATAGGGTTAATAAT	53
CsTPS3FN	TGTAGTTTGCCAAAAGCC	62	TTATTAGGAATATTAATTGGAGTAAT	55
CsTPS4FN	GGTGTATTTTTAGACCAAAATT	56	TTATGTATATAGGGGAATAGGTTC	55
CsTPS5FN	ATGTCACTATCAGGACTAATCTCCACT	63	TCAAATGGGAATGGAAGTGAAGA	66
CsTPS6FN	ATGTCCACTCAAATCTTAGC	55	TTATGGAATTGGATCAATGA	57
CsTPS7FN	ATGTCTAGTCAAGTGTTAGCTTC	55	CTATAATGGGATGGGATCTA	55
CsTPS8FN	TCATCTCAATTAAGTGACAAAA	56	TTAATATGGGATTGGATCTATAAG	56
CsTPS9FN	ATGTCATATCAAGTTTTAGCCTCAT	60	TCATGGGATTTGATCTATAAGTAAC	58

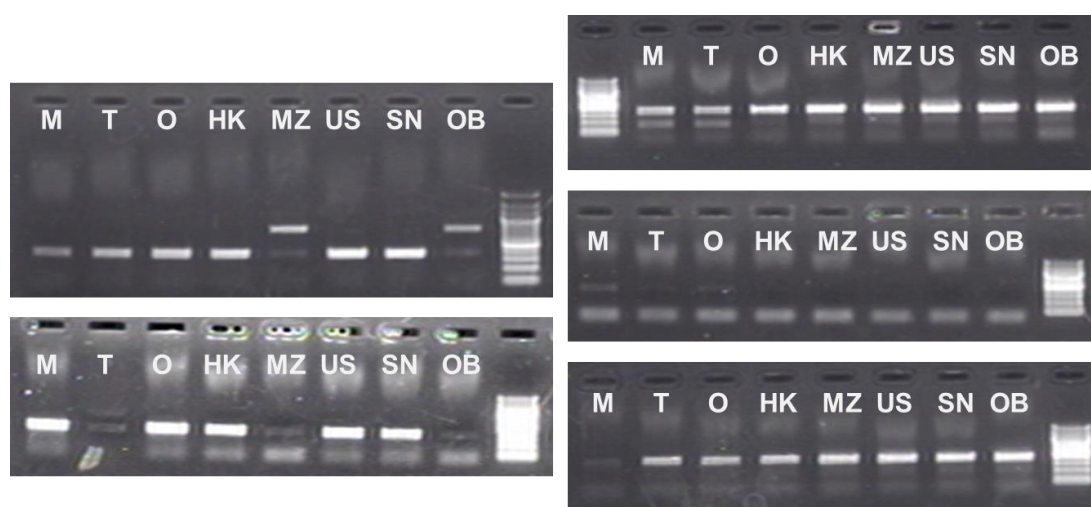


図1. 表1に示すプライマーセットを用いた PCR の電気泳動

M;メキシコ産系統, T;トチギシロ, O;大津産トチギシロ, HK;Hindu kush, MZ;MAZER, US;Ultra skunk, SN;SHAMAN, OB;Orange bud

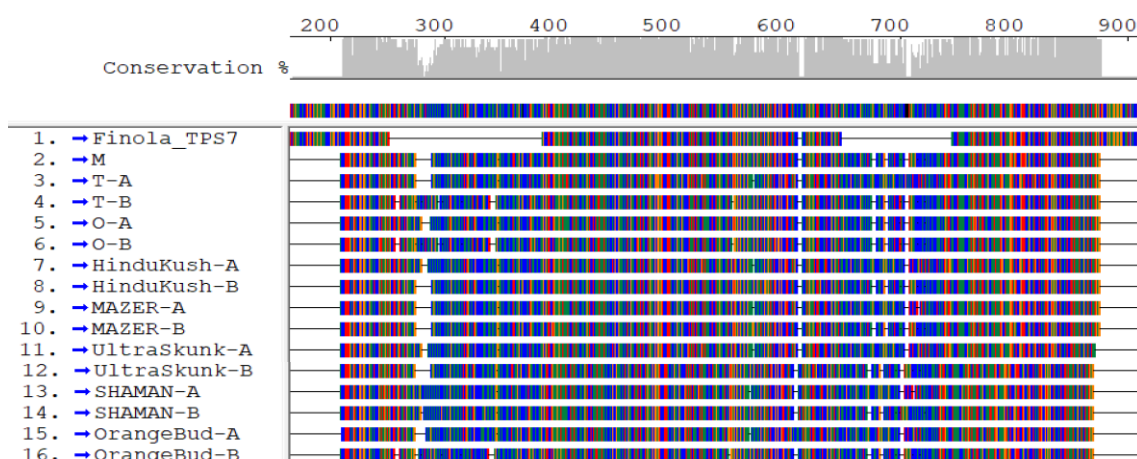


図2. 各試料から得られた Finola TPS7 mRNA との配列アライメント

Finola_TPS7: フィノーラテルペン合成酵素7遺伝子の mRNA, M;メキシコ産系統, T;トチギシロ, O;大津産トチギシロ.
 -A,-Bは各々の試料から得られた2タイプを示す.

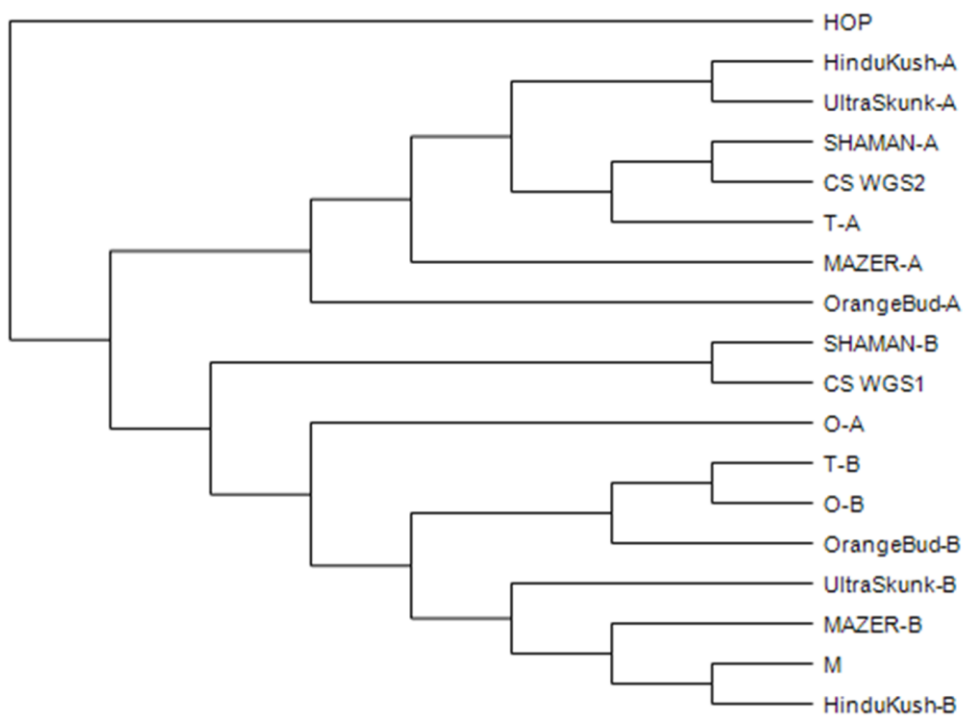


図3. 各試料から得られた Finola TPS7 類似配列の系統解析

HOP;ホップから得られた類似配列(outgroup), CS WGS; 大麻の whole genome shotgun シークエンスによる類似配列

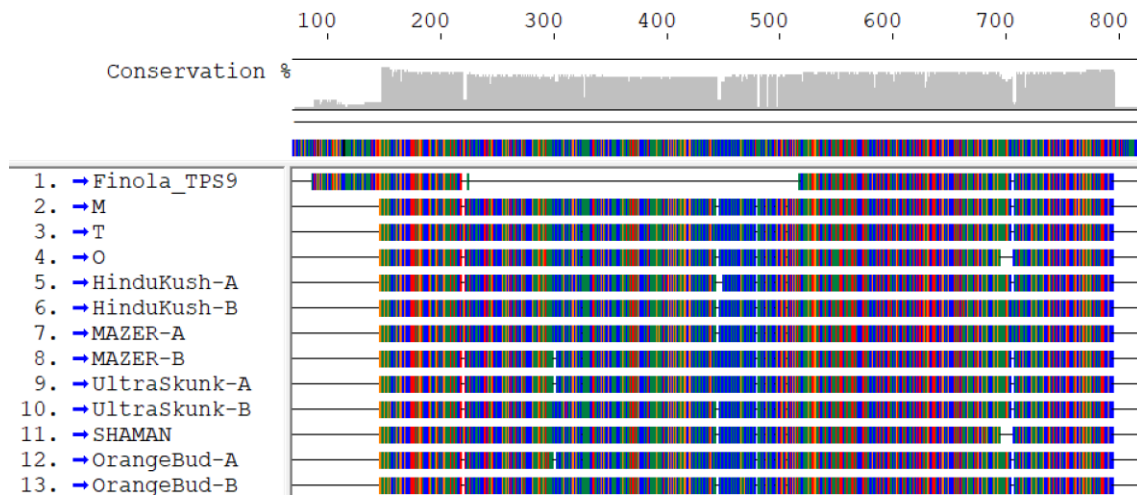


図 4. 各試料から得られた Finola TPS9 mRNA との配列アライメント

Finola_TPS7: フィノーラテルペン合成酵素9遺伝子の mRNA, M;メキシコ産系統, T;トチギシロ, O;大津産トチギシロ.

-A,-Bは各々の試料から得られた2タイプを示す.

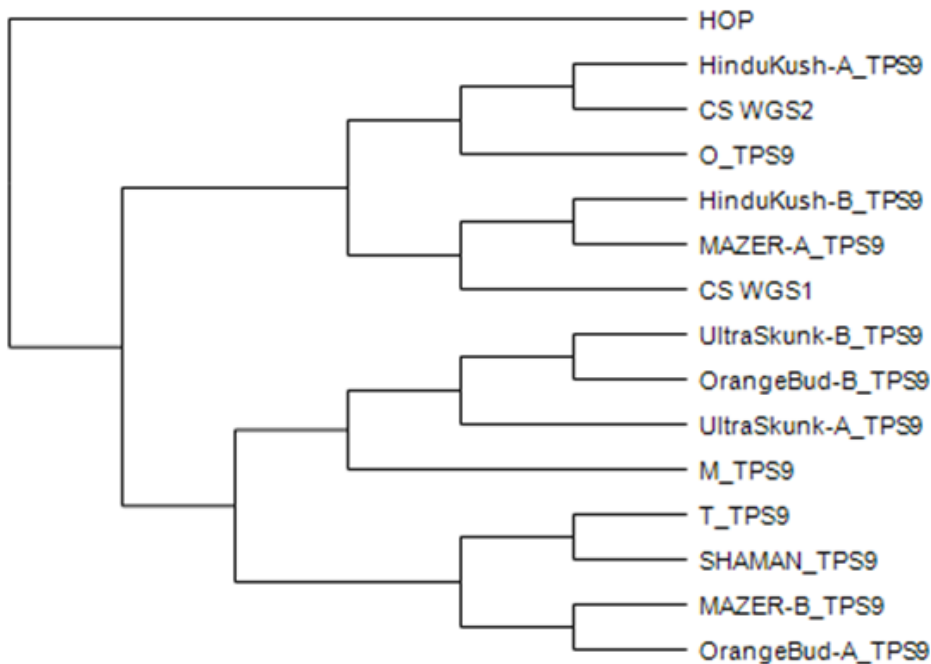


図 5. 各試料から得られた Finola TPS9類似配列の系統解析

HOP;ホップ(outgroup), CS WGS; 大麻の whole genome shotgun シークエンスによるゲノム情報