



Development of a Novel System for Producing Ajmalicine and Serpentine Using Direct Culture of Leaves in *Catharanthus roseus* Intact Plant

ニチニチソウ植物体の葉を直接培養するアジマリシン
およびセルペンチンの新規生産システムの開発

(J. Biosci. Bioeng., Vol.99, No.3, 208-215, 2005)

岩瀬 哲・青柳 秀紀・高木 優・田中 秀夫*

1960年代より植物培養細胞(カルス)を用い、医薬品や色素など様々な有用代謝産物の生産が世界中で試みられてきたが、実用化に至った例は数例しかない。この最大の原因は、分化した組織細胞から脱分化した培養細胞を誘導する際に、それまで有していた有用代謝産物(主に二次代謝産物)の生産能が消失してしまう点にある。また、細胞の選抜を繰り返すことにより、高生産株の樹立を行ったとしても、有用代謝産物生産能が不安定なため、継代培養を繰り返すうちに生産能が失われてしまうことが多い。カルスの二次代謝産物の生産能の不安定さは、“分化”と“脱分化”が深く関わっている(脱分化状態にあるカルスで、分化細胞の所産である二次代謝産物を生産させることに矛盾がある)。生産能の不安定さを生じさせる主要因としては、植物ホルモンや培養環境による遺伝子のメチル化や染色体変異などが指摘され、盛んに研究が行われているが、その詳細は解明されていない。この問題を解決するためには、細胞の“脱分化”に関わる遺伝子発現、タンパク質や代謝産物の挙動を解析し、その結果を活用することで、安定した二次代謝能を有する細胞を作製し、二次代謝産物の生産に用いることが重要である。

我々はこのような歴史的な背景を踏まえ、“分化”と“脱分化”に着目し、分子生物学的アプローチ(たとえば、カルスと植物体の組織細胞では遺伝子の発現はどのように違うのかをDNA microarrayで網羅的に解析し¹⁾、得られた知見を生かし、分子生物学的手法により安定した二次代謝能を有する細胞の作製を目指す)と細胞培養工学的アプローチを用いて植物細胞を用いた新規な有用物質生産法の開発に取り組んでいる。

近年、高等植物の二次代謝産物の生産は、器官を構成する個々の組織細胞の適切な役割分担により行われていることが明らかになっている²⁾。著者らは、「植物組織は、分化し安定した二次代謝能を有する細胞が高密度に固定化された状態である」と捉え、もしも適切な培養環境を設定することができれば、植物組織が有する二次代謝能を活性化させ、高度に二次代謝産物を生産することができるのではないかと考え、植物体の組織細胞を直接培養する新規な有用物質生産法を提案した。薬用植物のモデルとして研究が古くから行われ、多くの知見が蓄積されているニチニチ草(*Catharanthus roseus*)を用いて研究を開始した。実験に用いる組織(器官)として、同

一の個体から繰り返し再生され、取り扱いが容易な葉を選択し、有用二次代謝産物である terpenoid indole alkaloids (TIAs) の生産を試みた。糖を含むホルモンフリーのMS液体培地を用いて、暗条件下でニチニチ草の植物体から摘出した葉を振盪培養した結果、糖の消費と葉の組織の乾燥重量の増加がみられたが、TIAsの生産は認められなかった。種々検討した結果、培地の浸透圧をニチニチ草の葉の組織細胞が有する浸透圧(993 kPa at 25°C)と等しく調整し、明条件下($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)で振盪培養することにより、TIAsの一種である ajmalicine (Aj) と serpentine (Se) が生産され、細胞内に蓄積した。Ajは培養0日目の葉(control)では検出されない成分であった。Aj濃度は、葉の組織細胞の乾燥重量の増加が停止する培養7日目にピークを示した後に減少した。一方、Seは培養液中の glucose が完全に消費され尽くす培養12日目にピークを示した後、減少した。そこで、培養10日目に glucose (10 g/l) を添加したところ Aj と Se の生産がさらに増大し、培養18日間で、Ajが約1.6 (mg/g-dry cell weight)、Seがcontrolに比べて約11倍多く生産された。RT-PCRで解析した結果、今回設定した培養条件により、TIAsの合成経路の代謝が遺伝子の発現レベルから促進されていることが明らかとなった。以上の結果は、植物の組織細胞がカルス化を経なくても液体振盪培養条件下で生存し、一次代謝および二次代謝を維持するだけでなく、潜在的な二次代謝能を高度に発揮することを示しており、本報で開発した組織を直接用いた有用物質生産法の大きな可能性を示すものである。本システムでさらにTIAsの生産を増大させるためには、照射光の強度や波長の最適化、TIAsの生産を促進させるエリシターの利用、目的生産物の前駆体の添加、など³⁾が有効であると考えられ、現在検討中である。今後はメタボロミクス解析⁴⁾を適用することで、本培養系における葉の組織細胞の機能特性を明確にし、その特性を最大限に活用した、新規有用物質の高速度生産システムや新規有用物質の探索システムの開発に結びつけたい。

- 1) Iwase, A. et al.: *Biotech. Lett.*, **27**, 1097 (2005).
- 2) Murata, J. and De Luca, V.: *Plant J.*, **44**, 581 (2005).
- 3) Van der Heijden, R. et al.: *Curr. Med. Chem.*, **11**, 607 (2004).
- 4) Fukusaki, E. and Kobayashi, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 347 (2005).