

総合論文

平成18年度 生物工学賞 受賞



## 植物の生物工学的利用のための 基盤技術開発とその応用

新名 惇彦



### Basic Study on Plant Science and Biotechnological Application of Plant Function

Atsuhiko Shinmyo (*Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0101*) *Seibutsu-kogaku* **85**: 2-11, 2007.

#### 1. 発酵工学から植物細胞工学へ

筆者は大阪大学工学部醗酵工学科に入学し、大学院に進学し、照井堯造先生のご指導を受け、「クロカビの酸性プロテアーゼ生産の生理学および動力学的研究」で博士学位を取得した。同大学助手に任官後は、大腸菌、枯草菌、糸状菌の加水分解酵素生産の生理学的研究を行い、MIT では高温嫌気性菌のセルラーゼ生産にも取り組んだ。1978年から、*Bacillus pumilus* のキシラナーゼ遺伝子のクローニング、セルラーゼ生産糸状菌の細胞融合など、微生物の分子生物学、細胞工学などにも取り組んだ。

1970年代後半、三井石油化学がムラサキ（ムラサキ科植物、学名 *Lithospermum erythrorhizon*）の根に含まれる赤紫色色素、シコニンの細胞培養による実用生産に踏み出した。鐘紡はこの色素を口紅に入れ、バイオリップスティックとして若い女性に大いに歓迎された。日東電工は同じ頃、オタネニンジン（ウコギ科の多年草植物、学名 *Panax ginseng* 通称：朝鮮人参）の根の組織培養に成功し、20トンタンクで生産を始めた。含まれる薬用主成分、ジンセノライド量は天然の朝鮮人参と同等かそれ以上であった。植物組織培養による物質生産が現実になり、私が所属していた大阪大学醗酵工学科でも、対象生物を微生物から植物細胞にも拡張すべきだろうとの風潮が生まれた。動物細胞の培養も活発になりつつあった。

1970年代初めにカリフォルニアで成功した遺伝子組

換え技術は植物にも波及した。そのきっかけは、ほぼ同じ時期に、植物に腫瘍を生じる土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* が保持するTiプラスミドが腫瘍形成因子であることの発見であった。1980年代には、Tiプラスミドを用いた植物への遺伝子導入が可能になった。これは植物を画期的に改変できることを意味していた。また、動物細胞のcDNAクローニングが活発になりだした。これらを契機に、発酵工学、生物工学と植物科学との接点を模索しつつ、植物を研究対象に選んだ。分子生物学が活発になり始めた頃で、何となく将来は微生物より複雑な高等生物の研究が面白くなるのでは、との思いもあったが、同じ高等生物でも研究人口の多い動物よりは、植物のほうがやり易いのではとの打算もあった。ただ、やみくもに挑戦するのではなく、工学的視野をベースに置くことに留意し、当時、遺伝子工学、タンパク質工学、進化学などなど、さまざまな“工学”がブームのように台頭しつつあり、それにならって「植物細胞工学」を体系づけることも目標とした。

#### 2. 植物組織培養による有用物質生産

植物の組織培養による有用物質生産は世界中で試みられていたが、実用化に至ったのは先述の2件のみであった。当時から植物組織培養の第一人者であった、京都大学農学部山田康之教授（後の奈良先端科学技術大学院大学学長）に指導を請い1983年頃から、いろいろな植物

著者紹介 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科（教授） E-mail: shinmyou@bs.naist.jp

の組織培養を始めたが、愕然としたのは、あまりにも植物細胞の成長が遅いことであった。微生物なら2、3日、カビでも長くて1週間で実験が終わるところが、最低1ヶ月かかることであった。日東電工のオタネニンジンの20トンタンクでの培養は、今でも前々培養から始めて半年はかかる。そして、有用物質生産細胞の取得は数十万、数百万ある細胞集塊（カルス）を小分けしていき、高生産細胞を選び出す手順（選抜）を踏む。そこには突然変異処理はほとんど採用されない。なぜなら、微生物と異なり、遺伝子ファミリーが多い高等植物では、1遺伝子を破壊しても類似の遺伝子が多いため表現型が出ないからである。これは、微生物で例えれば、自然界から分離した比較的生産性の高い細胞に突然変異処理をしないで、いきなり培地・培養条件を最適化して実用生産に移すことと同じである。微生物培養では通常、何度も突然変異処理を重ねて、生産性を10倍、100倍、1000倍と上げることにより実用化が可能になるのである。これに気がつき、しばらくは植物細胞培養による物質生産をあきらめていた。

### 3. 植物の有用酵素の微生物生産への取り組み

一方、高等動物のcDNAを単離し、大腸菌や酵母で発現させる研究が活発になってきた。そこで、植物由来の付加価値の高い酵素のcDNAを取得し、微生物で大量生産させることにした。候補の一つは、西洋ワサビ (*Armoracia rusticana*) の根から抽出精製され、酵素免疫法、ELISAに汎用されるペルキシダーゼであった。当時、わが国では長野県で栽培されていた西洋ワサビが使われていた。西洋ワサビの根は、すりおろしてステーキに付けたり、市販の練りワサビに加えるなど、食品としても馴染みがある。もう一つの候補は、血中コレステロールなどの測定を妨害する血液中のアスコルビン酸（ビタミンC）を酸化するために使われるアスコルビン酸オキシダーゼであった。これは、キュウリ (*Cucumis sativus*) やカボチャなど、ウリ科植物の果皮に多く含まれ、わが国ではキュウリ果実から抽出精製され市販されている。しかし、栽培地、時期により酵素活性が大きく異なることが課題となっていた。そこで、この2つの酵素のcDNAをそれぞれ西洋ワサビとキュウリから単離することから始めた。

東洋紡と山田康之教授はペルキシダーゼを高生産する西洋ワサビの培養細胞を取得していた。この細胞を譲与していただき、mRNAの供給源とした。西洋ワサビのペルキシダーゼは少なくとも42種類のアイソフォームがあり、精製は大変困難であったが、デンマークのWelinderは長年かけて、そのうちの一つ、アイソザイム

Cを精製し、1979年に全アミノ酸配列を報告していた<sup>1)</sup>。これをもとにDNAプローブを作製し、大腸菌のcDNAライブラリーのスクリーニングを行った。これには、阪大の後輩で、当時、宝酒造で動物のcDNA単離に精通していた小谷博一博士の助言が大きかった。3種類のペルオキシダーゼのcDNAが得られ、次いでゲノム配列も明らかにし、1988年に報告した<sup>2)</sup>。そのうちの一つ、*prxC1a*と名づけた遺伝子がコードする酵素のアミノ酸配列は、Welinderが報告したアイソザイムCのアミノ酸配列と見事に一致し、後日、彼女から感謝された。

キュウリのアスコルビン酸オキシダーゼはホモダイマー酵素で、サブユニットあたり銅原子を4個含む。そのため硫酸銅と同じ青色を示すので、精製カラム内を青色のバンドが移動するので精製はしやすい。精製酵素のアミノ酸の部分配列を決定し、プローブを作製した。農家から入手した新鮮なキュウリの果実からmRNAを抽出し、先と同様にcDNAクローンを得た。これはアスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子の世界初のクローニングであり1989年に発表した<sup>3)</sup>。

目的の遺伝子を得たものの、当初の目標の微生物での酵素生産は封入体を形成するなど、遅々として進まなかった。しかし並行して、この2遺伝子が植物でどのような機能を果たしているかという植物生理学、分子生物学的研究を広く展開し、ようやく植物分野でも存在が認められるようになった。

### 4. ペルオキシダーゼ遺伝子の機能と発現解析

西洋ワサビのペルオキシダーゼ遺伝子を5種類 (*prxC1a*, *prxC1b*, *prxC1c*, *prxC2*, *prxC3*) 揃えた。また、西洋ワサビと同じアブラナ科に属し、ゲノム研究の対象としてクローズアップされたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から3種類、イネから1種類、ペルオキシダーゼ遺伝子を取得し、それぞれの機能と発現制御の解析を進めた。まず、5種類の西洋ワサビ・ペルオキシダーゼのcDNAをタバコ (*Nicotiana tabacum* L.cv.W38) に導入し、形質転換植物体の表現型から各遺伝子の機能を探ることを始めた。その中で*prxC1a*導入タバコは茎の成長が20~30%促進されることが分かった (図1a)<sup>4)</sup>。そこで日本製紙の河岡明義博士の協力で、このcDNAをパルプ原料のポプラに導入したところ、やはり同じ効果が見られた (図1b)。理由は、ペルオキシダーゼの基質の過酸化水素が消費されるので活性酸素ストレスに強くなる結果と思われる<sup>5)</sup>。すでに、日本製紙ではパルプ原料の約半分を占めるユーカリにこれを導入し、海外植林に利用する予定で生態・環境への影響を調べている。しかし、どのペルオキシダーゼも過酸化水素を基質とするので、



図1. 西洋ワサビのペルオキシダーゼ遺伝子, *prxC1a* 導入による生長促進. 左, 形質転換タバコ; 右, 形質転換ポプラ. 下は活性酸素を生じる過酸化水素またはメチルピオローゲンで処理後した葉のディスク. *prxC1a* 導入個体では黄化程度が野生型ポプラより少ない.

なぜ *prxC1a* だけが生長を促進するのか, 発現量, 局在性など, 調べることはまだまだ多い.

*prxC2* は西洋ワサビの葉に傷をつけると発現が誘導された. そこで *prxC2* のプロモーター領域で傷害応答に関わるシス配列を詳細に調べた. 手法は, プロモーター領域の DNA 断片を欠失, 塩基置換したものをレポーターの  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子に連結し, タバコに導入し, 葉に傷をつけた後の GUS 遺伝子の発現を調べる方法である. その結果, 傷害応答に必須の G ボックス配列 (CACGTG) と PAL ボックス配列 (CCACTTGAGTAC) を同定した<sup>6)</sup>. 次いで, このシス配列にそれぞれ結合する転写因子, TFHP1 と NtLim1 を, 主にサウスウエスタン法, ゲルシフトアッセイで同定した<sup>7)</sup>. これは植物の傷害応答機構を詳細に明らかにした最初であった. *prxC2* のプロモーターは外来遺伝子を傷害時に特異的に発現させる道具としても利用価値がある.

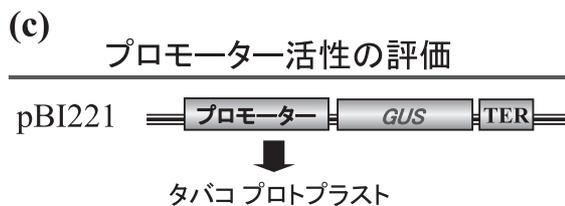
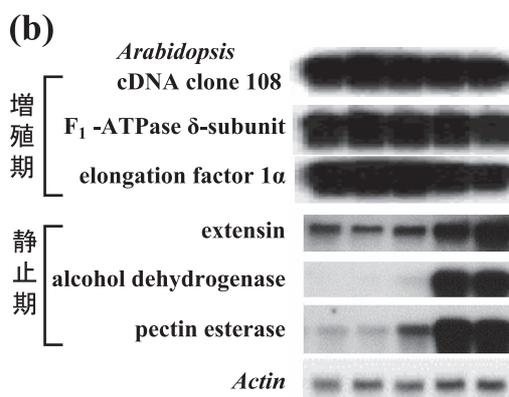
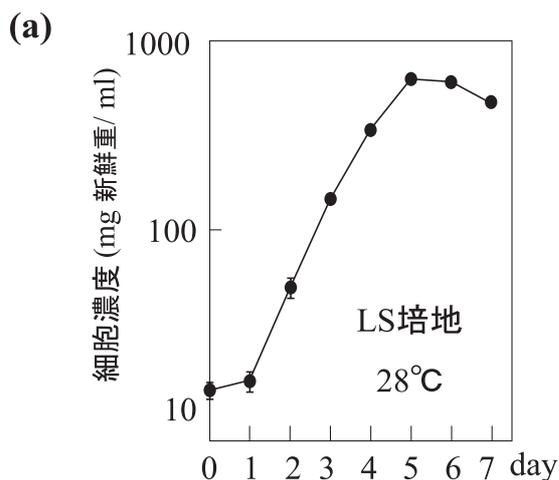
### 5. ペルオキシダーゼ, PrxC1a の N 末端, C 末端のプロペプチドの機能

PrxC1a は 308 アミノ酸残基から成ることを Welinder が精製酵素のアミノ酸配列から明らかにしていたが, cDNA の塩基配列では, コード領域は N 末端側に 30, C

末端側に 15 アミノ酸残基延びていた. 両プロペプチドはペルオキシダーゼの細胞内局在に機能すると考え, 対応する DNA 配列を緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の遺伝子の両端に付加し, タバコ培養細胞 (*N. tabacum* L. cv. Bright Yellow, 以下 BY2 と呼称)<sup>8)</sup> に導入した. 結論は, N 末端プロペプチドは細胞外分泌シグナル, C 末端プロペプチドは液相局在シグナルであった. 外来タンパク質を細胞外へ移行させるには N 末端プロペプチドだけを付ければよい. たとえば, 環境ホルモンやダイオキシンなどの有害化学物質を植物の根圏で分解させるために, 分解酵素を根の細胞外のアポプラスト (細胞間隙) に輸送する戦略に利用できる. 酵素を完全に細胞外に分泌させれば希釈されるので, アポプラストに蓄積させることは理にかなっている. 今後, ラッカーゼ, マンガンペルオキシダーゼなどを植物の根の表層に局在させ, 環境浄化, ファイトレメディエーションに利用すべく研究を行っている.

### 6. タバコ培養細胞の細胞工学

**6.1 高発現プロモーターの取得** 先に, 植物の細胞培養による有用物質生産は微生物に比べ増殖速度があまりにも遅いことと, 突然変異株取得が困難であるため実



プロモーター	相対GUS活性
pCaMV35S	1
pNt108	2
pNtATPD	0.9
pNtEF1A	1.9
pNtADH	140
pNtPES	10

図2. タバコ BY2 細胞から高発現プロモーターの単離。(a) BY2 細胞の増殖曲線。(b) 対数増殖期, 増殖停止期で高発現する遺伝子のノザン解析。(c) GUS をレポーターとするタバコ・プロトプラストにおけるプロモーター活性の一過性発現解析。

用化が困難であると述べた。1980年代半ばに、遺伝子組換え技術により大腸菌で生産させたヒト・インシュリン、ヒト・成長ホルモンが医薬品として発売された。すなわち、遺伝子組換え技術を使えば、かつては遺伝学の研究材料であった大腸菌が工業微生物に代わることを意味した。これは、植物培養細胞も遺伝子導入すれば、物質生産細胞に変えることが可能であることを示唆する。そこで、植物で最も増殖が速い細胞として、基礎生物学研究所の長田敏行博士（現、東京大学理学部教授）が開発したタバコ BY2 細胞を選んだ<sup>8)</sup>。BY2 細胞はサイズが 50 ~ 100  $\mu\text{m}$  の球形または楕円形で、増殖が衰えると糸状になることがある。無機塩と 3% ショ糖、植物成長ホルモンのオーキシン、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を添加した Linsmaire and Skoog (LS) 培地で、至適温度 28°C, 至適 pH 5.8 で液体振とう培養すると、世代時間は約 10 時間で、培養開始後 5 日間まで対数増殖し、7 日間で細胞濃度は 50 倍になり、700 mg 新鮮重/ml になる (図 2a)。BY2 細胞は世界中で使われ、同調培養も可能で、生理学的、分子生物学的知見が蓄積されていた。なお、BY2 細胞は植物体に再生する能力を失っているが、アグロバクテリウム法による遺伝子導入も可能で、約 2 ~ 3 週間で形質転換コロニーが得られるので、遺伝子

の機能解析には好都合な材料である。

BY2 細胞を宿主として、外来遺伝子導入により物質生産を行うには、まず遺伝子を高発現させるプロモーターが必要であると考え、対数増殖期に高発現している遺伝子を探した。mRNA から逆転写で得られる cDNA が高頻度に現れるものは mRNA が多く、つまりプロモーター活性が高い遺伝子であると考えられた。植物では多数の類似遺伝子がファミリーを形成していることが多く、一見 mRNA が多いといっても、多数の遺伝子の転写物の総計である場合も考えられた。そこで、得られたいくつかの候補 cDNA のゲノミックサザン解析により、遺伝子のコピー数が少ないものとして、F1-ATPase  $\delta$  サブユニット (ATPD), elongation factor 1 $\alpha$  (EF1A), および機能未知の No.108 遺伝子の 3 個を選んだ。

物質生産は培養液あたりの生産量が多くなければならず、高密度培養を行うのが普通であり、細胞濃度が高い培養後期の増殖停止期でプロモーター活性が高いものも必要である。そこで、対数増殖期と増殖停止期の BY2 細胞の mRNA のディフェレンシャルスクリーニングを行い、候補としてエクステンシン (EXT), アルコール脱水素酵素 (ADH), ペクチンエステラーゼ (PES) 遺伝子の 3 個を選んだ (図 2b)。

それぞれのcDNAに対応するゲノム遺伝子のプロモーターを含むと思われる5'上流、1~1.5 kbp DNA断片をクローニングし、GUSレポーター遺伝子に連結し、タバコBY2細胞のプロトプラストにエレクトロポレーション法で導入した。このプロトプラストを18時間培養し、GUS活性を測定し、プロモーターの強度を評価した。この条件では、導入したプロモーター/GUS遺伝子は核内で染色体には組み込まれておらず、一過性の遺伝子発現を見ることができる。後に詳しく述べるが、染色体に組み込まれると、組み込まれた場所により導入遺伝子の発現は大きく変動する(位置効果)ので、プロモーター活性の評価には適さない。エクステンシンのプロモーターは得られなかったが、他の5遺伝子のプロモーターは、強いプロモーターとして汎用されているカリフラワーモザイクウイルスの35S RNAのプロモーター(pCaMV35S)と同等かそれ以上のGUS活性を示した(図2c)。特に培養後期で高発現しているADHとPES遺伝子ではきわめてGUS活性が高く、応用のみならず、なぜそのような高い活性を持つかという基礎研究にも有用な材料となった。

さらに、プロモーター/GUS遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子とともに導入した形質転換タバコBY2細胞を取得し、液体培養でのGUS活性の経時変化を調べた。予想通り、対数増殖期で高発現する遺伝子のプロモーターではGUS活性はその時期に高く、ADHとPES遺伝子のプロモーターでは培養5日目から急激にGUS活性が上昇し、BY2細胞の内生の各遺伝子の発現のノザン解析の結果と一致した<sup>9)</sup>。

**6.2 タバコADHの翻訳エンハンサーの発見** ADHプロモーター/GUS遺伝子のBY2細胞での一過性発現では、きわめて高いGUS活性を示した。この構築ではGUS遺伝子の5'上流にADHの5'非翻訳領域(5'-UTR)と7アミノ酸残基のコード領域を含んでいた。そこで種々の領域に分けて、それぞれの転写、翻訳への影響を詳細に調べた。CaMV35SプロモーターとGUSとの間にADHの5'-UTR 82 bpをつけ(図3a)、タバコBY2細胞とシロイヌナズナの培養細胞T87のプロトプラストに導入し、一過性発現を調べたところ、GUS活性は、つけない場合の30倍に上昇した。mRNA量は82 bpの有無に関らず同じであったことから、この領域は翻訳を高めるエンハンサー機能があると結論した(図3b)。

次に、CaMV35Sp/ADH 5'-UTR/GUSをカナマイシン耐性遺伝子とともにタバコに導入し、形質転換体を取得した。それらの葉でのGUS mRNAあたりのGUS活性は5'-UTRがないときの20~40倍と、安定形質転換植物においても翻訳エンハンサー機能を持つことが解った(図3c)<sup>10)</sup>。これは外来遺伝子を植物で高発現させるツール

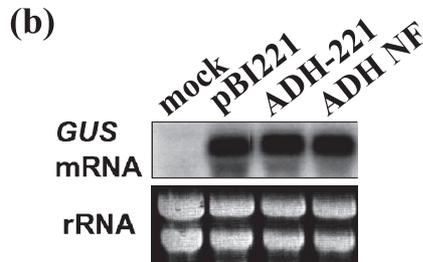
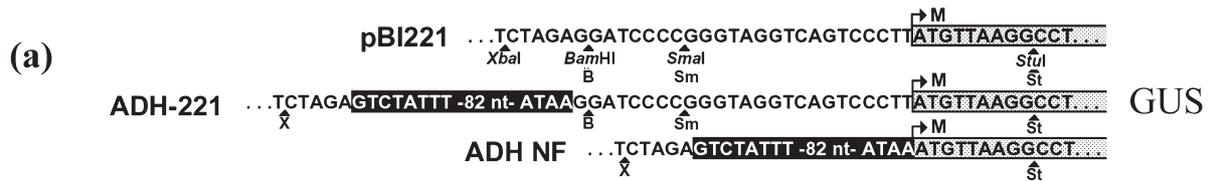
として貴重であり、多くの大学、企業の基礎、実用研究に活用されている。ADHの5'-UTRは一過性発現では、双子葉植物のタバコとシロイヌナズナでは高い翻訳上昇活性があったが、イネ・プロトプラストではほとんど効果はなかった。双子葉植物と単子葉植物ではこのような違いがよくあり、重要な作物であるイネ、ムギ、トウモロコシで効果がないのは弱点であった。そこで、イネからADH遺伝子を単離し、その5'-UTRの翻訳増大効果をイネとタバコで調べたところ、イネでは大きな増大効果があったが、タバコでは効果は小さかった(未発表)。なお、タバコとイネのADHの5'-UTRの配列には類似性はなかった。また、単子葉植物と双子葉植物では、5'-UTRに作用するトランス因子も異なると思われる。しかし、いずれも外来遺伝子を高発現させるという応用面では貴重な材料である。

なお、タバコADHのプロモーターと5'-UTRの両方があると、タバコの一過性発現ではCaMV35Sプロモーターの140倍のGUS活性があり、一方、翻訳増大効果は30倍であったことから、推定ではあるがADHのプロモーター活性はCaMV35Sの4~5倍程度ということになる。

## 7. 植物における外来遺伝子の安定発現

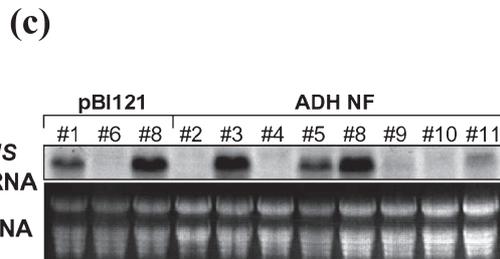
植物の染色体にアグロバクテリウム感染法あるいはパーティクルガン法で導入した外来遺伝子の発現は、形質転換体により1~10,000倍の間で大きくばらつくのが一般的である。そのため、形質転換体を少なくとも10~20個体解析しないと、結論が得られないという大きな壁がある。これは外来遺伝子が導入された染色体の位置により発現が変動するものと考えられ、染色体の位置効果と呼ばれている。その原因を突き止め、位置効果を回避し安定した高発現体を得ることは、応用面では特に重要である。

**7.1 インシュレーターによる位置効果の回避** 高等生物では遺伝子の発現を高めるエンハンサー、抑えるサイレンサーがあり、100 kbpも離れた遺伝子に影響を及ぼすことが知られている。しかし、無秩序に遠くの遺伝子に影響を及ぼさないように、どこかに影響力を限定するクロマチンの境界がなければならない。その一つであるインシュレーター(遮断するという意味)を、広島大学の赤坂教授はウニのアリルスルファターゼ遺伝子の5'上流に発見した。約600 bp領域はウニの受精卵において、すぐ上流のエンハンサーの効果を抑えた。このウニ・インシュレーターが植物においても機能するかを、タバコ培養細胞で試した。CaMV35Sプロモーター/GUS遺伝子をタバコBY2細胞に導入すると、GUS活性は形質転換細胞間で大きく異なるが、プロモーターの5'上流にインス



**GUS活性**

test plasmid	タバコ BY2	シロイヌナズナ T87
pBI221	260 ± 22 (1)	700 ± 60 (1)
ADH-221	7500 ± 920 (30)	22000 ± 230 (31)
ADH NF	25000 ± 780 (97)	43000 ± 2500 (61)



**mRNAとGUS活性の相対値**

	pBI121			ADH NF							
	#1	#6	#8	#2	#3	#4	#5	#8	#9	#10	#11
rel. GUS activity	1	-	3.2	-	51	-	40	46	8.3	-	10
rel. mRNA level	1	-	2.3	-	2.3	-	0.9	2.3	0.2	-	0.5
rel. GUS/mRNA	1	-	1.4	-	22	-	44	20	42	-	20

図3. タバコADHの5'-UTRの翻訳エンハンサー活性の評価。(a) 対照ベクターpBI221の部分構造。右端はGUS構造遺伝子の5'末端配列。ADH-221はpBI221にADH 5'-UTR, 82 bp (黒塗り)を挿入したもの。ADH-NFはADH 5'-UTRをGUS構造遺伝子の直前につないだもの。(b) 培養細胞から得たプロトプラストにおけるGUS遺伝子の一過性発現解析。左、タバコ・プロトプラストにおけるGUSのノザン解析；右、タバコBY2およびシロイヌナズナT87細胞のプロトプラストにおけるGUSの一過性発現活性 (unit/mg protein) と相対値 (括弧内)。ADH-NFではADH-221の2~3倍のGUS活性があり、これはGUSのATG開始コドンの直前の塩基が翻訳に影響することを示唆していた。ATGの直前の3塩基、64通りについてシロイヌナズナで翻訳活性への影響を調べた結果、最高のAAGと最低のUGCでは4倍の違いがあった。(c) 形質転換タバコの葉におけるGUS発現。左、GUS mRNAのノザン解析；右、GUS mRNAと活性の相対値。

レーターをつないでいくと、得られた形質転換細胞はいずれも高いGUS活性を示した。これは導入位置の染色体の影響を遮断したために、安定な高い発現を示したと解釈した。GUS遺伝子の3'下流にインスレーターをつないだ場合はGUS発現の変動は抑えられなかった<sup>11)</sup>。このインスレーターは植物で外来遺伝子を安定に発現させる重要なツールであり、日米で特許を取得した。

**7.2 シロイヌナズナにおける位置効果の検証** 外来遺伝子の発現量と染色体の導入位置との関係を探ると、CaMV35Sプロモーター/GUS遺伝子をシロイヌナズナに導入し、57個体を解析した。図4aに示すように、形質転換体T1の葉のGUS活性は10,000 unit/mg protein以上のもの(14個体)から500 unit/mg protein以下のもの(31個体)まで大きく変動した。GUS遺伝子をプロンプにサザン解析を行ったところ、導入されたGUS遺

伝子は単一コピーのものから多コピーのものまでさまざまであった。単一コピーのものGUS遺伝子の5', 3'の配列を詳細に調べたところ、完全長で導入された10個体はいずれも高いGUS活性を示し、mRNA量もほぼ同じであった(図4b)。クローン38のように完全長のGUS遺伝子と一部のGUS遺伝子が導入されたものは発現がほぼゼロであったということは、多コピー導入された個体で一部GUS遺伝子が欠落した不完全なものがあれば、post-transcriptional silencing (PTGS) が起こることを示唆する。シロイヌナズナではゲノムの全配列が解っているため、単一コピーの完全長GUS遺伝子が導入された個体について、GUS遺伝子の5'上流、3'下流の配列から染色体上の導入位置を決定した。10個体のGUS遺伝子導入位置は5本の染色体のさまざまな場所に挿入されており、特に高発現する位置はなかった(図4c)<sup>12)</sup>。した

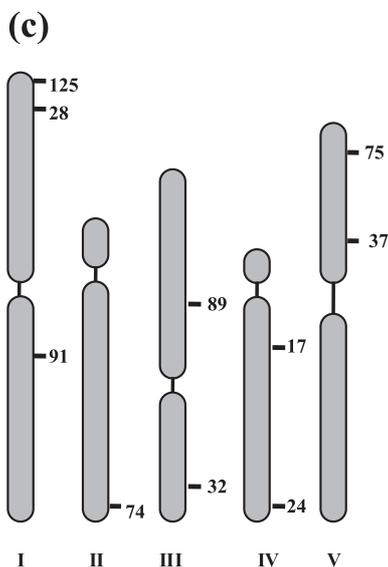
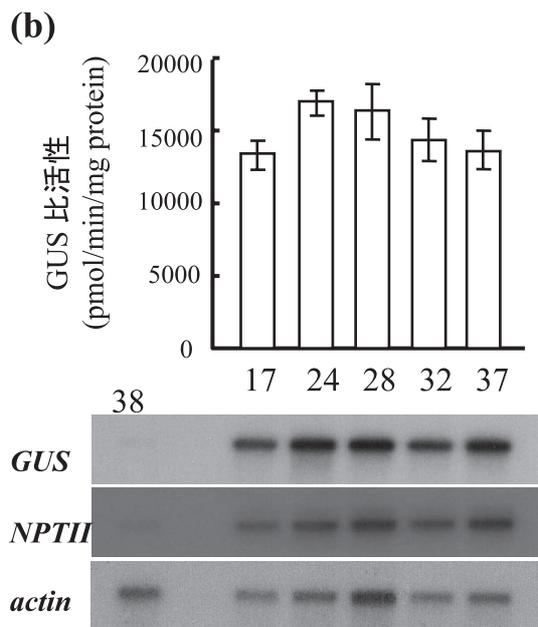
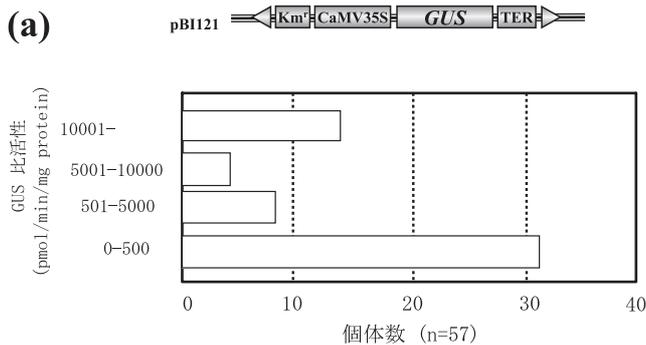


図4. シロイヌナズナ形質転換体のGUS遺伝子の染色体導入位置と活性。(a) pBI121を導入したシロイヌナズナ植物体57個体のT1世代の葉のGUS活性の分布。(b) 完全長単一コピー導入5個体(T3世代)のGUS活性とmRNA量。クローン38は不完全長GUS遺伝子を含んでおり、活性は0。図には示していないが、完全長単一コピーが導入された他の5個体もほぼ同じGUS活性を示した。(c) 完全長GUS遺伝子が単一コピーで導入された10個体のシロイヌナズナ染色体上の導入位置。ローマ数字はシロイヌナズナの染色体番号、染色体上の数字はクローン番号。

がって、少なくともシロイヌナズナにおいては、外来遺伝子の発現が大きくばらつくのは染色体上の導入位置のせいではなく、複数コピー入ったものでは、一部欠失した遺伝子も入っており、これがPTGSを誘起する結果であると思われる。

次に、完全長の遺伝子であれば多コピーになればなるほど発現量は増えるか、コピー数と発現量の相関を調べた。上で得られた10個体は、それぞれ異なる染色体に完全長のGUS遺伝子が入っているため、まず自家受粉により後代を作り、ホモ(2コピー)、ヘミ(1コピー)個体を得、それらの交配を重ねることにより、1コピーから7コピーを持つものまで、それぞれ数十個体のGUS活性を測定した。GUS活性は5コピーまではコピー数と比例して増えるが、6コピー以上では見事に活性はほぼゼロになり、コピー数には閾値が存在することが示された。これに関連すると思われるDNAのメチル化を調べると6コピー以上になるとGUS遺伝子のCCGG配列の多くがメチル化されており、転写の不活性化が起こることを示唆する(投稿準備中)。コピー数の増加となぜメチル化が起こるか解決すべき課題は多いが、その突破口を開く材料が揃ったと考えている。今は、植物に複数の遺伝子を導入し多くの機能を与える時代に入っているが、各遺伝子に付けるプロモーターやターミネーターは同じものを6個以上は使わない方が良いことを意味している。

## 8. 耐塩性植物の分子育種

大阪大学工学部高野光男教授(現、名誉教授)は1989年、タイ東北部の塩土から耐塩性菌*Halomonas elongata*を分離した。*H. elongata*は生育に海水並みの3% NaClが必要で、20% NaClでも増殖できるきわめて強い耐塩性を示した。外部塩濃度に対抗する細胞内の適合溶質は、あまり知られていなかった環状のアミノ酸誘導体、エクトイン(ectoine: 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinocarboxylic acid)であった<sup>13)</sup>。これを大腸菌の培地に添加すると大腸菌の耐塩性が上昇したので、植物に作らせる研究を始めた。エクトインはトレオニン、リジンなどの生合成中間体、L-aspartic- $\beta$ -semialdehydeから3段階の反応で生合成されることが分かり、それらの遺伝子、*ectA*, *ectB*, *ectC*を*H. elongata*のゲノムから取得し、それぞれをCaMV35Sプロモーターにつなぎ、タバコBY2細胞に導入した。3遺伝子を発現するクローンは10~80 nmol/g湿重量のエクトインを蓄積した。残念ながら、この程度の蓄積ではタバコ細胞は3%のNaClを含む培地では生育できなかったが、マンニトール、食塩などの高浸透圧培地に20分間漬けて、低浸透圧培地に戻すと、エクトイン蓄積量に応じて生残率が高くなった。エクトイン

は浸透圧ショックから膜構造などを保護すると考えられた<sup>14)</sup>。植物が高濃度の食塩に曝された時、膜構造や膜機能を保護できれば、自身でアミノ酸、糖類などの適合溶質を蓄積し、耐塩性を獲得すると思っただが、問題は高濃度の食塩存在下では適合溶質を蓄積していても有害なNa<sup>+</sup>イオンが浸入し、ほとんどの酵素が阻害されることであった。

耐塩性植物の分子育種には外部の高浸透圧から細胞を守ることに、Na<sup>+</sup>イオンの浸入を阻止するという、2つの課題を克服しなければならない。そこで、イネのNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>輸送膜タンパク質の構造と機能の解析を行った。イネの高親和性K<sup>+</sup>輸送体、HKT1はNa<sup>+</sup>イオン輸送活性が高く、植物が必要とするK<sup>+</sup>イオン取込能は低い。しかし、N末端から88番目のセリンをグリシンに置換するように変異させた遺伝子をNa<sup>+</sup>排出能を欠失した酵母に導入すると、形質転換体は海水より高濃度の600 mM NaCl (3.6%)を含む培地で生育し、K<sup>+</sup>イオン取込能が上昇した<sup>15)</sup>。

酵母のNa<sup>+</sup>イオン排出ポンプ遺伝子、*Ena1*をタバコBY2細胞に導入したところ、NaClより10倍程度毒性が強いLiCl、120 mM存在下で増殖するようになった。これはタバコにおいても浸入したLi<sup>+</sup>イオンを排出した結果であると判断された。高濃度NaClでの実験はNa<sup>+</sup>の毒性と高浸透圧のストレスの両者が影響するので行っていないが、*Ena1*も浸入したNa<sup>+</sup>イオンの排出に有効であると思われる、耐塩性植物の分子育種のツールである<sup>16)</sup>。

耐塩性植物の分子育種には多くの要素遺伝子が必要であるが、重要な候補遺伝子がほぼ揃った。ただし、変異*HKT1*遺伝子を植物に導入しても内在の*HKT1*遺伝子があればNa<sup>+</sup>イオンは取り込まれるので、内在遺伝子を破壊する必要がある。遺伝子の相同組換えがまだできない植物では、これはまだ困難であり今後の研究が待たれる。

## 9. 経済産業省・NEDOの植物プロジェクト

飽食、快適、便利な現在の先進国の豊かな文明は化石資源の大量消費により成り立っている。しかし、地球温暖化、地球規模での環境汚染と破壊など、大きなツケが回ってきた。これを解決し、持続可能な社会を実現するには、太陽エネルギーを使ってCO<sub>2</sub>を固定し、デンプン、セルロース、脂質、タンパク質などを生産する植物を抜本的に改良し、バイオマスの生産性を高める方策が理に適っている。バイオマスからできたエタノール、ディーゼル燃料、プラスチックを消費しても、生じるCO<sub>2</sub>は再び植物に利用される。地球上で年間に生産されるバイオマスエネルギー量は人間活動で消費されるエネルギー量の10倍ある。したがって、植物バイオマスの生産性を10

%高め、それが化石資源の代替になれば、CO<sub>2</sub>排出による地球温暖化は防止できる。それでは、植物の生産性を平均10%高める方策はあるのだろうか。答えはイエスである。一生移動できない植物は環境からさまざまなストレスを受け、本来備えている生産力の大半が失われている。米国の農業でさえ、実際に農地で収穫される収量は、最適条件で栽培したときの収量の1/4以下である。途上国の農業の収量の低さは推して知るべしである。今では遺伝子組換え技術によりウイルス耐性、昆虫抵抗性、除草剤耐性の作物が市場に多く出ているが、これらは明らかに生産力が数%上昇している。今後、遺伝子組換え技術を使えばストレスによる生産力の減少を防ぐのみでなく、植物が遺伝的に備えている生産力の上限を上げることも可能である。光合成活性やCO<sub>2</sub>固定量の増大、成長速度の上昇などである。ただ、これらを従来の交配育種で達成するにはあまりにも時間がかかりすぎ現実的ではない。目的の遺伝子をあらゆる生物から探索し、試験管内で加工し、複数の有用遺伝子を同時に導入できる遺伝子組換え技術を使えば、植物のバイオマス10%増産は可能である。

1995年にデュボン社の研究グループは、ダイズでリジンを生産させるという興味深い成果を発表した。微生物も植物も特定のアミノ酸などが高蓄積すると細胞に良くないので、最終産物が生合成の最初の酵素を抑えるフィードバック制御を備えている。アミノ酸発酵工業は突然変異によりフィードバック制御を解除した微生物を利用することにより成功した。そこで彼らは、リジン生合成経路でフィードバック阻害を受けるaspartokinaseとdihydrodipicolinate syntaseのフィードバック阻害非感受性酵素の遺伝子をそれぞれ大腸菌と*Corynebacterium*から取得し、ダイズに導入したところ、種子中のリジン含量が6倍増えた<sup>17)</sup>。いったん遺伝子組換えダイズの種子が得られれば、畑で太陽光とCO<sub>2</sub>からアミノ酸を生産することが可能であり、発酵法に比べ生産コストは大幅に低減できる。

以上のような背景から経済産業省に提案したナショナルプロジェクト「植物利用エネルギー合理化工業原料生産技術開発」が採択され、1999年から2005年までプロジェクトリーダーとして推進してきた。プロジェクトの構成は1)工業原料生産のための植物代謝利用技術、2)植物の環境ストレス耐性向上技術、3)植物への多重遺伝子導入技術および発現制御技術からなり、企業8社と多くの大学、研究機関が参加した。成果としては、酸性土壌では栄養素のリン酸がアルミニウムと結合し不溶性になっているが、クエン酸合成酵素遺伝子を導入し、根から有機酸を分泌させることによりリン酸を可溶化

し、酸性土壌で20%生長が促進されたパルプ材のユーカリ(王子製紙)、高付加価値の不飽和長鎖脂肪酸、アラキドン酸を蓄積するダイズ(サントリー)、抗菌ペプチド遺伝子を導入し、黒斑病菌耐性になったサツマイモ(豊田中研)、ポリアミン蓄積により乾燥・塩・低温などの複合ストレス耐性になったサツマイモ(東洋紡)、動物飼料中のフィチンのリン酸を遊離させるフィターゼを高生産するイネ(三井化学)、カフェイン生合成をRNAiで抑制したデカフェコーヒーノキ(奈良先端大)、gene dosage効果が期待できる葉緑体に遺伝子を導入することにより、全可溶性タンパク質の38%の外来タンパク質を蓄積させたタバコ(RITE)などが作られ、一部は実用化に向けた生態系への安全性試験が始まっている。

これからの遺伝子組換え植物作製には、複数の遺伝子を導入し複合ストレス耐性を付与するとともに、有用物質生産の代謝経路を改変する技術として、数十遺伝子を試験管内で連結し染色体の1ヶ所に導入する多重遺伝子導入技術が求められる。そこで、磁気ビーズ上でストレプトアビジン・ビオチン反応を利用して、10遺伝子を数時間で連結する多重遺伝子連結技術を開発し、自動化ロボットを完成させた。10遺伝子連結を3連平行して行い、これらを植物用ベクターに組み込むことにより数日で30遺伝子の連結が可能になった。100 kbpのDNA断片をシロイヌナズナに導入し、DNAが安定に維持されることも確認した(奈良先端大)。多数の外来遺伝子を目的に応じて発現させるためには多くのプロモーターを準備しなければならない。シロイヌナズナの葉、根特異的に発現する遺伝子群をDNAマイクロアレイで選択し<sup>18)</sup>、それぞれのプロモーターを40種取得し、発現様式を詳細に解析した(奈良先端大)。

プロジェクト進行中の2000年にはシロイヌナズナの全ゲノム配列が解読され、イネもそれに続き、植物分野も転写物、タンパク質、代謝物の網羅的解析が始まり、ポストゲノム時代に入った。そこで経済産業省はもう一つの植物プロジェクト「植物の物質生産プロセス制御基盤技術開発」(2002-2009)を開始したが、企画段階から参画し、現在もプロジェクトリーダーを務めている。構成は、1)モデル植物を用いた物質生産機能の解析、2)実用植物を用いた物質生産制御技術の開発からなっている。これにも企業8社と多くの大学研究室が参加し、1)の基盤研究はかずさDNA研で柴田大輔博士が指導に当たっている。モデル植物のシロイヌナズナの培養細胞でcDNAを網羅的に過剰発現または発現抑制し、工業原料生産に関わるアミノ酸、有機酸、脂質、糖質、イソプレノイドなどの代謝物の変動を解析し、律速反応をつきとめることにより、該当する遺伝子を実用植物のユーカ

リ、パラゴムノキ、トチュウ、亜麻、ジャガイモなどに導入し、目的生産物のアミノ酸、セルロース、リグニン、ゴム、多糖類、カロテノイド、ステロイドなどの増産への効果を検証するという戦略である。現時点では実用植物の網羅的遺伝子解析は無理であるが、たとえばパラゴムノキにおいても、ゴム生合成の前駆体、イソプレノイド関連遺伝子と代謝物の網羅的解析は行っている。転写因子も重要で、シロイヌナズナと実用植物で共通した転写因子があると思われる。得られたデータは統合してデータベースを作り、いずれ公開する予定である。

## おわりに

発酵工学を背景にスタートした植物バイオテクノロジーの研究経緯を述べた。開始当初に比べて人口・食料問題、地球温暖化、地球環境問題などが深刻になってきた今日、植物の重要性はますます高まってきたと認識している。バイオマスは化石資源に代わる21世紀の中心的資源である。農業面での植物の応用研究は昔からあるが、工業利用面で基礎研究に基づいた植物の応用研究はこれまでなかった。本会会員の一人として、このような視点から研究を展開してきたことが今回の受賞につながったわけで、会員のご理解に感謝する次第である。「植物の葉は理想のバイオリクターである」。一枚一枚が太陽電池を備えた生産工場であり、必要な遺伝子群をセットで導入すれば目的の生産物を作ることができる。そして植物は、いわゆる腐敗により堆肥に代わる「生分解性の工場である」ことが、太陽電池、風力発電に勝る点である。

20世紀は石油の世紀であった。産油国は巨額の富を得、先進国は石油の大量消費により豊かな文明を築いた。21世紀はバイオマスの世紀に違いない。国土が狭くバイオマスに乏しいわが国は、果たして今の繁栄を持続できるであろうか。石油を持たなかったわが国が世界第2の経済大国になれたのは科学と技術の振興に国を挙げて取り組んできたからである。今後、わが国が生き残るには、バイオマス増産のための植物の基礎と応用研究という上流と、バイオマスを有効に効率よく利用する生物工学という下流の科学技術に力を入れなければならないはずである。このような筆者の思いを、新潮選書「植物力」<sup>19)</sup>に詳しく述べている。

ここで紹介した研究は、大阪大学工学部応用生物工学科(1985~2004)と奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科(2004~現在)で行ってきたものである。すでにお名前を挙げた先生方以外に、実に多くの先生方、学生の皆さんに支えて頂いた。植物研究の開始時には大阪大学の岡田弘輔教授(故人)、岡田尚輔博士(故人)、藤山和仁助教授のご指導とご協力が大きかった。また、大阪大学時代から今日まで、私の講

座で研究と学生指導を共に行ってきた関根政実・石川県立大助教授、吉田和哉・奈良先端大助教授、奈良先端大に転任後に加わって頂いた加藤 晃、仲山英樹両博士のご尽力は多大である。関根助教授が指導してきた、植物の細胞周期制御遺伝子群の機能解析は膨大であるが、誌面の都合で述べる事ができなかった。そして、百数十名の大阪大学、奈良先端大の学生諸君、ポスドク研究員、実験・事務補助の皆さんの成果の集約であることは言うまでもない。ここに深甚なる謝意を表す。最後に、最高の研究環境で研究をさせていただいた、奈良先端大の歴代学長と植物研究グループの先生方、20年間、米国から常に最新の情報を提供し、支援いただいたUC Davis, Raymond L. Rodriguez教授に厚くお礼を申し上げる。

## 文 献

- 1) Welinder, K. G.: *Eur. J. Biochem.*, **96**, 483–502 (1979).
- 2) Fujiyama, K., Takemura, H., Shibayama, S., Kobayashi, K., Choi, J.-K., Shinmyo, A., Takano, M., Yamada, Y., and Okada, H.: *Eur. J. Biochem.*, **173**, 681–687 (1988).
- 3) Ohkawa, J., Okada, N., Shinmyo, A., and Takano, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1239–1243 (1989).
- 4) Kawaoka, A., Yoshida, K., Sekine, M., and Shinmyo, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 49–53 (1994).
- 5) Kawaoka, A., Matsunaga, E., Endo, S., Kondo, S., Yoshida, K., Shinmyo, A., and Ebinuma, H.: *Plant Physiology*, **132**, 1–9 (2003).
- 6) Kaothien, P., Shimokawatoko, Y., Kawaoka, A., Yoshida, K., and Shinmyo, A.: *Plant Cell Rep.*, **19**, 558–562 (2000).
- 7) Kaothien, P., Kawaoka, A., Ebinuma, H., Yoshida, K., and Shinmyo, A.: *Plant Mol. Biol.*, **49**, 591–599 (2002).
- 8) Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasegawa, S.: *Int. Rev. Cytol.*, **132**, 1–30 (1992).
- 9) Nagaya, S., Nakai, Y., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K., and Shinmyo, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 231–235 (2000).
- 10) Satoh, J., Kato, K., and Shinmyo, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 1–8 (2004).
- 11) Nagaya, S., Yoshida, K., Kato, K., Akasaka, K., and Shinmyo, A.: *Mol. Gen. Genet.*, **265**, 405–413 (2001).
- 12) Nagaya, S., Kato, K., Ninomiya, Y., Horie, R., Sekine, M., Yoshida, K., and Shinmyo, A.: *Plant Cell Physiol.*, **46**, 438–444 (2005).
- 13) Ono, H., Okuda, M., Tongpim, S., Imai, K., Shinmyo, A., Sakuda, S., Kaneko, Y., Murooka, Y., and Takano, M.: *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 362–368 (1998).
- 14) Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y., and Shinmyo, A.: *Plant Physiol.*, **122**, 1239–1247 (2000).
- 15) Mäser I, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman, B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E. P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J. I., and Uozumi, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6428–6433 (2002).
- 16) Nakayama, H., Yoshida, K., and Shinmyo, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **85**, 776–789 (2004).
- 17) Falco, S. C., Guida, T., Locke, M., Mauvais, J., Sanders, C., Ward, R. T., and Webber, P.: *Biotechnol.*, **13**, 577–582 (1995).
- 18) Ando, K., Yamakawa, S., Miyashita, K., Yoshida, K., Yokota, A., Shinmyo, A., and Kohchi, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 85–88 (2004).
- 19) 新名惇彦：植物力，新潮社 (2006).