

植物の代謝多様性とその応用 —この10年と今後の展開—

村中 俊哉

植物はカビ、バクテリア、病害虫、大型捕食者などの生物学的ストレス、乾燥、高温・低温、紫外線などの非生物学的ストレスに曝されても、自ら動きそれから逃れることができない。そのために、ストレスに対して自ら守る、敵を攻撃する、仲間を呼び寄せる、といったことを行うために多種多様な低分子化合物を合成する二次代謝経路を発達させてきた。植物が作り出す低分子化合物の数は20万種類といわれている。これらの多くは生理活性を持つことから、医薬品、機能性食品、食品添加物、工業原料などに用いられてきた。1980年代には、植物組織培養、すなわち、植物をタンクの中で培養して物質生産させようとする試みがなされてきた。この中には、世界初の組織培養による工業生産である三井石油化学工業株式会社（当時）によるレアプラント（希少植物）ムラサキの組織培養によるシコニンの生産や、日東電工株式会社によるオタネニンジンの組織培養など、工業生産に成功したものもあるが、多くは、コストがあわず、工業化を断念した。その背景には、当時はまだ植物二次代謝経路に係わる酵素遺伝子がほとんどわかっておらず、目的とする物質の生産性を上げようにも、“ブラックボックス”の中を手探りで行っている状況であったことが大きい。

その後の1990年代は、本分野の開発研究は停滞感があったが、21世紀にはいり、分子生物学、精密かつ包括的な分析技術の進展、情報科学の発達もあいまって、この10年間、植物の二次代謝研究-代謝多様性研究は新たな展開を見せはじめている。本稿では、この10年間の代謝多様性研究のトピックスとなる項目ごとに、特に筆者らが関わってきたテルペノイド代謝に係わる研究を例に挙げ、研究を振り返る。

モデル植物のゲノム解読

まず一番のトピックスは、2000年12月、まさに21世紀開幕を目前にモデル植物シロイスナズナのゲノムが開いたことである（2000年12月14日発行のNatureに掲載）¹⁾。これにより、多くの研究がゲノムベースで行われることになった。

テルペノイドは、炭素数5のイソプレン単位の倍数を基本骨格とする化合物群である。モノテルペノイド（炭素数10）、セスキテルペノイド（炭素数15）、ジテルペノイド（炭素数20）、トリテルペノイド（炭素数30）は、いずれも、直鎖のイソプレン単位が、閉環酵素によりさまざまな環化物となり、さらに、酸化、配糖化などの修飾を受け、その多様性が増大する（図1）。トリテルペノ

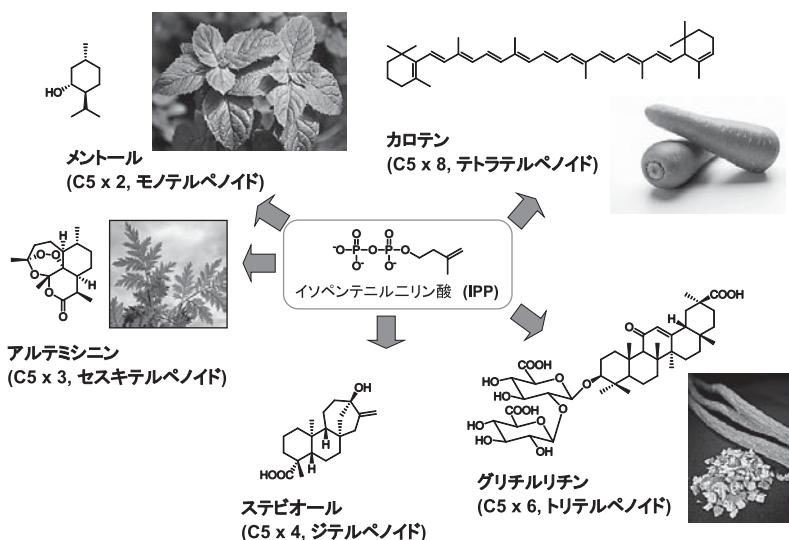


図1. 植物テルペノイド

著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（教授）E-mail: muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

イドの場合、直鎖の2,3-オキシドスクアレンが、オキシドスクアレン環化酵素(OSC)と呼ばれる一群の酵素によって環化される。天然には100以上の異なるトリテルペノイド骨格が見いだされている。シロイスナズナでは、ゲノム解読までに、その機能が調べられていたのは、ステロール合成経路に係わるシクロアルテノール合成酵素(CAS)遺伝子、植物でもっとも普遍的に存在するトリテルペノイドある β -アミリンの合成に係わる β -アミリン合成酵素遺伝子などごく一部に限られていた。ところがシロイスナズナゲノム解読の結果、シロイスナズナにはOSCと推定される遺伝子が全部で13あることがわかった。すなわち、ゲノム解読により達成目標が、有限の解の中にあることが示されたことになる。東京大学の海老塚・渋谷（現新潟薬科大学）らのグループと、米国ライス大学のMatsudaらは、それぞれ独立に、酵母発現系(後述)を用いることにより、これらOSCの機能を次々と明らかにしていった。筆者らも、ステロール合成に係わるCASに類似した、機能未知の遺伝子があることに気づき、渋谷らと共に、これまで植物には存在しないであろうと思われていたラノステロール合成酵素遺伝子(LASI)を同定し²⁾、さらに、ラノステロールを経由したステロール生合成経路が植物に存在することを初めて示した³⁾。2009年に、Matsudaらのグループは、シロイスナズナOSCの機能解析としては最後のPEN3の機能を明らかにした⁴⁾。

遺伝子破壊

植物に外来遺伝子が導入されるとき、相同組換えの頻度はきわめて低くランダムに挿入される。そのため、大腸菌、酵母などのように相同組換えを利用した遺伝子破壊を行うことができない。ゲノムプロジェクトでゲノムの配列はわかったものも逆遺伝学的手法を使えないのであれば、遺伝子の機能に迫ることができない。植物の形質転換では、自然界で起こる遺伝子組換えを利用したアグロバクテリウム法によるT-DNA遺伝子が挿入される。この挿入はランダムであるが、多数の形質転換植物クローンをつくることにより、目的とする遺伝子領域にT-DNAがタグされたもの(タグライン)をスクリーニングすることができる⁵⁾。

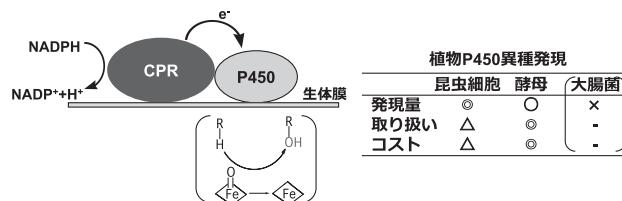
HMG-CoAレダクターゼ(HMGR)は、テルペノイド代謝の鍵酵素である。シロイスナズナには、HMG1、HMG2の2分子種があることが知られていた。筆者らは、HMGRの機能を明らかにすることを目的に、シロイスナズナのHMG1、HMG2の遺伝子破壊株を取ることを目指した。シロイスナズナの代謝研究を開始した2001

年当時は、自ら膨大な量のPCRにより選抜しなければならなかつたが、幸いにも、HMG1、HMG2の両者の破壊株を取得し、HMG1の破壊により、矮化、雄性不稔、早期老化といった顕著な表現型を示し、表現型の回復にはスクアレンより下流の代謝物(すなわちトリテルペノイド)が寄与すること⁶⁾、さらにHMG1、HMG2の両方の遺伝子破壊は、雄性配偶体致死をもたらすこと⁷⁾を見いだした。その後数年の間に、特にオハイオ州立大学のArabidopsis Biological Resource Center(ABRC)のタグラインがたいへん充実し、ネットからクリック一つで遺伝子破壊株を注文できるようになった。ところが、2010年代にはいり、基礎研究から応用研究へのシフトの流れの中で、シロイスナズナ研究への公的資金が大幅に削減され、ABRCの財政状況は厳しくなっている。

共発現データ解析

二次代謝産物は、必要な時と場所において生合成されなければならない。そのため、生合成に係わる一群の遺伝子の発現パターンが互いに相関する傾向にある。このような発現パターンが相同的な遺伝子のことを共発現遺伝子(coexpressed genes)と呼ぶ。モデル植物シロイスナズナでは、DNAマイクロアレイのデータを蓄積する公共のデータベースが整備されており、この公共データベースを利用した共発現データ解析のためのツールATTED-II(<http://atted.jp>)が東京工業大学の大林(現東北大学)により開発された⁸⁾。ATTED-IIは、シロイスナズナデータに特化したユーザーフレンドリーな解析システムである。シロイスナズナの共発現データ解析により、フラボノイド生合成に関わる酵素遺伝子群の網羅的な同定⁹⁾、転写因子の同定など、目覚ましい成果が挙っている。筆者らは、マメ科モデル植物であるタルウマゴ

動・植・微生物に広く分布
膜結合性のヘムタンパク質
Monooxygenase
シトクロムP450還元酵素(CPR)によって還元



命名法

CYP1A1 ファミリー(AA 40%以上相同)
サブファミリー(AA 55%以上相同)

図2. シトクロームP450モノオキシゲナーゼ

ヤシについて、パブリックに入手可能な共発現データベースを活用することにより、OSCの一つである β -アミリン合成酵素遺伝子と共に発現するシトクロームP450モノオキシゲナーゼ（以下P450とする、図2）分子種を絞り込み、3大機能性トリテルペノイドであるオレアノール酸、ウルソール酸、ベツリシン酸を生合成するP450 CYP716A12の機能同定を行うことができた¹⁰⁾。

異種発現系

ホモジー検索、あるいは、上記共発現データ解析などで絞り込んだ候補遺伝子の機能を解析するには、通常、異種発現系が用いられる。大腸菌では、GSTあるにはヒスチジンタグなどをつけ、組換えタンパクを容易に調製・精製できるシステムがあるが、膜結合性の酵素の場合、大腸菌発現系では期待通りのタンパク調製ができない場合が多い。特に植物で酸化修飾に係わるP450は、大腸菌での成功例もあるが、一般的に発現が難しく、酵母発現系が一般に用いられ、成功例も多い。筆者らはレアプラントであるカンゾウにおけるトリテルペノイドであるグリチルリチン（図1）生合成に係わる酸化酵素遺伝子の機能解析を出芽酵母で行うことができた^{11,12)}。ところが酵母発現系が万能とも言えないケースが現れた。植物ステロールの生合成においてシットステロールからステイグマステロールに変換する酵素は、動物のP450での構造類似性から、本研究分野の研究者の多くが、CYP710Aサブファミリーである推測していたが、そのいずれもが酵母発現系で活性を出すことができなかつた。大阪府立大学の太田らは、バキュロウイルス-昆虫系を用いることにより、この酵素の機能であるステロールC-22不飽和化酵素活性を証明することに成功した¹³⁾。P450研究は一筋縄ではいかないものである。

また、植物でタンパク質を大量に生合成させタンパク質の機能を解析する方法として、アグロバクテリウム菌を用いた植物体での一過的な遺伝子発現（アグロインフィルトレーション法）が行われてきたが、最近、代謝関連酵素遺伝子の機能解析にも本法を用いることが多くなってきた。本年6月にイタリアで開催された「P450の多様性とバイオテクノロジーに関する国際会議」においてもアグロインフィルトレーション法によるP450の機能解析が数多く報告された。本法は、シリングで圧力を掛け、アグロバクテリウム菌液を植物組織内に注入するものであり、肉厚の葉であり植物ウイルスの研究に使われてきたタバコ属植物 *Nicotiana benthamiana* を用いることが多いが、タバコ (*Nicotiana tabacum*) でも利用可能である。

遺伝子クラスター

この10年間の本研究分野での大きなトピックスの一つは、植物における代謝経路に係わる酵素遺伝子群がクラスターを作っていることが発見されたことであろう。エンバクにおけるトリテルペノイドサポニンであるアベナシンの代謝研究を行っていたOsbourneらは、アベナシンが蛍光物質であることから、蛍光を指標にアベナシン生合成における変異体解析を行ってきた。その結果、トリテルペノイド代謝に係わる遺伝子のいくつかがクラスターを形成していることがわかった¹⁴⁾。これは、エンバクのアベナシンに限定されたことと思われていたが、シロイヌナズナにおいても、トリテルペノイドであるサリアノール (thalianol) の骨格形成、酸化修飾などに係わる一群の生合成酵素遺伝子が、約30 kbのゲノム中に遺伝子クラスターを形成しており、しかも共発現していることがわかった¹⁵⁾。このことは、ゲノム情報がわかっている植物種であれば、ある代謝経路に関する生合成遺伝子群について知りたい場合、その代謝で係わるであろう酵素遺伝子（たとえば、閉環酵素遺伝子、酸化酵素遺伝子、配糖化酵素遺伝子など）の配列情報をもとに、一連の酵素遺伝子群を芋づる式に単離できる可能性を秘めている。実際筆者らの研究グループでも、ごく最近、ゲノム情報がわかっている植物種において公知の遺伝子配列情報を基に、その近傍のゲノム配列を検索することにより、その代謝に係わる新規酵素遺伝子群を単離することができた（未発表）。

合成生物学

大腸菌、酵母、植物など、本来その生物が保有している代謝経路を生かしつつ、副反応系の除去、外来遺伝子の導入などにより、その生物において生合成経路を再構築する方法である。この10年でもっとも着目を浴びたのが、カリフォルニア大学バークレイ校のKeaslingのグループによる酵母のテルペノイド代謝系の再構築によるアルテミシニン酸の生産である¹⁶⁾。アルテミシニン（図1）は、キク科ヨモギ属植物のアルテミシア・アヌアでのみ生合成される抗マラリア活性を有するセスキテルペノイドである。彼らは、キク科植物のEST情報をを利用してアルテミシニン生合成に係わる酸化酵素遺伝子 CYP71AV1を単離し、前駆体のセスキテルペノイドであるアモルファジエンを合成する酵素遺伝子ADSとともに、テルペノイド代謝を改変した酵母に導入することにより、酵母でアルテミシニン酸を生産させることができた。アルテミシニン酸からアルテミシニンへは有機合

成できる。本研究には、ゲイツ財団からの研究資金が投入された。従来、代謝工学 (metabolic engineering) と呼ばれていたものと同じではないかとの見方もあるが、ゲノム情報を活用し、よりダイナミックに代謝を改変、再構築するものが、この合成生物学、あるいは、合成代謝生物学という言葉に内包されているのだろう。筆者らも、上記のとおり、カンゾウにおける主生成物であるグリチルリチンの前駆体、グリチルレチン酸を、酵母のテルペノイド代謝系の再構築により生産することができた^{11,12)}。

今後の展望

以上本稿では、この10年間の植物の代謝多様性に係わる研究について筆者らが関わってきたテルペノイド代謝を中心に述べてきた。それではこの先10年はどのような展開を迎えるであろうか(図3)。まず、ゲノム、トラスクリプトミクスに関する情報はより加速度を増して集積されるであろう。今年にはいってからも、トマト、メロン、バナナと次々とゲノム解読が行われている。カナダのプロジェクト PhytoMetaSyn (<http://www.phytometasyn.ca/>) のように薬用植物を含む高付加価値を生み出す植

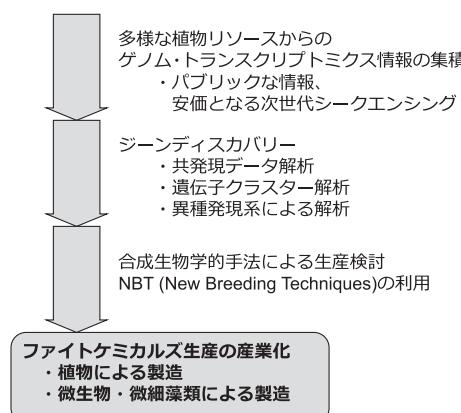


図3. 今後の展望

物代謝研究を目指したゲノム・トラスクリプトミクス解析も行われている。これらの情報を元に、共発現解析、遺伝子クラスター解析、異種発現系によって次々と新規遺伝子が単離されるであろう。今年になって、新しい遺伝子組換え技術 (new breeding techniques, NBT) ということばが使われるようになってきた。これは、植物病原菌が有するユニークなDNA結合タンパク質とスクレアーゼとの融合タンパクを用いて任意なDNA配列の欠失、挿入などを行う画期的な技術TALEN¹⁷⁾などの次世代型の育種技術である。TALENを代謝改変に応用した試みはまだないが、今後、倍数性植物の代謝改変などへの応用が期待される。これらの技術、さらには、合成生物学的手法による生産検討などにより、次の10年にはこれまでになし得なかった、植物低分子化合物（ファイトケミカルズ）生産の産業化が勃興することを大いに期待している。

文 献

- 1) Kaul, S. et al.: *Nature*, **408**, 796 (2000).
- 2) Suzuki, M. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **47**, 565 (2006).
- 3) Ohyama, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 725 (2009).
- 4) Moriacchi, P. et al.: *Org. Lett.*, **11**, 2627 (2009).
- 5) Feldmann, K. A. et al.: *Plant J.*, **1**, 71 (1991).
- 6) Suzuki, M. et al.: *Plant J.*, **37**, 750 (2004).
- 7) Suzuki, M. et al.: *J. Exp. Bot.*, **60**, 2055 (2009).
- 8) Obayashi, T. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **35**, D863 (2006).
- 9) Saito, K. et al.: *TRENDS Plant Sci.*, **13**, 36 (2007).
- 10) Fukushima, E. O. et al.: *Plant Cell Physiol.*, **52**, 2050 (2011).
- 11) Seki, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14204 (2008).
- 12) Seki, H. et al.: *Plant Cell*, **23**, 4112 (2011).
- 13) Morikawa, T. et al.: *Plant Cell*, **18**, 1008 (2006).
- 14) Qi, X. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8233 (2004).
- 15) Field, B. and Osbourn, E.: *Science*, **320**, 543 (2008).
- 16) Ro, D.-K. et al.: *Nature*, **440**, 940 (2006).
- 17) Cermak, T. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **39**, e82 (2011).