



特性を持つ高等植物培養細胞を用いた機能の解析と再構築

京都大学大学院生命科学研究科 統合生命科学専攻 教授 佐藤 文彦

植物は地球上の一次生産者として太陽エネルギーの固定（光合成）を行うとともに、多様な代謝産物の生産を行っている。こうした植物の機能を理解するうえで、それぞれの機能を有する細胞系を確立し解析することが重要と考え、まず、光合成能を有する高等植物細胞培養系（光独立栄養培養細胞系）を試験管内で確立し、その機能解析を試みた。また、一般に生合成の場が特定の組織に限られ、かつ、その活性が低く、解析は困難である二次代謝についても、その化学構造が多様であり、かつ、有用医薬品が多く含まれるイソキノリンアルカロイドに着目し、薬用植物であるオウレンから局方医薬品ベルベリンを高産生する培養細胞を選抜培養し、ベルベリン高産生系を確立するとともに、同細胞系をもとに、同合成系の分子基盤を解明し、その機能再構築を行ってきた。これらの研究は、現在、遺伝子組換え技術の発展から、植物個体を用いた解析、ならびに応用へと展開されつつある。以下、その研究成果を概説する。

1. 光独立栄養培養細胞の確立と葉緑体機能の分子メカニズムの解明（図1）

植物は光合成によって独立栄養的に生育するが、個体から切り出した細胞組織では、その光合成機能は大きく損なわれる。そうした細胞組織からも、植物ホルモン処理により個体が再生でき、光独立栄養性が回復するが、そうした化学調節では光独立栄養培養細胞は確立できなかった。さまざまな試みの結果、体細胞変異をもとに、光合成機能を発現する緑色細胞を選抜し、タバコから光独立栄養培養系を確立することが可能となった。同細胞系は、光独立栄養的に安定して培養される高等植物細胞として世界で2番目の細胞系であり、同系の確立以来、30年以上にわたり、安定して継代培養されている。同細胞系は、試験管内で、光合成機能を有することから、植物細胞に作用するさまざまな生理活性物質、特に、除草剤のスクリーニングや

耐性株のスクリーニングに用いることが可能であり、光化学系IIの反応中心を構成するD1タンパク質を標的とするDCMUに対する初めての耐性変異株の単離と耐性機構の解明につながるなど、植物化学調節研究において重要な材料となりうることが明らかになった。

また、同光独立栄養培養細胞は、葉緑体の機能発現調節機構を理解するための良い素材であり、同細胞系を用いて葉緑体DNAと結合する核様体タンパク質CND41が同定されるとともに、同遺伝子の発現を抑制した植物体緑葉では、葉緑体遺伝子の発現が促進していることが明らかとなり、同タンパク質が葉緑体遺伝子発現の負の制御因子であること、また、同タンパク質による葉緑体（未熟な色素体）の分化制御が植物ホルモンの一種ジベレリンの生合成に関与し、植物の生長を制御していることを示唆する結果も得ている。さらに、同タンパク質には、植物葉の主要タンパク質である炭酸固定酵素Rubiscoの分解と転流に関わるプロテアーゼとして老化の制御に関わることも明らかになり、葉緑体機能制御による多面的植物生長制御機構の一端が解明されるに至っている。

一方、光独立栄養細胞から確立された耐塩性細胞における光化学系IIの耐塩性の向上の発見は、その後の光化学系II酸素発生系(OEC)の分子機構解明の大きな原動力となった。特に、OECを構成するPsbPタンパク質に着目し、その3次元構造の解明に取り組むとともに、個体レベルでのPsbPの必須性の解明に至っている。また、PsbPは高等植物、緑藻に特徴的であるが、このPsbPファミリータンパク質が進化において多様な機能を獲得してきたことも解明している。例えば、PsbPファミリータンパク質の一つPPL2がOECではなく、循環的電子伝達系を構成するNAD(P)H脱水素酵素複合体(NDH)の構成因子であることを同定している。また、NDHが強光ストレス耐性やC4光合成のエネルギー源として機能することを強く示唆する結果を得る一方、NDF1/2/4など、循環的電子伝達系を構成するNDHの構成因子を数多く単離同定し、電子伝達系の制御機構の解明と植物の光合成機能開発のための分子基盤の再構築に大きく貢献することができた。

2. イソキノリンアルカロイド生合成系の分子基盤の解明

筆者らが分子細胞生物学的研究を開始した1990年代初頭、イソキノリンアルカロイド生合成系で単離された遺伝子はベルベリンブリッジ酵素(BBE)のみであった。筆者らは、高いイソキノリンアルカロイド生合成活性を示すオウレン細胞を用いることにより、世界に先駆けてスコウレリン-O-メチル化酵素(SMT)、ノルコクラウリン-6-O-メチル化酵素(6OMT)、3'-ヒドロキシ-N-メチルコクラウリン-4'-O-メチル化酵素(4'OMT)、コクラウリン-N-メチル化酵素(CNMT)の精製と遺伝子単離に成功した。また、同細胞から調製したcDNAライブラリーが生合成遺伝子の網羅的単離と解析に適していることを明らか

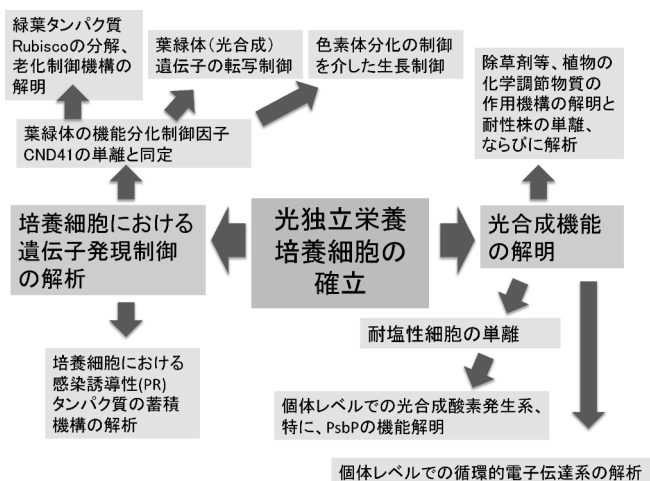


図1 光独立栄養培養細胞系を用いた葉緑体機能の分子メカニズムの解明の概要

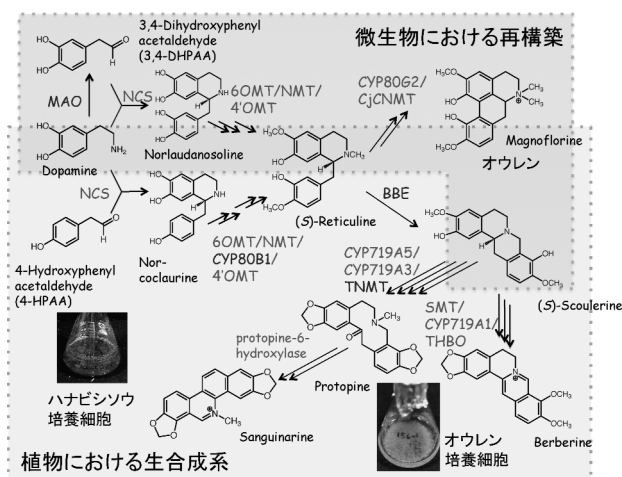


図2 イソキノリンアルカロイド生合成系の分子基盤の解明と微生物における再構築

とし、チロシンに由来するノルコクラウリンからベルベリンに至る9段階のうち7段階の酵素遺伝子、さらには、関連する生合成系の遺伝子の新規な単離と同定を行い、イソキノリンアルカロイド生合成系の解明に大きく貢献した(図2)。一方、筆者らが初めて遺伝子を単離同定したメチレンジオキシ環形成酵素は新規なチトクロムP450ファミリーCYP719に属し、イソキノリンアルカロイド生産性植物に特異的であった。また、コリツペリン合成酵素(CYP80G2)遺伝子は真核細胞から初めて単離された分子内C-Cフェノールカップリング酵素であった。また、オキシゲナーゼ様構造を持つノルコクラウリン合成酵素(NCS)遺伝子の単離と同定にも成功した。

3. イソキノリンアルカロイド生合成系における代謝工学

筆者らが単離した生合成酵素遺伝子は、イソキノリンアルカロイド生合成系の量的・質的改変の技術基盤の構築に極めて有用と考えられた。まず、植物に特徴的に存在する多重遺伝子の個々の遺伝子特異的発現抑制、さらには、共通する保存配列を標的とした網羅的発現抑制においてRNAi法が有効であることを実証するとともに、配列特異的発現抑制と標的配列を除いた過剰発現ベクターの組合せによる、個々の遺伝子機能の解析手法を確立した。また、プロトプラストを用いた一過的RNAi法も開発し、イソキノリンアルカロイド生合成系の包括的転写制御因子の単離にも成功した。

さらに、筆者らは、RNAi法を含む遺伝子組換え技術をイソキノリンアルカロイド生合成系に適用し、代謝工学の基盤構築を試みた。まず、ハナビシソウの形質転換系を確立し、さらに、6OMTがイソキノリンアルカロイド生合成の律速酵素であることを実証した。さらに、ハナビシソウではベルベリンが生合成されないことを利用し、ベルベリン生合成系のSMT遺伝子を導入することによりベルベリン型アルカロイドを含む新規なイソキノリンアルカロイドプロファイルを持つ細胞の創出に成功した。同形質転換細胞を用いた詳細な代謝産物の解析か

ら、新規な分岐経路の導入により二次代謝の多様性が生み出されている仕組みの一端が明らかになっている。一方、RNAi法を用いた遺伝子発現抑制により、他の研究者が容易には成し遂げなかった任意の中間体の蓄積が可能であることの実証にも成功し、イソキノリンアルカロイド生合成系の代謝工学の分子基盤が確立された。

4. イソキノリンアルカロイド生合成系の微生物細胞における再構築

以上のように、イソキノリンアルカロイドの代謝工学の分子基盤が確立されたが、依然、植物の細胞工学/代謝工学における長期間の培養、形質転換系の必要性という課題が存在した。この課題を解決するためには、これまでに単離された生合成遺伝子を用いて、生育の速い微生物系にイソキノリンアルカロイド生合成経路全体を再構築することが重要であるとの視点から、微生物における生合成系の再構築を行った(図2)。具体的には、ドーパミンを微生物由来のモノアミンオキシダーゼ(MAO)により酸化して生成したアルデヒドを基質に植物由来のノルコクラウリン合成酵素(NCS)とそれ以降の生合成酵素と組合せ、ドーパミンからレチクリン、さらには、マグフロリンやスコウレリンといったイソキノリンアルカロイドの合成が可能であることを世界に先駆け実証した。本成果は、微生物における植物アルカロイド生合成系の初めての再構築であり、化学合成では通常困難な天然型(S)体に特異的な光学異性体の合成法を提供する可能性が示された。

5. おわりに

以上、研究室を主宰してから約15年にわたる成果を中心に研究の概要をまとめさせていただいた。このような研究を進めるにあたって思い出すことは、筆者が大学に進学した当時のことである。当時、公害問題はまだ深刻であり、「沈黙の春」で代表される文明の進展に対する懐疑的意識が強かった。一方、大阪万博における「人類の進歩と調和」という基本理念が示すように、科学の進展が社会の調和的発展を可能にするという希望感も強かった。そうしたなか、生物の持つ機能を如何に活かし、利用していくかという農芸化学の理念はまさに、時代を先取りするものと感じられた。幸いなことに、大学院に進学し、植物細胞培養の発展期に巡り合え、農芸化学の一分野である植物バイオテクノロジーの発展にいささかでも貢献できたことは幸いである。もちろん、今までの成果はまだ実用化にはほど遠い段階であるが、さらに、鋭意努力し、その実現につなげていきたいと考えている。

謝辞 学生時代から現在に至るまで、山田康之先生をはじめ、多くの先生方からご指導いただきました。心より感謝申し上げます。本研究は、京都大学大学院農学研究科分子細胞育種学分野ならびに生命科学研究科全能的統御機構学分野の教員、卒業生、在校生ならびに、多くの共同研究者のご協力の成果です。この紙面をお借りして、厚くお礼申し上げます。