



植物細胞工学

岡崎光雄*

1. はじめに

植物の細胞培養は、20世紀初頭 Harberlant (1902) により始められ、又同じ頃 Goebel (1902) は、すべての若い体細胞 (somatic cell) に新しい植物体につくる能力が備わっていること、すなわち分化全能性 (totipotency) をもっているとの概念を与えた。その後、1930年代には White と Gautheret が、それぞれ独立に無限に増殖する植物細胞 (callus) の誘導に成功した。1950年代、植物生長調整物質 (plant hormone) の発見に伴って、Steward, Skoog らにより植物細胞の分化全能性が実証され、植物培養細胞から固体の再生・器官分化が可能となった。これらの基礎研究に立脚して、1960年代に入り培養細胞 (callus) による2次代謝産物 (アルカロイド類、ステロイド類、テルペノイド類など) の生産の研究が活発化した。一方1960年に Cocking が酵素的にプロトプラスト (protoplast) を単離することに成功し、この方法を建部らにより細胞融合に用いられ、その後多くの研究者により体細胞雑種育成、すなわち品種改良に応用されて来ている。

現在、植物組織培養は、遺伝・代謝・発生・分化・病理などの基礎研究と、応用としての植物細胞工学は主に上述の有用代謝物の生産と新品種育成が上げられる。ここでは後者の植物細胞工学の応用について、その可能性と問題点について述べる。

2. 培養細胞による2次代謝物の生産

高等植物は古くから医薬品などとして広く用いられて来っており、植物組織培養法で生産することが可能になれば、それによってもたらされ

る利益は測り知れない。培養細胞による有用2次代謝物の生産は多くの研究者により試みられており、アルカロイド類 (トロパンアルカロイド、タバコアルカロイド、ピンカアルカロイド、イソキノリンアルカロイドなど)、ステロイド類、テルペノイド類、キノン類などほとんどの植物代謝産物は、培養細胞によって生成可能である^{1)~3)}。

しかし、これらの代謝産物は親植物の含量に比較すると、一般には非常に少ない。これについて考えられる要因を挙げると、

i. 多くの2次代謝産物は植物体の分化と関係しており、又分化した特定の器官で代謝生成されるが、カルス自身無限増殖細胞であり、脱分化 (あるいは未分化) 細胞である。

ii. カルス化を行なう場合、植物ホルモン (オーキシニン系; indoleacetic acid (IAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), naphthaleneacetic acid (NAA) など; サイトカイニン系; kinetin (Kin), benzylamino purine (BAP) など) を多量に加え代謝異常にし、無限増殖細胞 (腫瘍) 化している (無限増殖細胞はまた植物病原菌 *Agromobacterium* の有する Ti-プラスミド (tumor inducing plasmid) によって誘導されるクラウンゴール (植物腫瘍細胞) としても得られる)。

iii. 2次代謝産物は細胞増殖にとっては必須物質でなく、増殖をくり返していく (あるいは継代培養していく) うちに、より増殖のよいもの、逆に云うと増殖に必要でない2次代謝の弱い株を選択して行くことになる。

iv. 培養細胞の継代培養をくり返して行くともはや再分化出来ない馴化細胞 (habituated cell) となる。すなわち増殖に必要でない2次代謝物の遺伝子の欠落などが考えられる。

v. 一般に2次代謝産物は多くの代謝経路を

*岡崎光雄 (Mitsuo OKAZAKI), 大阪大学, 薬学部, 薬学科, 助教授, 工学博士, 生物工学

必要とし、その一部でも代謝が衰える（遺伝子の発現が抑制される）とその目的産物は少なくなる。

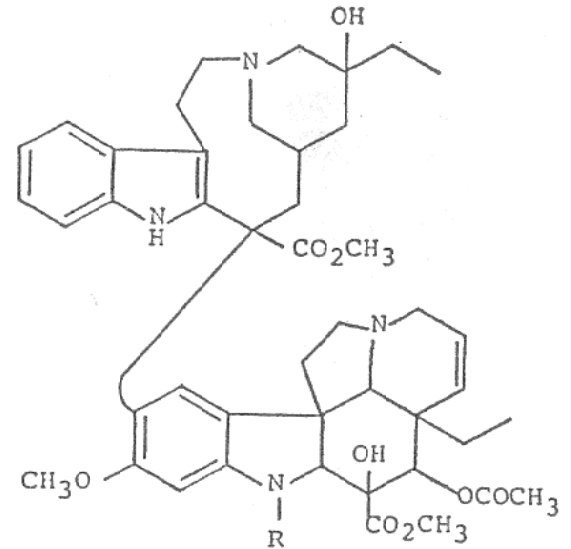
以上のように無限増殖細胞（脱分化・未分化細胞あるいは腫瘍細胞）で、2次代謝物の生産を行なわせること自体矛盾していることであろうか？

ここでは、カルス化細胞より、高生産株の選抜により高い生産株の分離が出来ること、更に馴化細胞でも植物ホルモン制御により、2次代謝物の生産調節が可能であることについて示す。

2. 1 高生産株の選抜

一般に薬用植物を植物ホルモン（主にオーキシン系及びサイトカイニン系）でカルス化すると、その有効成分含量はカルス化時において激減し、さらに継代培養を重ねて行くと、その合成能は徐々に減少して、1～2年でその含量はほとんど検出出来なくなる（親植物含量の1/100以下）。カルス自身ももはや再分化出来ない馴化カルスとなってしまふ。この現象はホルモン異常によるカルス化（腫瘍化）によって、目的代謝の遺伝子、特に2次代謝産物（増殖に直接関係ないと考えられる産物）の遺伝子の欠落あるいは発現の抑制などが考えられている。このカルス化時の細胞は遺伝子的にも非常に不均一な細胞集団であり、種々の生理活性をもつ細胞が含まれているものと考えられている。したがって、クローン保存のための植継ぎ（継代培養）及び培養により、結果的に増殖のみよいが、目的代謝産物、特に2次代謝産物の含量が少ないクローンのみが残る（淘汰される）ことになる。そこでカルス化時及びカルス化の早い時期の高生産株の選抜は、優良クローン株を得るのに非常に有効な手段であるとの報告⁴⁾⁵⁾が多い。

キョウチクトウ科のニチニチソウ (*Vinca rosea*) はビンカアルカロイドとして種々の医薬効果のあるインドールアルカロイドを含有するが、中でも制癌剤であるビンブラステンの高生産株の選抜の例を示す。ビンブラステンは急性白血病治療薬としてすでに市販され、臨床で広く用いられている。しかしこれは dimeric indole alkaloid という複雑な構造を有し（図



VINBLASTINE R=CH₃

図1 ビンブラステン

1), その作用は癌細胞の有糸分裂において紡錘体を形成する microtubular protein に結合し、その細胞分裂中期 (Metaphase) で阻害する。そこでビンブラステンの定量は癌培養細胞を用いた簡易微量バイオアッセイ法を開発して調べた。表1に示すように（未発表）、カルス化後選抜をしないで継代培養を行なえば徐々にビンブラステン含量は低下してしまうが、カルスを小部分に分け、高生産株のみを選抜継代培養を行なえば、ビンブラステンの高生産クローンが得られる。しかし、この高生産株もその後の植継ぎにより含量は減少し、もはや再分化能を有しない馴化カルスとなる傾向を示した。したがってカルス化時およびカルス化の早い時期、すなわち生理活性的に不均一な時期に高生産株の選抜を行なうことは、有効な手段と云える。

2. 2 ホルモン制御による2次代謝物生産の促進

タバコ (*Nicotiana tabacum*) より誘導された馴化カルス (habituated callus) は、植物ホルモン無添加培地でも無限に増殖し、もはや再分化能を示さない。これにオーキシン系植物ホルモンを添加し、2次代謝物の生成促進効果を調べると、表2⁶⁾より明らかなように、ニコチン類は植物ホルモンの indoleacetic acid (IAA) により生成促進され、2, 4-dichlorophenoxy-

表1 ニチニチソウ培養細胞のピンブラスチン高生産株の選抜

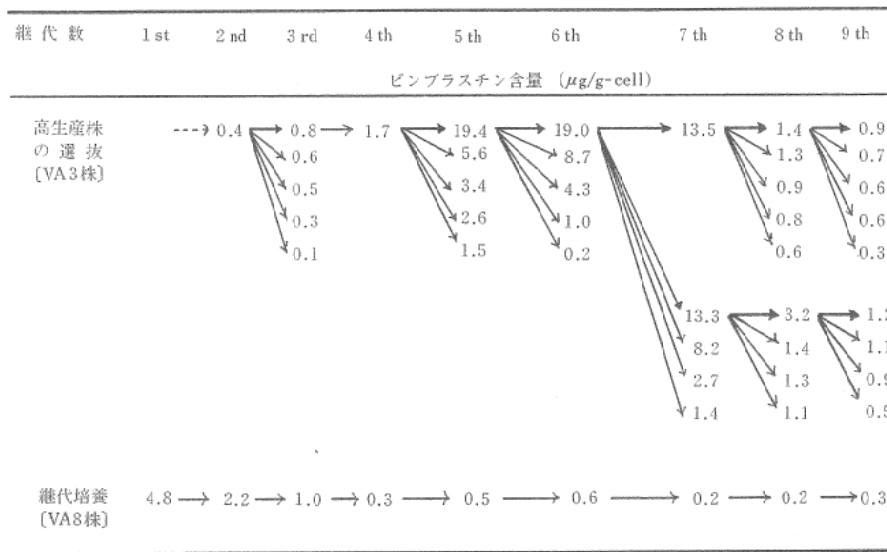

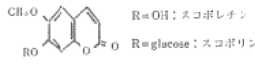
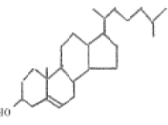


表2 タバコカサの2次代謝産物におよぼすホルモン効果

生産物	ホルモン	IAA	2,4-D
 ニコチン類		+	-
 クマリン類	R=OH: スコポレチン R=glucose: スコポリン	+	+
 ステロイド類		-	+

acetic acid (2,4-D) により抑制された。一方、ステロイド類は逆に 2, 4-D により生成促進され、IAA により抑制されることがわかった。クマリン類は両ホルモンにより促進された。すなわち、培養細胞でも植物ホルモンにより2次代謝物の代謝調節が行なわれていることが明らかである。

更にクマリン類の生成は、サイトカイニン系植物ホルモンである kinetin によって著しく促進された⁷⁾。そこで、この kinetin による促進効果を調べてみると⁸⁾、クマリン生合成の key enzyme である phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 活性が特異的に上昇することがわかった。この kinetin による活性上昇は、蛋白

合成阻害剤である cycloheximide (CHI) 及び RNA 合成阻害剤である actinomycin-D (Act-D) により阻害された (図2)。したがって、kinetin は PAL 遺伝子に作用し、その messenger RNA の転写を促進し、PAL の de novo 合成を行ない、その結果クマリンの生合成が促進されることがわかった。尚、図より明らかのように、kinetin による PAL の messenger RNA の転写促進完了後に、PAL の蛋白合成が始まることがわかる。

一方、オーキシシン系植物ホルモンである 2,4-D によるクマリン類、特にスコポレチンの配糖体 (スコポリン) の生成促進は、この配糖体化酵素である UDP-glucose : scopoletin glucosyltransferase (SGTase) 活性を著しく活性化することにある⁹⁾。この 2,4-D による SGTase の活性化は、kinetin による PAL の de novo 合成促進効果とは異なり、細胞内既存の SGTase の直接の活性化であり、1分子の SGTase に1分子の 2,4-D が共有結合し、SGTase を活性化していることがわかった (表3)。更に、2,4-D 添加によるこの SGTase の活性化には、培養細胞内の SGTase 活性化蛋白及び ATP が必要である¹⁰⁾。尚、この 2,4-D 結合活性化 SGTase は、基質のスコポレチン及び UDP-グルコースに対する Michaelis 定数は変化せず、活性化エネルギーを低下させ酵素触媒反応速度を10倍に高めていた (表3参照)。以上

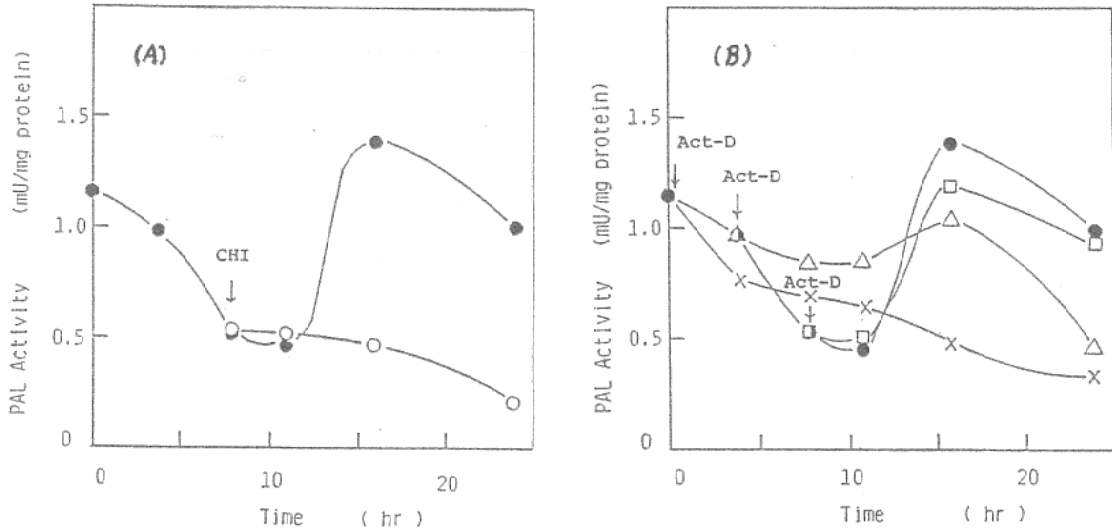


図2 カイネチンによる PAL 合成促進におよぼす阻害剤の影響
 (A) Cycloheximide (CHI) 添加, (B) Actinomycin-D (Act-D) 添加

表3 2,4-D結合による活性化 SGTase の性質

SGTase	Activity per cell (mu/mg-cell)	Specific activity (mu/mg-SGTase)	Molecular weight	Molar ratio of bound 2,4-D to SGTase	Km (mM)		Activation energy (kcal/mole)	Entropy of catalytic reaction (e.u.)
					Scopoletin	UDPG		
2,4-D-bound activated SGTase	0.27	114	45,000	1.2	0.2	0.11	7.0	-40
2,4-D-free SGTase	0.028	11.6	45,000	—	0.2	0.11	12.6	-26

の結果として、2, 4-D 添加による 培養細胞のクマリン類生成が促進されることが明らかとなった。また、以上の知見に基づき、これらのホルモン添加時に目的産物の前駆体であるフェニルアラニンを加えることにより、クマリン生産が著しく促進された。

上述のように、ホルモンフリーで無限に増殖し、もはや再分化能をもたない馴化カルス（脱分化培養細胞）でも、植物ホルモン制御によりかなり特異的に2次代謝まで調節出来ることがわかる。すなわち植物培養細胞における有用物質生産において、その代謝を司る遺伝子群が存在すれば、ホルモン制御により目的産物の生産性を向上させ得る可能性がある。したがってカルス化時の遺伝的に不安定な時期に、目的産物の高生産株の選抜を行ない、目的物質代謝を司る遺伝子の有する優良クローン株を確保

し、さらに植物ホルモン制御により目的産物の生産性を著しく向上させることが期待出来る。

3. 品種改良への応用

植物体細胞の分化全能性 (totipotency) を利用して、体細胞をカルス化し、増殖させた後、不定芽分化・不定根分化・器官分化させて、蘭などの栽培の繁殖に実用化している。また茎頂組織培養より再分化させ、ウィルスフリー植物を得、いや地性のない栽培が可能になり、実用的につかわれている。さらに、培養細胞を用いて、耐塩性、耐寒性、耐病性細胞を選抜し、再分化させて海水や寒地でも育ち、病気に強い植物育種が試みられている¹¹⁾¹²⁾。また禾穀類作物(イネ、トウモロコシなど)では、必須アミノ酸(リジン、トリプトファンなど)の高含量株を作るために、それらのアミノ酸アナログ耐性細

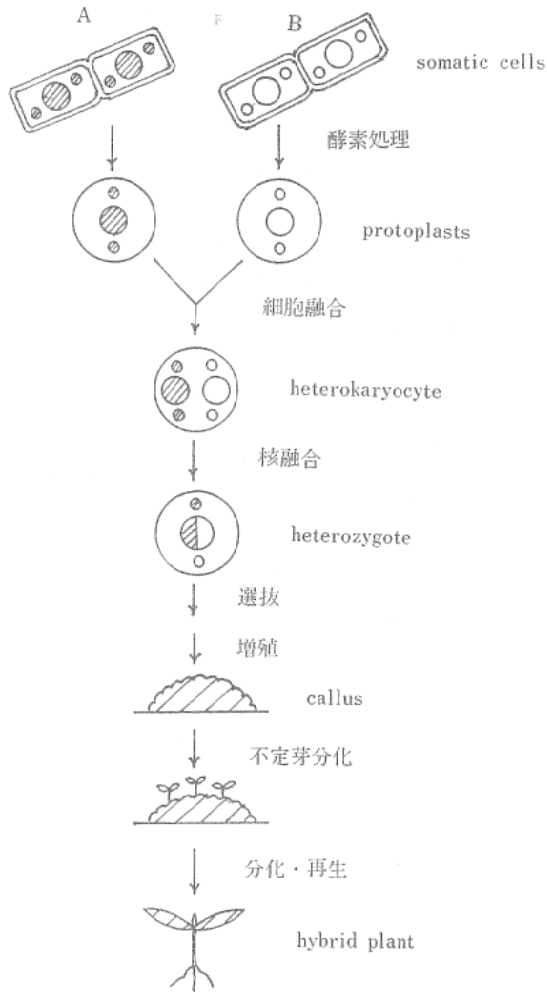


図3 細胞融合による新品種植物の育成

胞を分離し、再分化させて、これらのアミノ酸の高含量株のクローニングも試みられている¹³⁾。他の品種改良の有力な方法は、西独の Melchers の行なったポテトとトマトの体細胞融合により得られた雑種“ポマト”の育成例で示される。

この細胞融合法による新品種育成は、図3に示すように、体細胞組織を酵素処理（セルラーゼ、ペクチナーゼなど）によりプロトプラスト化し、主に polyethylene glycol (PEG) 存在下で細胞融合し、核融合を起した heterozygote を選抜し、細胞培養して再分化させ、雑種植物に育てるわけである。この細胞融合による新品種の育成は、動物細胞に比べて植物細胞の強い再分化能・固体形成能により、今日非常に有力な手段となりつつある。

また、動物細胞融合で実用化しているモノクローナル抗体生産雑種細胞（ハイブリドーマ）のクローニングで代表されるように、植物融合

細胞を用いた有用代謝物の生産も、将来有効な手段となるであろう。

4. おわりに

植物細胞工学の応用の1つとして、培養細胞による2次代謝物の生産で、高生産株の選抜およびホルモン制御による代謝調節で高生産性が得られることについて述べたが、これらの目的物質は一般に非常に複雑で、多くの代謝経路を必要とする。したがって、微生物を宿主とする遺伝子工学では、非常に多くの遺伝子をクローニングさせる必要があり、かつそれらの遺伝子の発現により生成した酵素群が生体内で代謝カップリングを起こさねばならず、現在の微生物遺伝子工学では無理である。また、高生産性にするためには、やはりその含有する植物体を宿主として行なわせる必要があるであろう。この場合、代謝産物生産においても将来分化した親植物の高生産細胞と無限増殖する細胞との融合により、生産能と増殖能を備えた雑種細胞（ハイブリドーマ）の選抜が有効な手段となるであろう。

モノクローナル抗体生産で代表される動物細胞工学に比べて、植物の方は遅れているようにみえるが、植物細胞工学の目的産物が多くの代謝経路を経た代謝産物であり、動物の場合多くの目的産物が単一蛋白であり、この目的産物の差が、植物細胞工学の企業化を困難にしている要因であろう。他の要因としては、モノクローナル抗体生産細胞は、遺伝子レベルで分化したリンパ球細胞（B-cell）であり、又リンパ球自身は単細胞であり、無限増殖細胞（ミエローマ細胞）との融合により増殖能を獲得すれば、いにかえるとミエローマ細胞にモノクローナル抗体産生の遺伝子（染色体）が付与されれば、増殖能のあるモノクローナル抗体産生雑種細胞が得られるわけである。しかし、植物培養細胞では動物細胞のような要求性をもつ増殖細胞（ミエローマ細胞）がなく、雑種細胞（ハイブリドーマ）の選択のための HAT 培地選抜のような簡単な方法が確立しておらず（タバコ培養細胞における硝酸還元酵素欠損株があるのみ）、今後の基礎研究が待たれている。

植物体細胞は動物細胞に比べて、分化・発生能が非常に強く、植物の新品種の育種は動物と比べて容易と考えられる。また植物細胞を宿主とするベクターも植物 DNA ウィルス, Ti-plasmid より開発が進んできており、目的産物の生成能のある植物細胞を宿主として、目的産物の代謝律速遺伝子をこれらのベクターに組込み、律速代謝経路を補充しつつ、より高い生産細胞のクローニングも将来可能となろう。

参考文献

- 1) 古谷 力：植物組織培養，竹内ら編，朝倉書店，P. 349 (1972).
- 2) 三沢正愛：植物細胞組織培養，原田ら編，理工学社，P. 325 (1979).
- 3) 田端 守ら：組織培養，1，120 (1975).
- 4) 西 荒介：細胞工学，1，256 (1982).
- 5) 山田康之：化学工業とバイオテクノロジー(下)，シーエムシー社，P. 103 (1982).
- 6) T. Furuya, H. Kojima and K. Syono: Chem. Pharm. Bull., 15, 901 (1967).
- 7) M. Okazaki, F. Hino, K. Kominami and Y. Miura: Agric. Biol. Chem., 46, 609 (1982).
- 8) F. Hino, M. Okazaki and Y. Miura: Agric. Biol. Chem., 46, 2195 (1982).
- 9) F. Hino, M. Okazaki and Y. Miura: Plant Physiol., 69, 810 (1982).
- 10) M. Okazaki, F. Hino and Y. Miura: Plant Tissue Culture 1982 (Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture), Tokyo, P. 341 (1982).
- 11) M.W. Nabors, S.E. Gibbs, C.S. Bernstein and M.E. Mein: Z. Pflanzen Phisiol., 97, 13 (1980).
- 12) B.G. Gengenback, C.E. Green and C.M. Donovan: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5113 (1977).
- 13) J.H. Widholm: Can. J. Bact., 54, 1523 (1976).

産業界からの

ご原稿を募集します

奮ってドシドシご投稿下さい

内 容： 技術解説，新製品紹介，会社・職場の紹介，職場の話題，随筆，御意見その他

頁 数： 本誌2頁以内
(400字詰原稿用紙8枚以内)

送 稿 先： 〒565 吹田市藤白台5丁目125-18

大阪大学工業会館

社 団 生 産 技 術 振 興 協 会 宛
法 人

- 注 1. 極端なご原稿は編集委員会で掲載をお断わりすることがあります。
2. 掲載のご原稿には、規定の原稿料をお支払致します。
3. 社名・職名・年令・氏名・連絡先と電話番号を明記下さい。
4. 誌上には、社名と氏名だけを発表します。