

研究ノート

植物細胞培養による物質生産への新しい試み

新名 惇彦*

New approach to production of useful compounds by plant cell culture

Key words : tobacco cell, promoter, enhancer, heat-shock element, β -glucuronidase

1. はじめに

1939年 P.R.White がトマトの根端組織を人工培地で培養することに成功した。近年、植物細胞を微生物のように培養し、植物特有の生産物を作らせる試みが盛んであるが、今日まで実用化に至ったのはシコニン、オタネニンジン根組織など数例に限られる。微生物に比べ植物細胞培養の不利な点は次のように要約される。

(a) 植物細胞の生育速度は微生物に比べ極めて遅く、1回の回分培養に数週間を要する。(b) 微生物では一晩から数日で単一コロニーが得られるが、植物は単一細胞からの培養が困難で、多細胞集団から生じたカルスを純化するのに1-2年かかる。(c) 微生物では突然変異により生産性向上が図られるが、類似遺伝子(アイソザイム遺伝子)を複数もつ植物では同時に複数遺伝子を破壊するのは極めて難しい。(d) 複雑な構造をもつ物質の生合成経路は殆ど解っていない。計画的に理論的に生産性向上を目指すには極めて不利である。

これらの問題点を抱えている植物細胞を微生物なみに扱い、工業的に利用するのは容易なことではない。そこで我々は観点を変え、遺伝子組換え技術により物質生産を行わせる、新しい系の開発を目指している。大腸菌はかつては実

験室での遺伝学材料であり、有用物質をつくる工業微生物ではなかったが、今では遺伝子導入によりヒト成長ホルモンやインターフェロンなどの生産が可能になった。植物細胞の中で成長の速いタバコ細胞を大腸菌のように変えようとする試みである。

2. タバコ細胞 (*Nicotiana tabacum* BY2) 改良の概念

タバコの組織培養の歴史は古く、かつての専売公社を中心に20年前に培養条件が確立し、

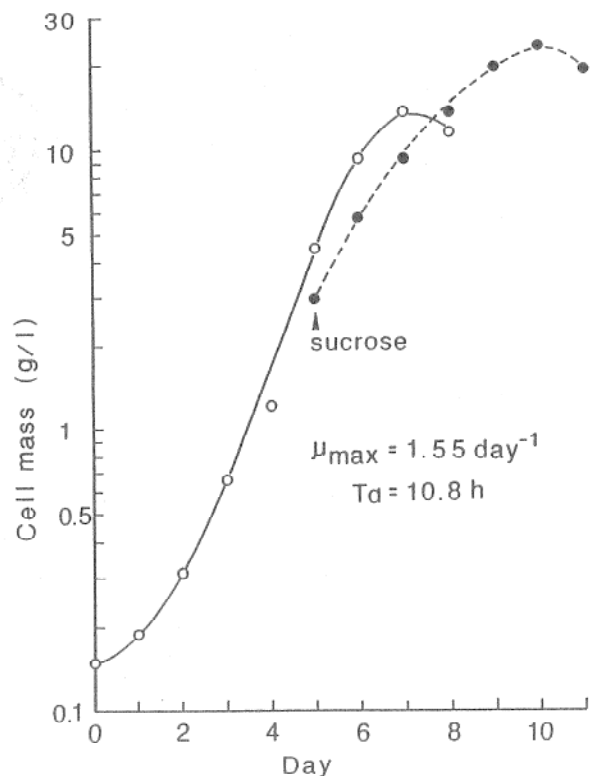


図1 タバコ培養細胞の増殖曲線。MS培地にシュクロース3%を添加し培養した(白丸)。黒丸は5日後に更に3%追加したもの。μ_{max}は最大比増殖速度、T_dは倍加時間。



*Atuhiko SHINMYO
1942年8月27日生
昭和45年大阪大学大学院工学研究科醸酵工学専攻博士課程修了
現在、大阪大学工学部応用生物工学科、細胞工学講座、教授、工学博士、植物細胞工学
TEL 06-877-5111(内線4381)

今も研究材料として汎用されている。図1に培養経過の一例を示す。世代時間は約11時間で7日間の培養で細胞量は50倍になる。また炭素源を補ってやれば乾燥重量で30g/lは得られる。しかしこのままでは有用な生産物は何も蓄積しない。図2に遺伝子導入による改良の概念



図2 タバコ細胞への遺伝子導入による物質生産系の概念。必要な構造遺伝子に種々エレメントをカセット式に連結する。

を示す。将来、有用代謝物質合成に関する複数の構造遺伝子をタバコ培養細胞に組み込み、生産させることを目指す。遺伝子を高発現させるための有効プロモーター・エンハンサーおよび遺伝子発現を誘導・抑制できる種々のシスエレメントが必要である。現在、モデル系として構造遺伝子としては β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を用い、これを作動させる制御遺伝子の検索を行っているので、以下に紹介する。

なお、タバコ細胞への遺伝子導入はTiプラスミドに組み込み、*Agrobacterium tumefaciens* 感染系を用いるが、詳細については紙面の関係上省略する。

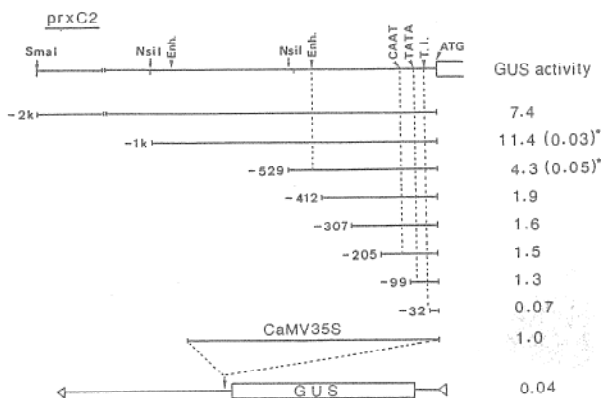


図3 西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ遺伝子, *prxC2*, 上流の転写活性。GUSとの融合遺伝子をタバコプロトプラストに導入し、1日培養後のGUS活性をCaMV35Sプロモーターの活性を1.0として比較した。括弧内の数字は上流断片を逆向きに連結したもの。制限酵素部位、エンハンサー配列(Enh), プロモーター配列(CAATとTATA), 転写開始点(T.I.)を上示す。マイナスの数字は翻訳開始点からの塩基対。

3. 植物細胞で有効なプロモーター

これまでに西洋ワサビとシロイヌナズナからペルオキシダーゼ遺伝子を7種類^{1), 2)}, キュウリからアスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子を1種類³⁾, クローニングし構造決定した。各遺伝子の5'上流配列の機能解析を行っているが、高発現プロモーターがいくつか見つかった。図3には西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ遺伝子, *prxC2*, のプロモーター活性を示す。GUSとの融合遺伝子をタバコプロトプラストに導入しGUSの一過性発現量を比較したものである⁴⁾。1kbp断片は植物での強いプロモーター、CaMV35S, の10倍以上の活性を示した。この中には動物遺伝子のエンハンサー配列, ATTTGCAT, が2ヶ所所在し、これらを欠失させると転写活性はそれぞれ1/3, 1/2に低下した。*prxC2*上流断片は応用可能なプロモーターの有力候補である。この断片には-289bpに傷害で発現が誘導されるシス配列の存在が明らかになった。また、アスコルビン酸オキシダーゼ遺伝子上流も、レポーター遺伝子としてGUSあるいはホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用いたタバコ細胞での解析で強い転写活性を示した。

4. 熱ショックエレメント

発現制御可能なシスエレメントの候補として、

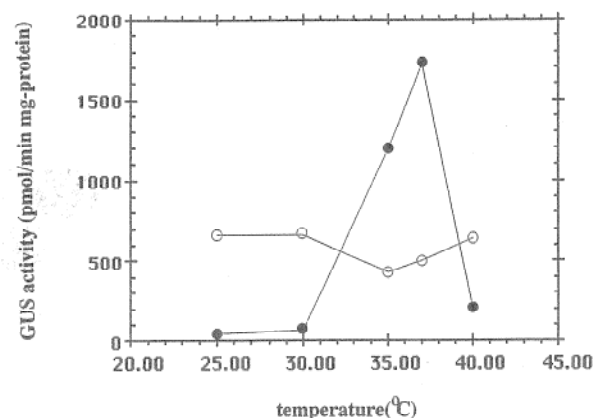


図4 タバコ培養細胞でのシロイヌナズナの熱ショックエレメントの転写活性の温度依存性。GUS遺伝子とHSP18.2遺伝子上流(●)またはCaMV35Sプロモーター(○)の融合遺伝子をもつ細胞を各温度で2時間培養した時のGUS活性。

シロイヌナズナで熱ショックにより誘導される HSP18.2 遺伝子を選んだ。この遺伝子上流約 700bp 断片を GUS に連結しタバコ培養細胞の染色体に組み込んだ。この細胞を種々温度で 2 時間培養したときの GUS 活性を図 4 に示す。植物細胞の生育温度は 25-28℃ が最適であるが、期待どおり 35-37℃ で強い発現を示した。培養温度のシフトにより遺伝子発現の ON-OFF 制御が可能であり、応用面のみならず植物の遺伝子発現解析にも有用である。

HSP18.2 遺伝子上流は植物成長ホルモンであるナフトレン酢酸 (NAA) によっても誘導される。5' 側から順次欠失させることにより NAA 応答に関するシスエレメントは翻訳開始点上流 -167bp 以内に存在することが解った。

5. おわりに

遺伝子導入によるタバコ培養細胞による有用物質生産系作製の研究に着手したばかりであるが、優良プロモーターや制御配列のいくつかの候補が見つかった。今後詳細な解析により制御領域の最小単位を決定する予定である。また、

植物細胞は増殖が遅いことが大きな欠点であるが、動物・酵母において細胞の周期 (DNA 複製期や細胞分裂期) を支配している遺伝子群が解ってきた。我々もタバコ細胞で同様の遺伝子数種について解析を進めている。これが解明されれば、細胞の成長速度を人工的に速めることが可能かも知れない。

文 献

- 1) Fujiyama, K., Takemura, H., Shinmyo, A., Okada, H., Takano, M. : Gene, 89, 163 (1990).
- 2) Intapruk, C., Higashimura, N., Yamamoto, K., Okada, N., Shinmyo, A., Takano, M. : Gene, 98, 237 (1991).
- 3) Ohkawa, J. Okada, N., Shinmyo, A., Takano, M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 1239 (1989).
- 4) Kawaoka, A., Sato, S., Nakahara, K., Matsushima, N., Okada, N., Sekine, M., Shinmyo, A., Takano, M. : Plant Cell Physiol., 33, 1143 (1992).

