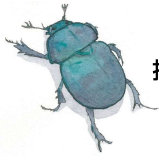


植物の有用成分を生産させる‘器’はなにが適切か？

～高度機能分化した植物組織による植物特化代謝産物の生産に向けて



技術解説

村中俊哉*

What is the most suited host to produce plant useful metabolites?
- Towards production of plant specialized metabolites by highly-developed plant tissue culture system

Key Words : metabolic engineering, plant tissue culture, synthetic biology, saponin, genome editing

1. はじめに

動物とは異なり、植物は自ら動くことができない。植物は、周囲のさまざまな環境に適応するために、多様な代謝経路を進化させ多様な化合物を合成する能力を獲得してきた。このうち、アミノ酸、核酸、脂肪酸、糖質など全ての生物に普遍的に存在する化合物は一次代謝産物と呼ばれている。それに対し、特定の生物種が産生する代謝物は二次代謝産物と呼ばれていた。近年、植物化学の研究領域では二次代謝産物を、特化代謝産物 (specialized metabolites) と呼ばれる傾向にある。特化代謝産物は、その構造や生合成過程から、フェノール基を含む化合物であるフェノリクス、窒素原子を含み、多くの場合塩基性を示す化合物であるアルカロイド、および、炭素数5のイソプレノ単位から生合成される化合物群であるテルペノイドに大別される。特化代謝産物は、草食動物、カビ、植物病原菌などから植物を保護する、花粉を媒介する昆虫を誘引する、あるいは、他の植物や微生物との共生に関与すると言われているが、それらの植物内での機能は未だ明らかとなっていないものが多い。一方、特化代謝産物の多くがヒトに対して何らかの生理活性を示すため、古くから植物は生薬、化粧品、香料などさまざまな用途に利用されてきた。植物界に存在する特化代謝産物は

20万種を超えると推測された¹⁾が、その後、各種データベースの精査、メタボロミクス技術の発展などにより、100万種を超えると推定する論文もある²⁾。

近年、これらの特化代謝産物の生合成、構造多様性を統合的に理解しようとする「ファイトケミカルゲノミクス」研究³⁾が進み、特化代謝産物の生合成に関わる遺伝子が数多く単離、機能解析されてきた。本稿では、特化代謝産物を医薬品原料など各種機能性素材としての応用の観点から、どのような生産法が適切か、私たちの研究成果も交えながら、将来展望について述べる。

2. 微生物を用いた植物特化代謝産物の生産

植物特化代謝産物の多くは、構造異性体によって生理活性が全く異なる。また、化学合成が困難であったり収率が悪い場合が多い。そのため、植物体からの抽出が一般的であるが、ごく限られた植物種の限られた組織、器官で生合成され蓄積すること、植物種によっては絶滅危惧種になっているものもあるため、これらの代替生産法の開発が求められてきた。そのため、目的とする特化代謝産物の生合成に関わる遺伝子の機能を明らかにし、微生物に遺伝子導入することにより目的物質を生産する研究開発が数多くなされている。

アルテミシニン、ヨモギ属植物であるアルテミシア・アヌアのみが生産する。アルテミシニンは、特化代謝産物のテルペノイドであり、炭素数15のセスキテルペノイドに分類される。セスキテルペノイドは、炭素数15の直鎖化合物であるファルネシル二リン酸 (FPP) を出発物質として、テルペン合成酵素による環化反応ののち、シトクローム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) による酸化反応などにより多様な化合物が生合成される。アルテミシニ



* Toshiya MURANAKA

1960年3月生まれ
現在、大阪大学 工学研究科 生命先端
工学専攻 細胞工学領域 教授
博士 (農学)
TEL : 06-6879-7423
FAX : 06-6879-7426
E-mail : muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

ンの生合成では、アモルファジエン合成酵素 (ADS) による環化、続く、CYP716AV1 による一連の酸化反応により生合成中間体であるアルテミシニン酸が生合成される。米国のベンチャー企業である Amyris 社は、これらの酵素遺伝子を出芽酵母に導入することにより、酵母でのアルテミシニン酸の生産に成功した⁴⁾。アルテミシニン酸は比較的簡単な化学反応により目的物質であるアルテミシニンに変換された。さらに合成生物学的手法を適用し、アルテミシニン酸のタイター 25 g/L を成し遂げ⁵⁾、この手法によりアルテミシニンが実際に製造されている。この研究に代表されるように、酵母あるいは大腸菌といった微生物で植物特化代謝産物を生産させる研究が、現在さかんに実施されている。

私たちの研究グループも、後述する薬用植物カンゾウの甘味成分であるグリチルリチンの生合成遺伝子である二種の P450 (CYP88D6, CYP72A154) の機能を明らかにし^{6, 7)}、出芽酵母に導入することにより、グリチルリチンの生合成中間体であるグリチルレチン酸製造に向けた開発研究を実施している。

3. 微生物での植物特化代謝産物の生産は万能ではない

それではすべての植物特化代謝産物において、生合成遺伝子の機能がわかりさえすれば、それらの遺伝子を微生物に導入して物質生産系を開発することができるのであろうか。現状はそう簡単ではない。前述のアルテミシニンにおいても、出芽酵母での生

産はアルテミシニン酸までであり、化学合成によりアルテミシニンに変換される (図 1a)。私たちが取り組んでいるグリチルリチンについても、酵母での生産は現時点ではグリチルレチン酸までである。また、タイヘイヨウイチイの樹皮に含まれるパクリタキセルは、抗がん剤として用いられているが、酵母による生産は、最終産物に至るまでまだ多くの合成ステップがあるタキサジエン酸化物に留まっている (図 1b)。さらに、生薬ムラサキの根に含まれるシコニンも、染料として古くから利用され、抗炎症作用がある物質であるが、酵母で生産することは全くできない。一方、植物組織培養を利用することにより、パクリタキセル、シコニンともに生産が可能である。特に、シコニンは、1980 年代に我が国で世界初の植物特化代謝産物の工業生産をなし得た物質である (図 1c)^{8), 9)}。

以上のように、少なくとも現状においては、微生物での特化代謝産物の生産法は万能ではなく、目的とする化合物ごとに生産に向けた研究開発戦略を立てる必要がある。

4. 植物によるサポニン生産研究のとりくみ

4-1. 背景

トリテルペノイド、ステロイドなど C30 の炭素骨格を基本とするテルペノイドの配糖体は、サポニンと呼ばれる。植物に含まれるサポニンには、不快味や食中毒の原因になるものがある一方、機能性食品素材や医薬原料となる有用なものがある。これら

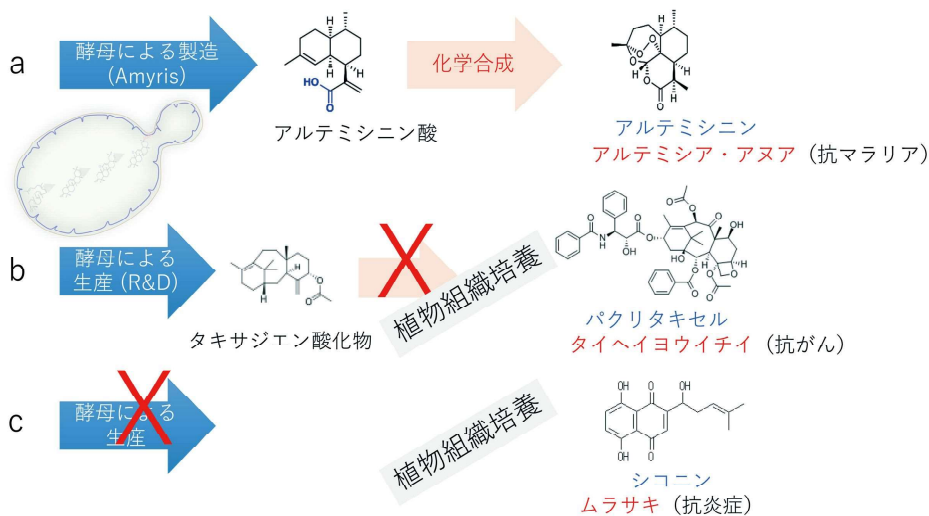


図 1. 微生物での植物特化代謝産物製造は万能ではない

有用サポニンの多くは、栽培植物ではなく自生植物から抽出することで生産されている。そのため、品質のばらつき、価格の不安定化、資源植物の枯渇化、砂漠化を含む環境破壊などの問題があり、有用サポニン生産のための新たな産生技術の開発が求められている。わたしたちは、ダイズやジャガイモなどの作物が有する不快味や食中毒の原因となる食品にとっては不要なサポニン産生能を、カンゾウのグリチルリチン（甘味・肝治療剤）やヤマイモのジオニン（医薬ステロイド原料）といった有用サポニンの産生力に「スイッチング」させるための生合成制御技術を開発することを目的として、大阪大学、神戸大学、理化学研究所、農研機構、キリン株式会社による共同研究を実施している。

4-2. ダイズ トリテルペノイドサポニンの代謝改変

マメ科植物に種々のトリテルペノイドサポニンが含まれている。マメ科ダイズのソヤサポニンは抗脂血、抗酸化など様々な薬理作用を持つ一方で、グループAサポニンは苦味・収斂味といった不快味の主要原因となることから、食品としてのダイズにおいては不要とされる物質である。ダイズが産生するソヤサポニンとカンゾウが産生するグリチルリチンは、ともにトリテルペン骨格のβ-アミリンを共通の中間体とし、その後、β-アミリンの異なる部位が酸化されることで生合成経路が分岐する。わたしたちは、β-アミリンからソヤサポニン、あるいは、グ

リチルリチンへの経路を触媒する代謝酵素遺伝子の機能を明らかにした。さらに、ダイズが有する内在性の酸化酵素遺伝子の発現を抑制し、グリチルリチン生合成に関わる酵素遺伝子群を導入したダイズを作出し、代謝の「スイッチング」が生じるかどうか調べた。その結果、作出したダイズ系統においてグリチルリチン生合成の中間体が蓄積することを見出した（図2）。

4-3. ジャガイモ ステロイドサポニンの代謝改変

ジャガイモの新芽や皮に含まれるソラニン、チャコニンといったステロイドサポニン（一般にステロイドグリコアルカロイド（SGA）と称される）は、不快な苦味を持つ上に食中毒の原因となる物質である。一方、ステロイドサポニンにはヤマイモに含まれ医薬用ステロイド薬剤の原料として重要であるジオスゲニン配糖体のジオシンなど、薬理作用をもつ化合物が数多く見いだされている。ジャガイモのソラニン生合成経路を、ジオシンと共通の前駆物質であるコレステロールの下流からジオシン経路に「スイッチング」することも可能だと考えた。わたしたちは、ステロイドサポニンの生合成に関わる種々の代謝酵素遺伝子の機能を明らかにした。さらに、ソラニン生合成に関わる酵素遺伝子の一つを発現抑制したジャガイモを作出したところ、元の不要ステロイドサポニンであるSGAは大幅に減少し、ジオスゲニンの構造異性体であるステロイド配糖体を蓄積できることがわかった¹⁰⁾。

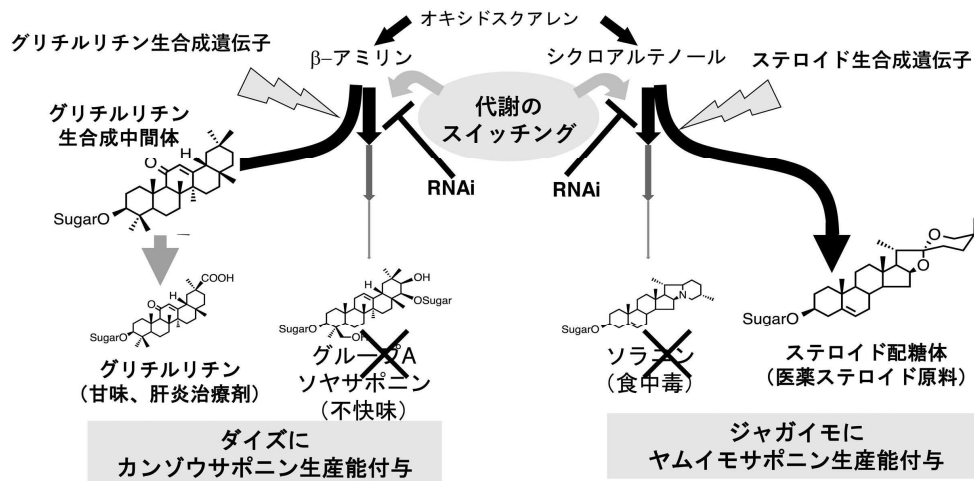


図2. 作物における有用サポニン産生制御技術の開発

4-4. 高度機能分化した植物組織の利用

以上、これらの研究により、トリテルペノイドサポニン、ステロイドサポニンのいずれも、「代謝スイッチング」が可能であり、代謝スイッチングのコンセプトがこれにより確立された。さて、実際、これらのサポニン生産を考えた際、いくつかの解決すべき課題があることがわかった。まず一つ目は、組換え作物となってしまうため、現状では我が国での実証はハードルが高いことである。植物工場による生産であれば、実施可能性が高いが完全密封型の植物工場では初期投資が高額になると予想される。

二つ目は、これらの化合物の含量が、植物体全体で考えると必ずしも高いとはいえないことである。多くの植物特化代謝産物は、植物体全体に満遍なく分布しているのではなく局在している場合が多い。たとえば、前述の抗マラリア活性を有するアルテミシニン¹は、葉の表皮の組織「トリコム」に偏在する。私たちがターゲットとしているサポニンの蓄積部位を調べると、まず、ダイズのソヤサポニンは、種子胚に含まれており、胚の成熟にしたがって含量が増加することがわかった。さらに、ジャガイモにおけるステロイドサポニンは、主として緑化した茎葉に蓄積した。そこで、これらの特化代謝産物を高濃度に蓄積させるには、高度機能分化した植物組織を作出し、植物体ではなく植物組織培養として生産することができるのではないかと考えた。植物組織培養においては、植物胚をミミックする不定胚を誘導することができる。また、茎葉のみを分化させた

茎葉培養組織も作出することができる。このような不定胚誘導、あるいは茎葉誘導は、元もと、優良種苗のマイクロプロパゲーション技術として確立されたものである。この種苗生産に用いられた手法を物質生産に適用しようと考えたわけである。さらに、このマイクロプロパゲーション技術を有する共同研究機関であるキリン株式会社では、同時に、極めて安価な袋型培養システムによる植物組織培養技術を持ち合わせていた(図3a)。袋型培養システムは、低コストで、しかも一つ一つが小規模であるため、たとえコンタミが起こったとしても廃棄ロスが低減でき、しかも、組換え植物組織を袋ごとに物理的に容易に封じ込めることができる優れたシステムであると考え、このシステムを用いた高度機能分化した植物組織によるサポニン生産を検討することとした。さらに同時に、実際目的とするサポニンが植物組織、器官のどこに局在するかを視覚化するために、イメージング質量分析の手法も取り入れることとした。

4-5. 高度機能分化した植物組織培養によるサポニン生産

まずステロイドサポニンについては、ヤマイモにおけるステロイドサポニン合成関連遺伝子を高発現させ、さらに、ジャガイモのステロイドアルカロイド合成に関わるP450遺伝子を発現抑制するベクターを構築し、アグロバクテリム法によりジャガイモへ導入して培養組織を選抜した。選抜した培養組織を袋型培養システムを用いて茎葉を増殖した。

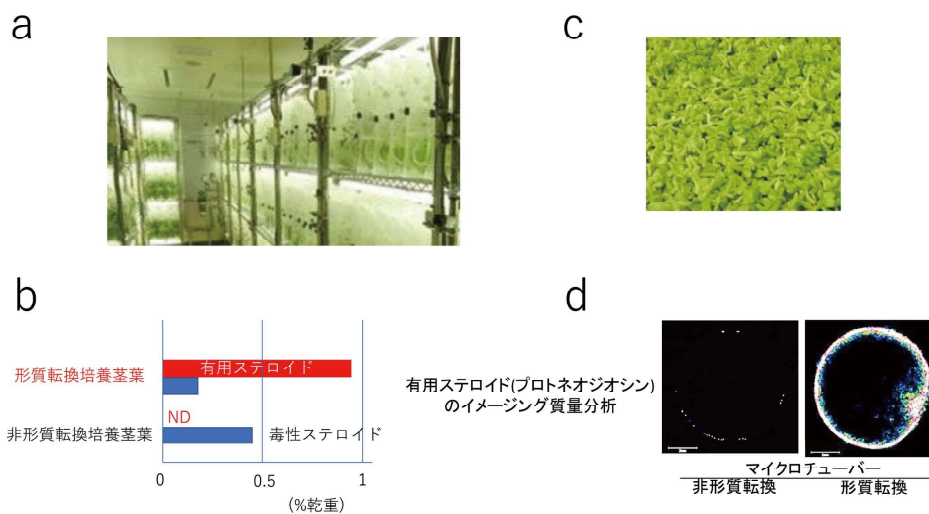


図3 a; 袋型培養システム、b; 形質転換ジャガイモ茎葉培養による有用ステロイドの蓄積、c; 高度機能分化したダイズ不定胚培養、d; 有用ステロイドのイメージング質量分析

植物ホルモン、糖濃度、光条件などステロイド含量に影響を及ぼす要因を検討した結果、有用ステロイドを高蓄積することができた (図3b)。さらにトリテルペノイドサポニンについては、ダイズでの均一な不定胚培養条件を確立することができ (図3c)、ダイズの内在性サポニン生合成遺伝子の自然突然変異体の集積等と外来遺伝子導入により、有用トリテルペノイドを蓄積するダイズ不定胚培養組織を作出することができた (石本ら、未発表)。またイメージング質量分析の最適化により、ジャガイモマイクロチューバーでのステロイド蓄積を検出することができた (図3d)。

以上、サポニン高蓄積培養組織を創出し、袋型培養システムを用いた大量培養技術の基盤が確立できた。現在、実用化に向けたステージにチャレンジしているところである。

5. 植物で特化代謝産物の製造メリット

植物あるいは植物組織で特化代謝産物を製造するメリットとして、その他以下のような可能性がある。

- i) 抗がん剤として使用されるポドフィロトキシンという化合物がある。これは、アメリカミヤオソウという北米原産の植物が産生する物質である。しかしながらこのような外来の植物材料については、日本が名古屋議定書に批准したことから、今後使用に制限がかかる可能性がある。一方、国産の植物には、ポドフィロトキシンには至らないが、中間体を産生する植物がある。したがって、この国産の植物に数種類の生合成酵素遺伝子を導入することにより、目的とするポドフィロトキシンを産生する植物を作出できる可能性がある (図4a)。
- ii) 前述の抗マラリア薬であるアルテミシニンは、

アルテミシア・アヌアでのみ産生されるが、この植物種がアルテミシニンを生合成するには、ADS 遺伝子の有無が鍵であることがわかった¹¹⁾。アルテミシア・アヌアは一年生の草本であるが、他の多年生のアルテミシア属植物にADSを導入することによりアルテミシア・アヌア以外でアルテミシニンを産生できる可能性がある (図4b)。

iii) ジャガイモシストセンチュウの孵化促進物質であるソラノエクレピンは、テルペノイドの誘導体と考えられる。この化合物の生合成遺伝子の全容解明には時間がかかると思うが、それを待たずしても、鍵となる遺伝子の発現増強等で、生産量を増大できる可能性がある (図4c)。

iv) 現時点では動物を原料としているビタミン類、脂質等を植物由来に代替することによりヒト感染ウイルス等からのリスク回避、今後需要が見込まれるモスリムのハラール対応となる可能性がある。

6. おわりに

以上、植物の有用成分を産生するホスト～器はなにが適当か、微生物 vs 植物の観点から述べてきた。ターゲット物質の種類と性質、使用する用途により微生物か植物かを切り分けたいと考える。世界の潮流は微生物での物質生産ではあるが、我が国は、1980-90年代のバイオテックブームの際に確立された職人芸とも言える植物組織培養技術を有し、天然物化学も強い。これらと最新のメタボロミクス、情報科学、ゲノム編集、さらには機械学習、AIなどの技術、知見を取り入れることにより、日本独自のユニークな植物 (組織培養) による物質製造法が確立できると期待している。

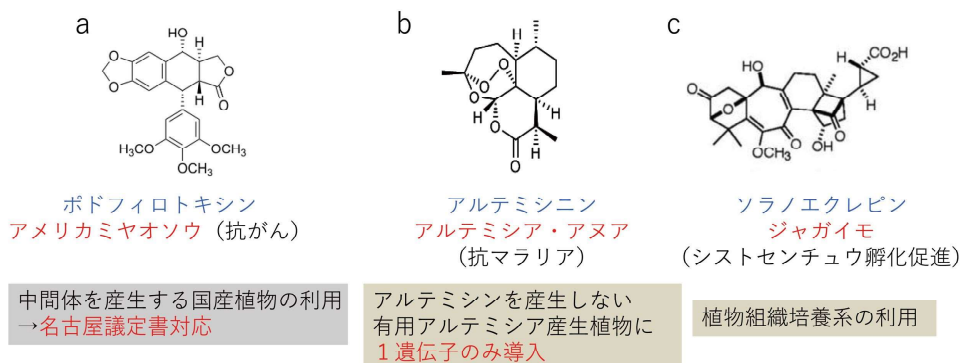


図4. 植物 (組織) による植物特化代謝産物製造のメリットの例

参考文献

- 1) Dixon RA, Strack D (2003) Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry* 62: 815-816.
- 2) Afnedi FM, Okada T, Yamazaki, M et al. (2012) KNApSack Family Databases: Integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.* 53: el (1-12).
- 3) Muranaka T, Saito K (2013) Phytochemical genomics on the way. *Plant Cell Physiol.* 54: 645-646
- 4) Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440: 940-943.
- 5) Paddon CJ, Westfall PL, Pitera DJ, et al. (2013) High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496: 528-532.
- 6) Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K and Muranaka T (2008) Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 105: 14204-14209.
- 7) Seki H, Sawai S, Ohyama K, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Fukushima EO, Akashi T, Aoki T, Saito K and Muranaka T (2011) Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *Plant Cell* 23: 4112-4123.
- 8) Tabata M, Fujita Y (1985) Production of shikonin by plant cell cultures. In: Zaitlin M, Day P, Hollaender A (eds) *Biotechnology in Plant Science*. Orlando, pp 207-218.
- 9) Yazaki K (2017) *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures: Present and future aspects. *Plant Biotechnology* 34: 131-142.
- 10) 秋山 遼太, 中安 大, 梅基 直行, 村中 俊哉, 水谷 正治 (2017) 毒をつくらず薬をつくるジャガイモの分子育種をめざして. *植物の生長調節* 52, 92-98.
- 11) Muangphrom P, Seki H, Suzuki M, Komori A, Nishiwaki M, Mikawa R, Fukushima EO, Muranaka T (2016) Functional analysis of amorpho-4, 11-diene synthase (ADS) homologs from non-artemisinin-producing *Artemisia* species: the discovery of novel koidzumiol and (+)- α -bisabolol synthases. *Plant Cell Physiol.* 57: 1678-1688.

