

研究領域 2

9

## 遺伝子操作を基盤にした薬食生産のための植物の活用

Molecular farming for production of pharmaceutical and nutraceutical compounds

生活健康科学研究科 食品栄養科学専攻  
食糧細胞工学研究室

小林 裕和 Hirokazu Kobayashi

Laboratory of Plant Cell Technology, Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka



### プロフィール ■ Profile

1954年 京都府福知山市 生まれ  
1977年 鳥取大学農学部 卒業  
1982年 名古屋大学大学院農学研究科 満了(農学博士)  
1982年 名古屋大学農学部 日本学術振興会奨励研究員  
1983年 ハーバード大学生物学教室 日本学術振興会海外特別研究員  
1984年 名古屋大学イノベーション総合センター 助手  
1991年 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科 助教授  
1993年 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 客員助教授(兼任, 1998年まで)  
2003年 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科 教授

1954 Birth, Fukuchiyama, Kyoto  
1977 Graduate, Faculty of Agriculture, Tottori University  
1982 Ph.D., Plant Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Nagoya University  
1982 JSPS Postdoctoral Fellow, School of Agriculture, Nagoya University  
1983 JSPS Postdoctoral Fellow for Research Abroad, Biological Laboratories, Harvard University  
1984 Assistant Professor, Radioisotope Research Center, Nagoya University  
1991 Associate Professor, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka  
1993- Associate Professor (Adjunct), National Institute for Basic Biology  
1998- Associate Professor, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka  
2003

### 連絡先 ■ Address

T E L 054-264-5582  
+81-54-264-5582  
F A X 054-264-5584  
+81-54-264-5584  
e-mail hirokoba@u-shizuoka-ken.ac.jp  
U R L http://sfn.s.u-shizuoka-ken.ac.jp/pctech/

### 序論

21世紀は、高齢化社会に加え、食糧不足と地球環境の悪化が見込まれ、環境と調和した維持的な社会の成熟が望まれる。植物は、太陽エネルギーを利用して、大気中二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)から炭水化物を合成し(光合成)、これが人間の食糧源となる。大気中CO<sub>2</sub>の蓄積は、地球温暖化の元凶であり、したがって、植物は地球温暖化の抑制にも資する。健康長寿に寄与する薬効成分・機能性食品の多くは植物由来であり、この供給源としての植物のさらなる活用・改良が望まれる。自然環境と経口摂取に対して安全な植物遺伝子操作技術の開発を基盤として、薬食生産のための植物の有効活用を目指す。

### 成果

植物に限らず、遺伝子組換え操作には、遺伝子組換え体を選抜するために、「選択マーカー」と呼ばれる遺伝子が不可欠となる。植物の選択マーカーとしては、抗生物質耐性遺伝子や除草剤耐性遺伝子が使われるが、これらの主たるものは細菌由来である。抗生物質耐性遺伝子は、薬剤耐性菌の出現につながる危険性もあり、とりわけ歓迎されない。遺伝子組換え農作物の作出に必要な選択マーカーを本来食に供している植物などから提供すべきと考える。一方、遺伝子組換え農作物からの花粉を介した外来遺伝子の飛散が懸念され、これは、「遺伝子汚染」として問題視されている。植物の主な遺伝情報(ゲノム)は、細胞核に存在するが、細胞における「光合成」工場である「葉緑体」もゲノムを有する。この遺伝情報は、ほとんどの植物では花粉に移行しないため、葉緑体ゲノムへの遺伝子導入により、花粉を介した遺伝子汚染の危険性が回避できる。安全な遺伝子組換え植物を作出する技術として、植物由来の選択マーカーを用いた葉緑体遺伝子導入法を開発した。この目的に対する選択マーカーとして、葉緑体で行われるアミノ酸合成の酵素に着目し、この酵素に各種アミノ酸置換を導入して、これらの変異型酵素の除草剤耐性を検討した。除草剤耐性型アミノ酸合成酵素の遺伝子を用いて、アブラナ科植物やタバコへの葉緑体遺伝子導入を試みた(図1)。本法により、市場に受け入れられやすい遺伝子組換え農作物や植物による医薬品の生産が可能になる。

本「21世紀COEプログラム」助成期間内の研究成果の実用化を目指し、遺伝子組換え植物の作出に加えて、植物培養細胞を用いた薬効成分・機能性食品の生産を指向している。植物細胞は、一般に、糖添加培地を用いて従属栄養的に培養される。しかしながら、植物は、光合成を伴った独立栄養生長において、葉緑体から多種の基質の供給が可能であるため、葉緑体機能が発達した緑の培養細胞系の樹立が望まれる。この目的に対して、モデル植物シロイヌナズナより、複数の「緑化遺伝子」のクローニングに成功した(図2)。

### 展望

開発した安全な選択マーカーを用いて、茶培養細胞の遺伝子操作を試みている。この技術を用いて、緑化遺伝子およびフラボノイド合成系の遺伝子を導入することにより、茶培養細胞を用いたカテキン(ポリフェノール)の生産を狙う。加えて、他植物の培養系も開発し、機能成分としてラズベリー香気成分やホップ苦み成分、薬効成分としてクロモン類(抗アレルギー薬)の生産を目指す(図3)。さらに、レタス等へのIgA抗体遺伝子の導入により、食べて感染症を抑制する野菜の育成を指向する(図3)。

### Introduction

Exhaustion of food supplies, aggravation of the environment worldwide, and aging of the human population are predicted for the 21st century. Nonetheless, a mature society in which humanity can achieve healthy aging and longevity and can live in harmony with nature is desired. Plants can utilize solar energy and synthesize carbohydrate food supplies from atmospheric CO<sub>2</sub>. Excess atmospheric CO<sub>2</sub>, the primary cause of the greenhouse gas effect on the earth, can be absorbed by plants. Most medicinal pharmaceuticals and health promoting nutraceuticals are derived from plants. Therefore, improvement of plants can have important implications for human societies. Moreover, development of gene manipulation methodologies to produce plants that are safe both for the environment and being consumed, are of great value.

"Selectable marker" genes are required for production of genetically-modified plants. Selectable markers are used to select plants in which genes of interest have been successfully integrated into genomes of host plants. There is particular interest in introducing genes that will give plants tolerance to antibiotics or herbicides, the majority of which are derived from bacteria. The safety of such genes, especially for that confer antibiotic resistance, is suspicious because it is possible that the genes might be transferred into pathogenic bacteria which may then convert to antibiotic-resistant strains. There is also fear is "genetic pollution" of wild-type plants or other crops by foreign genes from genetically-modified plants. The majority of genetic information (genome) is located in nuclei in plant cells, and there is a relatively small number (some 100 or so) genes that are present in plastids, i.e. in the chloroplasts. Since genes in plastids in most plant species are inherited maternally, those genes are not transferred to other plants via pollen. Therefore, the development of genetic manipulation of plastid genomes, instead of nuclear ones whose engineering has been established, is necessary for ecological safety.

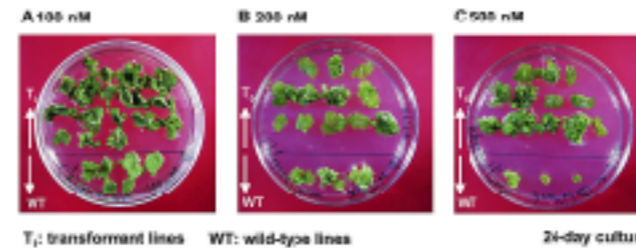
### Results

Methodology for effective and reliable manipulation of plastids with plant-origin selectable markers is highly desired in order to satisfy both the need for selectable markers and to avoid the chance of genetic pollution. To this end, we have focused our research on an enzyme involved in amino acid biosynthesis in plastids. A variety of amino acid substitutions have been introduced into this enzyme and its tolerance to herbicides has been evaluated. We have made constructs to express them in plastids in brassica plants and tobacco (Fig. 1). We are developing this strategy so that it may be applied for improvement of crops and production of pharmaceuticals and nutraceuticals in plants.

We expect that this technology will be ready for application within the period of "COE Program in the 21st Century", and the employment of transgenic cultured plant cells for production of pharmaceuticals and nutraceuticals would be more promised than the establishment of new plant cultivars genetically modified. Plant cells are usually cultured under heterotrophic conditions in supplementation with sugar, resulting in nongreen cells propagating. However, plant cells are vital for production of a variety of substrates with the function of green chloroplasts. We have succeeded in isolating a few genes for "greening" via stimulation of biogenesis of chloroplasts (Fig. 2).

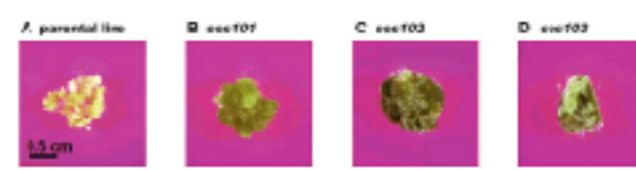
### Perspectives

Putative selectable markers are being tested in transformed tea cells in culture. We are cultivating catechin-producing tea cells in which a selectable marker gene combined with a gene for flavonoid biosynthesis has been introduced. Raspberry flavors and hops bitters as functional compounds, and anti-allergic chromones as medicines are planned to be produced in other plant systems (Fig. 3). Furthermore, lettuce plants that accumulate IgA against infectious microbial antigens are being generated (Fig. 3).



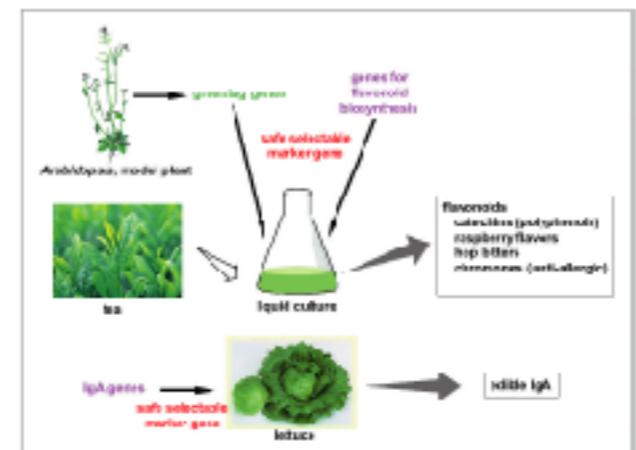
【図1】新規形質転換選択マーカーとしての安全なシロイヌナズナ由来除草剤耐性変異型アミノ酸合成酵素の遺伝子の開発。遺伝子を葉緑体ゲノムに導入したタバコ形質転換システムを用いて異なる濃度の除草剤に対する耐性を評価した。

【Fig.1】Development of a novel selectable marker of mutagenized *Arabidopsis* gene for an enzyme for amino acid biosynthesis which is insensitive to herbicides. Tobacco lines in which the gene was integrated into the plastid genome were exposed to different concentrations of a herbicide.



【図2】従属栄養培養においても葉緑体が発達し多種の基質を合成させる「緑化遺伝子」の活用。「緑化遺伝子」の発現によりシロイヌナズナ根から誘導した従属栄養培養細胞は緑色を呈した。

【Fig.2】"Greening genes" conferring chloroplast function to generate a variety of substrates on plastids in heterotrophically-cultured cells. Cultured cells derived from *Arabidopsis* roots exhibited green due to expression of the genes.



【図3】「遺伝子操作を基盤にした薬食生産のための植物の活用」研究スキーム。モデル植物シロイヌナズナを用いて発見した「緑化遺伝子」およびフラボノイド合成系遺伝子を独自の安全な形質転換選択マーカーを用いて茶培養細胞に導入し、各種機能性成分および薬効成分を生産する。また、安全な形質転換選択マーカーを用いて食べて感染症を抑制するレタスを生産する。

【Fig.3】Schematic representation of strategies for "molecular farming for production of pharmaceutical and nutraceutical compounds". "Greening genes" discovered with the model plant *Arabidopsis* and genes for flavonoid biosynthesis are introduced into cultured tea cells by our original selectable marker gene, resulting in production of functional and medical compounds therein. The selectable marker gene is also employed for generation of lettuce which protects humans against pathogen by being eaten.

### 代表的な研究業績/Major Publication and Achievements

1. Y. Niwa, S. Goto, T. Nakano, M. Sakaiya, T. Hirano, H. Tsukaya, Y. Komeda, and H. Kobayashi: *Arabidopsis* mutants by activation tagging in which photosynthesis genes are expressed in dedifferentiated calli. *Plant Cell Physiol.*, **47**, 319-331 (2006)
2. T. Iwaki, K. Haranoh, N. Inoue, K. Kojima, R. Satoh, T. Nishino, S. Wada, H. Ihara, S. Tsuyama, H. Kobayashi, and A. Wadano: Expression of foreign type I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39) stimulates photosynthesis in cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 cells. *Photosynth Res.*, **88**, 287-297 (2006)
3. H. Kobayashi, H. Kato, and M. Shimizu: Symbiotic aspects of participation of multiple  $\sigma$  factors in functional chloroplasts. In "*Endosymbiosis and Eukaryotic Organelles*" (M. Sugiura, R. Oelmüller, and J. Obokata, eds.), *Finkdruck Apolda, Apolda*, pp. 235-245 (2004)
4. 後藤新悟, 丹羽康夫, 小林裕和: アクティブーションタギングと葉緑体機能発現。蛋白質核酸酵素 増刊, 共立出版, **50**, 1921-1922 (2005)
5. 小林裕和(発明者), 静岡県(出願人): 植物に環境ストレス耐性を付与するポリヌクレオチド。2005-71774; PCT/JP2006/305328 (特許出願番号), 2005年3月14日; 2006年3月13日(出願日)