

食糧と機能性食品生産のためのバイオテクノロジー

小林 裕 和

大学院生活健康科学研究科 教授



こばやし ひろかず

1954 年生まれ.

1982 年名古屋大学大学院農学研究科博士課程修了 (農学博士).

1982 年日本学術振興会奨励研究員

1983 年米国ハーバード大学生物学教室研究員

1984 年名古屋大学アイソトープ総合センター助手

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 (併任, 1998 年まで).

2003 年より現職.

担当科目は, 食糧細胞工学特論 (大学院), 食糧遺伝子工学, 遺伝子と生命 (分担) など.

主な著書に, 分子生物学の展開: 5 巻 植物分子生物学 (分担執筆, 朝倉書店, 1997),

Symbiosis and Eukaryotic Organelles (分担執筆, Thuringen University Library, 2004).

主な原著論文に, 葉緑体遺伝子の転写制御 (英文) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 巻 (1997)]. 耐塩機構 (英文) [*Plant Cell*, 11 巻 (1999)]. 強光耐性機構 (英文) [*J. Biol. Chem.*, 274 巻 (1999)].

はじめに

静岡県は, 男性の平均寿命が 78.15 歳 (2000 年統計, 全国第 8 位), 女性は 84.95 歳 (全国第 14 位) であり, 比較的長寿県といえる. 全国老年人口 (65 歳以上) は 2,300 万人であり, 老人医療費は 12 兆円/年になる. 近年, 国民年金の議論が沸騰しているが, 少子化に伴い老人医療費増大の社会的負担の問題は解決が困難である. 人は皆, 健康で長生きをしたいと考えるが, この本能を満たす方策が見いだされれば, これは医療費増大の社会的問題の解決にも通じる. 世界に目を転じれば, 餓死者は, 28 人 (うち子供 21 人) /分であり, 餓死人口はなんと 1,500 万人/年になる. 世界の 2/3 以上の人は, 空腹を満たされていない. さらに世界人口は増加傾向にあるため, 2030 年ごろに「世界食糧恐慌」が予測される. 一方, 地球環境の破壊は現在も進行しつつあり, 熱帯雨林は 13 万 km²/年 (北海道と九州を合わせた面積) ずつ減少し, 不毛乾燥地帯は 6 万 km²/年 (九

州と四国を合わせて面積) ずつ増大している。人類の将来は楽観的とはいえない。

人が生きていく上で必要な「衣食住」において、とりわけ「食」の重要性は高い。これは、「医食同源」といわれるように、健康の源でもある。「住」としては、地球環境が危機である。バイオテクノロジーを駆使して「食」を改良・増産することは可能であろうか？ これにより、最近注目される特定保健用食品の開発に貢献することも可能になるのではないか？ また、地球に緑を取り戻す上でバイオテクノロジーは寄与できないか？

植物由来の遺伝子を用い外来遺伝子が飛散しない安全な遺伝子操作

植物も動物も (微生物も)、生命の設計図は遺伝情報として DNA と呼ばれる物質に保存され、それは子孫に受け継がれる。この DNA を操作することにより、植物や動物の性質を変えることが可能になる。これを「遺伝子操作」、そしてでき上がったものを「遺伝子組換え」生物 (植物、農作物、動物: *genetically modified organism*, GMO) あるいは食品 (*genetically modified food*, GM food) 等という。これは、「バイオテクノロジー」における強力な方法論である。遺伝子操作をした農作物を食べても大丈夫だろうか？ 1999年5月に著名な科学誌「ネイチャー」に掲載された一編の記事が一躍注目を集めた。それは、アメリカ大陸を移動し、「皇帝蝶 (*monarch butterfly*)」の英名を持つオオカバマダラをめぐるものであった。この幼虫は、トウワタの葉を食べて大きくなる。トウワタ葉に遺伝子組換え害虫抵抗性トウモロコシの花粉をまぶして、オオカバマダラの幼虫に食べさせたところ、4日間で幼虫の44%が死亡した。これが契機となり、ヨーロッパで遺伝子組換え農作物の不買運動が起こり、これは日本に飛び火した。これを受けて、日本では、2001年4月より遺伝子組換え食品の表示が法令化された。これは市民運動の成果である。なお、オオカバマダラ幼虫の死は、自然界では起こり得ない実験条件下での出来事であり、そのまま遺伝子組換え害虫抵抗性トウモロコシの危険性を示すものではないことを、上記記事を執筆した研究者自身もその後認めている。遺伝子組換え農作物は、日本には、1996年に7品目について輸入が認可された。それらのうち、3品目は上記のトウモロコシに代表される害虫抵抗性遺伝子組換え農作物であり、4品目は除草剤耐性遺伝子を組込んだダイズあるいはナタネであった。これらの功罪については、各種議論があるが、米国ではこれら遺伝子組換え農作物は、5-10%の収量増加をもたらしており、この点からは世界的に見た食糧・飼料の増産に貢献している。

厚生労働省によって輸入が認可されている遺伝子組換え農作物は、現時点で57品目に及び、現在でも害虫抵抗性と除草剤耐性農作物は代表的なものである。害虫抵抗性や除草剤耐性の遺伝子は、ともに細菌に由来する。これらの遺伝子に加えて、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である。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、これらもまた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、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生物から提供できないかと考える。一方、遺伝子組換え農作物は、研究目的以外の国内での栽培は未だ認められていないが、この研究圃場栽培は、本年2月より法令化された。この際、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、北海道、茨城県、滋賀県などで反対運動が激化した。植物の細胞には、太陽光を受けて酸素を発生し空気中の炭酸ガスから糖を生産する工場が存在し、これを「葉緑体」と呼ぶ。この葉緑体にある遺伝情報は、通常の植物では花粉に入らないため、花粉を介した「遺伝子汚染」の可能性が回避できる。本講師の研究室では、植物由来 (したがって安全) で遺伝子汚染を伴わない (花粉を介して外来遺伝

子が飛散しない) 夢の「選択マーカー」を開発している。

食糧生産および地球温暖化の元凶となる炭酸ガスの除去に役立つ植物

植物細胞内の葉緑体 (上述) は、太陽エネルギーを利用して空气中炭酸ガスを固定し糖 (食糧源) を合成する能力 (光合成能) を有している。この能力は、つぎの2点において人類の生存と密接な関係を有し、植物なしに人は生存できない。第1は、食糧の供給であり、第2は、地球に温暖化をもたらす炭酸ガスの除去である。この重要な光合成の反応機構の全貌はすでに明らかにされているが、光合成反応の律速段階は、光条件によっても異なり画一的な議論は困難である。しかしながら、限定された空間における炭酸ガス濃度を実験的に上昇させると、植物は見違えるばかりに生長する。すなわち、光合成反応において炭酸ガスを固定する酵素であるルビスコ (Rubisco) の活性が、植物生育の律速になっていると考えられる。

本講師らは、食糧生産性が高くかつ炭酸ガス固定能の高い植物を遺伝子操作により作出するために、その標的をルビスコに置き、その遺伝子改変を試みた。約25年前、現存するルビスコの中で最も高い活性を光合成紅色硫黄細菌 (クロマチウム) 由来のものに見いだしたことが、研究の発端になっている。このルビスコは、植物の2.5倍の炭酸ガス固定能力を有していた。本講師らは、世界に先駆けこのルビスコの遺伝子を取り出し、大腸菌において大量に発現させ解析する実験系を1985年に発表した。その後、欧米を中心に、ルビスコの遺伝子を改変し炭酸ガス固定能を増強する実験が精力的に試みられたが、成功には至らなかった。本講師らは、遺伝子のどこを改変すればルビスコの酵素活性が増大するかを推定し、遺伝子を改変後、改変遺伝子を大腸菌で発現させた。その結果、自然界に存在する最も活性の高い光合成紅色硫黄細菌のルビスコの活性をさらに倍増させることに成功した。植物では、ルビスコの働きに関する遺伝情報は、葉緑体DNAに保存されている。今後、前項で紹介した葉緑体への遺伝子導入技術により、このルビスコ (スーパールビスコ) を植物に導入し、植物の生産性および炭酸ガス固定能の増大を検討していく。

塩や乾燥に強い植物

人の呼吸や燃料の燃焼に必要な酸素は、植物の光合成によって水から生産される。植物は光合成に伴う発熱を水の蒸散によって除去しており、植物にとって、水の有効利用は、その生存に関わる最重要課題である。植物が利用できる水分の枯渇という点において、塩ストレスは乾燥ストレスと類似する。不毛砂漠乾燥地帯は、地表陸地の1/3までも占め、これはさらに毎年拡大している。砂漠乾燥地帯における植物栽培および緑化を図るためには灌漑が必要であるが、水の確保が可能な場合も、水分蒸発による土壌中塩分 (主としてNaCl) の地表層集積が問題になる。なお、地球上に分布する塩集積土壌の総計は955万km²と報告されており、これはアメリカ合衆国国土面積に匹敵する。一方、海岸乾燥地域においては、希釈海水灌漑も考えられる。いずれの場合も、植物に塩耐性が要求される。塩および乾燥に対する耐性を植物に付与するために、その機構の解明は急務である。

灌漑方法および土壌の改良、また現存する植物の中で乾燥および塩に強い栽培種や樹木を用い、乾燥地域の植物栽培および緑化が試みられている。これらの努力に加え、バイオテクノロジーの方法論により、新たに耐乾耐塩性を植物に付与できないものかと考える。耐塩植物としては、熱帯・亜熱帯の汽水地域に生育するマングローブがよく知られており、海水 (約3%のNaClを含む) の1/4から1/2の塩濃度において生育が良好であり、海水の濃度でも生存できる。一方、塩に比較的強い栽培植物としては、オオ

ムギ、テンサイ、およびワタが挙げられ、これらは 0.5 % NaCl でも減収を伴わないことが知られている。

現在までの研究においては、既存の耐乾耐塩植物の解析が中心であるが、新たに耐乾耐塩性を他の植物に付与するためには、まずそれを支配する遺伝子を取り出されなければならない。最終的には、その遺伝子を必要に応じて改変し、目的とする植物への導入が指向されるべきである。植物の耐塩機構としては、浸透圧調節物質の蓄積 (例えば、ナメクジに塩を振りかけるとナメクジは体内から水分を奪われ死に至る。同様に植物も塩にさらされると水分を吸収できず枯死する。これを回避するには細胞の中に外部の塩に相当する濃度の物質を蓄積しておく必要がある)、高塩土壌からの能動的な水分吸収、体内中 NaCl の積極的除去、および塩耐性光合成能力の獲得などが考えられる。また、植物のストレス応答遺伝子発現に興味を持たれている。これらのうち、浸透圧調節物質の蓄積あるいは乾燥誘導性遺伝子の発現を人為的に制御することにより、植物への環境ストレス耐性の付与の成功例がある。しかしながら、環境ストレスに対する耐性および応答機構の全貌は明らかにされていない。講師らは、遺伝学的解析に適したシロイヌナズナを用い、光合成独立栄養生長が耐塩性になった突然変異体を選抜することを通して、その未知の耐塩機構を解明したいと考えた。

野生体は完全に枯死する条件下 [1.2~1.5% (200~250 mM) NaCl, 海水の約半分あるいは生理的食塩水の 2 倍弱の塩濃度] で生存できることを指標に、変異原処理したモデル実験植物シロイヌナズナの実生から、耐塩性突然変異体を選抜した。合計 148,300 個体から 2 系統の光合成生育耐塩性突然変異体 *pst1* (*photoautotrophic salt tolerance 1*) および *pst2* を得た。*pst* 植物体の耐塩性は、実生の時期から植物体が成熟するまで維持されることを確認した。塩ストレスがない条件で生育させた *pst1* 個体の形態において、野生体と有意な差異は見い出されなかった。研究の過程において、光照度が野生体の塩ストレスに影響を与えることを見出した。生育に適した照度 (3,000~5,000 ルクス) は、塩ストレス下では、野生体の生育を大きく阻害し、照度の上昇は、さらに塩ストレスを強めた。この結果は、塩ストレスによって、光合成の際に活性酸素 (細胞に有害) が生じている可能性を示唆している。塩ストレスにさらした *pst1* 植物体においては、葉緑体における活性酸素消去系として知られているスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) およびアルコールペルオキシダーゼという酵素の活性が顕著に増大していた。このことから、*pst1* は活性酸素に耐性になった結果、塩ストレスに対しても耐性になっていると考えられた。ここで紹介した *pst* 耐塩性突然変異系統においては、耐塩性誘導機構を抑制する遺伝子に変異が起こったものと考えられる。すなわち、植物は塩に強くなる機構を持っているにもかかわらず、それが抑制されていることになり、これは、植物を含む生物の起源が海にあることと無縁とは思われない。現在、これら *pst* 耐塩性突然変異系統において耐塩性を支配している遺伝子を特定している。遺伝子が明らかになれば、モデル植物シロイヌナズナではなく、これらの遺伝子を農作物等に導入あるいはそれらにおいて破壊することにより、塩析出土壤や乾燥地帯での農業生産や緑化の促進に貢献できるものと考えられる。

日焼けし難い植物

光は、光合成に必要な唯一のエネルギー源であり、光合成反応により、我々人類を含めた地球上の生命の維持に必要な酸素と糖 (食糧) を提供する。ところが、光は諸刃の剣であり、過剰な光は光合成生物に有害である。植物種によって光感受性は異なり、陰生植物は光障害を受け易い。また、植物の生育ステージによっても感受性は異なり、実生は成熟植物よりも障害を受け易く、農業上は遮光されることが多い。光合成の進行に不

利な低温下，低炭酸ガス濃度下で光障害を受けやすいことも知られている．このように，光合成が強光のもとで阻害を受ける現象は「強光阻害」と呼ばれるが，その機構には不明な点が多い．

従来，強光耐性植物の作出にあたっては，光合成の過程で産生される活性酸素（上述）の消去系が着目されてきた．活性酸素消去系として，スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）やアルコールペルオキシダーゼなどの活性を増大させるために，これら遺伝子の高発現系が植物に導入され，その効果が検証されてきた．一方，光合成において，光のエネルギーを受け止める装置の部品である D1 タンパク質について，タンパク質工学的な手法を用いて，タンパク質の一次構造の改変が試みられてきたが，強光耐性光合成生物の作出には至らなかった．

本講師らは，この問題点を克服するために，まず，試験管内で D1 タンパク質遺伝子をランダムに改変した後，光合成生物に返し，強光耐性を獲得している遺伝子導入体を選抜し，その D1 タンパク質遺伝子を取り出して DNA の塩基配列を決定し，変異アミノ酸を特定するという方法を試みた．ランダムに改変された D1 タンパク質のうち，強光耐性能を獲得するようになった D1 タンパク質の出現する頻度は，1 アミノ酸置換を想定すると， $1/6,536$ と計算される（詳細は省略）．この実験を満足させるだけの遺伝子導入頻度を高等植物で得ることは容易ではなく，また強光耐性変異株の選抜の簡便さも加味し，植物型光合成を営む原始的な生き物であるラン藻シネコシスティスを実験に供することとした．本ラン藻の D1 タンパク質遺伝子（「*psbA*」と呼ぶ）に対して試験管内ランダム突然変異誘導を行ない，野生型表現型のシネコシスティスに導入した．これらの遺伝子導入株を，野生株が正常に生育できない強光条件下（24,000 ルクス）で選抜し，約 500,000 の遺伝子導入株から約 50 の光耐性株を得た．

光耐性株として得られたすべての株の *psbA* の DNA 塩基配列を決定した結果，同一株と判断されるものが複数存在し，最終的に 18 の異なる株が選抜されたことが明らかになった．つぎに，野生型 *psbA* 遺伝子に，ここで明らかになったアミノ酸置換を部位特異的突然変異誘導により導入し，これらアミノ酸置換の強光耐性付与への関与を確認した．これらの実験により，D1 タンパク質の限定された部位（1 ないし複数箇所）に生じた変異が重要なことが明らかになった．これらの変異は，その変異部位から 4 グループに大別できた．植物においては，*psbA* 遺伝子は葉緑体 DNA に保存されている．したがって，前述の葉緑体遺伝子操作により，植物葉緑体への強光耐性 D1 タンパク質遺伝子の導入が可能になる．この実験が成功すれば，日焼けし難い栽培植物創製への新たな道が開かれる．

おわりに

食糧生産性および炭酸ガス固定能の高い植物，また乾燥地での生育に必要な耐塩性植物，さらに日焼けしにくい植物の作出は，実験室のレベルでは数年以内実現可能であると考えられる．一方，現在までの遺伝子組換え農作物は生産者にメリットが大きく，消費者には利点が見えにくい．しかしながら，身近な一例として，静岡名産のメロンに，講師らが開発した安全な遺伝子組換え植物作出法を用い，これらの生産性増大，乾燥耐性，強光耐性の遺伝子を導入すれば，地域農業振興への貢献は大きい．消費者へのメリットとしては，生産性・生産効率の増大に伴う販売価格の低下に加えて，既に，遺伝子操作によりビタミン E や C を高蓄積する植物が作出されており，今後，健康や長寿に一層有効な農作物あるいはそれらに由来する特定保健用食品の提供が見込まれる．食糧・環境問題に関して，最終的に地球規模で人類に恩恵をもたらすには，政治的かつ経済的努力が伴わなければならないが，よりよい生活と子孫の繁栄を願う個人の思いが集約され，

世論として遺伝子組換え植物の重要性が顧みられれば、人類の将来は悲観的ではないはずである。

参考文献・記事

以下 "<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/pctech/pdf/>" にて全文 (PDF) 公開

全般

1. 人類の未来を救うスーパー植物への期待. *VEGA (技術者情報マガジン, 静岡新聞社)*, **49**, 1-2, 1997.
2. 小林裕和, 池内昌彦: 光合成. 「分子生物学の展開, 5巻 植物分子生物学」, 山田康之 編, 朝倉書店, pp. 99-120, 1997.
3. 飢餓を救う植物遺伝子組み換え. *静岡新聞*, 2001年8月4日.

植物由来の遺伝子を用い外来遺伝子が飛散しない安全な遺伝子操作

(特許出願のため詳細は非公開)

4. 植物と21世紀維持型社会. *静岡新聞*, 夕刊, 2002年8月24日.

食糧生産および地球温暖化の元凶となる炭酸ガスの除去に役立つ植物

5. 光合成機能を2倍に: 作物の収穫を増大. *日刊工業新聞*, 1996年4月9日
6. K. Uemura, N. Shibata, Anwaruzzaman, M. Fujiwara, T. Higuchi, H. Kobayashi, Y. Kai, and A. Yokota.: A role of structural intersubunit microheterogeneity in regulation of activity in hysteresis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biochem.*, **128**, 591-599, 2000.

塩や乾燥に強い植物

7. 小林裕和, 小林京子: 新しい高等植物耐塩機構: 劣勢遺伝子支配. *バイオサイエンスとインダストリー*, **58**, 489-490, 2000.
8. K. Tsugane, K. Kobayashi, Y. Niwa, Y. Ohba, K. Wada, and H. Kobayashi: A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active-oxygen detoxification. *Plant Cell*, **11**, 1195-1206, 1999.

日焼けし難い植物

9. 小林裕和, 佐藤公行: 日焼けし難いラン藻. *バイオサイエンスとインダストリー*, **54**, 27-28, 1996.
10. Y. Narusaka, M. Narusaka, K. Satoh, and H. Kobayashi: *In vitro* random mutagenesis of the D1 protein of the photosystem II reaction center confers photo-tolerance on the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23270-23275, 1999.