

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580279

研究課題名（和文） 代謝経路を改変したエリート植物細胞工場による有用物質生産

研究課題名（英文） Production of useful compounds by plant cell factories established by metabolic engineering

研究代表者

北村 美江 (KITAMURA YOSHIE)

長崎大学・環境科学部・教授

研究者番号：40108337

研究成果の概要（和文）：石油資源に頼らず、医薬用や工業用として、有用な様々な有機化合物を植物細胞により生産することを行った。数種の植物の細胞と毛状根を用い、遺伝子組換え、及びストレス負荷法により、新たに代謝経路を構築したものや誘導したものを確立した。その中で有用化合物の生産能の極めて高い、エリートクローンを選抜したところ、遺伝子組換えしたものでは、その生産能が工業用に応用可能なものが得られた。また、ストレス下で新たに有用物質を多量生産するものがみつかった。

研究成果の概要（英文）：The productions of medicinally and industrially useful organic compounds were accomplished by plant cells in place of petroleum resource. Both cell cultures and hairy roots harboring or induced new metabolic pathways were established via either genetic engineering or artificial stress application. Among them a genetically engineered clone was able to produce hilly amounts of such a compound that seemed to be possible to apply industrial production. In addition, a clone was found to produce a large amount of new compounds under stress condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：植物機能学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：エリート植物細胞・有用物質生産・代謝工学・ストレス・組織培養

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は炭酸同化を始めとした無機物の有機物への変換から植物特有の多様な二次代謝産物の生産に至るまで、様々な物質を生産している。この生産は非常に巧妙にコントロールされたミクロの空間で進行する最も効率的な精密細胞工場とすることができる。

に要するコストの低減の観点から、また安全性の点でも、医薬品から生活用品に至るまでの我々の生活に必要な有機物質を可能な限り、植物の持つこの機能を利用して生産することが望まれる。

## (2) 排出二酸化炭素ガスの削減や環境保全

## 2. 研究の目的

(1) 従来合成化学を基盤として生産されて

いる工業製品や医薬品の原料を植物の持つ物質生産能を用いて高生産させる。

(2) 遺伝子導入や細胞選抜、ストレス応答法により新たに代謝機能を構築・誘導し、選抜したエリート細胞を用いて、有用有機物質の生産を行うための基礎的開発を行う。

### 3. 研究の方法

(1) *Agrobacterium rhizogenes* を用いて、微生物由来の *HCHL* 遺伝子をビート(*Beta vulgaris*)に導入し、毛状根のクローンを多数確立した。

① 遺伝子の導入を PCR で、導入遺伝子の発現は RT-PCR と Western blot で、代謝産物の生産を HPLC で分析した。

② 遺伝子導入の根の強度に与える影響の調査には引っ張り試験を行った。

(2) *Agrobacterium rhizogenes* を用いて、ヒヨスとハマボウフウス(*Glehnia littoralis*)の毛状根を確立した。これらの根にストレス負荷法として、鉄欠乏条件とアスコルビン酸処理、その両者を組み合わせて、処理した。

① 処理後に生産された furanocoumarin や riboflavin、未知の新物質は HPLC で定量した。

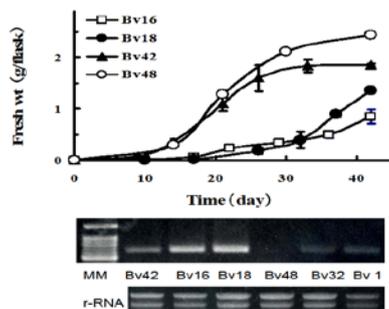
② 細胞毒性の検定はエバンスブルーによる染色法で行った。ラジカルの検出には ESR 法を用いた。

③ 未知の新物質は大量培養後、培地から酢酸エチルで抽出し、HPLC で分離分取し、精製した後、NMR, IR, MS 等で解析し、構造を決定した。

### 4. 研究成果

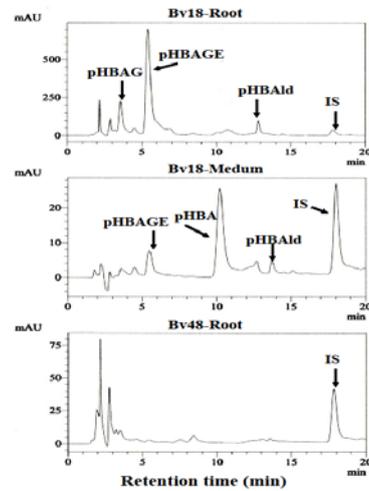
(1) *HCHL* 遺伝子を導入したビート毛状根による有用物質の生産

① 遺伝子発現の強いもの、弱いもの、無いものを選び、根の増殖を比較したところ、発現の強いクローンは発現しないものや弱いものと比較して、増殖がやや劣った。



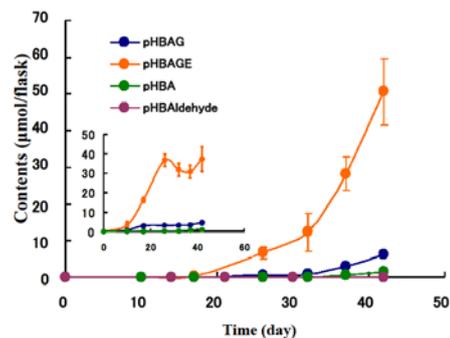
図：遺伝子発現と生長のクローン間の相違

② 主たる代謝産物として、液晶や医薬品の原料として有用な p-hydroxybenzoic acid (pHBA) の配糖体が検出された。



図：遺伝子高発現株 Bv18 および非発現株 Bv48 による生産物の HPLC クロマトグラム

③ *HCHL* 遺伝子の発現の強いクローンほど生産量が高かった。中でも、クローン Bv18 は pHBA 誘導体を乾燥重量で約 14% 生産する超高生産株であることが判明した。しかも、主な誘導体がグルコースエステル (pHBAGE) であるため、容易に加水分解され、原料として pHBA を回収し易い、これまでに報告の無い優良クローンであることが判明した。



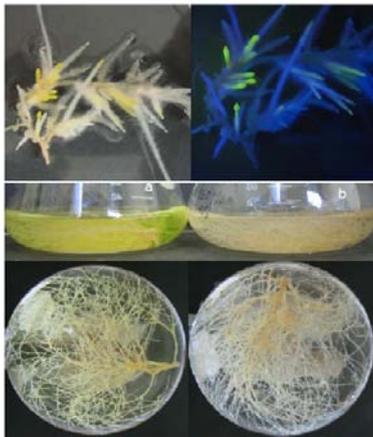
図：クローン Bv18 による pHBA 誘導体の生産量の経時変化 (図内図は組織当りの生産量)

④ 高遺伝子発現の組織に及ぼす影響を調べた結果、細胞壁結合成分として、pHBA が検出され、根の張力が小さくなることが判明した。

これらの成果は今後、工業レベルでの生産の検討を必要としており、砂糖などの工業生産材料となっているビートでの遺伝子組換えの成功は国際的にも注目されている。

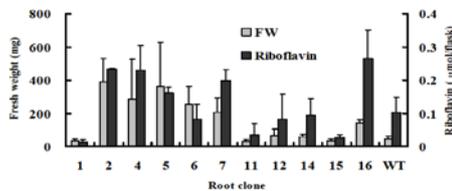
(2) 鉄欠乏ストレスによりヒヨス毛状根で誘導される有用物質の生産

①毛状根を鉄欠乏下で培養すると培地が黄色になることを見出し、黄色化合物が根端から分泌された riboflavin (Vitamin B2) であることを明らかにした。



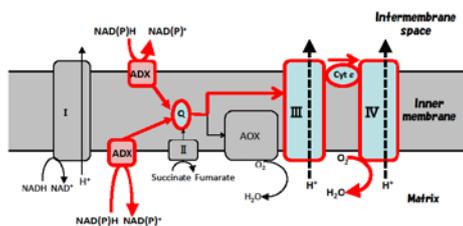
鉄欠乏下でのヒヨスの根の生長(下)と根端からのriboflavinの分泌(上)と培地の黄色化(中段) a:鉄欠乏下 b:鉄十分下

②各種クローンによる生産量を比較し、Ha16が増殖と riboflavin 生産量の点で優れたエリートクローンであることを明らかにした。



クローン間での根の増殖とriboflavin生産量の相違

③鉄欠乏下では呼吸活性が上昇すること、呼吸鎖を構成する各タンパク質に特異的阻害剤による阻害実験から、riboflavin を放出する原因は鉄要求性の高い、呼吸鎖複合体が鉄を節約するように変化したことと関連するというモデルを提案した。

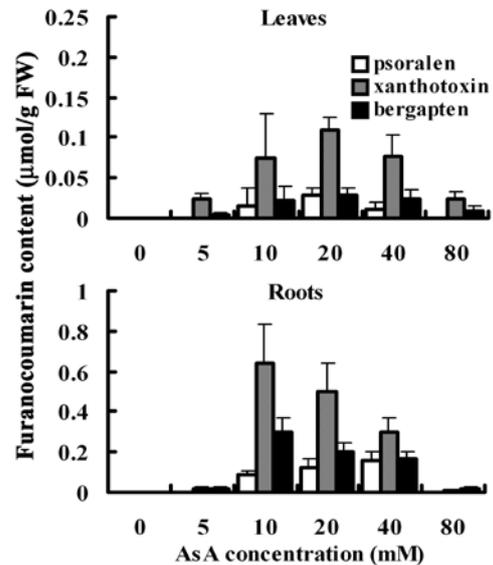


鉄欠乏下で働く呼吸鎖電子伝達系モデル

今後、鉄欠乏処理を行うことで野菜などに riboflavin を多量生産させる方法の確立に応用が可能と思われる、栄養学上の貢献が期待される。また、鉄欠乏下で生長する植物やその生長のしくみはこれまでに全く報告がないことから、今後、アルカリ土壌等への応用や砂漠化防止への利用に期待がもたれる。

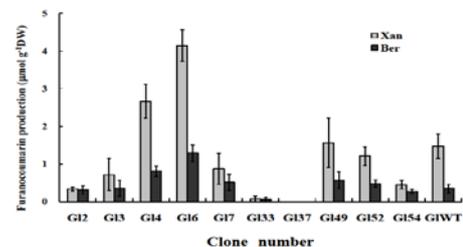
(3) アスコルビン酸(AsA) 過剰ストレス、および鉄欠乏ストレス下のハマボウフウ培養根により誘導される有用物質の生産

①通常の鉄を含む培地で培養した根や葉を 10~40mM AsA で処理すると、医薬品として重要な furanocoumarin が誘導、高生産されることを見出した。



図：葉および根による Furanocoumarin の誘導・生産に及びす AsA 濃度の影響

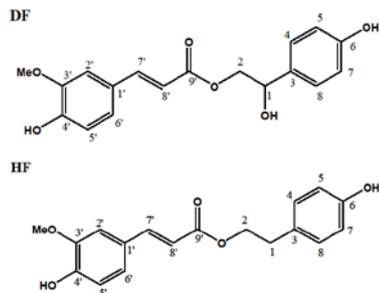
②形質転換した毛状根を用い、AsA 処理によるクローン間での Furanocoumarin 生産量を比較したところ、G16 が根の増殖と有用物質の生産の両方で優れていることが明らかになった。



クローン間でのFuranocoumarin生産量の違い

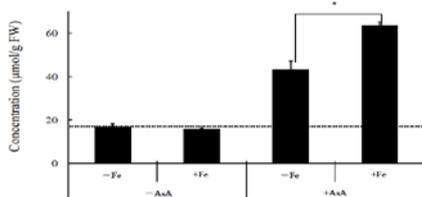
③鉄欠乏条件下で AsA を処理すると、これまでに検出されたことの無い、未知の化合物を 2 種、新たに多量につくり出すことが判明した。

④同定の結果、この未知の化合物は 6,β-dihydroxyphenethyl ferulate (DF)と 6, β-hydroxyphenethyl ferulate (HF)と判明した。



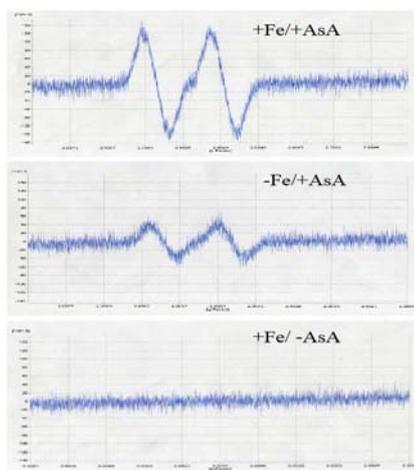
図：フェルラ酸の誘導 DF および HF の構造

⑤AsA で誘導される代謝物が鉄の有無により異なる原因を調べ、ラジカルの発生による細胞毒性と関連があることを明らかにした。



図：鉄の有無による AsA の細胞毒性の相違

⑥細胞毒性の原因を調べ、様々なラジカル種の特定を行い、鉄存在下では鉄欠乏下と比較して、アスコルビン酸ラジカルの生産が顕著であることを明らかにした。



図：AsA ラジカルの生成と強度 (ESR 法による検出)

本研究で植物中に普遍的に存在するアスコルビン酸が、一定濃度以上で植物細胞にストレス代謝を誘導することを始めて明らかにした。加えて、鉄欠乏下ではその代謝が変化すること、ハマボウフウでは全く報告の無い新物質を誘導したことなど、本研究の成果の新規性は著しい。また、ここで得られた DF と HF には、化学構造上、生理作用が期待されることから、今後は大量生産させ、生理作用を調べる必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Terato M, Ishikawa A, Yamada K, Ozeki Y, Kitamura Y (2011) Increased furanocoumarin production by *Glehnia littoralis* roots induced via *Agrobacterium rhizogenes* infection. *Plant Biotechnology* 査読有 (in press).
- ② Higa A, Mori Y, Kitamura Y (2010) Iron deficiency induces changes in riboflavin secretion and the mitochondrial electron transport chain in hairy roots of *Hyoscyamus albus*. *Journal of Plant Physiology* 査読有 167: 870-878.
- ③ Ishikawa A, Kuma T, Sasaki H, Sasaki N, Ozeki Y, Kobayashi N, Kitamura Y (2009) Constitutive expression of bergaptol O-methyltransferase in *Glehnia littoralis* cell cultures. *Plant Cell Report* 査読有 28: 257-265.
- ④ Rahman L, Kouno H, Hashiguchi Y, Yamamoto H, Narbad A, Parr A, Walton N, Ikenaga T, Kitamura Y (2009) *HCHL* expression in hairy roots of *Beta vulgaris* yields a high accumulation of p-hydroxybenzoic acid (pHBA) glucose ester, and linkage of pHBA into cell walls. *Bioresource Technology* 査読有 100: 4836-4842.
- ⑤ Higa A, Miyamoto E, Rahman LU, Kitamura Y. (2008) Root tip-dependent, active riboflavin secretion by *Hyoscyamus albus* hairy roots under iron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 査読有 46:452-460.
- ⑥ Matsuba Y, Okuda Y, Abe Y, Kitamura Y, Terasaka K, Mizukami H, Kamakura H, Kawahara N, Goda Y, Sasaki N, Ozeki Y

(2008) Enzymatic preparation of 1-O-hydroxycinnamoyl-β-D-glucoses and their application to the study of 1-O-hydroxycinnamoyl-β-D-glucose-dependent acyltransferase in anthocyanin-producing cultured cells of *Daucus carota* and *Glehnia littoralis*. *Plant Biotechnology* 査読有 25:369-375.

- ⑦ Ishikawa A, Kobayashi N, Kitamura Y (2008) Ascorbic acid induces furanocoumarin production in organ cultures of *Glehnia littoralis*. *Planta Medica* 査読有 4:1517-1519.

参考:長崎大学附属図書館 学術研究成果  
リポジトリ:NAOSITE

<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/>

[学会発表] (計 9 件)

- ① 比嘉中、森裕子、Jebunnahar Khandakar、北村美江: 鉄欠乏下のヒヨス培養根からのリボフラビン放出は呼吸と関係する? 第28回日本植物細胞分子生物学会(仙台)大会 2010年9月2~3日、要旨集 p.126 (2Da-08)
- ② Kitamura Y, Higa A, Tamari N, Mori Y, Sakata S. Metabolic shifts associated with riboflavin excretion in *Hyoscyamus albus* roots under iron deficiency. International symposium on current status and opportunities in aromatic and medicinal plants. Feb 21-24, 2010. Lucknow (India)
- ③ 矢賀部由季野、寺戸政紘、山田耕史、北村美江: ハマボウフウ培養根のストレス化合物誘導に及ぼすアスコルビン酸の影響. 第27回日本植物細胞分子生物学会(神奈川)大会 2009年7月30~31日、要旨集 p.126 (2Da-08)
- ④ 森裕子、比嘉中、北村美江: 鉄欠乏ストレス下でのヒヨス培養根のリボフラビン分泌と呼吸活性. 第27回日本植物細胞分子生物学会(神奈川)大会 2009年7月30~31日要旨集 p.126 (2Da-08)
- ⑤ 比嘉中、北村美江: 鉄欠乏ストレスにおけるヒヨス培養根のリボフラビン生合成遺伝子の発現. 第27回日本植物細胞分子生物学会(神奈川)大会 2009年7月30~31日要旨集 p.126 (2Da-08)

- ⑥ 松崎由紀、奥田裕樹、阿部裕、北村美江、寺坂和洋、水上元、鎌倉浩之、川原信夫、合田幸弘、佐々木伸大、小関良宏ニンジン及びハマボウフウ培養細胞におけるアントシアニンアシル基転移酵素の生化学的解析 第72回日本植物学会(高知)2008年9月25~27日要旨集 p.126 (2Da-08)

- ⑦ Higa A, Miyamoto E, Kitamura Y. Riboflavin secretion from iron-deficient *Hyoscyamus albus* root tips. *Plant Metabolism 2008* (Banff, Canada) July 31-Aug 3, 2008.

- ⑧ Kitamura Y, Rahman L, Kawano H, Hashiguchi Y, Walton N. *HCHL* gene expression in hairy roots of *Beta vulgaris* causes high accumulation of soluble p-Hydroxybenzoic acid derivatives and alters cell wall components. *Plant Metabolism 2008* (Banff, Canada) July 31-Aug 3, 2008.

- ⑨ 松崎由紀、奥田裕樹、阿部裕、北村美江、寺坂和洋、水上元、鎌倉浩之、川原信夫、合田幸弘、佐々木伸大、小関良宏ニンジン及びハマボウフウ培養細胞におけるアントシアニンアシル基転移酵素の基質特異性比較. 第26回日本植物細胞分子生物学会(大阪)大会 2008年9月1~2日要旨集 p.126 (2Da-08)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 美江 (KITAMURA YOSHIE)  
長崎大学・環境科学部・教授  
研究者番号: 40108337

### (2) 研究分担者

山口 健一 (YAMAGUCHI KENICHI)  
長崎大学・水産学部・准教授  
研究者番号: 90363473  
山田 耕史 (YAMADA KOJI)  
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科  
・准教授  
研究者番号: 00253469

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: