

## フラスコの中から見ると30年後の光合成研究<sup>‡</sup>

京都大学 大学院生命科学研究所

佐藤 文彦<sup>\*</sup>

過去30年の急激な分子生物学の進展は、培養細胞を用いたモデル研究を過去の遺物に追いやった。しかし、培養細胞系は、単離葉緑体（オルガネラ）や植物個体では実験できないような植物化学調節物質／除草剤の*in vitro*スクリーニングや除草剤・環境ストレス耐性株の単離と解析を可能としてきた。また、個体レベルでは見落とされる現象、例えば、葉緑体の機能分化の制御に関わる因子（CND41）の同定も可能にしてきた。次の30年は、分子から生態系にいたる俯瞰的な視点での科学が必要である。培養細胞における機能分化制御機構の解明とともに、培養細胞を用いた解析が、両者のハブとして、生物学の深化と応用に貢献できると期待している。

### 1. はじめに

田中歩会長から、2013年の年会で30年後の光合成研究について話をしてほしいという依頼があったのは、2月の初めのころである。そのころ、磯貝彰奈良先端科学大学院大学前学長（当時、学長）が総括をしておられるJSTのCREST研究「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」の評価会で、少し嫌みな質問ばかりしていたので、そうした意見を学会講演会でも発言してほしいのかと考えた。しかし、プログラムをみると、かならずしも、そうではなく、もっと科学的な展望が期待されているように思われた。ということで、講演会では、「フラスコの中からは光合成研究の未来をみる」として、私が専門としている植物細胞培養／細胞分子生物学の立場から、光合成研究への貢献の可能性について、紹介した。今回、再度、記事を執筆してほしいとの依頼があり、講演の内容とともに、当初予定していた「光合成研究に対する危機感と期待」をもう少し率直に述べることにしたい。

### 2. 植物細胞培養・細胞分子生物学の30年

現在の植物科学、あるいは、生命科学研究では、分子生物学／遺伝子組換え技術を抜きにして研究を考えるとできない。30年後を予測するにあたり、まず30年にわたる過去の研究の進展を振り返ってみることにしたい。

では、30年前（1983年）とはどういう年であろうか？さらにさかのぼる60年前、すなわち、1953年のWatsonとCrickによるDNAの二重らせん構造の発見からの分子生物学の大きな進展の結果、植物でも形質転換体の作成が報告された年である<sup>1)</sup>。一方、植物細胞培養研究においても、1957年SkoogとMillerによるオーキシンとサイトカイニンの量比による個体再生制御の確立、メリクロンを利用したウイルスフリー苗の育成、プロトプラストの単離と融合によるトマトとポテトの体細胞雑種「ポマト」の作成、有用物質高産生培養細胞の育成など、細胞培養工学の大きな進展があり、非常に熱気にあふれていた時代である。特に、1982年日本で国際植物細胞培養学会が開催され、我が国における植物細胞培養・細胞分子生物学研究は一気に加熱したといえる（細胞培養から遺伝子組換え作物の開発の歴史については、Vasilの総説<sup>2)</sup>を参照）。

植物細胞培養研究者の駆け出しとしては、分子生物学の潮流を感じてはいたものの、その技術は、まだ、ごく一部の研究者が使うことのできる先端技術であり、一般の研究への普及は遠いと感じていた。もちろん、我々の研究室でも、1980年代半ばから、分子生物学を取り入れ、いくつかの遺伝子の単離を開始したが、一つの遺伝子を単離して解析をするというのが大仕事であった。大山莞爾博士、ならびに杉浦昌弘博士らにより1986年、葉緑体ゲノムの解読が報告されたが、それらはとてつもない大事業と感じられた<sup>3,4)</sup>。一方、

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

<sup>\*</sup> 連絡先 E-mail: fsato@lif.kyoto-u.ac.jp

その後のゲノム解読技術の進展により、アラビドプシスゲノムが2000年に解読<sup>5)</sup>され、さらに、その後、イネを初めとする多数の植物種において大規模なゲノム解読が進展し、様々なビッグサイエンスが展開されていることは、まさに時代の進展を感じるばかりである。

当然、当時の科学研究の雰囲気は、ある意味、牧歌的、非常に単純であり、ドラエモンの歌のように「こんなことができたらいいな」という楽観的発想に満ちあふれていた。例えば、先にあげた「ポマト」は、研究者の真の目的は別にあつたにしても、一般的には、地上部にはトマト、地下部にはジャガイモが収穫できる夢の作物として語られていた。すなわち、科学の進歩によって、なんでもできるのではないかという非常な楽観があり、現在の知識からして困難と思われる二律背反を平気で期待していたといえる。

### 3. 培養細胞と光合成研究

実際に私が研究を開始した1970年代中頃では、分子生物学の適用範囲はさらに狭く、大腸菌など一部の微生物やウイルスでのみ研究可能であつた。従つて、圃場レベルでの植物科学研究と生化学／分子生物学との狭間で、植物細胞培養は、最も解析的であり、かつ、実用化への展開が可能な材料と考えられた。当時の課題は、一般的な植物培養細胞は光合成をしないということであり、如何にして、光合成をする培養細胞系を確立するかということにあつた。培養細胞は、ホルモン制御により器官再生ができるとはいえ、動物細胞のように分化した表現形質を持続的に維持することは困難であり、容易に脱分化／再分化できるという特性ゆえに、光合成をする葉肉細胞も、培養に伴い容易に光合成活性を失った。幸いなことに、より緑化したタバコ培養細胞を入手し、実際にこの細胞が、糖存在下でも光合成をしていることを確かめるとともに、さらに、糖無添加条件でも光合成に不可欠なCO<sub>2</sub>濃度を富化することにより、光独立栄養的に生育できることを実証したのが、その後の研究の出発である<sup>6)</sup>。こうした研究の多くでありがちなことであるが、この研究は、ほぼ同時期に行われていたHuesemann & Barzら(1977)の*Chenopodium*の系<sup>7)</sup>に次いで、2例目の安定した光独立栄養培養細胞系の成功例となり、現在まで維持されている。

光合成だけで生育する培養細胞の作成においては、先にも述べたように、二律背反を期待する過酷

な課題が与えられていた。それは、光独立栄養細胞系において、有用物質生産を行うという課題であつた。従つて、通常の光合成研究では使わない特殊な薬用植物を用いて緑色培養細胞／光独立栄養培養細胞を作成し、その有用二次代謝物産生を検討した。しかし、既に述べたように、これは明らかに二律背反を期待するものであり、光独立栄養培養細胞における有用物質生産の試みは頓挫した。現在、微細藻類を用いたバイオ燃料生産の試みをみると、その多くは細胞生育と物質生産を追求するものであり、我々が過去に試みたように、できないことを追い求めているように感じられる。すなわち、生育するためには、余剰エネルギー蓄積／二次代謝にかかるエネルギーの余裕はなく、二次代謝を追求すると生育が低下するという二律背反があると考えられる。

光合成だけで生育する緑色細胞確立の一つの要因は、生育の遅い細胞を選ぶことであつた。すなわち、糖存在下における生育を優先すると葉緑体形成そのものが生育にとっては余分のコストとなり、葉緑体が未発達な状態、つまり、白色の培養細胞が選抜される。同様なことは、二次代謝産物産生においても同様である。陸上化にともない、余分の光合成産物を蓄積できる組織を形成するようになるとともに、二次代謝産物の合成と蓄積が可能となったというのが、私の理解である。ある種の分化した組織、例えば、シュート形成したジギタリスが強心配糖体であるジギトキシンを産生するが、このような組織分化が二律背反を達成するために必要と思われる。

一方、光合成だけで生育する光独立栄養培養細胞の光合成研究への利用であるが、いくつかの解析の結果、光合成研究のモデル植物ほどではないが、それなりの光合成活性を持つことが明らかになり、多くの共同研究者の協力により、様々な植物生長調節物質の評価や耐性株のスクリーニングに応用することが可能であつた。特に、重松由夫博士の努力により光化学系II阻害剤であるアトラジン耐性株のスクリーニングに成功するとともに、同株が通常の抵抗性雑草が示さないDCMU耐性を示すとともに、葉緑体遺伝子*psbA*においてSer264Thrという初めての葉緑体ゲノム変異を示すことにも成功した<sup>8,9)</sup>。緑藻類を用いた葉緑体変異体の単離研究はよく行われているが、高等植物でも同様の選抜が可能であることを示す初めての成果となつた（詳しくは、総説<sup>10)</sup>を参照）。

#### 4. 光独立栄養細胞と葉肉細胞との違い

このように、光独立栄養培養細胞は光合成研究のモデルとなりうるものではあったが、一方、葉肉細胞との明らかな違いもあった。すなわち、培養細胞は、遅いとはいえ、継続的に増殖する細胞であり、特に、活発に生育する時期には、C<sub>4</sub>光合成の初発炭酸固定酵素であるphosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) の高い活性が見られた。もちろん、PEPCには解糖系におけるアナプレロティックな役割が知られていたが、<sup>14</sup>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いた炭酸同化の解析から、C<sub>4</sub>有機酸への取り込みが認められた。そこで、さらなるC代謝への期待を持ち、多くの共同研究者、特に、小泉望博士が精力的に解析し、初めてのC<sub>3</sub>型PEPC遺伝子の単離、形質転換植物体の作製を行ったが、C<sub>3</sub>植物におけるPEPCの役割の解明には最終的に至らなかった。

一方、培養細胞の遺伝子発現をタンパク質レベルで、緑葉の葉肉細胞と直接比較すること（今でいうプロテオミックス）により、培養細胞特有の遺伝子発現、すなわち、培養細胞は無菌で生育しているにもかかわらず、病害菌感染誘導タンパク質を著量蓄積していることが明らかになった<sup>11)</sup>。竹田恵美博士の一連の研究により、培養細胞には、明らかに葉肉細胞とは異なる遺伝子発現があり、かつ、その光合成的生育には、通常の大気濃度を大きく上回るCO<sub>2</sub>濃度が必要であること形態の違いが明らかとなった。すなわち、通常、細胞膜に張り付いている葉緑体が細胞膜から脱落し、核膜の近くに局在していることが、細胞質におけるCO<sub>2</sub>の拡散抵抗を大きくしていると考えられた（図1参照）<sup>12,13)</sup>。このことは、葉緑体の運動を制御するアクチンフィラメントの不全とも考えられるが、一方、培養細胞では、細胞内で活発に呼吸が起きていることを考えると、むしろ、原始的な真核細胞に捕らえられた植物細胞の初期の状況を反映しているとも思われる。培養細胞は、植物細胞の通常観察されない特性を明らかにする良い実験系と考えられる。

#### 5. 培養細胞と葉緑体遺伝子発現

光独立栄養細胞の解析から明らかになった、もう一つ重要な成果は、葉緑体の遺伝子発現を制御するタンパク質CND41の同定である<sup>14,15)</sup>。我々が、この研究を始めた当時、黒岩常祥博士のグループが精力的に、葉緑体核様体タンパク質を観察しておられた。ま

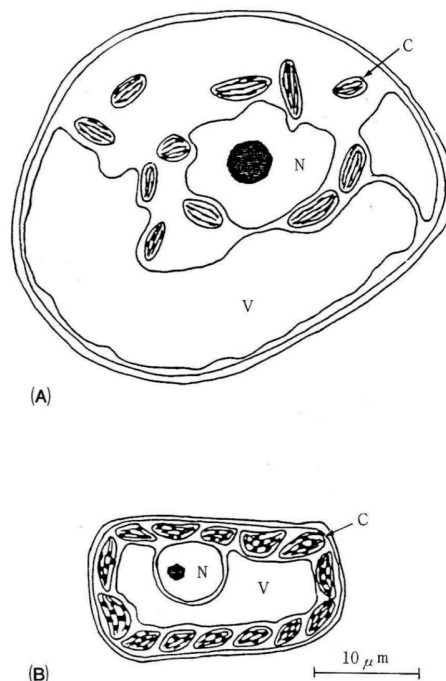


図1 光mixotrophic (混合) 培養細胞(A)ならびに、緑葉葉肉細胞(B)の模式図  
C:葉緑体、N:核、V:液胞、文献12より許可をえて引用（竹田恵美博士原図）

た、葉緑体の祖先と考えられる原核細胞では、ヒストンは存在しないもののHUなどのDNA結合タンパク質が存在し、その遺伝子発現の制御に関わっていることが明らかになりつつあった。我々も光独立栄養培養細胞を用いることにより、葉緑体核様体構成タンパク質の単離同定ができるのではないかと考えた。中野雄司博士の努力により、培養細胞から、CND41という新規な葉緑体DNA結合性タンパク質を単離・同定することができた。また、村上真也博士の努力により、同タンパク質がプロテアーゼ活性を有することが明らかになり<sup>16)</sup>、さらに、現在、加藤裕介博士の努力により、同タンパク質が老化時におけるRubiscoの分解と転流に関わっていること<sup>17,18)</sup>、また、中野博士の努力によりCND41の発現抑制によりプロプラスチドから葉緑体への分化が進行するとともに、プロプラスチドにおけるジベレリン合成の抑制と植物生長の抑制が起こるという全く予想していなかった色素体のバイオジェネシスと個体の生長制御における機能が明らかになってきた<sup>19)</sup>。我々が最初にタバコで同定したCND41に存在するN末端の塩基性配列は、タバコやトマトなど、ナス科の植物に限定されており、そのため、CND41の普遍的生理作用については、一部

の研究者の興味を引くにとどまっているが、タバコ植物体において明らかになった老化制御機能は、植物の生長制御のひとつの糸口になると期待している。

## 6. 培養細胞から見た光合成研究の可能性

以上の自己総括を踏まえて述べたいことは、分子生物学研究が全盛の現代において、古びたように見える培養細胞研究の中にも、未来が詰まっているのではないかということである。例えば、光独立栄養培養細胞系は、植物体よりも単純化したシステムとして、光合成のメカニズム解析、特に、細胞選抜系としての利点は既に述べた通りである。例えば、大気中のCO<sub>2</sub>だけで生育できる光独立栄養培養の確立は、高等植物におけるCO<sub>2</sub>濃縮機構の存在の理解に繋がると期待される。また、完全に制御した環境での培養という利点から、培地交換によるC/Nバランスの解析等、様々な解析が可能である。例えば、個体を用いたCND41の機能解析は、器官分化を伴うために複雑であるが、培養細胞系をもちいることにより大幅に簡略化できると考えている。また、未解明に終わっている培養細胞におけるPEPCの高発現はC3植物からのC4植物の進化の理解につながると期待できる。また、培養細胞における継続的な増殖は、葉緑体の分裂・分化の理解に有用な素材を提供している<sup>13)</sup>。さらに、耐塩性光独立栄養培養細胞の単離と、その光化学系IIの耐塩性の解明<sup>20)</sup>は、さらなる耐塩性植物の開発、あるいは、構造解析に耐える安定した光化学系IIの単離と解析に有用と期待される。意外とフラスコの中は、個体を用いた研究よりも自在の材料を提供してくれる可能性がある。

## 7. おわりに

以上、30年におよぶ光独立栄養培養細胞を用いた研究を総括していえることは、培養細胞系も意外と使えるのではないかということである。もちろん、遺伝子組換え技術／分子生物学の発展により、個体レベルで、遺伝子機能を直接解析できるようになり、培養細胞のように個体での機能評価に反映しにくい系を使う必要がないことも事実ではある。しかし、個体を使っているからといって、個体の生産機能評価につながっているかという点、それは、意外と見落とされていると感じることがしばしばある。培養細胞で研究したことが、個体の機能改変にもっと繋がること、例えば、より高い光合成機能を持つとして選抜

した細胞から、自在に植物個体を再生し、その機能を強化できること、あるいは、植物体の特定の時期の特定の細胞の遺伝子発現を任意に制御できることなど、期待する夢はたくさんある。まだまだ、我々が知らない遺伝子機能が埋蔵されており、そうした遺伝子機能の発掘は、環境変化とともに進化してきた植物の多様性を考えると無限であると言える。

このように、夢は無限であるが、我々の日常は有限である。夢だけで生活することはできない。何処かで、実用化を考える必要もある。残念ながら、我々の研究も、現時点では、圃場における作物生産性の向上につなげることはできていない。しかし、常に、研究成果を作物生産／物質生産につなげたいという意識をもって解析している。そのために、使える技術／目標を掲げて、研究してきたといえる。例えば、除草剤による耐性株のスクリーニング、除草剤機能の評価、新規な生長調整物質の探索や耐塩性細胞の選抜、環境制御による光合成機能の改変の可能性や、抗菌性タンパク質の解析など<sup>21)</sup>、広い意味での光合成機能の最適化のために、よくいえば、多面的に、悪く言えば、底浅く、解析し続けてきたといえる。

一方、近年の大型研究プロジェクトを拝見すると、より深掘した提案が多いと感じる。当然、内容は精密になっている。しかし、目標が絞り込まれるとともに、解析対象がマイクロ化し、部分現象の解明に終わり、個体、あるいは、自然環境下での評価という、現場の必要とする目標に向かっていないように感じる。このように書くと、研究に対する考えが、応用に縛られすぎていると感じる方も多いかと思う。研究が好奇心で動いていることは事実であり、かつ、重要である。しかし、予算の大型化に伴い、好奇心を満足させる多くの研究成果とともに、納税者の期待を、より考える必要があるように思われる。自分自身、もし、予算がなく、自分のお金でしないといけないとすれば、どれだけの予算を自分で支払うのだろうと考えることがある。実用化ができるに越したことはないが、それができなくとも、できるだけ、わくわくする研究で、より多くの社会的インパクトを与え続けることを続けたいと願っている。それは、何も光合成研究に限ることではなく、全ての科学に共通すると考える。同時に、「光合成研究という縛り」をつくることは、自らの道を狭めているのではないかと危惧している。30年後、光合成研究が

無限の広がりをもって、人類の未来に貢献していることを念願している。

## 謝辞

本文に名前を挙げた方々以外にも多くの共同研究者のご協力、ご支援、ならびに、科学研究費補助金を始めとする多くの研究助成金により、ここに記載しました研究を推進することができましたことを感謝申し上げます。

Received November 18, 2013, Accepted November 26, 2013, Published December 31, 2013

## 参考文献

- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montague, M. and Schell, J. (1983) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209-213.
- Vasil, I.K. (2008) A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep.* 27, 1423-1440.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi M., Chang, Z., Aota, S-I, Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572-574.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hyashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T, Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5, 2043-2049.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Yamada, Y., Sato, F. (1978) The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant Cell Physiol.* 19, 691-697.
- Huesemann, W. and Barz, W. (1977) Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiol. Plant.* 40, 77-81.
- Sato, F., Shigematsu, Y. and Yamada, Y. (1988) The mechanism of herbicide resistance in tobacco cells with a new mutation in the Qb protein. *Mol. Gen. Genet.* 214, 358-360.
- Shigematsu, Y., Sato, F. and Yamada, Y. (1989) The mechanism of herbicide resistance in tobacco cells with a new mutation in the Qb protein. *Plant Physiol.* 89, 986-992.
- Sato, F. (2013) Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1-9.
- Takeda, S., Sato, F., Ida, K. and Yamada, Y. (1990) Characterization of polypeptides that accumulate in cultured *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell Physiol.* 31, 215-221.
- 佐藤文彦、竹田恵美、山田康之 (1989) 緑色培養細胞における機能分化. 組織培養 15, 7-11.
- Takeda, S., Kaneko, Y., Matsushima, H., Yamada, Y. and Sato, F. (1999) Cultured green cells of tobacco as a useful material for the study of chloroplast replication. *Methods Cell Sciences* 21, 149-154.
- Nakano, T., Sato, F. and Yamada Y. (1993) Cultured green cells of tobacco as a useful material for the study of chloroplast replication. *Plant Cell Physiol.* 34, 873-880.
- Nakano, T., Murakami, S., Shoji, T., Yoshida, S., Yamada, Y. and Sato, F. (1997) A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 9, 1673-1682.
- Murakami, S., Kondo, Y., Nakano, T. and Sato, F. (2000) Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Lett.* 468, 15-18.
- Kato, Y., Murakami, S., Yamamoto, Y., Chatani, H., Kondo, Y., Nakano, T., Yokota, A. and Sato, F. (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* 220, 97-104.
- Kato, Y., Yamamoto, Y., Murakami, S. and Sato (2005) Post-translational regulation of protease activity of CND41 in senescent tobacco leaves. *Planta* 222, 643-651.
- Nakano, T., Nagata, N., Kimura, T., Sekimoto, M., Kawaide, H., Murakami, S., Kaneko, Y., Matsushima, H., Kamiya, Y, Sato, F. and Yoshida, S. (2003) CND41, a chloroplast nucleoid protein, regulated plastid development and dwarfism related to gibberellin biosynthesis. *Physiol. Plant.* 117, 130-136.
- Murota, K., Sato, F., Ohshita, Y., Watanae, A., Aso, S. and Yamada, Y. (1994) Changes related to salt tolerance in thylakoid membranes of photoautotrophically cultured green tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 35, 107-113.
- 佐藤文彦 (2000) 光独立栄養培養細胞株を用いた植物機能の分子細胞生物学的解析とその応用. 植物の化学調節 35, 8-16.

## Perspectives in Photosynthetic Research; View Through In-Vitro Culture Systems of Higher Plants

Fumihiko Sato\*

Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University