

## RNAi と創薬

RNAi and combinatorial biosynthesis of novel compounds in medicinal plants



佐藤 文彦

Fumihiko SATO

京都大学大学院生命科学研究所全能性統御機構学分野

◎ヒトゲノムの解明によってゲノム創薬が可能となってきたが、創薬のための素材の開発が一方で急務である。幅広い生物資源の探索とともに、既存の生薬資源の再開発が必要と思われる。実際にはゲノム解析技術の進展に伴い、これまで解析の対象とされてこなかった薬用植物のゲノム解析も急激に進展している。一方、得られたゲノム情報を生物機能につなげる手法はまだ乏しく、異種発現系を用いた解析がおもに行われている。一方、RNAi法は、遺伝子発現抑制によるゲノム機能同定、さらには代謝工学による創薬素材の開発の手法としてきわめて有望と考えられる。ここではイソキノリンアルカロイド生合成系をモデルに、RNAi法を用いた効率的な代謝系の遮断により中間代謝産物の蓄積が可能であることを紹介する。この結果は蓄積した中間体を材料にしたコンビナトリアル生合成系が可能であることを示唆している。



イソキノリンアルカロイド、コンビナトリアル生合成系、代謝工学、生合成中間体生産

現代医学においてスコポラミンやコデインのように天然物を直接利用する医薬品は多い。また、タキソールやジオスゲニンのように天然由来の化合物を修飾して用いたり、あるいはサリチル酸誘導体(アスピリン)のように完全合成して用いられている化合物も多く存在する。世界的には現在も300億ドルを超える植物由来の化合物が医薬品として用いられている<sup>1)</sup>。しかし、天然由来の化合物を利用する場合には生薬として直接利用する場合を除いて活性成分の精製が必要であり、その収量と生理活性が問題になる。したがって、化学合成によって類似した活性を有する単純な化合物の作出が試みられてきたが、複雑な構造をもつ天然物の生理活性を模倣することは容易ではなく、多くの化合物がいまだ天然から抽出されている。

一方、生薬において多数の類縁化合物が含有されることは特定の化合物の生産という観点からいえば好ましくないことであるが、生薬の多様な生理活性から考えるとあらたな活性をもつ化合物の

発見(創薬)につながると考えられる。とくに、ハイスループット解析が可能な現在においてはあらたな創薬原料として期待できる。天然物由来の化合物を用いた創薬における問題は、これらの多様な化合物のなかから、いかに生理活性の高い化合物を効率的に選別し、生産するかである。そのためには、天然物中に存在する化合物の選択的生合成法の開発が必要である。遺伝子組換え作物はいまだ市民権を十分に得ているといい難いところがあるが、こと薬用成分の育種、創薬という観点からいうと遺伝子組換え技術は非常に大きな可能性をもっている。ここでは著者らが研究対象としているイソキノリンアルカロイドを例に創薬の可能性を述べたい。

### イソキノリンアルカロイド生合成系を対象とした分子育種

イソキノリンアルカロイドは、インドールアルカロイドと並び、植物アルカロイドのなかでも

表 1 代表的な植物由来の医薬品原料

抗癌剤：camptothecin, podophyllotoxin, taxol, vinblastine, vincristine  
 鎮痛/麻酔剤：atropine, cocaine, codeine\*, hyoscyamine, morphine\*, scopolamine  
 抗マラリア剤：quinine, quinidine, artemisinin  
 その他：berberine\*, colchicine\*, diosgenin, digoxin, emetine\*, sennosides, tubocurarine\*

\*：イソキノリンアルカロイド。

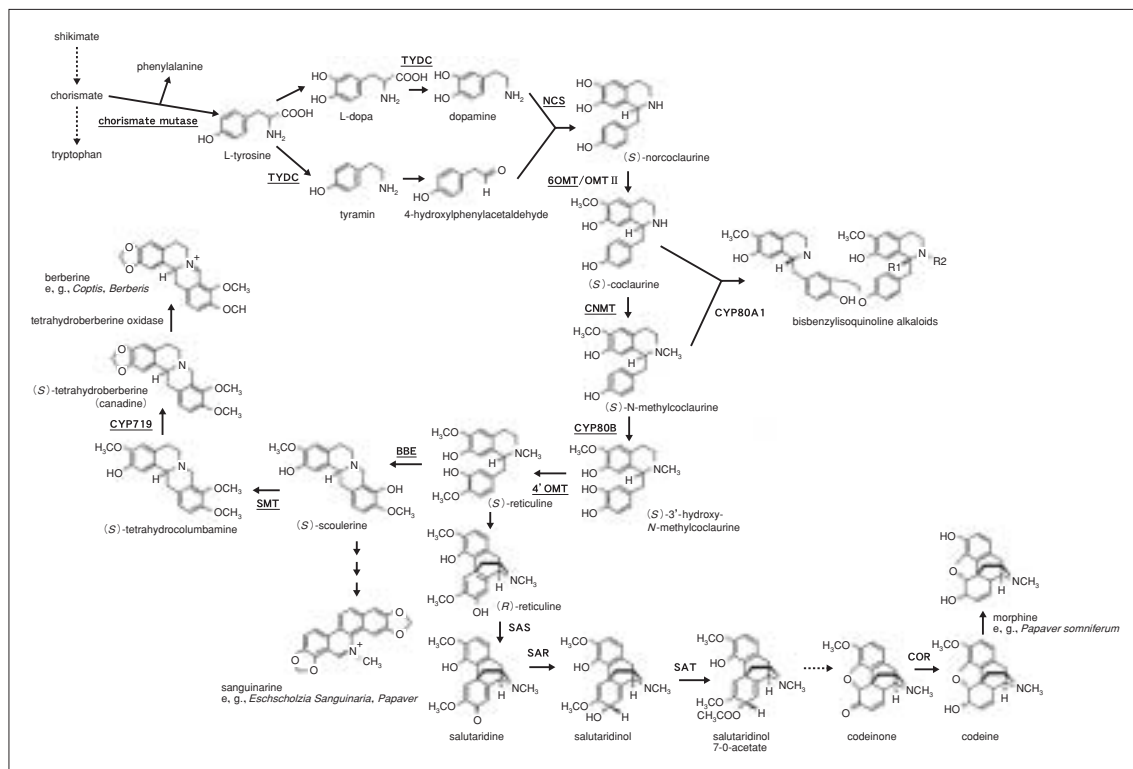


図 1 イソキノリンアルカロイド生合成系

これまでにもオウレン細胞から単離している遺伝子を下線で示す。

もっとも大きな一群を構成しており、また多様な生理活性を有する重要なアルカロイドである。そのなかにはケシ (*Papaver somniferum*) の未熟果実より得られ鎮痛剤として利用されるモルヒネ、オウレン (*Coptis japonica*) の根茎やキハダ (*Phellodendron amurense*) の樹皮に含まれる健胃薬の成分であるベルベリン、ツツラフジ科の植物 (*Chondodendron tomentosum Ruiz*) などが産生し、筋弛緩薬として用いられているツボクラリン (ビスベンジルイソキノリンアルカロイド) などが含まれ、とくに医薬品として用いられるものが多い (表 1, 図 1)。これらの化合物は現在も植物から抽出され、医薬品として利用されている。これら化合物の利用特

性を高めるうえで、量的・質的向上が必要であり、ケシでは交配育種によりテバインをより多く含む品種の育成が進んでいる。しかし、従来育種ではその改良に長年月がかかり、また、その改変は限定的である。

一方、二次代謝産物の分子育種は第二世代バイオテクノロジーのターゲットとして有望であるが、分子育種のために必要な遺伝子の特定と単離に困難がある。著者らはイソキノリンアルカロイド生合成系の分子育種のモデルとして細胞培養系において高生産性を達成しているキンポウゲ科のオウレン細胞を材料として、その生合成系を解析してきた。その結果、イソキノリンアルカロイド

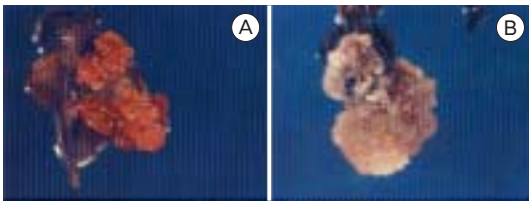


図 2 BBEir 発現ベクターならびにコントロールベクターを導入したハナビシソウ細胞  
A: コントロール形質転換体, B: BBEir 形質転換体

生合成の重要な中間体であるレチクリンに至る生合成系のうちノルコクラウリンからレチクリンに至る 5 段階の酵素遺伝子すべてを単離同定した。また、レチクリンからベルベリンに至る 4 段階のうち、3 段階の遺伝子についても単離同定に成功している(たとえば、文献<sup>2,3</sup>参照)。これらの遺伝子の単離により、たとえば通常、ベルベリン系アルカロイドを生産しないケシ科のハナビシソウ (*Eschscholzia californica*) 細胞にベルベリン生合成系への分岐酵素であるスコウレリン 9-O-メチル化酵素 (SMT) を過剰発現することにより新規な化合物を生産することに成功している<sup>4</sup>。また、これらの遺伝子は大腸菌などの異種発現系を用いた有用アルカロイドの物質変換においても有用である<sup>3</sup>。

では RNAi 法はどのように創薬に活用できるのだろうか。すでに述べたように、植物材料を用いた有用化合物生産の最大の問題点として類縁化合物の存在がある。類縁化合物の存在は生薬としての有効性を高めていると考えられるが、特定成分の生産という観点からすると精製の困難さとコストの増大をもたらしている。著者らは分子育種的手法によって代謝を遮断し、代謝産物を単純化すること、あるいは特定の中間代謝産物を蓄積すること、さらには蓄積した中間代謝産物をもとに、あらたな代謝酵素を導入することにより関連する誘導体のコンビナトリアル生合成系の開発をはかっている。この目的のためには中間代謝産物の効果的な蓄積系の開発が重要である。シロイヌナズナのようなモデル植物ではすでに T-DNA やトランスポゾンを用いた変異体ライブラリーが整備されているが、薬用植物においては今後もそのようなライブラリーが整備されるとは考えにくい。

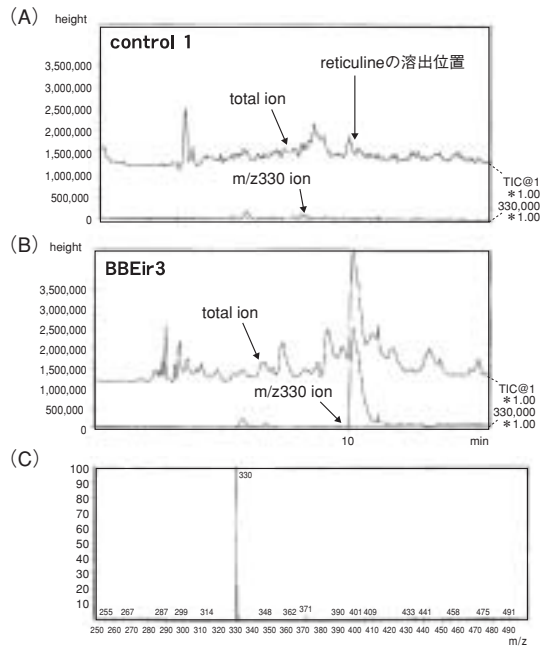


図 3 ハナビシソウ BBEir 形質転換細胞抽出液の LC-MS 解析

A: コントロール細胞, B: BBEir 形質転換細胞の LC-MS クロマトグラム, C: BBEir 形質転換体において検出されたピークのマスペクトラム(レチクリンの  $m/z$ 330 に同じ)。

植物の分子育種の有力手法であるアンチセンス法は有用であり、代謝系の遮断が可能であることが報告されているが、残念ながら代謝産物の蓄積を報告したものはない。たとえば、ハナビシソウ細胞のイソキノリンアルカロイド生合成系においてベルベリンブリッジ酵素 (BBE) を対象としてアンチセンス遺伝子の導入が行われた<sup>5</sup>が、最終産物であるサングイナリンなどベンゾフェナンスリジンアルカロイドの含量は低下したものの、BBE 反応の基質となるレチクリンの蓄積は認められていない。著者らは、この結果はアンチセンス法における標的遺伝子の発現抑制が不十分であるためと考えている。

著者らはアンチセンス法ではなく、RNAi 法であれば、より効果的に遺伝子発現を抑制し、代謝系を遮断できると考えた。そこで、ハナビシソウの BBEcDNA ほぼ全長に対し二本鎖 RNA (dsRNA) を合成する BBEir 発現ベクターを構築し、ハナビシソウ細胞に導入した。その結果、BBEir 発現ベクターを導入した細胞においてアルカロイド生産性

の指標となる赤色素の蓄積が低下していることを認めた(図2)。さらに、これら形質転換細胞の多くの細胞株においてサンガイナリンなどのベンゾフェナンスリジンアルカロイドの蓄積を完全に遮断するとともに、前駆物質であるレチクリンが蓄積していることをLC-MSを用いて確認した(図3, 藤井・他:未発表データ)。この結果はRNAi法を用いて代謝の遮断とともに中間体の蓄積が可能であることを示したはじめての例である。

すでに、RNAi法を用いた二次代謝の分子育種に関してはコーヒー植物のカフェイン生合成系の遮断による低カフェインコーヒー植物の育成が報告されている<sup>6)</sup>が、この場合にも中間代謝産物の蓄積は報告されていない。この場合、代謝系の遮断が十分でなかったことがカフェインの分析から明らかである(カフェインの低下は50~70%程度である)。植物では多くの場合、生合成遺伝子が遺伝子ファミリーを形成していることが多く、RNAi法といえども用いた配列の相同性の違いにより遺伝子発現抑制が不十分となり、そのために、代謝の漏れが生じていると考えられる。著者らがファミリー遺伝子を抑制してきた経験からいうと、すくなくとも80%程度の相同性と100bp以上の配列が効果的な抑制に必要である<sup>7)</sup>。配列のどの部位を対象にRNAiベクターを構築するかはまだ試行錯誤的などころが残っているが、非常に有効な遺伝子抑制法であることは間違いない。植物細胞におけるRNAi法についてはいくつかの総説があるので、合わせて参照してほしい<sup>8-10)</sup>。

## おわりに

以上示してきたように、近年のゲノムプロジェクトの進展に伴い、これまで対象とされてこなかったような非モデル生物にも解析の恩恵がめぐってきている。これらの細胞における二次代謝系の生合成酵素遺伝子の単離と同定は従来困難であった多様な二次代謝産物の効率的生産と創薬を可能にすると期待できる。とくに、RNAi法に示さ

れる新規な遺伝子発現制御法により、特定の化合物を選択的に生産することが可能になると考えられる。これらの生産系の開発は、現在、化学合成に多くを依存している創薬プロセスを生物生産系に変換するきっかけになると期待している。すくなくとも天然原料に依存している多くの医薬品生産の製造法の効率化と高品質化に大きな貢献が期待できる。

**謝辞:**これらの研究は、日本学術振興会・未来開拓学術研究推進事業JSPS-RFTF00L01606, NEDO エネルギー使用合理化技術開発費等補助金“植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術の研究開発”などの支援を受けて行われた。

## 文献

- 1) Raskin, I. et al.: Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.*, **20**: 522-531, 2002.
- 2) Ikezawa, N. et al.: Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *J. Biol. Chem.*, **278** (40): 38557-38565, 2003.
- 3) Choi, K.-B. et al.: Molecular cloning and characterization of coclaurine N-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *J. Biol. Chem.*, **277**: 830-835, 2002.
- 4) Sato, F. et al.: Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98** (1): 367-372, 2001.
- 5) Park, S. U. et al.: Antisense RNA-mediated suppression of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in transgenic cell cultures of California poppy. *Plant Physiol.*, **128**: 696-706, 2002.
- 6) Ogita, S. et al.: Producing decaffeinated coffee plants. *Nature*, **423**: 823, 2003.
- 7) Ifuku, K. et al.: Specific RNA interference in *psbP* genes encoded by a multigene family in *Nicotiana tabacum* with a short 3'-untranslated sequence. *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.*, **67**(1): 107-113, 2003.
- 8) 佐藤文彦: 遺伝子発現抑制技術(植物代謝工学ハンドブック), 新名惇彦, 吉田和哉監修, エヌ・ティ・エス, 2002, pp.278-288.
- 9) Wang, M. B. and Waterhouse, P. M.: Application of gene silencing in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5** (2): 146-150, 2002.
- 10) Waterhouse, P. M. and Helliwell, C. A.: Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.*, **4**: 29-38, 2003.