

農学博士山田康之君の「植物培養細胞における機能発現 ならびに物質産生機構の解析」に対する授賞審査要旨

山田康之君は、独自の発想に基づき、高等植物の培養細胞からそれぞれの研究目的に適合した特定の機能を強く発現する細胞を選抜し、それを大量培養する実験系を確立した。これによって従来、高等植物の個体やそれから作成した無細胞システムによつては追跡が困難であつた植物の機能発現と二次代謝産物の産生機構を実体的に解明することが、はじめて可能となつた。そして同君は、この独創的実験系を用いて、次々と新しい研究領域を開拓し、他の追隨を許さぬ数々のすぐれた業績を挙げるに至つてゐる。以下、山田君の重要な研究成果について概述する。

I. 植物細胞間の融合とイネ細胞からの植物個体再生

山田君がこの問題に取り組むまで、イネ培養細胞およびプロトプラストからの個体再生に関する成功例はまったく報告されていなかった。このような状況の中で、同君は一九六八年、イネ培養細胞から、さらに一九八五年には、イネプロトプラストから、それぞれ個体を再生させることに成功した。これらの成果は、イネ供試品種の選択、プロトプラストの分離、細胞の培養等にかかわる諸条件を徹底的に検討することを通じて、はじめて生まれたものである。さらに同君は、自らが開発した独特の電気細胞融合法を応用して、これまで雑種作成の困難な種間細胞融合に成功するとともに、この成果に基づき細胞質雄性不稔イネと栽培イネから作成したプロトプラスト間での非対称的な細胞融合と、

それからの個体再生にも成功した。⁽⁶⁾ これらの研究成果は、イネを含む作物新品種の創製に向けて一つの新しい技術を提示したものであり、農学における基礎研究として、その意義はきわめて大きい。

なお同君は、細胞質雄性不稔ミトコンドリア内の四種の環状DNAについて遺伝子解析を行い、^(7,8) それらの塩基配列がトウモロコシのミトコンドリア内に見い出されている環状プラスミド様DNAの塩基配列と相同性を有していることを確認した。⁽⁹⁾ この研究成果は、単子葉植物のミトコンドリア遺伝子が共通の起源を有することを示唆するものとして国の内外から高い評価を受けている。

II. 光独立栄養培養細胞の育成とその光合成機能

山田君は、 C_3 植物であるタバコ培養細胞の中から緑色の細胞だけを選抜、培養し、自らが行う光合成のみによって増殖可能な光独立栄養培養細胞を育成することに成功した。⁽¹⁰⁾ この C_3 植物に由来の緑色培養細胞においては、従来 C_4 植物に特徴的とされるホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ活性が顕著に機能しており、この研究によって光独立栄養培養細胞における機能発現の特異性というきわめて興味のある事実が明らかになった。⁽¹¹⁾ 同君はさらに、この C_3 緑色培養細胞のホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼを単一酵素として精製し、⁽¹²⁾ その遺伝子の塩基配列をはじめて決定した。

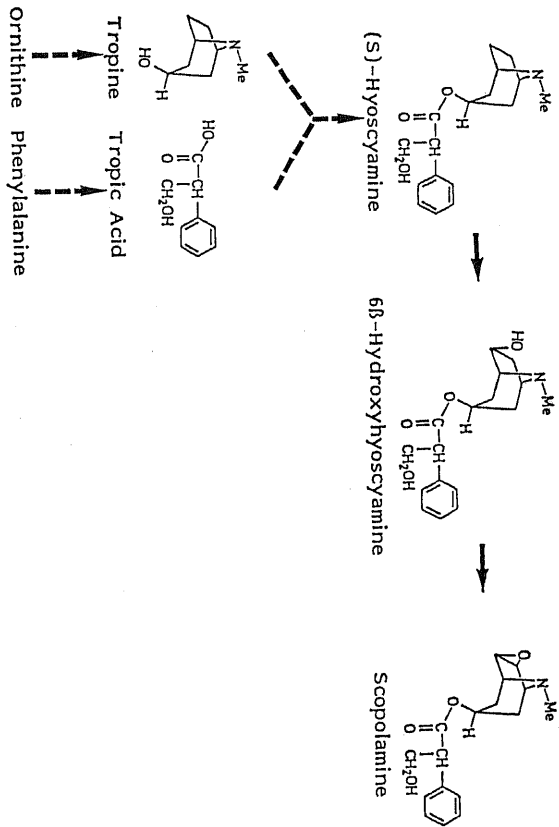
なお、山田君は、この光独立栄養培養細胞から、光合成阻害型除草剤アトラジンに対して耐性を示す細胞を得て、それに含まれる光化学系IIのD-1タンパク質のアミノ酸配列を決定し、N末端から二六四番目のアミノ酸が、セリンからスレオニンに変異していることを確認し、^(13,14) 従来にない耐性発現の由来を推定した。⁽¹⁵⁾

III. 二次代謝産物高産生細胞の選抜とその利用

山田君は、培養細胞の物質産生機能を検討する過程で培養細胞塊（カルス）を構成する個々の細胞が特定物質の産生能を異にし、その機能に関してモザイク的な構成をなしているというきわめて注目すべき事実を見出した。⁽¹⁶⁾そこで同君は、細胞塊のなから特定物質の産生能の高い細胞を選抜し、それを大量培養することによって目的物を高収量で取得する独特な方法を開発した。そして、ハナキリン培養細胞からアントシアニン^(17, 18)、セリバオウレン培養細胞からベルベリン^(19, 20)、タマサキツヅラフジ培養根からアロモリン⁽²¹⁾、ムラサキ培養細胞からシコニン⁽²²⁾、インド蛇木培養細胞からレセルピン⁽²³⁾、ヒヨス培養根・ドゥボイシア培養根からスコポラミンを大量に生産することに成功し、植物細胞培養法による有用物質の工業的生産のための基盤を構築した。^(24, 25)

IV. 植物の培養細胞および培養根における二次代謝産物産生機構の解析

従来、植物体内における二次代謝産物の産生過程やその機構を追求する場合、植物個体またはそれから作成した無細胞システムを用い、それらにアイソトープを投与して代謝経路を推定するより他に途は無かった。ところが、前述した山田君の研究によって、目的とする二次代謝産物の産生能の高い培養細胞や培養根を用い、さまざまな物質の合成過程における反応機構を、具体的に解明することが可能になり、同君は、セリバオウレン培養細胞におけるベルベリン^(26, 27)（イソキノリンアルカロイド）、タマサキツヅラフジ培養根におけるアロモリン⁽²⁸⁻³⁰⁾（ビスベンジルイソキノリンアルカロイド）、ヒヨス培養根・ドゥボイシア培養根におけるスコポラミン^(31, 36)（トロパンアルカロイド）の合成過程を克明に追跡していった。なかならず、オルニチンからスコポラミンへの物質変換に関する山田君の研究成果はその独創



性によって、国の内外から高く評価されている。すなわち同君は、この生合成過程で最も重要視される「S」ヒヨシ
 アミンからスコポラミンへの変換に関し、前者が2-オキシグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼの働きによって

6β-ヒドロキシヒヨシアミンに変換し、さらにエポキシ化されてスコポラミンを生じることが明らかにするとともに、この新規酵素ヒヨシアミン 6β-ヒドロキシラーゼを単一酵素として精製し遺伝子の全塩基配列を決定した。^(37,42) またこの遺伝子をタバコ細胞に導入して酵素活性の発現を確認した。本研究におけるようにアルカロイドの産生に直接関与する酵素の反応機構を解明し、さらにその形質転換によって他の植物細胞での活性発現を確かめた例は、これまで発表されていない。

以上述べたように、植物培養細胞の特性を利用した独創的な実験系を用いて、植物の機能発現と物質産生機構を生化学的、有機化学的ならびに分子生物学的手法により実体的に解明した山田君の研究成果は、植物科学の分野に新しい領域を開拓したものであって、昭和六二年第二回日本農芸化学会賞、平成元年にスウェーデン国ウプサラ大学名誉博士号が授与されている。

主な論文目録〔共著者（ ）内に記載〕

- (I) 植物細胞間の融合とイネ細胞からの植物個体再生
 1. Callus induction in rice, *Oryza sativa* L. Proc. Japan Acad., 43, Ser. B, 156-160 (1967) (K. Tanaka and E. Takahashi).
 2. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature, 219, 508-509 (1968) (T. Nishi and E. Takahashi).
 3. Regeneration of rice plants from protoplasts. Rice Genetics Newsletter, 2, 94-95 (1985) (Z. Q. Yang and D. Tang).

4. Plant regeneration from protoplast derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, **5**, 85-88 (1986) (Z. Q. Yang and D. Tang).
 5. Protoplast fusion: effect of low temperature on the membrane fluidity of cultured cells. *Plant Physiol.*, **65**, 1099-1102 (1980) (Y. Hara, H. Katagi and M. Senda).
 6. Plant regeneration from cytoplasmic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **77**, 305-310 (1989) (Z. Q. Yang and T. Shikanai).
 7. Properties of the circular plasmid-like DNA B1 from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice. *Plant & Cell Physiol.*, **28**, 1243-1251 (1987) (T. Shikanai and Z. Q. Yang).
 8. Properties of the circular plasmid-like DNA, B₄ from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice. *Curr. Genet.*, **13**, 441-443 (1988) (T. Shikanai).
 9. Nucleotide sequence and molecular characterization of plasmid-like DNAs from mitochondria of cytoplasmic male-sterile rice. *Curr. Genet.*, **15**, 349-354 (1989) (T. Shikanai and Z. Q. Yang).
- (II) 光独立栄養培養細胞の育成と光合成機能
10. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant & Cell Physiol.*, **19**, 691-699 (1978) (F. Sato).
 11. Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and mixotrophically cultured tobacco cells. *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 47-55 (1980) (K. Nishida and F. Sato).
 12. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase of photomixotrophically cultured green tobacco cells. *Plant & Cell Physiol.*, **29**, 329-337 (1988) (F. Sato and N. Koizumi).
 13. Selection of an atrazine-resistant tobacco cell line having a mutant *psbA* gene. *Mol. Gen. Genet.*, **214**, 358-360 (1988) (F. Sato and Y. Shigematsu).

14. The mechanism of herbicide resistance in tobacco cells with a new mutation in the Q₉ protein. *Plant Physiol.*, **89**, 986-992 (1989) (Y. Shigematsu and F. Sato).
 15. A binding model for phenylurea herbicides based on analysis of a Thr264 mutation in the D-1 protein of tobacco. *Pesticide Biochem. & Physiol.*, **35**, 33-41 (1989) (Y. Shigematsu and F. Sato).
- (Ⅲ) 二次代謝産物高産生細胞の選抜とその利用
16. Selection of high vitamin B₉ producing strains in cultured green cells. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2683-2687 (1980) (K. Watanabe).
 17. Selection of a high stable pigment-producing strain in cultured *Euphorbia millii* cells. *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 113-116 (1982) (Y. Yamamoto and R. Mizuguchi).
 18. Computer tracing of the pedigree of cultured *Euphorbia millii* cells that produce high levels of anthocyanin. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1021-1026 (1983) (Y. Yamamoto, N. Kadota and R. Mizuguchi).
 19. Production of berberine in cultured cells of *Coptis japonica*. *Phytochemistry*, **20**, 545-547 (1981) (F. Sato).
 20. Secondary plant products from cultured hybrid cells. *Proc. Japan Acad.*, **63**, Ser. B, 208-210 (1987) (H. Morikawa, F. Sato and Y. Yamamoto).
 21. Effects of culture conditions on bisbenzylisoquinoline alkaloid production in cultured roots of *Stephania cepharantha*. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1495-1498 (1988) (Y. Sugimoto and Y. Sugimura).
 22. Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplast culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1755-1759 (1985) (Y. Fujita and S. Takahashi).
 23. Selection of reserpine-producing cell strain using UV-light and optimization of reserpine production in

- the selected cell strain. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, **8**, 125-133 (1987) (O. Yamamoto).
24. Anthocyanin production in suspension cultures of high-producing cells of *Euphorbia millii*. *Agric Biol. Chem.*, **53**, 417-423 (1989) (Y. Yamamoto, Y. Kinoshita and S. Watanabe).
25. High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **46**, 61-69 (1989) (K. Matsubara, S. Kitani, T. Yoshioka, T. Morimoto and Y. Fujita).
- (N) 植物培養細胞の二次代謝産物産生機構の解析
26. High berberine-producing culture of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, **23**, 281-285 (1984) (F. Sato).
27. Biotransformation of tetrahydroberberine to berberine by enzymes prepared from cultured *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, **24**, 63-65 (1985) (N. Okada).
28. Comparison of bisbenzylisoquinoline alkaloids in root cultures of *Stephania cepharantha* with those in the parent plant. *J. Natl. Prod.*, **52**, 199-202 (1989) (Y. Sugimoto and Y. Sugimura).
29. Production of bisbenzylisoquinoline alkaloids in cultured roots of *Stephania cepharantha*. *Phytochemistry*, **27**, 1379-1381 (1988) (Y. Sugimoto and Y. Sugimura).
30. Biosynthesis of bisbenzylisoquinoline alkaloids in cultured roots of *Stephania cepharantha*. *FEBS Lett.*, **273**, 82-86 (1990).
31. Putrescine and putrescine N-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. I. Biochemical studies. *Planta*, **178**, 123-130 (1989) (T. Hashimoto and Y. Yukimune).
32. Putrescine and putrescine N-methyltransferase in the biosynthesis of tropane alkaloids in cultured roots of *Hyoscyamus albus*. II. Incorporation of labeled precursors. *Planta*, **178**, 131-137 (1989) (T. Hashimoto

- and Y. Yukiunne).
33. Non-enzymatic synthesis of hygrine from acetacetic acid and from acetonedicarboxylic acid. FEBS Lett., **234**, 86-90 (1988) (T. Endo, N. Hamaguchi and T. Hashimoto).
 34. Purification and characterization of pseudotropine forming tropinone reductase from *Hyoscyamus niger* root cultures. Agric. Biol. Chem., **52**, 2663-2667 (1988) (B. Dräger and T. Hashimoto).
 35. Species-dependent biosynthesis of hyoscyamine. J. Am. Chem. Soc., **111**, 1141-1142 (1989) (T. Hashimoto and E. Leete).
 36. Biosynthesis of tropane alkaloids. Ciba Foundation Symposium, **137**, 199-212 (1988) (T. Hashimoto).
 37. Hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root culture. Plant Physiol., **81**, 619-625 (1986) (T. Hashimoto).
 38. Purification and characterization of hyoscyamine 6 β -hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. Eur. J. Biochem., **164**, 277-285 (1987) (T. Hashimoto).
 39. Epoxidation *in vivo* of hyoscyamine to scopolamine dose not involve a dehydration step. Plant Physiol., **84**, 144-147 (1987) (T. Hashimoto and J. Kohno).
 40. 6 β -hydroxyhyoscyamine epoxidase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. Phytochemistry, **28**, 1077-1082 (1989) (T. Hashimoto and J. Kohno).
 41. Substrate specificity of the hyoscyamine 6 β -hydroxylase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. Proc. Japan Acad., **65**, Ser. B, 156-159 (1989) (T. Hashimoto).
 42. Homogeneous hyoscyamine 6 β -hydroxylase from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. Proc. Japan Acad., **66**, Ser. B, 73-76 (1990) (S. Okabe and T. Hashimoto).

(他論文論文一四〇篇)

総書

- Yamada, Y. with D. A. Evans, W. R. Sharp and P. V. Ammirato (ed.): Handbook of Plant Cell Culture I. 970 pp. Macmillan Publishing Co., N.Y. (1983).
- Yamada, Y. with W. R. Sharp, D. A. Evans and P. V. Ammirato (ed.): Handbook of Plant Cell Culture II. 644 pp. Macmillan Publishing Co., N.Y. (1984).
- Yamada, Y. with P. V. Ammirato, D. A. Evans and W. R. Sharp (ed.): Handbook of Plant Cell Culture III 613 pp. Macmillan Publishing Co., N.Y. (1984).