

ヒトの健康増進を目指したミラクリントマトの研究開発

江面 浩

近年、植物細胞を工場と見立て、遺伝子組換え植物を使った物質生産技術の研究開発が進んでいる。すでに、植物で生産された医薬品が上市されている。一方、一部の医薬品やワクチンを除いて、費用対効果、特に安全性評価に係る費用の観点から、遺伝子組換え植物を使って生産された物質の実用化は大きく進んではいない。

植物が生産するソウマチンやモネリンなどの甘味タンパク質やミラクリンなどの味覚修飾タンパク質は、代替甘味料あるいは人工甘味料として注目されている。ミラクリンは、熱帯西アフリカ原産のミラクルフルーツ (*Richadella dulcifica*; synonym *Synsepalum dulcificum*) の果実に蓄積する糖タンパク質で、酸味を甘味に変える味覚修飾機能を持っている。ミラクリン自体に甘味はないが、赤いミラクルフルーツを口に含んだ後、レモンを食べるとオレンジのような甘味を感じることができる。このユニークな機能からこの植物はミラクルフルーツと命名された¹⁾。

現在、我が国では糖尿病予備軍やメタボリックシンドロームによる医療費の増加は国民のみならず、国財政の大きな負担となっている。そのため、近年では治療医学とともに予防医学の重要性が指摘されている。この味覚修飾機能により、ミラクリンは低カロリー甘味料としての利用や、過剰なエネルギー摂取により発症する疾病予防への利用が期待されている。しかし、ミラクルフルーツはその栽培特性から大量・安定供給が困難である。そこで、現在までに、微生物を用いた大量生産技術の研究開発も試みられてきたが、大量・安定供給には至っていない。我々は、トマトを植物工場として、生産性が高く、後代でも安定してミラクリンを蓄積する組換えトマト (ミラクリントマト) の開発とそれを使ったミラクリン生産技術の基盤作りに取り組んできた²⁾。具体的には、組換えトマトを植物工場内で栽培し、ミラクリンを大量・安定生産するための基盤技術開発を目的に、1) ミラクリンを安定生産するミラクリントマトの開発、2) 植物工場向けの小型ミラクリントマトの開発、3) 植物工場におけるミラクリントマトの栽培技術の開発、4) ミラクリントマトからのミラクリン精製法の開発、5) ミラ

クリントマトの食品としての安全性評価と栽培を行うにあたっての環境影響評価に取り組んでいる。併せて、海外 (インドネシア) においても実用化を目指し、食品安全性評価と環境影響評価に関する共同研究を展開している。ここでは、上記1), 2), 3), 5) について概要を紹介する。

なお、本研究は、経済産業省の「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発/植物利用高付加価値植物製造基盤技術開発」事業およびJSPS二国間交流事業共同研究/日本-インドネシア共同研究「遺伝子組換え作物評価法の日本-インドネシア比較と標準化」の課題として実施した。

ミラクリントマトの開発

微生物を宿主とし、組換えミラクリンの生産には成功したものの、ミラクルフルーツ由来のミラクリンの甘味誘導活性と比較してその相対活性は5分の1以下であった²⁾。そこで、イチゴ、レタス、トマトを宿主として組換えミラクリン農作物の開発が試みられた。しかし、イチゴでは組換えミラクリンの蓄積量が非常に少なかった。レタスでは組換えミラクリンの十分な蓄積がみられ、天然ミラクリンと同等の相対活性を示したものの、遺伝的安定性が保たれず、後代において組換えミラクリンを蓄積できなくなるといった問題が生じた。トマトでは、果実でレタスのおよそ2倍の組換えミラクリンを生産した。この組換えミラクリンは、天然ミラクリンと同等の相対活性を持ち、遺伝的安定性はミラクリン遺伝子の発現量、ミラクリン蓄積量において5世代以上にわたって確認できた³⁾。以上から、ミラクリンを生産するためのプラットホームとしてトマトが適していることが示された。また、トマトは遺伝子組換え体の作出技術も確立していることから、組換えミラクリン生産性のさらなる改善のためにも有効と考えられた。

初期に開発した品種“MoneyMaker”を親とするミラクリントマトでは、トマトの赤熟果実に全可溶性タンパク質の約1%のミラクリンを蓄積していた。しかし、ミラクルフルーツは全可溶性タンパク質あたり、約10%

のミラクリンを蓄積する。そのため、トマト果実内でもミラクリンを可溶性タンパク質あたり10%程度集積させることは可能ではないかと考えた。そこで導入遺伝子の改良を行い、“Micro-Tom”トマトを親とする果実で全可溶性タンパク質あたり最高で17%の組換えミラクリン蓄積を達成した⁴⁾。ミラクリンは、トマト果実において新鮮重あたりでは外果皮、つまり皮の部分にもっともミラクリンを高濃度で蓄積する⁵⁾。ミラクリンは細胞と細胞の間である細胞間層に輸送され蓄積するため⁶⁾、小さな細胞が多く集まる組織は必然的に細胞間層の占める割合が増え、ミラクリン蓄積量が高くなる傾向がある。トマト果実の外果皮は他の組織に比べ細胞が小さいため単位重量あたりのミラクリン濃度が高くなるわけである。また、外果皮の果実重に占める割合は、通常小さい果実で高く、調査した中では“Micro-Tom”がもっとも外果皮率が高く8.16%、初期の組換えトマトの親である“Moneymaker”では1.94%であり⁶⁾、同じ果実収穫量を得られた場合“Micro-Tom”でミラクリンを生産させた場合に、より生産性が高くなると考えられた。つまり、組換えミラクリンの増産のためには品種の選択も重要な要素であるといえる。

植物工場向けの小型ミラクリントマトの開発

植物は最適な環境条件下で栽培することで、早く安定した成長を示す。人工光型植物工場では、環境を人工制御できるため、安定した環境下で周年栽培が可能となり、収量と品質が安定する。さらに、閉鎖環境下での栽培では、外界からの病害虫の侵入を防ぐことが可能なため、

農薬の利用を低減できる。また、遺伝子組換えトマトの屋外での栽培は、現在の日本では環境への遺伝子拡散防止の観点から規則に従った環境影響評価の結果を待つ必要があるが、閉鎖環境にすることで自然界への遺伝子流出を防止できるため、遺伝子組換え植物の栽培も比較的容易になる。しかし、このような利点がある一方で、設備設置費用や運営維持費が高いこと、確立されている多くの人工光型植物工場の対象は葉菜類に限られ、トマトを含む果菜類ではコスト的課題が残されている。そこで、トマトに適した閉鎖型の栽培装置を開発し、この装置を利用した収量増加のための栽培条件の最適化を行った。

まず、トマト用の植物工場システムの開発を試みた。栽培システムは、二つのグロースチャンバーを縦に2段重ねた二層式の栽培装置とし、薄膜水耕法による水耕栽培を採用した(図1)⁷⁾。初期に開発したミラクリントマトは、品種“Moneymaker”を使って作出された系統で、この品種は無限成長するため、植物工場での限られた栽培空間に合わせて第一花房の上3葉を残して剪定作業を行い、草勢を調節した。閉鎖型植物工場では、トマトは温室よりも均一に早く成長し、この装置を使って栽培したトマト果実のミラクリン蓄積量は、屋外にある特定網室で栽培したトマトよりも安定化した(図2)⁷⁾。将来、精製組換えミラクリン、あるいはミラクルトマト自体を生食用の果実として商業利用するうえで、閉鎖型植物工場の利用は安定生産、品質の維持のために欠かせない手段といえる。

露地栽培や一般温室栽培用に開発されたトマト品種は一般的に無限成長するため草丈も高く、栽培期間も長い

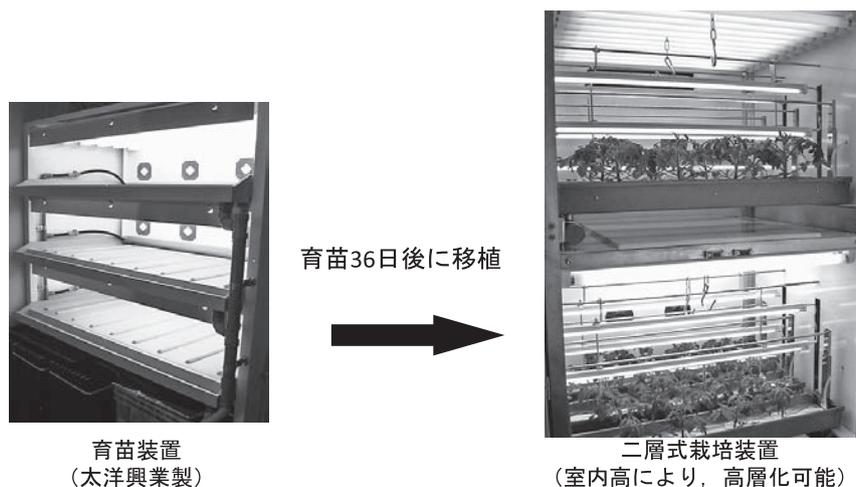
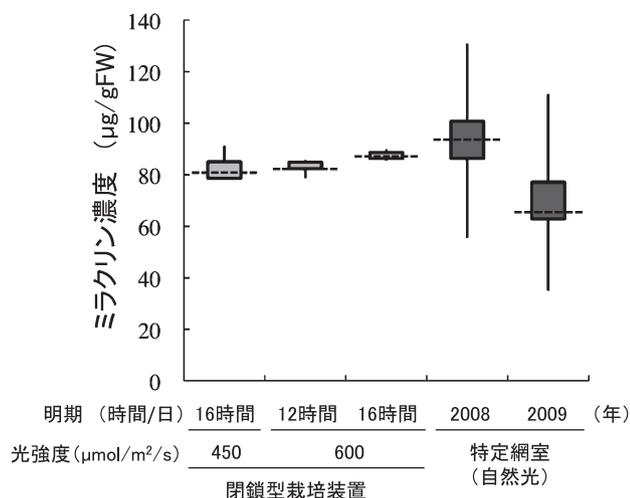


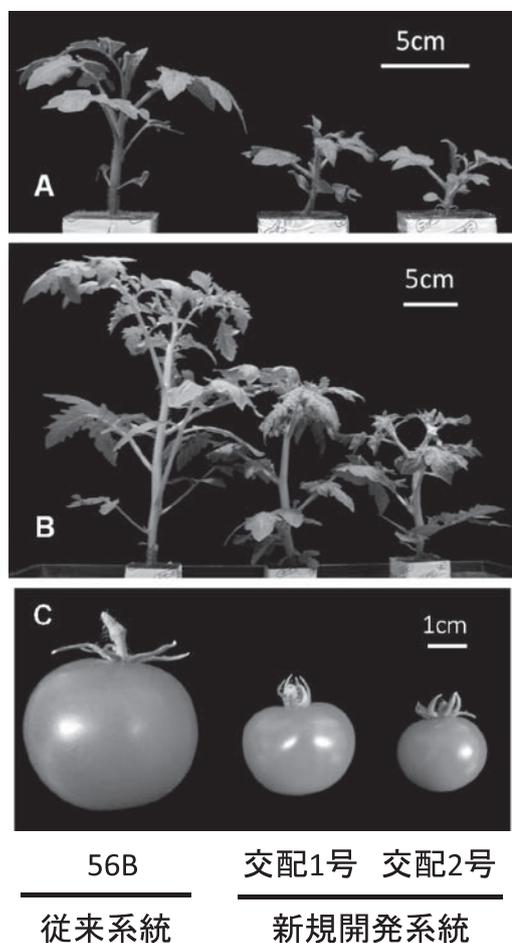
図1. 開発したトマト用閉鎖型栽培装置

特 集

図2. 開発したトマト用閉鎖型栽培装置⁸⁾

ため、スペースの限られた人工光型の閉鎖型植物工場には不向きである。トマト用の栽培装置を使った場合でも例外ではなく、限られた空間で栽培するために第一花房のみを栽培する生産システムを行う必要があった。そこで、閉鎖型植物工場向けの品種開発に着手した。それでは、閉鎖型植物工場向けの品種にはどのような性質が必要か？限られた空間で生産コストを下げるために、もっとも重要なことは生産量を増やすことである。多段式の栽培は空間を効率的に使用できる点で有利であるが、これを実現するには芯止まり形質を有し、草姿が小さい品種が好ましい。さらに、栽培期間が短く、できるだけ果実数、果実サイズが大きい品種が理想的である。これに加えて、トマトを使った組換えタンパク質の生産を目的とした場合では、生産したい組換えタンパク質の蓄積特性なども把握し、栽培条件や品種・育種選抜の際の選定条件に加える必要がある。

ミラクリンをトマトで生産するための閉鎖型植物工場用品種育成のため、中玉で無限成長する“Moneymaker”から作出したミラクルトマト56B系統と、芯止まり形質を有し小型矮性品種の“Micro-Tom”を交配し、育種を行った⁹⁾。“Micro-Tom”の小型矮性形質は閉鎖型植物工場での栽培に必須の要素である。選抜では、組換えミラクリンを蓄積し、芯止まり形質を示す系統を選抜し、最終的に果実収量、植物体の大きさを指標として二つの交配系統を選抜し、世代を進めて性質を固定した(図3)。開発した2系統を閉鎖型植物工場での栽培試験を行ったところ⁸⁾、植物体サイズが小さいことで56B系統の2倍の栽植密度での栽培が可能であった。栽培中の生育特性と

図3. 従来系統と新規開発系統の植物体および果実のサイズ⁹⁾。A: 播種22日目, B: 播種32日目, C: 平均的なサイズの各果実。

しては、開発系統の一つ、交配1号は二層式栽培装置に移植した後、草勢が強くなり草姿が乱れたために、余分な腋芽や葉を除くための剪定作業が必要となった。一方で、交配2号では草姿が安定し剪定作業を必要とせず、56B系統や交配1号で見られた果実の裂果が見られなかった。植物1個体あたりの果実収量は、交配1号がもっとも収量が高く、交配2号と56B系統は同程度であった。ただし、栽培面積あたりでは、交配1号に続き、より密植が可能な交配2号のほうが56B系統よりも高い収量となった。組換えミラクリンの生産性は果肉中のミラクリン蓄積量を調査することで行った。果肉のミラクリン濃度は開発した2系統とも56B系統よりも2.5倍高かった。これは果実収量が同程度である場合、ミラクリンの生産性としては開発系統が優れていることを示す。

閉鎖型植物工場での栽培試験に基づき、単位面積あたりの年間の果実収量とミラクリン蓄積量から試算した結果、ミラクリン生産量は年間1 m²あたり56B系統2.2 g、

交配1号16.6 g、交配2号9.8 gとなり、新規開発系統は従来系統のおよそ5~8倍であった。今回は、育苗期間や栽培棚などの設定を56B系統の栽培に合わせて行っていたが、仮に交配1号、あるいは交配2号に最適な栽培条件下で栽培を実施した場合にはさらなる果実収量の増加、ミラクリン生産性の向上が期待できる。また、交配1号、2号を比較した場合、交配1号は果実収量が多いものの、草姿が乱れ、栽培に手間がかかることから人件費がかかり、人の手が入る割合が増えることで果実収量のバラツキが大きくなることなどが想定された。一方で、交配2号は草姿が安定していることから、栽培管理にかかる人件費が安く、果実収量も安定することが予想される。加えて、交配1号よりも草丈が低いため今回の二層式の栽培装置分の高さで三層分の棚を設置した場合でも栽培が可能であり、空間を有効利用できることから果実収量のさらなる増加が見込まれた。総じて、栽培にかかる労力（人件費）、果実収量の安定性、今後栽培を最適化したときに見込まれる収量増加の期待値からミラクリン生産のための植物工場用品種として交配2号が適していた。

植物工場におけるトマト高収量栽培技術の開発

閉鎖型植物工場で栽培を行う上での主な稼働費用は電気代である。特に光源に供給するエネルギーおよび、複数の光源による温度上昇を抑えるための空調にかかる費用が大きい。そのため、栽培に必要な光強度の限界値を知ることは有益である。そこで光環境の違いによって、植物の生育やミラクリン濃度に及ぼす影響を調査した⁹⁾。試験には、閉鎖型植物工場用に育種開発したミラクリントマト（交配2号）を用いた。この交配2号は植物体サイズが小さいため、二層式栽培装置を用いなくても育苗に用いた苗テラスだけでも栽培可能である。さらに交配2号は“Micro-Tom”の性質を多く有しているため、比較的弱い光強度でも栽培が可能であると予想された。

交配2号は光強度PPF（photosynthetic photon flux, 光合成有効光量子束）400のもと、34日間育苗後、PPF100, 200, 300, 400の光条件下に移植した。その際、明期/暗期は12時間で切り替え、二酸化炭素は1000 ppmの一定濃度、温度は明期/暗期で24°C/18°Cとした。また、光条件を変更した後の栽植密度は44.4植物体/m²とした。

トマト果実の収量は、光強度に依存しPPF400で果実数、収穫量ともに最大となった。しかし、新鮮重あたりのミラクリン蓄積量は、収量とは逆に光強度に反比例し

てPPF100でもっとも高い値を示した。この理由としては、①光強度が弱い、②果実の成長・成熟時間が長くなる、③ミラクリンが果実に蓄積する期間が長くなる、④ミラクリンが多く蓄積すると考えられた。PPF400でも、赤熟に達してからの収穫時期を2, 4, 6週後と遅らせることでミラクリンの蓄積量はPPF100とほぼ同等まで増加していることから、果実の成熟期間の長さがミラクリン蓄積量に影響していることは明らかである。

本実験から、投入エネルギーあたりのミラクリン生産量はPPF100がもっとも高い結果となったが、一定面積あたりではPPF300でもっとも高い生産量となった。また、“MoneyMaker”を親とするミラクリントマト56B系統は弱光下では正常に栽培できないが、この試験で栽培した交配2号はPPF100でも正常な植物体を栽培することが可能であることを示した。これは、小型矮性の“Micro-Tom”と交配したことで、生育に必要な光要求量が少なくなったためと考えられる。つまり、光要求量の点においても閉鎖型の植物工場に適した品種であることが証明された。

遺伝子組換え植物を使って組換えタンパク質を大量生産するためには最適な栽培環境条件を確立することが重要である。この研究で、組換えトマト果実におけるミラクリンの蓄積量をもっとも収量の低い、弱い光条件下で最高に達した。弱い光条件の利点は、電気代を抑えることができるため安価かつ効率的に組換えミラクリンを生産できることである。しかし、多少生産コストが高くなっても、需要が高く利益が得られる場合、生産性の高さを重視して強い光強度、今回の場合はPPF300で栽培するという選択肢もある。すなわち、需要と供給のバランスから経営目的に応じて、適した光条件を選択することが重要である。この研究では、生産コストを極力抑えて栽培する場合、およびコストよりも生産性重視の栽培する場合での光栽培条件の指標が提案できた。

組換えトマト由来ミラクリンの安全性評価

開発したミラクリントマトは、ミラクリンの生産性という点では、すでに実用化に耐えうるレベルに達していると考えている。現在、次の段階として、食品としての安全性評価の審査とカルタヘナ法に基づいた環境影響評価の審査のためのデータの蓄積を行っている。さらに、開発したミラクリントマトの海外での利用も想定し、インドネシアにおいて、共同研究機関とともに、食品としての安全性評価の審査とカルタヘナ法に基づいた環

特 集



図4. インドネシアの共同研究先の温室で栽培中のミラクリントマト (2014年6月26日).

境影響評価の審査のためのデータの蓄積を進めている (図4).

おわりに

これまでの研究で、草勢が小型で一定面積での栽培個体数が多く、収穫開始も早く、芯止まり形質を備えているために管理も省力化が可能な植物工場用のミラクリントマトが開発された。ミラクリンの生産性と稼働コストを考慮した栽培条件の提案もなされている。ミラクルフROOTSのミラクリン濃度は400 $\mu\text{g/gFW}$ で果実一つの果肉部分の重さは約1 gなので400 μg あれば甘味誘導に十分な量といえるが、新規開発系統のミラクリントマトでは栽培の光強度の違いでバラツキはあるものの210~470 $\mu\text{g/gFW}$ のミラクリンを含む。ミラクリントマト果実1個の重さは4.0~5.6 gであることから、果実一つの摂取で十分なミラクリンの効果が得られる。将来的に生食用としてミラクリントマトの販売が可能となった場合、十分対応できる濃度のミラクリンを含有していると

言える。

それでは今後、ミラクルトマトを利用した植物工場でのミラクリン生産性向上、低コスト化、増収を進めるために必要な要素には何があるだろうか。一つは、単為結果性形質の付与である。トマトは自然状態では着果が不十分となるため、安定した果実生産を行うには人の手による受粉作業が必要となる。この作業は時間と労力を浪費し人件費を増加させる。そのため、さらなる省力化のためには自動受粉装置を開発することも一つの手だろう。しかし、単為結果性能力を備えたトマトが開発できれば、装置の設置や稼働コストがかからず、結実を安定化させることが可能となる。また、単為結果性果実の多くが示す、“種無し性”は、トマトからのミラクリン精製、加工の際、作業工程を簡素化できる利点や、遺伝子組換えトマト種子の外部環境への拡散を防止できるため、遺伝子組換え技術により開発した品種の安全な利用や保護にもつながる。

以上、ミラクリントマト開発研究の現状を紹介してきたが、今後、実用化し、ヒトの健康増進に貢献することを期待したい。

文 献

- 1) Kurihara, K. and Beidler, S.: *Science*, **161**, 1241 (1968).
- 2) Hiwasa-Tanase, H. *et al.*: *Plant Cell Rep.*, **31**, 513 (2012).
- 3) Yano, M. *et al.*: *Plant Sci.*, **178**, 469 (2010).
- 4) Hirai, T. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 9942 (2011).
- 5) Kim, Y. W. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 282 (2010).
- 6) Hirai, T. *et al.*: *J. Plant Physiol.*, **167**, 209 (2010).
- 7) Hirai, T. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 6096 (2010).
- 8) Kato, K. *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 9505 (2010).
- 9) Kato, K. *et al.*: *Plant Signal. Behav.*, **6**, 1172 (2011).