

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 中村雅之

本論文は、植物培養細胞における二次代謝物の生産性を向上させる手法として、通気ガスや培地成分等の環境因子の影響に関する検討ならびに変異株や高生産株の取得と選抜方法に関する検討を行い、各手法の二次代謝物生産性向上に対する有効性を明らかにすることを目的としたもので、全10章から構成されている。

第1章では、本論文の意義を明確にするために、植物培養細胞を用いた物質生産に関する既往の研究のまとめ、および本論文の研究目的を示した。

第2章では、植物培養細胞のフラスコバッチ培養における、酸素や二酸化炭素などのガス環境の影響について検討した。特に、フラスコ栓のガス移動を容量係数として定義し、この値と気液界面でのガス移動容量係数の値に基づきガス移動の物質収支式を立て、これに基づいてフラスコバッチ培養における植物培養細胞の臨界酸素取り込み速度(COUR)を新たに定義した。そして、このCOURを酸素供給の評価基準として用いることを提案した。その結果、これまで比較的問題とされて来なかった植物細胞フラスコ培養系の通気的重要性を定量的に明らかにしている。さらに、イチゴ培養細胞を用いて、酸素と二酸化炭素の培地中およびフラスコ気相中の経時的濃度変化のシミュレーションを行い、実験結果とよい一致を示すことにより、モデルの有効性を確認した。

第3章では、二次代謝物生産に対するガス環境の影響を検討するため、ガス濃度ならびに、光照射条件を制御する新規なフラスコ培養装置を作成した。イチゴ培養細胞を用いて、酸素濃度やエチレン濃度のアントシアニン生産への影響を検討した。細胞増殖よりもアントシアニン生産に対して、低酸素濃度での障害が大きいことが明らかになった。

第4章では、培地成分としての植物ホルモンおよびリン酸の濃度を減少させることによる、二次代謝物の生産性向上を検討した。植物ホルモンの1つであるオーキシン(2,4-D)の濃度低下により、アントシアニン比生産速度は約2倍に向上した。リン酸の濃度低下実験においても、同様の傾向(細胞増殖抑制ならびにアントシアニン含量の向上)が観察された。さらに、細胞増殖抑制がアントシアニン類の組成に及ぼす影響も検討した。イチゴ培養細胞では、明赤色のシアニジン-3-グルコシドと、それがメチル化された暗赤色のペオニジン-3-グルコシドの2つのアントシアニンが同時に生産されているが、細胞増殖抑制下において、ペオニジン-3-グルコシドの比率の増加(アントシアニンのメチル化促進)を起こることを初めて明らかにした。

第5章では、培地にアントシアニンの前駆体を添加することによる二次代謝物の生産性向上

を検討した。低濃度（1—10 mg/L）のフェニルアラニン，または桂皮酸を添加することにより，アントシアニン生産を最高 1.5 倍まで向上させることができた。一方，高濃度（50—1000 mg/L）の添加が，細胞増殖およびアントシアニン生産に阻害的に働くことを明らかにした。

第 6 章では，植物の防御シグナル物質の 1 つであるジャスモン酸メチルを用いて，イチゴ培養細胞によるアントシアニン生およびヨウシュヤマゴボウによるベタシアニンの生産性向上を検討した。双方において，ジャスモン酸メチルの色素生産への促進的効果が確認された。

第 7 章では，アントシアニンの生産性が非常に高いイチゴ培養細胞の変異株（FAR）の取得し，親株（FAW）との比較を行った。自発的に変異の生じた細胞を長期間に渡って選抜を繰り返しながら培養することにより，新たな株（FAR）を樹立した。FAW との比較において，増殖速度は幾分低い（最大比増殖速度；FAR: 2.3 (d<sup>-1</sup>), FAW: 3.3 (d<sup>-1</sup>)) もの，アントシアニン生産性が飛躍的に向上していることが明らかとなった。また，FAR は暗所においても 20 mg/g-dcw の高含有量を示した。フェノール性化合物の生産性も向上していることより，FAR ではアントシアニン合成系を含むフェニルプロパノイド系全体が大幅に活性化していることが示唆された。暗所でのアントシアニン高生産能を有する FAR 株は工業的な利用が強く期待される。

第 8 章では，イチゴ培養細胞に遺伝子導入することにより，アントシアニン生産の向上を試みた。導入はアグロバクテリウムを介した T-DNA 法によって行った。マーカーである GUS 遺伝子の導入を酵素活性により確認したが，安定な細胞株を樹立するには至らなかった。

第 9 章では，細胞選抜の新規な手法として，マグネットを用いた細胞分離技術の植物培養細胞への適用を試みた。直径 100 nm 前後の微小なマグネットビーズと，フロースルー型の分離装置を用いることにより，細胞表面のリガンド量の相違によって細胞を磁気分離する方法を提案した。特に，分離条件の決定に必要な，磁化細胞の磁場内での速度分布を測定する装置（Cell Tracking Velocimetry, CTV）の開発を行った。CTV では，磁場強度の勾配を一定になるよう設計することにより，磁場内での細胞の移動速度が一定となることが特徴である。また，画像処理およびトラッキングアルゴリズムを用いることで，速度測定を自動化し，多量のサンプルを測定することが可能となった。マグネットを添加した擬似細胞ビーズを用いて，CTV の測定能力を評価し，10<sup>-6</sup>から 10<sup>-2</sup> (mm<sup>3</sup>/T·A·s) の広い範囲での速度測定を実現した。CTV の開発により，植物培養細胞の磁気分離の可能性が大きく広がった。

第 10 章では，本研究を総括し，今後の展望を述べている。

以上述べてきたように，本論文は，植物培養細胞の二次代謝物生産性を向上させる様々な手法を詳細に検討しその有効性を評価したもので，植物培養細胞を用いた工業的物質生産に貢献するものと期待される。よって，本論文は，博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。