

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 枝廣 純一

本論文は、植物培養細胞を用いた有用物質生産プロセスの生産性向上を目指して行った培養工学的研究について纏められたものであり、高生産細胞株の選抜技術、二次代謝活性に基づく細胞集塊形成のコントロール、及び前駆体の逐次添加による目的物質の生産性向上について記述されている。本論文の目的は植物細胞を物質生産のソースとして用いる際に生ずる諸問題を解決することであり、植物培養細胞固有の問題点に着目している点にその特徴がある。本論文は全5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、研究の背景として、植物培養細胞を有用物質生産に用いる際に障害となる植物細胞固有の問題を明確にし、それらを如何にして解決するかについて論じてられている。以下の章では、本章の議論に基づいて行われた具体的な研究の成果について述べられている。

第2章では、有用物質の高生産細胞を選抜するために行った、水性二相分配法による細胞分離の研究について述べられている。植物培養細胞は培養中に細胞集塊（アグリゲート）を形成し、これが細胞の増殖や代謝に必要であることが報告されている。従ってアグリゲートを酵素処理によって単細胞化する必要がある細胞選抜操作、即ち微生物細胞の選抜に頻用される単細胞由来のクローンコロニーの取得等には、現在のところ大きな困難が伴う。本論文では、アグリゲートの単細胞化をおこなわず、目的細胞を多く含むアグリゲートの回収を簡易な手法で行うことにより、目的の細胞を多く含む細胞集団を迅速に取得するための新規な手法が提案されている。

水性二相系は連続相が水であるため、細胞や生体高分子などの非侵襲的分離操作に応用されてきたが、粒径の大きな植物細胞アグリゲートは界面に沈降し、分離後の細胞同士が混合するという問題点があった。そこで、本論文では、細胞の分配平衡の成立を待たず、相分離した水性二相系に細胞が均一に分散した状態で細胞を回収することを提案し、このことによって植物培養細胞のアグリゲートの分離も可能になることを明らかにしている。また、この手法を利用して、単一の細胞株として確立されたイチゴ培養細胞株を2つの細胞アグリゲート集団に分け、同株がアグリゲート表面の親疎水性または電荷に関してヘテロな細胞集団であることを示している。

さらに、分離された2つの細胞集団のアントシアニン含有量が異なることを見だし、アグリゲート表面の性質の違いに基づき、有用二次代謝産物の高蓄積細

胞株を、簡便な操作で短時間に分離できることが可能であることが示されている。植物培養細胞の選抜を目的として水性二相分配法を用いたのは本論文が初めてであり、またそれによって細胞表面の性質がヘテロであり、細胞内の二次代謝活性と相関をもつことを初めて明らかにしている。

第3章では、二次代謝活性に基づくアグリゲート形成の制御について述べられている。培養中に細胞が受けるシアストレスを低減するためにはアグリゲートは小さいことが望ましいが、増殖や代謝物生産を促進するためにはある程度の大きさのアグリゲートの形成が必要である。そのため細胞にダメージを与えずにアグリゲートサイズを適切にコントロールする技術が必要とされていた。本論文では植物の代表的な二次代謝系であるフェニルプロパノイド代謝系、及びその下流のフラボノイド代謝系がアグリゲート形成に及ぼす働きに着目している。同代謝系の特異的阻害剤 AOPP を培地中に添加することにより、細胞増殖やタンパク合成に影響を与えることなく、培養中期のアグリゲートサイズが顕著に減少することを明らかにしている。本論文は上記の代謝系がアグリゲート形成に一定の役割を果たしていることを直接的に証明した初めての報告である。また、アグリゲートサイズと相関のある具体的な代謝産物の特定には至らなかったが、本法がアグリゲートサイズをコントロールするための一般的な手法として応用可能であることが示唆された。

第4章では、培地条件の調節による有用物質の生産性向上について述べている。一般に細胞の培養は回分操作で行われるが、その場合、培養の進行と共に培養条件が非定常に変化する。本論文では特定の培地条件を一定に維持することで、目的物質の生産性を大きく高めることができると考え、アントシアニンを生産するイチゴ培養細胞に対し、その生合成前駆体であるアミノ酸 L-フェニルアラニンを培地中に複数回にわたって逐次添加し、アントシアニンの生産性を大幅に向上させることが可能であることが明らかにしている。

第5章においては、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、植物培養細胞を用いた物質生産プロセスの問題点を明確にし、それらの解決手段となりうる基礎的技術を提示したものである。これらの成果は、植物培養細胞の増殖および物質生産の特性制御に関する重要な結論を含んでいるため、生物学・植物細胞工学・生物化学工学の発展に寄与すると同時に、植物培養細胞を用いた工業スケールの二次代謝物質生産プロセスの開発を行なうにあたっても実用的な手法としても大きな意義を持つものと考えられる。

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。