

氏名(本籍)	いわせあきら 岩瀬 哲 (東京都)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第2141号
学位授与年月日	平成17年7月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	植物細胞の分化・脱分化制御による新規な有用物質生産法の開発に関する研究

主査	筑波大学教授	工学博士	田中秀夫
副査	筑波大学教授	農学博士	松本宏
副査	筑波大学教授	工学博士	王碧昭
副査	筑波大学助教授	農学博士	青柳秀紀

論文の内容の要旨

植物培養細胞を用いた有用物質生産は約40年に及ぶ研究にも関わらず、工業化に至った例は数例しかない。この最大の原因は、分化した組織細胞から脱分化した培養細胞を誘導する際に、それまで有していた有用物質(主に二次代謝産物)の生産能が失われてしまうことにある。また高生産株を得ても生産能が不安定なことにある。本研究はこのような背景をふまえて、分子生物学的なアプローチと培養工学的なアプローチから新規な有用物質生産法の開発に取り組んだ。

まず分子生物学的なアプローチから、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のDNAマイクロアレイを用いて、植物体の組織細胞と3種類の培養細胞の遺伝子発現を比較解析した。この結果、今回用いた遺伝子選抜条件では、どの培養細胞株でも変化が見られたのはマイクロアレイ上の全遺伝子中の1%以下という傾向であった。変化があった遺伝子では、培養細胞で発現が抑制されるものが多く、培養細胞は組織細胞に比べて様々な機能が抑制されていることが推測された。

次にマイクロアレイの結果を基に新規な培養細胞の開発に取り組んだ。培養細胞を誘導する際に用いる植物ホルモンは、細胞の脱分化を促進するとともに二次代謝を抑制する場合が多い。脱分化を制御する遺伝子のみを細胞で発現させることができれば、ホルモンを添加せずに培養細胞が得られると考えた。そこで、上記したマイクロアレイの結果から、培養細胞で発現の促進がみられた転写因子に特に注目した。この転写因子を植物体で強制的に発現させたところ、脱分化した細胞塊が誘導された。単離した細胞塊は植物ホルモンフリーの固体および液体培地で増殖し継代培養が可能であった。またこの転写因子のホモログ遺伝子についても同様の結果が得られた。得られた培養細胞は、植物ホルモンを用いて誘導した従来の培養細胞に比べ高いアントシアニン生産能を示した。これらの結果は新規な培養細胞の誘導法を提案すると共にこのように誘導された細胞を用いて有用物質生産が可能であることを示唆するものである。

培養工学的なアプローチとして、植物体の組織細胞を直接培養する新規な有用物質生産法の開発に取り組んだ。植物組織は、分化し安定した二次代謝能を有する細胞が高密度に固定化された状態であると培養工学的に捉えられる。適切な培養環境を設定することで植物組織が有する二次代謝能を活性化させることを考えた。モデルとして薬用植物としての研究が古くからされているニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) を用いた。

ニチニチソウの植物体から摘出した葉を用い、有用な二次代謝産物である Terpenoid Indole Alkaloid (TIA) の生産を試みた。糖を含むホルモンフリーの MS 液体培地、暗条件下で葉を振盪培養したところ、糖の消費と乾燥重量の増加がみられたが、TIA の生産は認められなかった。種々検討した結果、培地の浸透圧を調整し、明条件下で培養することにより、TIA の一種であり植物体では主に根に蓄積する Ajmalicine (Aj) と Serpentine (Sp) の生産が見られた。Aj は培養 0 日目の葉 (コントロール) では検出されない成分であった。Aj と Sp は、乾燥重量の増加が停止する培養 7 日目前後から顕著に増加した。そこで、糖が消費され尽くす培養 10 日目に糖を添加したところ Aj と Sp の生産がさらに増大し、培養 18 日間で、Aj を約 1.6mg/g D.C.W., Sp をコントロール比で約 11 倍生産した。これらの結果は分化した組織を直接用いた有用物質生産の可能性を示すものである。

以上のように本研究では、植物細胞の脱分化および分化に注目し、分子生物学的および培養工学的なアプローチから植物細胞の新規な有用物質生産法の開発に関する重要な知見が得られた。今後、ここで得られた分子生物学的なアプローチと培養工学的なアプローチをさらに融合させるようなアプローチを検討して行くことも必要である。本研究を通して得られた知見は、従来の植物培養細胞による有用物質生産法の問題点を排除した新規な有用物質生産法の開発の基礎になりうることが考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、植物培養細胞を用いた有用物質生産がこれまで必ずしも成功していないという歴史的背景をふまえて、この主な原因が細胞の脱分化の過程や継代培養される過程で有用物質生産能を消失することにあることを考慮し、植物細胞の分化と脱分化に着目した新規な有用物質生産法の開発を目的とした研究である。まず植物細胞の「脱分化」に着目し、分子生物学的なアプローチから、シロイヌナズナの植物体と培養細胞の差異を遺伝子発現レベルから比較した。この結果、培養細胞では様々な遺伝子の発現が抑制されていることが明らかとなった。この解析から培養細胞で発現が促進されている転写因子の遺伝子に着目し、この遺伝子を植物体で強制的に発現させることによって、植物細胞の脱分化が引き起こされることを発見した。次に、このように誘導された脱分化細胞がホルモンフリーの培地でも継代培養が可能であり有用物質生産にも適応が可能であることを明らかにした。さらに植物細胞の「分化」に着目し、培養工学的なアプローチからニチニチソウの組織 (葉) を直接培養する有用物質生産法の開発に取り組み、培養法の構築や培養条件の設定を通して、従来根に蓄積する有用なアルカロイドを葉で高濃度に生産させ、蓄積させることに成功した。

これらの着眼点やアプローチは、いずれも新規であり、非常に独創的な研究と言える。また得られた結果および発見は、応用科学のみならず基礎科学にも大いに貢献することが期待される。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。