

氏名(本籍)	あお やぎ ひで き 青柳秀紀(東京都)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 1069 号		
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審査研究科	農 学 研 究 科		
学位論文題目	植物懸濁培養細胞のプロトプラスト化最適反応条件の定量的設定法の開発		
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	石 塚 皓 造
副査	筑波大学教授	農学博士	前 川 孝 昭
副査	筑波大学助教授	農学博士	白 井 健 二

論 文 の 要 旨

植物懸濁培養細胞のプロトプラストは細胞融合や遺伝子導入に用いられる重要な素材であり、その際に用いるプロトプラストは生存活性が高いことが必須条件である。生存活性が高いプロトプラストを効率よく獲得するためには、細胞をプロトプラスト化するための酵素反応を最適条件下で行う必要がある。しかしながら、これまでプロトプラスト化反応の条件設定は、主として顕微鏡観察などによる経験的な試行錯誤法によって行われてきたため、必ずしも適切になされてきたとは言いがたく、その上、最適条件の設定には莫大な労力や時間が費やされてきた。

本研究では、生存活性の高いプロトプラストを効率的に獲得するために必要なプロトプラスト化最適条件を短時間で簡便かつ客観的に設定できる方法の開発を目的とし、そのために植物細胞のプロトプラスト化反応プロセスの定量化と生存活性の測定法の確立を行い、実際に両法に基づいてタバコ懸濁培養細胞から生存活性の高いプロトプラストの獲得を試みている。本研究の内容は以下のような項目にまとめられる。

- ① 植物懸濁培養細胞の物性値の測定
 - ② 植物懸濁培養細胞濃度の光学的測定法の開発
 - ③ プロトプラスト化反応プロセスの定量化
 - ④ プロトプラストの生存活性測定法の開発
 - ⑤ タバコ懸濁培養細胞の最適プロトプラスト化条件の定量的設定
- ① 植物懸濁培養細胞の物性値の測定

従来、経験的に観察されてきたプロトプラスト化反応プロセスを定量化するために、*Catharanth-*

us roseus (ニチニチソウ) と *Nicotiana tabacum* (タバコ) 細胞を用い種々模索した結果、粒径分布測定装置により細胞集塊がプロトプラストに変化するのに伴いサイズが小さくなることを見いだした。本研究ではこの細胞の形態変化を測光法により連続測定できればプロトプラスト化反応プロセスの定量化が可能であろうと推定した。細胞の形態変化を測光法で測定する際、液中の細胞の挙動を定量的に把握するための基礎値となる植物細胞の物性値 (サイズと密度) の測定を行った。その結果、植物細胞は単一細胞の状態より、複数の細胞で構成される細胞集塊の状態で数多く存在し、広い集塊サイズ分布を有することが明らかとなった (*C. roseus* 32~500 μm , *Oryza sativa* [イネ] 32~2000 μm)。細胞が存在する培養液の浸透圧を考慮した精度の高い植物細胞密度測定法を新たに開発し、密度測定を行った結果、*C. roseus*細胞(1.010–1.028g/cm³)は*O. sativa*細胞(1.030–1.064 g/cm³)に比べ小さく狭い密度分布を有すること、同じ細胞株でもAgeや集塊サイズにより密度は大きく異なること、を明らかにした。

② 植物懸濁培養細胞濃度の光学的測定法の開発

プロトプラスト化に伴う植物細胞の形態変化を光学的に測定するために、従来、不均一系のため測定が不可能であった植物懸濁培養細胞の細胞濃度の光学的測定法の開発を行った。植物細胞濃度の光学的測定のため、光学密度 (O. D.) 測定用セル中の細胞懸濁液の均一混合が可能な特殊分光光度計を開発した。本装置は攪拌混合により、系を不均一にする要因である細胞の沈降を防ぎ、セル内の擬似均一系を実現した。なお、植物細胞 (集塊) およびプロトプラストは、高い攪拌速度により生じる物理的ストレスに対して破壊されやすい点と、低い攪拌速度では細胞集塊の沈降に伴いO. D.の減少が生じる点を考慮し、セル中の攪拌子の攪拌速度を2500rpmと設定した。その結果ほぼ一定のO. D.がレコーダー上の読みで得られ、その値は高い再現性を示した。*C. roseus*と*O. sativa*の細胞懸濁液において本装置により測定した細胞濃度の値は乾燥細胞重量基準の細胞濃度と一致し、広い条件下で光学的測定による植物懸濁細胞濃度の測定が可能となった。

③ プロトプラスト化反応プロセスの定量化

開発した特殊分光光度計を用いて、プロトプラスト化反応プロセスの定量化を行った。プロトプラスト化に伴う細胞の形態変化を、O. D.₇₅₀で測定した結果、(イ) 原形質分離、(ロ) マセレーション (ペクチナーゼによる細胞集塊からの細胞単離)、(ハ) 細胞壁分解 (セルラーゼによる) に伴うプロトプラストの形成、の3つのプロセスからなるプロトプラスト化反応をO. D.の減少として連続的に測定でき、この反応プロセスの定量化の可能性が得られた。特に (ロ) および (ハ) のプロセスでは、反応の進行に伴いO. D.が大きく減少し、それぞれの反応の終了に伴いO. D.が定常値を示した。O. D.が定常値を示した時点をもって、マセレーション終了時間やプロトプラスト形成終了時間を客観的に判定することができた。O. D.減少曲線のうち、プロトプラストを形成する (ハ) のプロセスの数式化を検討した結果、大部分の単離細胞 (全体の約70%) のプロトプラスト化反応は、反応速度が単離細胞の濃度に比例する単純な一次反応で、その速度定数である k をプロトプラスト化反応の速度を反映する指標としてプロトプラスト化定数と名付けた。 k を用いて *C. roseus*細胞と *N. tabacum*細胞のプロトプラスト化条件を種々検討した結果、酵素反応からみた最適条件を短時間

で容易にかつ客観的に設定することができた。

④ プロトプラストの生存活性測定法の開発

プロトプラストの生存活性の測定は、Fluorescein diacetate (FDA) による蛍光染色法を利用して行った。従来のFDAによる生存活性の測定は、蛍光顕微鏡による生存プロトプラストの計数により行われるため、得られる値の精度や操作の迅速性の点で問題があった。これらの問題点を排除するために、蛍光測定用セル中のプロトプラスト懸濁液の均一混合が可能な特殊蛍光光度計を作製した。本装置により再現性の高い生存プロトプラストの蛍光強度の測定が可能となりその値を生存活性の指標とした。蛍光染色したプロトプラストを浸透圧を調整したKMC (KCl, MgCl₂, CaCl₂で調整) 溶液で洗浄することにより、生存プロトプラストのみが発する蛍光の測定が可能となった。以上の点を改良して得られた蛍光強度と蛍光顕微鏡で測定した生存プロトプラスト濃度は相関し、プロトプラストの生存活性を迅速に再現性よく蛍光強度で評価することが可能となった。

⑤ タバコ懸濁培養細胞の最適プロトプラスト化条件の定量的設定

プロトプラスト化定数 (k) と生存活性の2つの指標を用いて実際に *N. tabacum* の懸濁培養細胞のプロトプラスト化最適条件の設定を行った。ペクチナーゼとして Macerozyme R-10, セルラーゼとして Cellulase Onozuka R10 を用い、*N. tabacum* 細胞のプロトプラスト化条件を種々検討した結果、(イ) プロトプラスト作製の材料として用いる細胞の Age, マセレーションを行う際の Macerozyme の濃度や反応 pH および Cellulase の濃度が形成されるプロトプラストの生存活性に大きな影響を与えること、(ロ) k の値と生存活性は必ずしも相関せず、生存活性の高いプロトプラストを効率的に得るための最適条件の設定には生存活性の値を重視する必要があること、が明らかとなった。*N. tabacum* 細胞のプロトプラスト化最適条件として、0.1% Pectolyase Y23 + 1.0% Cellulase Onozuka RS (一段階法), pH 5.7, temp. 30°C, 0.6M Mannitol, Age 5d が設定された。なお、FDA法に基づき評価した生存活性はプロトプラストのコロニー形成率とよい相関が認められ、先の最適条件で得られたプロトプラストは45.8%とこれまで得られていない高いコロニー形成率を示し、生存活性が高いことが実証された。

以上のように本研究は、従来の経験的な植物懸濁培養細胞のプロトプラスト化最適反応条件の設定方法に換わる、短時間で簡便かつ客観的に設定する新規な方法を開発し、タバコ懸濁培養細胞のプロトプラスト化を例に、その妥当性を実証したものである。

審 査 の 要 旨

本論文は、細胞に新たな遺伝情報を入れて新機能を有する細胞を育種するために、最も重要なポイントである生存活性の高いプロトプラストを効率よく獲得するための方法の開発研究を目的としたものである。これまで、新機能を有する細胞を育種するに当って、細胞融合法や遺伝子導入法に関して多くの研究が集中的になされてきたにもかかわらず、有効な成果があまり得られていない点に著者は注目し、むしろ問題点がそこで用いられる素材であるプロトプラストの生存活性にあると

いう立場に立って研究を展開し、生生活性の高いプロトプラストの効率的な獲得法を提案している。そのような視点には高いオリジナリティーがあり、そこで得られた成果の学問上および実用上の有用性は高く評価できるものである。なお、本研究で開発された特殊分光光度計と特殊蛍光光度計が植物細胞のプロトプラスト化最適反応条件を検討するための装置として、ある企業から既に市販されていることから、その有用性の一端がうかがえる。

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。