

氏名(本籍)	あきもとち はる 秋本千春(千葉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2275号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	アルギン酸による植物培養細胞の有用物質生産促進効果とその利用
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 日下部功
副査	筑波大学教授 農学博士 小澤哲夫
副査	筑波大学教授 農学博士 柿 眞

### 論文の内容の要旨

植物培養細胞による有用物質生産が盛んに試みられてきたが、実用化した例は2, 3しかない。この最大の原因は植物培養細胞が有用物質を微量にしか生産しない点にある。この問題点を解決するために、固定化植物培養細胞を用いた有用物質生産が広く行われてきた。その中で、アルギン酸で固定化した植物培養細胞では、様々な代謝産物の生産促進が認められているにもかかわらず、アルギン酸が植物培養細胞にどの様に作用しているかについては明らかとなっていない。そこで本研究では、抗菌酵素であるキチナーゼを細胞外に分泌するワサビ (*Wasabia japonica*) 細胞および同じく抗菌酵素である5'-phosphodiesterase (5'-PDase) を細胞内に蓄積するニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) 細胞をモデル植物培養細胞として用い、以下の検討を行った。

(1) アルギン酸が植物培養細胞に及ぼす影響 アルギン酸をワサビおよびニチニチソウ細胞に作用されると、細胞の増殖がわずかに抑制され、キチナーゼおよび5'-PDaseの生産が促進された。これらの現象から、アルギン酸は一種のエリシターであると考えられた。そこで、アルギン酸と代表的な外来性エリシターであるキトサン、および代表的な内在性エリシターであるガラクトチュロン酸の3種が、それぞれ植物培養細胞に与える生理的な影響について検討し、比較した結果、アルギン酸の生理活性はキトサンよりも、ガラクトチュロン酸の生理活性に類似していることが明らかとなった。また、アルギン酸およびガラクトチュロン酸が共通に有するカルボキシル基の電荷がエリシター効果の発現に大きな役割を果たしていることも明らかとなった。さらに、蛍光標識を用いた検討結果から、両者はいずれもニチニチソウおよびワサビ細胞の細胞壁や細胞膜だけでなく原形質にまで到達していることが明らかとなった。

(2) アルギン酸熱分解物または活性酸素種が植物培養細胞の有用物質生産に及ぼす影響 アルギン酸をオートクレーブ処理することで生じる加熱分解物が、ワサビおよびニチニチソウ細胞のキチナーゼおよび5'-PDaseの生産を増大させる効果があり、加熱分解のうち、trans-4,5-dihydroxy-2-cyclopenten-1-one (DHCP) が特に強い活性を有することが明らかとなった。そこで、DHCPの効果的な生成条件を設定した。また、純酸素の強制通気およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加によっても、植物培養細胞の酵素生産能が促進されることが明らかとなった。さらに、アルギン酸と純酸素の強制通気もしくはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を同時に培地へ添加することによって、細胞あたりのキチナーゼおよび5'-PDaseの生産性を相乗的に増大させることができた。

(3) アルギン酸を用いた植物培養細胞による有用物質生産法の開発 以上で認められた現象をもとにして、植物

培養細胞による新規な有用物質生産法の開発を試みた。アルギン酸の細胞中への侵入を促進させるため、細胞の細胞壁を取り去ったプロトプラストを作成し、プロトプラストにアルギン酸を作用させる方法により、細胞の約3倍のキチナーゼを生産させることができた。次に、アルギン酸固定化ワサビプロトプラストに活性酸素種を添加する新規な生産システムを用いることで、3回の繰り返し回分培養（18日間）において細胞の場合の約21倍のキチナーゼを生産することができた。一方、ニチニチソウプロトプラストにアルギン酸を作用されても、5'-PDase生産量の増大がみられなかったために、ニチニチソウ細胞による5'-PDase生産量を増大させることを目的として検討した。アルギン酸ポリマーをアルギン酸リナーゼ分泌菌によって分解し、得られた混合物をDHCPの最適生成条件にてオートクレーブ処理することにより調製した混合エリシターを、ニチニチソウ細胞に作用させることにより、何も作用させない細胞の場合の約120倍の5'-PDaseを細胞外に生産させることに成功した。

以上より、アルギン酸が植物培養細胞に与える有用物質生産促進効果の原因について検討を行い、その促進効果を有効に利用した有用物質生産法を確立することに成功した。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、アルギン酸を担体として植物培養細胞を固定化した際に認められる、二次代謝産物の生産促進効果のメカニズムの解明に関して、2種類の植物（ワサビ、ニチニチソウ）培養細胞を用いて検討を行い、さらにその生産促進効果を有効に利用した植物培養細胞による有用物質生産法を確立することを目的とした研究である。その結果、アルギン酸は内在性エリシターであるガラクトチュロン酸と同様に有用物質生産促進効果を示すとともにアルギン酸のオートクレーブによる熱分解物（特にDHCP）も同様な促進効果を有し、アルギン酸を固定化担体とした場合に両者によって生産促進効果が生ずることを明らかにした。さらにこれらの効果が純酸素の通気や $H_2O_2$ の添加によって更に促進されることも明らかにしている。次にこれらの研究成果を利用して、ワサビ細胞については固定化プロトプラストに $H_2O_2$ を添加する新規な生産法により、従来法に比べ20倍以上のキチナーゼの生産に成功し、ニチニチソウ細胞についてはアルギン酸とDHCPおよびアルギン酸分解菌熱処理物を組み合わせた混合エリシターを用いる生産法により、従来法に比べて120倍以上の5'-PDaseの生産に成功している。本研究の前半の検討結果だけではアルギン酸が二次代謝産物の生産を促進させるメカニズムを十分に明らかにするには至っておらず、更なる検討が必要であるが、全体的にはこれで得られた結果から、アルギン酸を植物培養細胞の固定化担体として用いる意義が明確となったと言えよう。また、その利用に関してもこれまで得られなかった高濃度の生産物（キチナーゼと5'-PDase）が得られたことは評価に値する。本研究で得られた結果は2種類の細胞に関する研究についてであるが、他の植物培養細胞の有用物質生産にも広く利用できる方法や考え方を提案するもので、現在壁にぶつかっている植物細胞からの有用物質生産法に新たな可能性を与えるものとして高く評価できる。

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。