

所属 生物資源学開発科学 専攻 氏名 山中 淳
審査委員 橋本 篤, 亀岡 孝治, 久松 眞, 末原 憲一郎, 山口 淳二
論文題目 赤外分光法を援用した懸濁植物細胞の糖代謝挙動に関する速度論的研究

(要旨本文)

1. はじめに

植物の品種改良や有用資源の獲得のためには、植物培養技術の応用と培養工程における計測・制御が極めて重要になる。そのためには、糖代謝の入力と出力を速度論的に把握することが必要となる。しかし、植物細胞の糖代謝経路や生化学的な反応は、詳細に解明されてきているが、その速度過程に関する理解は不十分である。そこで、糖代謝の入口と出口に着目し、赤外分光法を援用して懸濁植物細胞の糖代謝挙動を速度論的に解析し、培地中の炭素源に対する細胞の動的挙動を把握することを目的とした。具体的には、糖代謝成分の定量法を確立して、培養基質・条件・期間および細胞種が糖代謝挙動におよぼす影響を研究した。

2. 赤外分光法による糖代謝成分の定量法の確立

糖代謝挙動を速度論的に解析するには、培養液中の糖代謝成分の定性、定量的な情報を経時的に把握する必要がある。培養液成分の測定には一般的に HPLC 法を用いるが、測定時間が長く、前処理やカラムの選択などで情報量も限定される。そこで本研究では、短時間で非破壊による測定が可能であり、オンライン計測の可能性を有する赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) に着目し、培地中の糖とエタノールの同時定量法を確立した。さらに、実際の培養液成分の測定を行い、HPLC 法と比較して同程度の精度を有することを実験的に示した。

3. 培地中の炭素源種が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響

タバコ BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow No.2; TBY-2) 細胞を様々な炭素源 (グルコース ; Glc, フルクトース ; Fru, マンノース ; Man, ガラクトース ; Gal, スクロース ; Suc, トレハロース ; Tre, マルトース ; Mal, ラクトース ; Lac) で培養した。本研究では、培養液成分や細胞濃度の変化をボルツマン関数でフィッティングし、連続的な経時データとして扱うことを可能にして比糖消費速度等を求め、動的挙動を解析した。

その結果、糖成分により糖代謝挙動の差異が認められた。とくに Gal では、凝集しながら増殖する上、糖取込みまでに長いタイムラグが必要となり、Mal では、植物細胞では報告されていないマルトーストランスポートの存在が示唆された。また、糖代謝が早いグループ (Suc, Glc, Fru) と遅いグループ (Tre, Mal, Man, Gal) に分類でき、細胞は炭素源として直ちに活用できない糖を供試されると、形質発現が起こってその糖に対する適応能力を獲得すると考えられた。また、混合糖 (Glc-Fru, Glc-Man, Glc-Gal) で培養したところ、Glc が優先的に取込まれ、各糖の取込み時期も単独での培養と異なることから、Glc が糖代謝経路に何らかの影響をおよぼしていることが示唆された。

4. 前培養条件が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響

糖成分による糖代謝挙動の差異は認められた。そこで、前培養条件 (糖成分, 培養期間) が細胞の形質発現におよぼす影響を比較した。その際、フィッティングパラメータを用いた細胞増殖を基準とした無次元時間軸を採用し、増殖ステージをそろえた比較を行った。その結果、誘導期では Gal 前培養後の細胞は増殖しなかったが、対数期, 定常期では増殖の開始時期が劇的に早まったこと等が分かった。このことから、誘導期では代謝に必要な酵素の活性レベルが低い、対数期, 定常期では形質発現により高まっていることが実験的に示唆された。

5. 異なる植物細胞種の糖代謝挙動の比較

植物には様々な種があり，それを構成する細胞も，器官や組織により特徴が異なる．そこで，異なる植物細胞種（TBY-2 細胞とイネ細胞（*Oryza sativa* L. Japonica cv. Nipponbare））を用いて，前培養と本培養の糖成分がおよぼす影響を把握，比較した．この解析にも無次元時間軸を用いた．

その結果，両種とも Fru 培養の糖代謝挙動は前培養の糖成分による影響をあまり受けなかった．また，培養条件に関わらず TBY-2 細胞では細胞増殖よりも糖消費が早くイネ細胞では遅くなること，エタノール発生量がイネ細胞では TBY-2 細胞よりも多いことなどが分かった．このように，無次元時間軸を用いた解析により，異なる細胞種の動的挙動を比較でき，両種の糖代謝挙動に関する共通する特徴や細胞固有の特徴が把握できた．

6. まとめ

赤外分光法を援用して培養液成分を測定することで，短時間，非破壊で高精度に定量できた．本方法を用いて懸濁植物細胞の糖代謝挙動を速度論的に解析したところ，培地中の炭素源に対する細胞の応答を把握することができた．このことから，培地中の炭素源をコントロールすることで形質発現を促し，細胞の潜在的な能力を引き出せる可能性があることが実験的に示された．