

博士論文

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

平成21年9月

三重大学大学院生物資源学研究科

山中 淳

目次

表の目次	vii
図の目次	viii
1 章. 緒言	1
1-1. 植物工学の発展と分光計測の応用	1
1-1-1. 植物工学の発展と社会的意義	1
1-1-2. 赤外分光法を用いた計測	4
1-1-3. 植物培養細胞を用いた バイオプロセス工学と分光計測	5
1-2. 懸濁植物細胞の糖代謝挙動と 培地成分計測に関する基礎的事項	7
1-2-1. 懸濁植物細胞の培養	7
1-2-2. 懸濁植物細胞の糖代謝	8
1-2-3. 植物体内の糖の役割	10
1-2-4. 赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) による糖の定量	13
1-3. 本研究に関する既往の研究	17
1-3-1. 植物細胞の糖代謝に関する研究	17
1-3-2. 赤外分光法を用いた計測法に関する研究	20
1-4. 本研究の目的	22
1-5. 本研究の構成	23
2 章. 赤外分光法による糖代謝成分の 定量法の確立	26
2-1. 本章の背景	26
2-1-1. 従来法による糖の定量	26

2-1-2. エタノールの定量	27
2-2. 本章の目的	27
2-3. 実験試料および方法	28
2-3-1. 供試培地	28
(1) 培地成分	
(2) 培地調製	
2-3-2. 供試細胞	37
(1) タバコ BY-2 細胞	
(2) イネ細胞	
2-3-3. 培養方法	38
(1) タバコ BY-2 細胞	
(2) イネ細胞	
2-3-4. 糖の定量法	41
(1) 赤外分光法 (FT-IR/ATR 法)	
(2) HPLC 法	
2-4. 赤外分光法による培地中の糖代謝成分の定量	44
2-4-1. R2S 培地中の糖代謝成分	44
(1) 糖, エタノールおよび R2S 培地成分の赤外スペクトル	
(2) R2S 培地中の糖およびエタノールの定量	
2-4-2. MS 培地中の糖代謝成分の定量	59
2-5. 本章の結論	66
3 章. 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	68
3-1. 本章の目的	69
3-2. 実験試料および方法	69
3-2-1. 実験試料	69

3-2-2. 実験方法	70
(1) 細胞培養	
(2) 酵素活性測定 (Enzyme assay)	
(3) 糖, エタノールおよび細胞濃度の定量法	
(a) 赤外分光法 (FT-IR/ATR 法)	
(b) HPLC 法	
(c) 可視分光法	
3-3. 1 種類の糖で培養したときの動的糖代謝挙動	79
3-3-1. 培養液スペクトル	79
3-3-2. 糖およびエタノール濃度の経時変化	81
(1) 単糖類	
(2) 二糖類	
3-3-3. 動的糖代謝挙動特性	89
(1) ガラクトース	
(a) 細胞増殖	
(b) 糖代謝挙動	
(2) マルトース	
(a) スクロース培養液に含まれるインベルターゼの活性	
(b) マルトース培養液に含まれるマルターゼの活性	
(3) 動的糖代謝挙動特性の比較	
3-4. 2 種類の糖で培養したときの動的糖代謝挙動	110
3-4-1. 培養液スペクトル	110
3-4-2. 糖およびエタノール濃度の経時変化	112
3-4-3. 動的糖代謝挙動特性	114
(1) 細胞増殖	
(2) 動的糖代謝特性の比較	
3-5. 本章の結論	119

4 章. 前培養条件が TBY-2 細胞の 糖代謝挙動におよぼす影響	124
4-1. 本章の目的	124
4-2. 実験試料および方法	124
4-2-1. 実験試料	124
4-2-2. 実験方法	125
(1) 細胞培養	
(2) 糖, エタノールおよび細胞濃度の定量法	
(a) 赤外分光法 (FT-IR/ATR 法)	
(b) 可視分光法	
4-3. 前培養の糖成分が動的糖代謝挙動に およぼす影響	128
4-3-1. グルコースによる前培養	128
4-3-2. フルクトースによる前培養	131
4-3-3. マンノースによる前培養	133
4-3-4. ガラクトースによる前培養	136
4-4. 前培養期間が動的糖代謝挙動におよぼす影響	141
4-4-1. 誘導期 (A: Log phase)	141
4-4-2. 対数期 (B: Logarithmic phase)	143
4-4-3. 定常期 (C: Stationary phase)	145
4-5. 本章の結論	147
 5 章. 異なる植物細胞種の糖代謝挙動の比較	 149
5-1. 本章の目的	149
5-2. 実験試料および方法	150
5-2-1. 実験試料	150
5-2-2. 実験方法	150

(1) 細胞培養	
(2) 糖, エタノールおよび細胞濃度の定量法	
(a) 赤外分光法 (FT-IR/ATR 法)	
(b) 可視分光法	
(c) 乾重量測定法	
5-3. 異なる植物細胞種による糖代謝挙動の比較	155
5-3-1. 培養液スペクトル	155
5-3-2. 糖およびエタノール濃度の経時変化	159
5-3-3. 動的糖代謝挙動特性	167
(1) 実時間軸で比較したときの各細胞種の特	
(2) 無次元時間軸で比較したときの各細胞種の特	
5-3-4. エタノール濃度の比較	170
5-4. 本章の結論	172
6章. 結言	174
6-1. 本研究の成果	174
6-1-1. 赤外分光法による糖代謝成分の定量法の確立	174
6-1-2. 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	175
6-1-3. 前培養条件が TBY-2 細胞の糖代謝挙動に およぼす影響	177
6-1-4. 異なる植物細胞種の糖代謝挙動の比較	178
6-1-5. 本研究の結論	181
6-2. 本研究の課題	185
6-3. 今後の展開	194
6-3-1. 赤外分光法のバイオプロセス工学における展開	194
6-3-2. 植物工学における展開	195

研究業績	200
参考文献	204
学術論文	218
• MIR Spectroscopic Analysis on Sugar Metabolic and Ethanol Productive Kinetics of Suspension TBY-2 and Rice Cells Pre-Cultured in Various Media.	218
• Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells using FT-IR/ATR method.	227
謝辞	239

表の目次

表 1-1	植物細胞の糖代謝に関する文献	18
表 2-1	様々な培地の組成とその含量	29
表 2-2	MS 培地のストック溶液の種類とその用量 (培地 1/ 中)	30
表 2-3	R2S 培地の混合塩類調製粉末の成分とその含有量 (培地 1/ 中)	32
表 2-4	R2S 培地のストック溶液成分とその含有量 (培地 1/ 中)	32
表 2-5	本研究で採用した糖成分と培養時の濃度	33
表 2-6	本研究で採用した糖成分とエタノールの立体構造	34
表 2-7	培養条件	40
表 2-8	測定条件 (FT-IR)	42
表 2-9	測定条件 (HPLC)	43
表 2-10	検量線のパラメータ (R2S 培地)	50
表 2-11	調製サンプルの各成分濃度	51
表 2-12	糖の中赤外領域におけるピーク波長の帰属	61
表 2-13	検量線のパラメータ (MS 培地)	63
表 3-1	本章で採用した糖	70
表 3-2	培養条件	71
表 3-3	酵素活性測定の場合	75
表 3-4	測定条件 (自記分光光度計)	78
表 3-5	フィッティングパラメータ (Glc)	85
表 3-6	フィッティングパラメータ (Fru)	85
表 3-7	フィッティングパラメータ (Man)	85
表 3-8	フィッティングパラメータ (Gal)	86
表 3-9	細胞増殖の経時変化の写真 (単糖類)	90
表 3-10	細胞増殖の経時変化の写真 (二糖類)	91

表 3-11	酵素反応における初速度と培養時の糖取込み速度の比較	104
表 3-12	フィッティングパラメータ (Suc)	106
表 3-13	フィッティングパラメータ (Tre)	107
表 3-14	フィッティングパラメータ (Mal)	107
表 3-15	フィッティングパラメータ (混合糖)	114
表 3-16	細胞増殖の経時変化の写真 (混合糖)	115
表 4-1	培養条件	128
表 4-2	細胞増殖の経時変化の写真 (Pre-Gal, Cul-Suc)	138
表 4-3	細胞増殖の経時変化の写真 (Pre-Gal, Cul-Gal)	139
表 5-1	TBY-2 細胞の培養条件	152
表 5-2	イネ細胞の培養条件	153
表 5-3	フィッティングパラメータ (Pre-Suc, TBY-2 細胞)	161
表 5-4	フィッティングパラメータ (Pre-Suc, イネ細胞)	161
表 5-5	フィッティングパラメータ (Pre-Glc, TBY-2 細胞)	163
表 5-6	フィッティングパラメータ (Pre-Glc, イネ細胞)	163
表 5-7	フィッティングパラメータ (Pre-Fru, TBY-2 細胞)	165
表 5-8	フィッティングパラメータ (Pre-Fru, イネ細胞)	165
表 6-1	調製サンプルの各成分濃度	186
表 6-2	ピーク波数とモル吸光度	189

図の目次

図 1-1	光の波長, 振動数, エネルギーの関係	5
図 1-2	糖代謝経路	10
図 1-3	Bouguer-Berr の法則	14

図 1-4	干渉計の構造と光路	16
図 1-5	エバネッセント波の減衰挙動	16
図 1-6	ATR の装置の概略図	17
図 1-7	本研究の構成	25
図 2-1	培地調製手順	36
写真 2-1	タバコ BY-2 細胞	38
写真 2-2	イネ細胞	38
写真 2-3	組織培養フィルターユニット, タイプ TA	40
写真 2-4	オートクレイブ可能な自作容器	40
写真 2-5	FT-IR/ATR の外観	41
写真 2-6	ATR アクセサリー	41
写真 2-7	HPLC システム全体	43
写真 2-8	カラムとガードカラム	43
写真 2-9	カラムオープン内部	43
図 2-2	糖水溶液と水スペクトルの比較 (a) 4000 ~ 800 cm^{-1} (b) 1300 ~ 900 cm^{-1}	46
図 2-3	R2S 培地と水スペクトルの比較 (a) 4000 ~ 800 cm^{-1} (b) 1300 ~ 900 cm^{-1}	46
図 2-4	糖を含まない R2S 培地と水スペクトルの比較 (a) 4000 ~ 800 cm^{-1} (b) 1300 ~ 900 cm^{-1}	47
図 2-5	(a) 糖水溶液と R2S 培地 (b) 糖を含まない R2S 培地と 水との差スペクトルと R2S 培地と糖水溶液との差スペクトル	47
図 2-6	R2S 培地中の糖とエタノールの固有スペクトル	48
図 2-7	R2S 培地中の検量線 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) EtOH	49
図 2-8	調製スペクトルと合成スペクトルの比較 (R2S 培地) エタノール濃度 3 g/l (a) 糖が 1 種類の場合, (b) 複数の場合	52
図 2-9	調製スペクトルと合成スペクトルの比較 (R2S 培地)	

エタノール濃度 6 g/l (a) 糖が 1 種類の場合, (b) 複数の場合	53
図 2-10 調製スペクトルと合成スペクトルの比 (R2S 培地)	
エタノール濃度 (a) 3 g/l, (b) 6 g/l	54
図 2-11 調製値と算出値の相関 (R2S 培地)	
(a) FT-IR/ATR 法, (b) HPLC 法	57
図 2-12 培養液スペクトルの経日変化	59
図 2-13 クロマトグラム (8 日目)	59
図 2-14 糖濃度およびエタノール濃度の経日変化	59
図 2-15 MS 培地中の糖とエタノールの固有スペクトル	
(a) 単糖類, (b) 二糖類	60
図 2-16 MS 培地中の単糖類の検量線	
(a) Glc, (b) Fru, (c) Man, (d) Gal	61
図 2-17 MS 培地中の二糖類の検量線	
(a) Suc, (b) Tre, (c) Mal, (d) Lac	62
図 2-18 MS 培地中の EtOH の検量線	62
図 2-19 培養液スペクトルの経日変化	65
図 2-20 培養液成分の経日変化	65
図 2-21 FT-IR/ATR 法 (3 成分系と 4 成分系) と HPLC 法の相関	65
図 3-1 細胞培養および測定手順	72
図 3-2 酵素活性測定の手順	74
図 3-3 酵素溶液の調製方法	75
写真 3-1 自記分光光度計	76
写真 3-2 測定室内	76
図 3-4 可視分光スペクトルの経日変化	78
図 3-5 細胞濃度の検量線	78
図 3-6 培養液成分の赤外スペクトル (単糖類)	
(a) Glc, (b) Fru, (c) Man, (d) Gal	80

図 3-7	培養液成分の赤外スペクトル (二糖類)	
	(a) Suc, (b) Tre, (c) Mal, (d) Lac	80
図 3-8	ボルツマン関数	83
図 3-9	培養液成分と細胞濃度の経日変化 (単糖類)	
	(a) Glc, (b) Fru, (c) Man, (d) Gal	84
図 3-10	培養液成分と細胞濃度の経日変化 (二糖類)	
	(a) Suc, (b) Tre, (c) Mal, (d) Lac	88
図 3-11	ガラクトース代謝	94
図 3-12	ボルツマン関数とシグモイド関数	95
図 3-13	Galactose 培養における比糖消費速度の比較	
	(a) 実時間, (b) 無次元時間	96
図 3-14	マルトースの取込み経路	98
図 3-15	培養液に含まれる酵素の活性測定 (スクロース)	101
図 3-16	培養液に含まれる酵素の活性測定 (マルトース)	103
図 3-17	糖消費量の経日変化	106
図 3-18	単糖類および二糖類の比糖消費速度の比較	
	(a) 実時間, (b) 無次元時間	108
図 3-19	培養液成分の赤外スペクトル (混合糖)	
	(a) Glc-Fru, (b) Glc-Man, (c) Glc-Gal	111
図 3-20	培養液成分と細胞濃度の経日変化 (混合糖)	
	(a) Glc-Fru, (b) Glc-Man, (c) Glc-Gal	113
図 3-21	混合糖培養における比糖消費速度の比較	
	(a) 実時間, (b) 無次元時間	118
図 4-1	細胞培養および測定手順	126
図 4-2	前培養と本培養	127
図 4-3	培養液成分および細胞濃度の経日変化 (Glc 前培養)	130
図 4-4	Pre-Glc 培養時の比糖消費速度の比較 (実時間)	

	(a) Suc, (b) Glc.....	130
図 4-5	Pre-Glc 培養時の比糖消費速度の比較 (無次元時間)	
	(a) Suc, (b) Glc.....	130
図 4-6	培養液成分および細胞濃度の経日変化 (Fru 前培養)	132
図 4-7	Pre-Fru 培養時の比糖消費速度の比較 (実時間)	
	(a) Suc, (b) Fru.....	132
図 4-8	Pre-Fru 培養時の比糖消費速度の比較 (無次元時間)	
	(a) Suc, (b) Fru.....	132
図 4-9	培養液成分および細胞濃度の経日変化 (Man 前培養)	134
図 4-10	Pre-Man 培養時の比糖消費速度の比較 (実時間)	
	(a) Suc, (b) Man	134
図 4-11	Pre-Man 培養時の比糖消費速度の比較 (無次元時間)	
	(a) Suc, (b) Man	134
図 4-12	マンノース代謝.....	135
図 4-13	培養液成分および細胞濃度の経日変化 (Gal 前培養)	137
図 4-14	Pre-Gal 培養時の比糖消費速度の比較 (実時間)	
	(a) Suc, (b) Gal	137
図 4-15	Pre-Man 培養時の比糖消費速度の比較 (無次元時間)	
	(a) Suc, (b) Gal	137
図 4-16	前培養の誘導期にある細胞を本培養したときの 比糖消費速度の比較 (実時間) (a) Suc, (b) Suc 以外.....	142
図 4-17	前培養の誘導期にある細胞を本培養したときの 比糖消費速度の比較 (無次元時間) (a) Suc, (b) Suc 以外.....	142
図 4-18	前培養の対数期にある細胞を本培養したときの 比糖消費速度の比較 (実時間) (a) Suc, (b) Suc 以外.....	144
図 4-19	前培養の対数期にある細胞を本培養したときの 比糖消費速度の比較 (無次元時間) (a) Suc, (b) Suc 以外.....	144
図 4-20	前培養の定常期にある細胞を本培養したときの	

	比糖消費速度の比較（実時間） (a) Suc, (b) Suc 以外	146
図 4-21	前培養の定常期にある細胞を本培養したときの 比糖消費速度の比較（無次元時間） (a) Suc, (b) Suc 以外	146
図 5-1	TBY-2 細胞の培養および測定手順	152
図 5-2	イネ細胞の培養および測定手順	153
図 5-3	TBY-2 細胞の Pre-Suc 培養における培養液成分の 赤外スペクトル(a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	156
図 5-4	イネ細胞の Pre-Suc 培養における培養液成分の 赤外スペクトル(a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	156
図 5-5	TBY-2 細胞の Pre-Glc 培養における培養液成分の 赤外スペクトル(a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	157
図 5-6	イネ細胞の Pre-Glc 培養における培養液成分の 赤外スペクトル(a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	157
図 5-7	TBY-2 細胞の Pre-Fru 培養における培養液成分の 赤外スペクトル(a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	158
図 5-8	イネ細胞の Pre-Fru 培養における培養液成分の 赤外スペクトル(a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	158
図 5-9	TBY-2 細胞の Pre-Suc 培養における培養液成分および 細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	160
図 5-10	イネ細胞の Pre-Suc 培養における培養液成分および 細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	160
図 5-11	TBY-2 細胞の Pre-Glc 培養における培養液成分および 細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	162
図 5-12	イネ細胞の Pre-Glc 培養における培養液成分および 細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	162
図 5-13	TBY-2 細胞の Pre-Fru 培養における培養液成分および 細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	164

図 5-14	イネ細胞の Pre-Fru 培養における培養液成分および細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	164
図 5-15	TBY-2 細胞の比糖消費速度の比較 (実時間) (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	167
図 5-16	イネ細胞の比糖消費速度の比較 (実時間) (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	167
図 5-17	TBY-2 細胞の比糖消費速度の比較 (無次元時間) (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	169
図 5-18	イネ細胞の比糖消費速度の比較 (無次元時間) (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	169
図 5-19	TBY-2 細胞のエタノール濃度の比較 (無次元時間) (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	171
図 5-20	イネ細胞のエタノール濃度の比較 (無次元時間) (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc-Fru	171
図 6-1	本研究のまとめ	180
図 6-2	調製値と算出値 (従来法) の比較 (R2S 培地)	186
図 6-3	調製値と算出値 (単回帰分析) の比較 (MS 培地) エタノール (a) 0 g/l (b) 1 g/l, (c) 2 g/l	187
図 6-4	モル吸光度スペクトル	188
図 6-5	調製値と算出値 (重回帰分析) の比較 (MS 培地) エタノール (a) 0 g/l (b) 1 g/l, (c) 2 g/l	190
図 6-6	HPLC 法と単回帰分析との算出値の比較 (Mal 培養)	191
図 6-7	HPLC 法と重回帰分析との算出値の比較 (Mal 培養)	191

1 章. 緒言

1 - 1. 植物工学の発展と分光計測の応用

1-1-1. 植物工学の発展と社会的意義

農業とは、耕作地等を利用して作物あるいは家畜を飼育して、衣（繊維）・食（農作物・肉・卵など）・住（建築）に必要な資材を生産する産業 [1]であり、人類には欠かすことの出来ないものである。しかし、自然を対象にするため、その成長が気象状態（日照・気温・降水量など）に左右されやすく、収穫量が一定しないため、価格変動も大きいと言われる。そこで、人類は安定供給を目指して伝統的な植物栽培技術を発展させたり、優良形質の組み合わせによる品種改良を行ったりすることで農業を進歩させてきたが、これらは経験的なものに頼ったものが多かった。ところが、近現代に入って産業革命を経験した人類は、大きな発展を遂げた。それに伴い人口増加が急激に進み、求められる水準が量的にも質的にも高くなってきた。特に、近年の発展途上国を中心とした人口爆発とも言える増加で、将来的に食糧危機が予測されている。しかし、交配による品種改良は、ほとんどし尽くされた感があり、新たな方策が必要となっている。このような問題を解決するために期待されているのが植物工学である [2]。近年、細胞工学、分子生物学、遺伝子工学などの新しい技術が向上し、植物の形質を遺伝子レベルで扱うことが現実となってきた。植物細胞は分化の全能性を有しており、単離された体細胞から固体再生を行うことができる。この分化の全能性を最大限利用し、組織・器官の培養を行うことでカルスや分化の誘導からクローン植物を作成したり、細胞の遺伝的修飾を行ったり、プロトプラストによる細胞融合によって形質転換された細胞を作成したりすることで、新品種が得られるようになった [3]。植物工学とは、このようなバイオテクノロジーを用いた新しい手法を、従来の農業手法と組み合わせていく手法である。

一方、栽培された農産物を貯蔵することも大切である。収穫された農産物はエネルギーの供給が閉ざされる。そのため、農産物は今まで自身の体内に蓄積してきた糖、デンプン、セルロースなどをエネルギー源に変換し代謝を行う。

したがって、収穫した農産物の鮮度を貯蔵中、輸送中の間も保持するためには、その代謝を最小限に抑制する必要がある。このとき、もっとも基本的な代謝経路であり、エネルギー生産系である呼吸代謝を抑制することが重要となる。この呼吸代謝、つまりエネルギー代謝系を抑制することにより、代謝速度を最低限まで落とした状態で農産物を生かすことが可能であると考えられる。

農産物の貯蔵技術の一つに追熟処理がある。果実の中には、果肉に糖分が蓄積された状態で成熟がいったん休止し、その後徐々にでんぷんやペクチンの分解しながら後熟するものがある。このような、果実を後熟が起きる前の段階で収穫したものは保存性に富むため、この段階で収穫すれば長距離輸送に有利であると言われる。そのため、農業の現場では後熟前に収穫、集荷、輸送を行い、最後の段階で成熟をスタートさせて食用に供することになる。この過程を追熟と呼ぶが、追熟のコントロールには呼吸過程の制御が重要となる。その方法には低酸素保存や低温保存などがあるが、一般的に個体レベル（マクロ）での研究が行われてきた。しかし、果実は様々な細胞から構成されており、バイオテクノロジーを駆使した細胞レベル（ミクロ）での研究も望まれている。

植物工学に期待される役割は、これだけにとどまらない。植物には光合成能力が備わっており、水と二酸化炭素から糖質（炭素源）を合成することができる。また、植物は生殖や防御のため、様々な代謝産物を生産する。この代謝産物には非常に有用な成分が含まれている。さらに、微生物を用いた発酵を利用することでも様々な成分が獲得できる。そのため人類は、植物（農作物）を主に穀物、果樹、野菜などの食糧資源として利用してきたが、副産物ともいえる代謝産物からも様々な有用資源を獲得してきた。これらは食品に関わるもの（食品添加物や香辛料など）以外に、医薬、工学などの幅広い分野で利用されている。このように、植物の効率的な栽培はもちろん、栽培したものから有用資源を獲得するためにも植物工学は応用されている。こうした有用資源は、科学技術が発達した現代においても、生物を介さずに生産できるものは限られているため、それを生み出すことができる植物工学の利用価値は高い [4]。

また、近年では「環境にやさしい化学」と言われるグリーンケミストリーが

注目されている [5]. これは、産業界全体が取り組んできた環境保全のひとつで、「環境に優しい化学を創造する」という観点から環境問題に取り組んでいる活動である。これまでは、炭素源として化石資源である石油を用い、生産効率と低コスト化を重視してきた。その結果、製品を得るために環境に様々な面で負担をかけてきた。そこで、有害物質は使わない、出さない、また、省資源、省エネルギー型の生産方式とするなど、環境に与える影響を少なくするような科学技術、製品の開発を推進している。そのためには、できる限り安全で再生可能な原料を利用することがのぞまれているが、バイオマスや農業廃棄物などは再生可能で環境に優しい原料と考えられている。ここで、その一例として、バイオエタノールについて述べる。バイオエタノールは、原料としてトウモロコシやサトウキビが利用されており、これを酵母で発酵させることでエタノールを生産している。植物は大気中のCO₂を固定化することで生長しているので、このエタノールは、大気中のCO₂からできていることになる。したがって、このエタノールを消費しても、大気中のCO₂濃度は増加したことになる。このことから、バイオエタノールは環境に優しい炭素源といえる。バイオマスを炭素源として得られる資源は、クリーンで循環持続可能な資源であり、低炭素社会実現へ向けた未来のエネルギーと言えるかもしれない。このような、継続可能な化学のことを、とくにサステイナブルケミストリー (sustainable chemistry) という。上述したように、バイオエタノールは生産過程で酵母による発酵を経ていることから、農作物の栽培過程と発酵過程で植物工学が利用されている。このように、人類の抱える大きな問題である食糧問題と双璧をなす、資源、環境問題でも植物工学の潜在的な利用価値が高まっているといえるだろう。こうしたバイオマスの利用は一部で実用化されつつあるが、まだまだ新しい分野であり、さらなる発展が期待されている。

以上のことから、植物工学は、現在農業はもとより様々な分野（食品・医薬・バイオ・化学・エネルギーなど）での利用価値が増しており、その社会的意義はますます高まっている。

1-1-2. 赤外分光法を用いた計測 [6-9]

近年、盛んに使用されている分析装置の一つとして、赤外分光光度計がある。この手法は、これまでの化学分析とは異なり、光を用いることによって非破壊で分析できるという利点をもっている。分光器には、分散素子（プリズムや回折光子）を利用して分光する分散型と、波長が光路長に依存して干渉を起こし、光の強度が変わるのを利用して光路長を可変することで分光する干渉型に大別することができる。現在は、さまざまな点で優位性のある、干渉型分光器のフーリエ変換赤外分光光度計（Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FT-IR）が広く普及して主流となってきた（特長については後述）。また、赤外分光法の基本は透過法と呼ばれる測定法であるが、近年アクセサリが発達してきたことにより、ATR（attenuated total reflection）法、拡散反射法、光音響分光法、顕微赤外法、発光測定法などの方法が開発された。

ところで、赤外線にはその波長領域により、分類が分かれている。分光学の分野においては分子の基準振動に基づく波長帯を中赤外線（波長領域：2.5～25 μm ，波数領域：4000～400 cm^{-1} ）とし、この波長帯より短波長側を近赤外線（波長領域：0.78～2.5 μm ，波数領域：15000～4000 cm^{-1} ），長波長側を遠赤外線（波長領域：25～1000 μm ，波数領域：15000～4000 cm^{-1} ）としている。特に、中赤外領域における分析では、各種官能基の基本振動の情報など膨大な理論的基礎が存在しているため、測定物質の分子的構造や分子とそれを取り巻く環境（溶媒）との相互作用の関係を基にした定性、定量的な分析が可能である。一方、これに対して近赤外領域では、中赤外領域に現れる官能基の基準振動の倍音・結合音が得られる。そのため、スペクトルは非常に複雑であり、理論的な解析は困難な場合が多く、解析には PLS（Partial Least Squares）や PCR（Principal Component Regression）といった多変量解析（ケモメトリクス手法）が多く用いられる。これらの性質を利用して、赤外分光法は農産物や食品加工の現場などでの成分分析（水分、糖度、酸度など）、医療現場での血液中の酸素濃度や血流の測定、化学プラント等での製品の品質管理など広範な分野で活用されている。

50000		25000		12500		4000		400		10		cm ⁻¹ (波数)
真空 紫外	紫外	可視	近赤外	赤 外		遠赤外						
200	400	800	2500	25000		1000000		nm (波長)				
			2.5μm	25μm		1mm						
600	300	150	48	4.8		0.12		kJ mol ⁻¹ (エネルギー)				

図 1-1 光の波長，振動数，エネルギーの関係 [10]

Fig. 1-1 A relation with the wavelength, the number of vibrations, and energy.

1-1-3. 植物培養細胞を用いたバイオプロセス工学と分光計測

植物の品種改良や有用資源の獲得のため，植物工学が応用できることは上述した．そこで本項では，植物培養細胞技術に赤外分光法を利用したバイオプロセス工学の可能性について述べる．

植物はエネルギーを消費し，代謝を行うことで代謝産物が得られる．その代謝産物に含まれる有用物質を工業的に生産するために，さまざまなアプローチがなされているが，その一つに代謝工学がある．これは，植物の代謝機構を抜本的に改変，利用することで，物質資源を得ようというものである．その手法として，遺伝子工学を利用して新規代謝経路を作出する，代謝経路を分断する等があり，これを用いて，有用資源獲得に有効な特徴を持った細胞を作り出すことができる [11]．このような改良した細胞の大量培養が可能であれば，バイオリクターによる有用資源の工業的な生産が可能になり，さらに植物の分化の全能性を利用すれば，形質転換された植物体を得ることもできるだろう．これを可能にするための方法として，植物培養技術がある [2, 12]．近年，この技術が発達し，植物生理学から生物工学までさまざまな分野で重要な役割を果たしている．培養工程を正確に制御することは，科学的，工学的の両面において重要であり，効率的な植物の栽培，貯蔵，あるいは代謝産物に含まれる有用物質の獲得にも役立つ．そのためには，糖代謝機構全体の詳細な解明，特に動的な挙動の把握が必要不可欠となる．植物の糖代謝経路は非常に複雑に発達した反応系を持つが，解糖系はその最初のステージであり，グルコースのような糖

を消費することによってスタートする。したがって、糖代謝の糖取込み過程における動的な挙動を理解することは、システム生物学において、そして細胞培養プロセスを制御する上で、非常に有効であると考えられる。しかし、微生物や原生生物でさえ、このような研究では動的な定量性がなく、解析手順も複雑であった [13-15]。このことを理解するためには、植物細胞の動的な糖代謝システムを研究したり、外部からの輸送現象のモデルシステムを構築したりすることが必要である。さらに、このようなシステム、すなわちバイオプロセスを制御するには物質や情報の動的な流れを、定量的にリアルタイムで計測することが重要となる。

そこで、このようなリアルタイムでの定量測定に分光計測が検討されている。この手法は、これまでの化学分析とは異なり、光を用いることによって、非破壊で分析できるという利点をもっていることはすでに述べた。培養系において細胞濃度の管理は重要である。培養液に固形分を含んでおらず、比較的透明な培地の場合、自記分光光度計によって濁度を測定し、細胞濃度に換算する方法が有効であることはよく知られている (3章に後述)。この手法は、オンラインモニタリングに適しており、光源にレーザー光線を用いたレーザー濁度計が、バイオリアクターに組み込まれている製品も市販されている [16]。さらに Hashimoto らは、懸濁植物細胞のタバコ BY-2 細胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow No.2) を培養した時の培地の糖成分の定量法として、赤外分光法を提示している [17]。これまで、培地の成分分析には HPLC (高速液体クロマトグラフィー) が用いられてきたが、測定に時間がかかるため、リアルタイムでの制御には適していなかった。しかし、赤外分光法を用いれば、非破壊で短時間に複数の培地情報が同時に得られるため、オンラインモニタリングには適している。これをバイオリアクター等のセンサーとして応用すれば、培地の成分変化に即応した制御も可能になるはずである。また、培地中には元々存在しなかった成分が代謝産物として放出されるが、HPLC ではカラムの選択によって最終的に得られる情報が限定的になるのに対して、分光計測では理論的に原スペクトルの情報に欠落が存在しない。スペクトルには、官能基の基準振動に由来す

る分子構造的な情報がすべて含まれており，未知成分で解析方法が分からない場合でも，それを検出すること自体は可能である．そのため，新たな解析法が見つかった時点で，原スペクトルを用いた新たな解析が可能になる．このように，スペクトルには目的とする物質の定量情報以外の情報も多く含まれており，このことも，分光法を用いる上で大きな利点となる [7]．

以上のことから，植物培養細胞を用いたバイオプロセスには，糖代謝経路の把握が不可欠であることを示した．さらに，その計測・制御としての分光計測が活用できる可能性についても触れた．

1-2. 懸濁植物細胞の糖代謝挙動と培地成分計測に関する基礎的事項

1-2-1. 懸濁植物細胞の培養

高等植物の培養細胞が，発生，分化の研究に有力な手段となって，その方面での多くの研究が行われるようになってかなり経つ．一方，比較的近年になって高等植物の培養細胞は，代謝生理学的に大きな分野を占めるに至っている．

このような代謝という細胞機能を利用した応用に，植物培養細胞による有用物質の生産がある．以前は微生物を用いて有用物質を生産する発酵工学が急速に進展したが，近年，植物細胞を同じ手段で培養し，植物細胞の代謝産物である有用物質を生産しようという試みが活発に行われてきた．有用代謝物質の多くは，栽培や野生株の採取によって生産されているが，含量が低く，また気候や栽培条件などにより生産性も異なる．しかし，植物培養細胞を応用すれば，工業的規模で生産することが可能となるため，多くの研究者によって活発に研究されてきた [18]．一方，高等植物の機能を代謝レベルから解明することを目的とした，いわゆる代謝生物学の研究においても，培養細胞系はたいへん優れた実験系である．そのため，従来から行われている代謝経路自体の研究に加えて，インタクトな細胞でのより動的な多くの情報を得ることが可能となる．植物の液体培養細胞系は，単純で均一な細胞群からなるので，標的細胞へ物質を

直接投与することが可能である。また、培地成分などの生育環境を変化させることによって、容易に細胞の代謝を制御でき、代謝活性の細胞レベルの解析が可能である。そして、継代培養によりいつでも無菌的で無傷な細胞が使えるので、微生物の代謝活性の混入を無視できる。また、同じ材料で多岐にわたる実験データが要求される代謝調節機構の研究や代謝経路間の相互作用の研究に好適である [19]。さらに、二次代謝の発現は、全能性の代謝レベルでの発現と考えることができる。しかし、培養細胞が正常植物よりも成長が速いとはいえ、細菌などの微生物に比べると世代時間はかなり遅い。また、培養に要する時間と労力も無視できない。さらに、継代培養中に遺伝的変異を起こす場合があり、形質が必ずしも安定でないため、たえずチェックする必要がある。加えて、培養細胞の代謝が、もとの植物体の代謝と同一でない場合もあるので注意する必要がある。これらの制約があるにもかかわらず、培養細胞系が代謝の研究に用いられる理由は、上述の欠点を補ってあまりある有利さのためである。

植物細胞培養に関する研究は、未だ技術的開発を対象にする研究も多いが、将来培養細胞の特性を基礎的立場から解析、解明し、さらにその特性を有効に利用した新しい研究領域が開拓され、植物科学の発展に大きく寄与することが期待されている。

1-2-2. 懸濁植物細胞の糖代謝

高等植物の多くはスクロース、ラフィノース、スタキオースといった糖類を炭素源輸送体としており、その中でもスクロースを主たる輸送体として用いている植物が多い。スクロースは多くの緑色植物にとって炭水化物の基本的単位であり、維管束系を転流する主要な炭素源として植物の成長に欠かせないものである。スクロースは、グルコースとフルクトースがグリコシド結合した非還元二糖であり、水に対する溶解度が高く、比較的高濃度であっても生体内での生物学的反応に対して阻害的に作用せず、また反応性にも乏しい。そして、加水分解の際の自由エネルギー変化が高いといった炭素源輸送体としての利点を

持っている。とくにスクロースは、一般の植物体でも転流物質としてソースからシンクへ輸送され、解糖系などの基質となる場合が多い [20].

そこで、培養細胞においてもエネルギー源として、スクロースやグルコースなどの糖がよく使われる。培養細胞は、糖を細胞内に取込むため、二糖類や多糖類をインベルターゼやアミラーゼなどの酵素によって分解する。なかでも、スクロースの加水分解を優先的に行うことが、とくにサトウキビにおいて幅広く報告されている [21]。また、イネなどのいくつかの培養細胞についても同様に報告されている [22]。培地中のスクロースは、細胞壁表面のインベルターゼや培地中に分泌されたインベルターゼによってグルコースとフルクトースに加水分解され、これらヘキソースを細胞に取込み、代謝される。加水分解は、培地の酸化とともに再培養の初期段階において細胞外で急激に起こる。イネは、両方のヘキソースが同程度の速度で取込まれるが [22]、ニチニチソウ [23]、ニンジン [24]、ビート [25]の細胞は、グルコースの方を優先的に取込む。これらの糖輸送は能動的に行われると思われるが、詳細はまだ明らかにされていない。そして、加水分解なしでスクロースを細胞内に取込むスクロース輸送体の存在も確認されている [26]。また、細胞壁を酵素によって分解することによって得られるプロトプラストでは、スクロースよりグルコース、フルクトースのほうがかなり優先的に利用されることもわかっている。

細胞内に取込まれたヘキソースは、いろいろな酵素による反応を繰り返して細胞が必要とする ATP、スクロース、グリコーゲン、デンプン、セルロース、アミノ酸、タンパク質、核酸などに変換される。ニチニチソウでは、取込まれたグルコースはもっぱら呼吸に使われるのに対し、フルクトースは細胞内でのスクロースの再合成に使われる比率が高いことがわかっている [27]。図 1-2 にニチニチソウの懸濁細胞の培養中における糖代謝の経路を簡単にまとめた。他の植物懸濁細胞においても、ほぼ同様の糖代謝経路が存在すると考えられる。

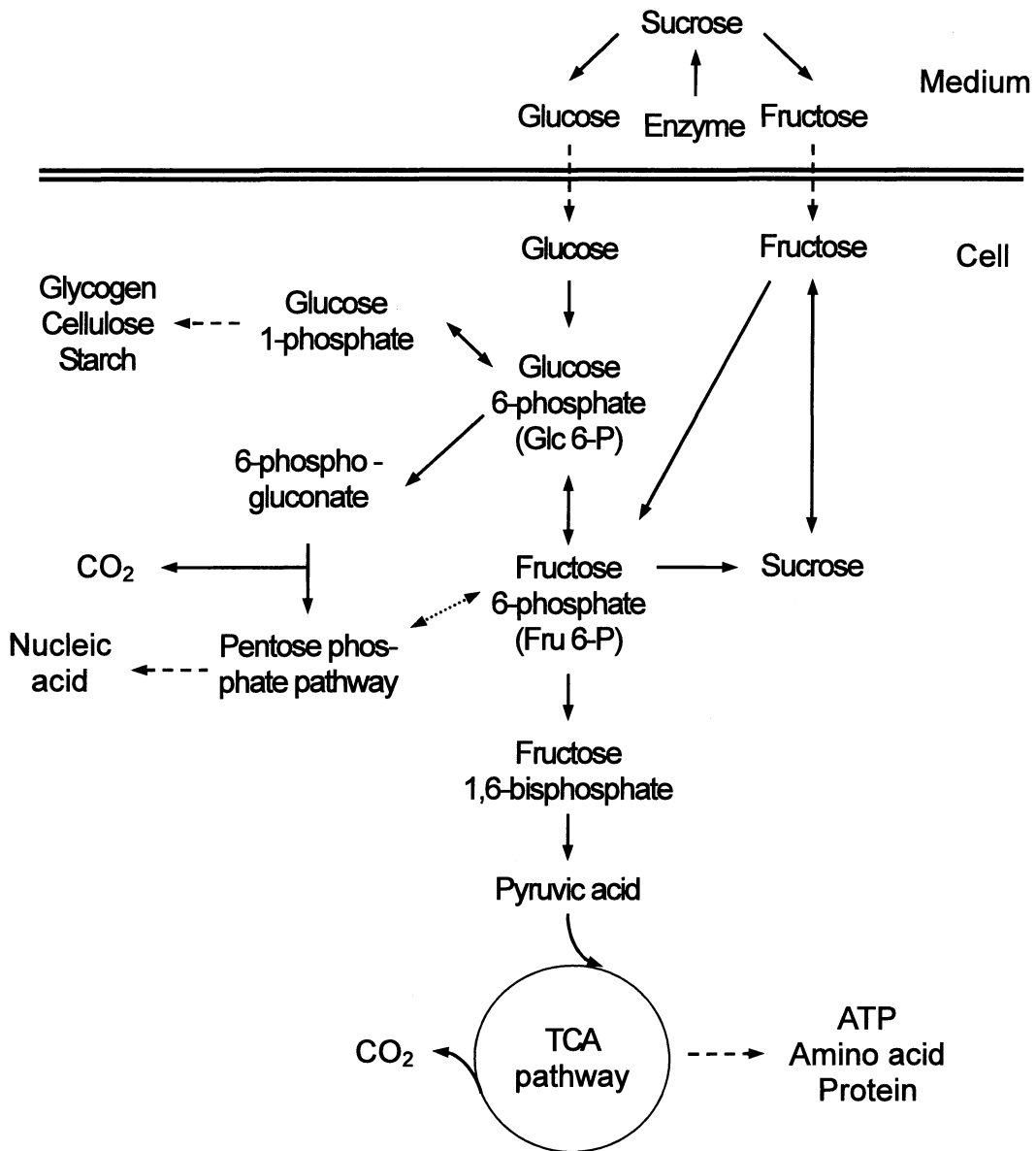


図 1-2 糖代謝経路 [27]
Fig. 1-2 Sugar metabolic pathway

1-2-3. 植物体内の糖の役割

植物体内における糖類は主に炭素源として用いられ、ATP などのエネルギー源、細胞成分合成のための基質として、あるいは、細胞や組織の構成成分、アミノ酸などの生体高分子合成などの炭素骨格として利用されたりする。また、

情報の受容や細胞間の認識，識別などの機能もあることが知られており，これらの様々な機能は糖分子の構造により異なる。

グルコースは，天然に存在する糖のうち，量的な大部分を占める．好気的および嫌氣的呼吸における主要なエネルギー源であり，代謝の基点となっている．グルコースは，解糖系や TCA サイクルなどの代謝経路を経て二酸化炭素と水になるか，あるいは発酵によって酢酸，リンゴ酸，コハク酸などの有機酸，アミノ酸，あるいはエタノールなど多種多様な有機化合物に変換される [28]など，生物にとっては非常に重要な糖である。

マンノースは，遊離の状態ではミズゴケやピートなどの植物中に少量存在するが，大部分は酵母，細菌，植物の細胞壁，細胞膜，および高等植物に含まれる多糖類のマンナン構成成分として存在する．また，D-マンノースは 6-リン酸誘導体を経て，フルクトース 6-リン酸 (Fructose 6-phosphate; Fru 6-P) に変換され解糖系に入って分解される (図 4-12)．量的にはグルコースに次いで多く天然に存在する．しかし，植物の種類によっては，マンノースをリン酸化するのに必要な酵素であるヘキソキナーゼ (Hexokinase (E.C. 2.7.1.1)) を発現しない植物や，リン酸化されたマンノースを Fru 6-P に変換するホスホマンノースイソメラーゼ (Phospho-mannose-isomerase; PMI (E.C. 5.3.1.8)) を発現しない植物も存在する．そのような植物にとっては，マンノースは有害であるという報告もある [29-31]．

ガラクトースは，植物には，メリビオース，ラフィノース，スキタキオース，およびガラクタン，あるいは，リポ多糖，ムコ多糖，糖タンパク質，および糖脂質の構成糖として存在している．また，細胞壁に含まれるペクチン多糖類の構成糖のひとつでもある [32]．量的にはグルコース，マンノースに次いで多く天然に存在する．なお，ガラクトースはオリゴ糖鎖の非還元末端に位置することが多く，シアル酸や L-フコースとともに生体内における分子認識に深く関わっている [33]．しかし，植物にとってガラクトースは炭素源にならず，成長を阻害するという報告もある [34-36]．また，細胞壁中のガラクトース濃度が細胞間の接着力に関与しているという報告もある [36]．

フルクトースは各種の多糖類の構成成分として存在する。自然界では常に他の糖類と混在するか、あるいは重合体の形で存在する。

さらに、多糖類を構成する単糖類は、D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、およびD-フルクトースがほとんどであり、それ以外には、L-アラビノース、D-キシロース、等が存在する程度である。また、複雑な多糖類でも、これらのうち4種類以上の単糖類から構成されるものは稀である。

グルコース2分子が α -1,1結合したトレハロースは、酵母や茸類、海藻類、海老類などに多く含まれていて、自然界に広く分布している。トレハロースについては、蛋白質や細胞膜といった生体膜を乾燥や凍結などの物理的ストレスから守る働きが注目されている。しかし、このようなトレハロースの生体保護効果については、トレハロースが直接、水の代わりにタンパク質分子に水素結合して水のようにふるまう（水置換説）、あるいは、トレハロースがガラス状になり、そのガラス構造によって、タンパク質をカプセルに包むようにして分子構造を歪まないようにする（ガラス状態仮説）という2つのメカニズムが提案されているが、いずれも決定的な証拠は明らかにされていない [37, 38]。また、二糖類の構成要素である単糖に着目すると、その α 、 β 構造を決定するC-1-OH基が、トレハロース分子ではグリコシド結合に使われるため、トレハロースは全てのOH基がエクソトリアル配向（平均e-OH数8.0）である。以下で述べるマルトースおよびスクロースの平均e-OH数が順に7.6、6.3であることから、水溶液中において、トレハロースは動的に安定な水和圏を形成するとされている [38]。

マルトースは、デンプンやグリコーゲンの基本的な構成単位であり、遊離の状態では高等植物や動物にわずかに存在する糖である。また、水に対する親和性が大きく、これを添加すると水分活性が低下するので、静菌効果が期待できる。なお、マルトースはグルコース2分子の α -1,4結合により構成されるが、グルコース2分子が β -1,4結合し、セルロースの基本的な構成単位となる二糖類として、セロビオースがある。

スクロースは、葉緑体を持つすべての植物に輸送体の糖質として可溶性の形

で存在し、重要な役割を果たしている。また、植物体内においてはグルコースに比べ貯蔵にも輸送にも適している。スクロースは、このような転流糖としての役割がある。とくに、高等植物では主要な転流糖として知られる。なお、動物は生合成することはできない。なお、スクロースはグルコースとフルクトースが、 α -1,2 結合により構成されている。

ラクトースは、ミルクの中の主な炭水化物であり、哺乳類にとって栄養上大切であるが、植物の体内には一般的に存在しない。しかし、ナツメヤシなど2, 3 種類の植物に存在することが確認されている。また、通常の酵母では発酵されないが、乳酸菌にとっては好適な栄養源である [39]。なお、ラクトースは、グルコースとガラクトースが β -1,4 結合したものである。

この他に、グルコースとマンノースが結合した二糖類として、多糖類であるグルコマンナンが部分加水分解することによって生じるエピセロビオース（グルコシルマンノース）がある [40, 41]。なお、エピセロビオースは、グルコースとマンノースが β -1,4 結合したものである。

また、上記の二糖類のうち、トレハロースおよびスクロースは非還元性を有し（閉じた構造）、マルトース、ラクトースは還元性を有する（開いた構造）。マルトースやラクトースやエピセロビオースの様に還元性をもつ二糖類の還元末端は、単糖類と同様に α , β 構造をとる。

1-2-4. 赤外分光法（FT-IR/ATR 法）による糖の定量 [42-44]

赤外分光法は、物質がどういう構成要素から成っているかを調べるための一つの手段であり、物質と赤外光の相互作用を利用して物質から情報を抽出する方法である。この方法では、物質にある特定の光を照射し、その光と物質との相互作用の結果として現れる応答を計測し、得られる情報を解析する。解析した結果をもとに物質を評価し分析目的に応じて判断したり、将来の予測を行い物質の制御をしたりすることが可能となる。

分子の中では、原子または原子団の位置は一定でなく、絶えずその位置や距

離を変え運動をしている。その運動とは主に振動と回転であり、物質が赤外光を吸収したとき、化合物中の官能基は独立した基として振動するため、それぞれの官能基に特有な振動数の波数が決まる。この振動数を固定振動数または基準振動数といい、特に中赤外領域には官能基の基本振動が現れる。この振動周期と同じ振動数の赤外光を照射したとき、それぞれの原子、原子団はそのエネルギーを吸収し、励起状態になる。すなわち、吸収されず透過した振動周期と比較すれば、これら原子団の固有振動数を知ることができる。これらの基本振動に基づくピークの位置は、この原子団に特有なものとなるので、ピークの有無によって原子団の有無を判定しうることとなる。これを横軸に波数（または波長）をとり、縦軸に吸光度（または透過率）をとって表示したものが赤外分光スペクトルであり、横軸の波数から定性分析が可能となる。また、縦軸に吸光度をとった場合、物質の赤外吸収の強さと濃度および試料層の厚さとの関係を表す Bouguer-Berr の法則により、定量分析が可能となる。Bouguer-Berr の法則は式 1-1 のように表せる。

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon Cl \quad (1-1)$$

ここで、 I_0 は入射光の強度、 I は透過光の強度、 C は吸収する物質の濃度、 l は光が物質の中を透過する距離、 ϵ はモル吸光係数である。

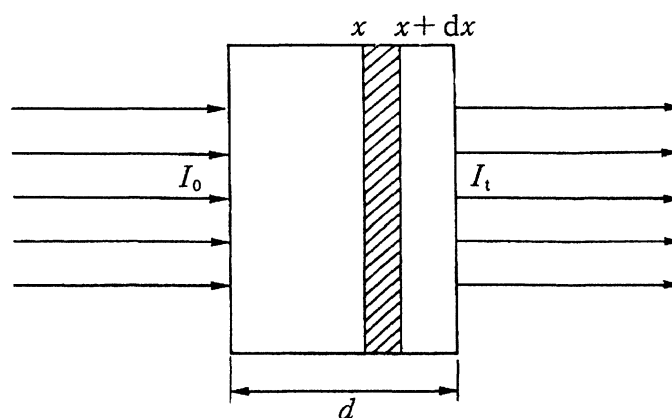


図 1-3 Bouguer-Berr の法則 [10]

Fig. 1-3 Bouguer-Berr Law

式 1-1 より，試料濃度と吸光度は比例関係にある．定量分析は式 1-1 を利用して吸光度から試料濃度を算出するものである．すなわち既知の濃度の溶液を測定して検量線を作成し，未知濃度の溶液の吸光度を比較して濃度を決定する．また，スペクトルの加成性が成り立つとき Bouguer-Berr の法則を用いて定量することができるので，溶液のスペクトルから溶媒のスペクトルを差し引き補償法により，溶質のスペクトルを得ることが可能である．

現在，赤外分光スペクトルを測定する装置には，FT-IR と分散型赤外分光光度計の 2 種類がある．FT-IR は，分散型分光光度計と比べて，①光量利用率がよい，②測定時間が短い，③波数精度が高い，という理由から多く普及している．また，赤外分光スペクトルを測定する一般的な方法の 1 つに透過法が挙げられる．しかし，この手法は赤外領域に強い吸収を持つ物質である水を含んだ水溶液の測定には，透過光がすべて吸収されてしまうので不向きである．そこで，その欠点を補う手法として ATR 法がある．ATR 法は，ゴム上試料のように不溶，不融物質のスペクトル測定に最適である．バルクな物質はもとより，薄膜や溶液，場合によっては繊維状物質や粉末試料のスペクトル測定，また表面分析や物質の光学定数の測定にも応用されている．ATR 法では，入射光が内部反射エレメント (Internal Reflectance Element; IRE) 中で全反射を繰り返すとき，光は IRE-試料界面で反射するのではなく，試料にある深さしみ込んで (エバネッセント波) から全反射する．このとき，試料が光を吸収しない波数領域では，光は全反射する．しかし，光を吸収する領域では，100 %全反射するのではなく吸収の強さに応じて全反射光の強度が落ちる．したがって，この全反射光を測定することにより，赤外分光スペクトルを得ることができる．ATR 法では，しみ込む深さが数 μm なので，水のように赤外領域に強い吸収を持つ物質の測定には大きな威力を発揮することがわかっている．FT-IR 法と ATR 法を組み合わせた FT-IR/ATR 法により得られるスペクトルパターンは糖の指紋領域 ($1300\sim 900\text{ cm}^{-1}$) において糖に固有であり，したがって，糖の種類別定量分析に利用できる．この領域のスペクトルから，水溶液中の単糖類，二糖類の定量が可能であることがわかっている [45, 46].

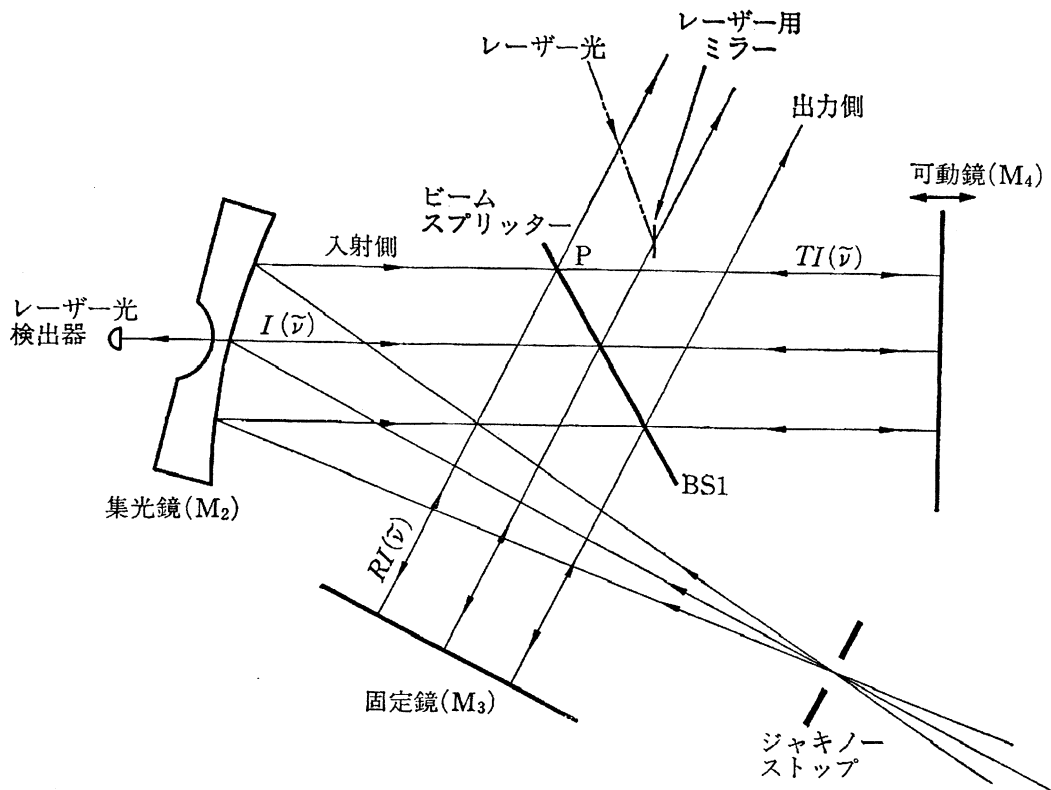


図 1-4 干渉計の構造と光路 [42]

Fig. 1-4 A structure of interferometer and optical path.

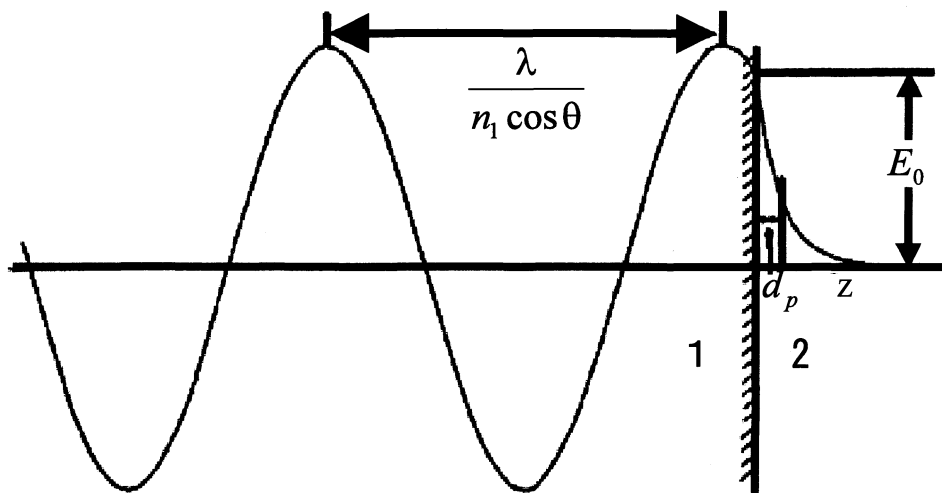


図 1-5 エバネッセント波の減衰挙動 [42]

Fig. 1-5 Attenuation behavior of evanescent wave.

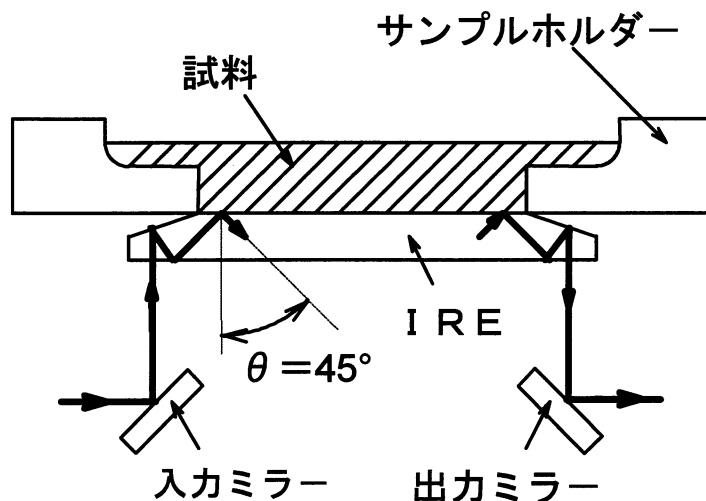


図 1-6 ATR の装置の概略図
Fig.1-6 Figure of ATR accessory.

1-3. 本研究に関する既往の研究

1-3-1. 植物細胞の糖代謝に関する研究

植物の糖代謝に関する研究は、現在まで細胞レベルでの糖代謝の研究も数多くあるため、糖代謝経路や個々の生化学的な反応についてはかなり詳細に解明されている [48]. しかし、糖代謝過程の速度論的な研究はほとんどされていないため、液体培地から懸濁細胞へと栄養源である糖の動的な輸送現象は詳細に解明されていない [13-15]. 糖代謝の速度論的な解析を行うには、まず糖輸送現象そのものを理解する必要があるが、糖輸送に関わる個々の現象、すなわち、糖トランスポーター、糖センシング (糖認識)、糖シグナルなどの研究は多数報告されている [49-53]. 例えば、Riesmeier らはホウレンソウからスクローストランスポーター (sucrose transporter; SUT) を初めて単離した [54]. 彼らは、この SUT はマルトースも通すことが出来ることを示唆した. その後、SUT は様々な植物から単離されるようになった. また、マルトーストランスポーターはそれまで確認されてこなかったが、Niittylä らはシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) の葉から他の糖のトランスポーターとは関係しないマルトーストランスポーター

を発見した [55]. 一方, 単糖トランスポーター (mono-saccharide transporter; MST) についても, 様々な植物で報告されている. 単細胞藻類のクロレラから初めて単離され [56], 高等植物ではシロイヌナズナから初めて単離された [57]. これ以降, 多種の高等植物で, 様々な器官から発見, 単離された [58-61].

ところで, 植物細胞培養系での有用物質の生産等を考えた場合, 細胞内外で多数の反応が同時進行する複雑な糖代謝機構を理解するには, 個々の反応のみ着目するだけでは十分ではなく, 細胞全体, さらには植物全体の生物情報や物質収支を定量的に把握する必要がある. そこで, Hashimoto らはこれまで植物細胞の栄養素として, また糖代謝の起点としての糖に着目し, 赤外分光法を援用することにより培養液中の糖濃度を測定し, 糖代謝挙動に関する研究を行っている [17, 62]. 彼らは, 供試細胞にはタバコ BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow No.2; TBY-2) 細胞を, 供試培地は Murashige & Skoog (MS) 培地を採用し, この培地を基本として, 糖成分をスクロース, グルコース, フルクトースの3種類設定してそれぞれで培養し, 糖の取込み挙動を比較することで糖代謝挙動の解析を試みている. その結果, スクロース培地で培養した場合, 糖の取込みおよび細胞増殖が最も早いこと, スクロースはグルコースとフルクトースに加水分解されて取込まれること, グルコースとフルクトースが同時に培地中に存在する場合は, グルコースが優先的に取込まれること, などが分かった. しかし, 高等植物ではスクロースを炭素源輸送体 (転流糖) としているものが多く [63], タバコもその一つである. また, スクロース培地で継代培養されている TBY-2 細胞を用いたこともあり, その影響がある可能性も示唆された. 表 1-1 に植物の糖代謝について, 主に糖輸送に関する論文の一覧を示す.

表 1-1 植物細胞の糖代謝に関する文献

Table 1-1 A list of reference in sugar metabolism of plant cells.

Authors	Year	Plant	Sugar	Ref.	Metabolic function
Mohr H. et al.	1998	Many	Sugar	[48]	Sugar metabolic pathway
Lalonde S. et al.	1999	Many	Sugar	[49]	Sugar transport, Sugar sensing
Rolland F. et al.	2002	Many	Sugar	[50]	Sugar transporter
Buttner M. et al.	2000	Many	Mono-saccharide	[51]	単糖トランスポーター (MST)
Lemoine R.	2000	Many	Suc	[52]	スクローストランスポーター (SUTs)
Riesmeier et al.	1992	ハウレンソウ	Suc, Mal	[53]	SUTs
Niittylä et al.	2004	シロイヌナズナ	Mal	[55]	Maltose transporter
Sauer N. et al.	1989	クロレラ	Mono-saccharide	[56]	MST
Sauer N. et al.	1990	シロイヌナズナ	Mono-saccharide	[57]	MST
Riesmeier JW. et al.	1993	ジャガイモ	Suc	[58]	SUTs
Sauer N. et al.	1994	シロイヌナズナ	Suc	[59]	SUTs
Gahrtz M. et al.	1994	オオバコ	Suc	[60]	SUTs
Hirose T. et al.	1997	イネ	Suc	[61]	SUTs
Hashimoto A. et al.	2000	タバコ	Suc, Glc, Fru	[17]	糖代謝挙動の解析
Hashimoto A. et al.	2001	タバコ	Suc, Glc, Fru	[62]	糖代謝挙動の解析
Zimmermann MH. et al.	1975	Many	Suc Stachyose Raffinose	[63]	高等植物ではスクロースが転流糖である場合が多い
Amino S. et al.	1988	イネ	Suc, Glc, Fru	[22]	インベルターゼによるスクロースの加水分解
Glasziou KT. et al.	1972	サトウキビ	Suc	[21]	スクロースの加水分解を優先的に行う
Sagishima K. et al.	1989	ニチニチソウ	Glc	[23]	グルコースを優先的に取込む
Kanabus J. et al.	1986	ニンジン	Glc	[24]	グルコースを優先的に取込む
Zamski E. et al.	1985	ビート	Glc ...	[25]	グルコーストランスポーター (GLUT)
Sarah M. et al.	2003	シロイヌナズナ	Glc	[64]	GLUT

Daie J. et al.	1987	アスパラガス	Suc	[26]	SUTs とヘキソーストランスポーター (HXTs) の比較
Schluepmann H. et al.	2004	シロイヌナズナ	Tre	[65]	トレハロースの毒性
Eastmond P.J. et al.	2003	シロイヌナズナ	Tre	[66]	Trehalose metabolism
Eastmond P.J. et al.	2003	シロイヌナズナ	Tre	[67]	Trehalose metabolism
Goddijn O. et al.	1998	シロイヌナズナ	Tre	[68]	Sensing trehalose biosynthesis
SheuHwa CS. et al.	1975	Many	Man	[29]	Starch formation
Herold A. et al.	1976	C3 and C4 plants	Man	[30]	Starch synthesis
Herold A. et al.	1977	Many	Man	[31]	Man metabolism
Servaites J.C. et al.	2002	ホウレンソウ	Glc, Mal	[69]	Chloroplast におけるトランスポーター

*Suc; Sucrose, Glc; Glucose, Fru; Fructose, Mal; Maltose, Tre; Trehalose, Man; Mannose

1-3-2. 赤外分光法を用いた計測法に関する研究

赤外分光法を用いた計測法に関する研究について、これまで多くの報告がなされているが、その中で本研究と関連する分野（農産物・食品）を中心に紹介していく。

赤外分光法が食品成分などの分析に用いられはじめたのは 1960 年代後半からであり、分散型の装置を用いた牛乳中の乳脂肪、タンパク質、乳糖の定量についての報告がある [70]。その後、van de Voort ら、Ng-Kwai-Hang らが、吸光度値と化学分析値との間で検量線を作成し、牛乳や乳製品の品質管理に利用している [71, 72]。また、Darwish らは、魚の脂肪およびタンパク質含有量の測定を行っている [73]。FT-IR の透過法を用いた報告として、Martel らと Hop らがそれぞれ牛乳中の水分の定量を行っている [74, 75]。これに対して、FT-IR/ATR 法を用いた報告例として、van de Voort らが、FT-IR/ATR 法により、バター中の乳脂肪含有量の測定を行い、オンラインでの製造工程の品質管理への応用を検討している [76, 77]。また、McQueen らは、チーズへの応用を検討している他 [78]、

Wilson も、食品への応用を検討している [79].

糖類の定量分析に関しても、透過法 [80, 81]に対して FT-IR/ATR 法を用いた研究は増加しつつあり, Cadet らは, サトウキビジュース中のスクロースの定量を行っている [82]. Dupuy らは, フルーツジュース中の糖, 酸の定量を 10% の誤差範囲内で行った [83, 84]. Mirouze らは, シロップ中のグルコース, スクロース, フルクトース, およびマルトースの定量を試み, グルコースとその他の糖という分類で PLS 回帰を行っている [85]. 亀岡らは, グルコース, スクロース等の単糖類, 二糖類の水溶液スペクトルを取得し, 糖と水との相互作用について解析を行っている. また, グルコース, スクロース, フルクトース, およびラクトーススペクトルの特徴的な波数における検量線を用い, オレンジ, アップルジュース, および乳酸菌飲料中の上記糖類の定量を高精度で行い, 固定波長を用いたオンラインでのモニタリングへの可能性を示唆している [45, 46]. さらに, Hashimoto らは, 懸濁植物細胞の培養過程での培地のスペクトルからスクロース, グルコース, およびフルクトース濃度を上記の手法により求め, 各糖濃度の経時変化と HPLC より求めた経時変化が定性的, 定量的に類似したことから, FT-IR/ATR 法が植物細胞培養過程の糖代謝計測に有効な手段であることを示している [17]. また, 彼らはヨーグルト発酵のモニタリングにもこの方法を適用している [86]. さらに, Alberti らは, FT-IR/ATR プロブを用いてグルコース等のスペクトルを取得し, 発酵試料のオフラインモニタリングを行い, リアルタイムでのプロセス制御への可能性を検討している [87].

糖成分以外の食品成分も分析が試みられている. FT-IR/ATR 法を用いることで, 果汁に含まれているクエン酸の定量が可能であると報告されている [88]. また, ワインのスペクトルパターンから品種を特定する, あるいは品質状態を把握するといった研究も行われている [8]. FT-IR/ATR プロブを活用すれば, 食品に含まれる主要な構成成分を, 瞬時に, 定性かつ定量的に把握でき, この技術がオンラインでの味覚センサーにつながるものと期待されている.

糖以外の生体関連物質への応用として, ヘモグロビンの分光解析 [89]やタンパク質への応用 [90-95]などがある. また, イオン解離状態などの把握 [96]に

も応用でき、スペクトルから解離反応と密接な関係にある生体情報（pH・温度等）までも同時に得られる [97, 98] ことがわかっている。

1-4. 本研究の目的

植物の品種改良や有用資源の獲得のため、植物培養技術を用いることは大変有効である。この技術を応用するには、植物細胞の培養工程を正確に制御できることが望ましく、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、近年詳細に解明されてきている一方で、その速度過程についてはほとんど解明されていないことはすでに述べた。そこで、Hashimoto らは赤外分光法を援用して懸濁植物細胞の栄養素としての糖に着目して、一次代謝の起点となる糖の取込み挙動から懸濁植物細胞の糖代謝解析を試みてきた [17, 62]。本研究でも、植物細胞の糖代謝挙動をより詳しく動的に解析するために、糖代謝の入り口（炭素源）と出口（増殖や代謝産物）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することを目指す。

上記のような速度論的な解析をするには、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。そこで、本研究においても培養液成分の定量に赤外分光法（FT-IR/ATR 法）を援用する。本方法は複数成分を同時、かつ迅速に計測でき、オンラインモニタリングに適している測定法である。本方法ではスペクトルパターンの変化から培養液中の糖成分の変化を分子レベルで構造的に把握できる。そのため、糖取込み挙動にともなう培地中の糖成分の変化を瞬時に定性、定量的に捉えることができる。加えて、細胞から培地に放出される代謝産物も同時に検出できる。そこで、本研究では Hashimoto らの確立した定量方法 [17] をさらに発展させ、炭素源の糖だけでなく代謝産物のエタノールも含めた糖代謝成分の同時定量法を確立することも目的とし、従来法である HPLC 法と精度を比較することで FT-IR/ATR 法の有効性を示すこととした (2章)。本研究では、この赤外分光法を援用して以下に示す3つの方法で懸

濁植物細胞の動的糖代謝挙動の解析を試みる。

まず、標準状態で培養された細胞の炭素源に対する応答を検討する。炭素源は、単糖類ではグルコース、二糖類ではスクロースを基準とし、これと構造が異なる単糖類および結合形態が異なる二糖類を採用し、その差異が細胞の糖代謝におよぼす影響を検討する。

つぎに、前培養により形質発現させた細胞の炭素源に対する応答を検証する。細胞が糖を取込んで代謝する際、糖成分によって認識、取込み挙動および代謝経路はそれぞれ異なるはずである。そこで、前培養の糖成分や培養期間が糖代謝挙動におよぼす影響を分子レベルで確認していく。

最後に、前培養により形質発現させた異なる細胞種の炭素源に対する応答の比較を行う。植物には様々な種があり、それぞれで固有の特徴を有している。したがって、植物を構成する細胞も、品種によって、さらに器官、組織によって特徴が異なる。そこで、異なる植物細胞種で糖代謝挙動を比較し、共通の特徴や固有の特徴を把握する。

これらの観点を総合して、本研究の目的は、糖代謝の入力と出力に着目し、赤外分光法による培養液中の代謝関連物質の定量法を確立した上で、懸濁植物細胞の糖代謝挙動に関する速度論的な解析をし、生化学的な変化まで含めた炭素源の流れを動的に把握することとした。

1-5. 本研究の構成

最後に、本研究の概要を以下にまとめる。上記の目的を達成するため、本研究を図1-7に示した構成となっている。

まず、本章で本研究の背景、目的を述べた後、2章で赤外分光法による糖代謝成分の定量法について検討する。本研究では Hashimoto らの確立した定量方法 [17] をさらに発展させ、糖だけでなくエタノールも含めた糖代謝成分の定量法の確立を目指す。そして、従来法である HPLC 法と比べて同等の精度であることを示すことで有効性を確認する。以降、本方法を用いて3つの角度から動

的糖代謝挙動を解析していく。

3章では単糖類はグルコースを、二糖類はスクロースを基準として様々な炭素源を採用して培養を行う。細胞は糖を認識し、トランスポーターが活性化して能動的にこれを取込むが、糖によっては取込む前に酵素による加水分解等を行う場合もあり、糖認識機構および取込み過程は糖成分によって異なる。そこで、培地中の炭素源種や結合形態の差異が糖代謝におよぼす影響について検討していく。植物にとって転流糖でもあるスクロースや糖代謝経路で重要な役割を果たすグルコース、フルクトース、また認識糖として、あるいは細胞壁多糖の成分として知られるガラクトースやマンノース、でんぷんなどの貯蔵成分に使われるマルトースなどを用いて糖代謝挙動を比較することで検証する。

4章では、前培養条件（糖成分・培養期間）が動的糖代謝挙動におよぼす影響を検証する。前培養の影響を検討するため、前培養の糖成分を4種類（グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース）設定し、前培養と本培養の糖成分が同じ場合と本培養がスクロース培養の場合（標準MS培地の炭素源はスクロース）の2種類ずつ設定し、前培養の期間も増殖曲線の誘導期、対数期および定常期に相当する期間の3種類ずつ設定した計24種類の培養を行う。この実験結果より、前培養の糖成分と培養期間という2つの視点から動的糖代謝挙動におよぼす影響について考察を試みる。

5章では、均一に増加するといわれる TBY-2 細胞に対して、凝集しながら増殖していくタイプのイネ細胞を採用し、異種細胞種間での糖代謝挙動の比較を試みる。前培養の糖成分が異なる場合の動的な糖代謝挙動を両者で比較し、共通する特徴や細胞固有の特徴を把握する。

最後に、6章の結言でこれらの成果をまとめた上で、本研究の結論を論じ、課題について触れた後、そこから考えられる今後の展開を述べる。

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

1. 緒言

- (1) 植物工学の発展と分光計測の応用
 - 1) 植物工学の発展と社会的意義
 - 2) 赤外分光法を用いた計測
 - 3) 植物培養細胞を用いたバイオプロセス工学と分光計測
- (2) 懸濁植物細胞の糖代謝挙動と培地成分計測に関する基礎的事項
- (3) 本研究に関する既往の研究
 - 1) 植物細胞の糖代謝に関する研究
 - 2) 赤外分光法を用いた計測法に関する研究
- (4) 本研究の目的
- (5) 本研究の構成

2. 赤外分光法による糖代謝成分の定量法の確立

- (1) 本章の背景
- (2) 本章の目的
- (3) 実験試料および方法
 - 1) 供試培地
 - 2) 供試細胞
 - 3) 培養方法
 - 4) 糖の定量法
- (4) 赤外分光法による培地中の糖代謝成分の定量
 - 1) R2S培地中の糖代謝成分の定量
 - 2) MS培地中の糖代謝成分の定量
- (5) 本章の結論

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

- (1) 本章の目的
- (2) 実験試料および方法
 - 1) 実験試料
 - 2) 実験方法
 - 3) 糖と細胞濃度の定量法
- (3) 1種類の糖で培養したときの動的糖代謝挙動
 - 1) 培養液スペクトル
 - 2) 糖およびエタノール濃度の経時変化
 - 3) 動的糖代謝挙動特性
- (4) 2種類の糖で培養したときの動的糖代謝挙動
 - 1) 培養液スペクトル
 - 2) 糖およびエタノール濃度の経時変化
 - 3) 動的糖代謝挙動特性
- (5) 本章の結論

4. 前培養条件がTBY-2細胞の糖代謝挙動におよぼす影響

- (1) 本章の目的
- (2) 実験試料および方法
 - 1) 実験試料
 - 2) 実験方法
 - 3) 糖と細胞濃度の定量法
- (3) 前培養の糖成分が動的糖代謝挙動におよぼす影響
 - 1) Glcで前培養した場合
 - 2) Fruで前培養した場合
 - 3) Manで前培養した場合
 - 4) Galで前培養した場合
- (4) 前培養期間が動的糖代謝挙動におよぼす影響
 - 1) 誘導期
 - 2) 対数期
 - 3) 定常期
- (5) 本章の結論

5. 異なる植物細胞種の糖代謝挙動の比較

- (1) 本章の目的
- (2) 実験試料および方法
 - 1) 実験試料
 - 2) 実験方法
 - 3) 糖と細胞濃度の定量法
- (3) 異なる植物細胞種による糖代謝挙動の比較
 - 1) 培養液スペクトル
 - 2) 糖およびエタノール濃度の経時変化
 - 3) 動的糖代謝挙動特性
 - 4) エタノール濃度の比較
- (4) 本章の結論

6. 結言

- (1) 本研究の成果
 - 1) 赤外分光法による糖代謝成分の定量法の確立
 - 2) 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
 - 3) 前培養条件がTBY-2細胞の糖代謝挙動におよぼす影響
 - 4) 異なる植物細胞種による糖代謝挙動の比較
 - 5) 本研究の結論
- (2) 本研究の課題
- (3) 今後の展開
 - 1) 赤外分光法のバイオプロセス工学における展開
 - 2) 植物工学における展開

図 1-7 本研究の構成
Fig. 1-7 Constitution of this study.

2章. 赤外分光法による糖代謝成分の定量法の確立

本章に関する研究は、以下のように投稿および掲載されている。

Hashimoto A., Yamanaka A., Kanou M., Nahar F., Kameoka T.: Simple and Rapid Determination of Metabolite Content in Plant Cell Culture Medium Using an FT-IR/ATR Method. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **27**:115-123, 2005

2-1. 本章の背景

本研究では、懸濁植物細胞の糖代謝挙動の解析を行うため、本章において、赤外分光法を援用した培地成分の糖代謝成分の定量法の確立を目指すことは1章で触れた。そこで、糖およびエタノールの定量法について、一般的に知られている方法をまとめた。

2-1-1. 従来法による糖の定量

現在、いろいろな研究で細胞培養が行われていて、同時に培養液中の糖の定量もされている。ここでは、一般的によく使用されている糖の定量法について、以下に簡単に紹介する [99].

滴定法では、ソモジ (Somogyi) 法、比色法を用いた方法では、ソモジ-ネルソン (Somogyi-Nelson) 法 [100, 101], アンスロン-硫酸法 [102], フェノール-硫酸法 [103]があげられる。また、移動相と固定相の間の相互作用 (吸着, 分配, イオン交換など) の差によって、混合物を分離する手法であるクロマトグラフィー [104]については、薄層クロマトグラフィー (Thin Layer Chromatography; TLC), 気-液クロマトグラフィー (Gas-Liquid Chromatography; GLC), 高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) などがある。

2-1-2. エタノールの定量

一般に、エタノールのような揮発性物質（気体および液体）の定量で、よく使われているのはガスクロマトグラフィー（Gas Chromatography; GC）である。ガスクロマトグラフィーでは、試料はガス状になりカラム中を通りぬけて移動して行く。固定相には、液体または化学結合された薄膜かのいずれかである。移動相には He, N₂, Ar, H₂ などのガス（キャリアーガス）を用いる。エタノール定量には N₂ がよい。また検出器には炭素に応答する FID が適している [47]。また、前述した HPLC でもエタノールを検出できるカラムを取りつければ定量が可能である。

2-2. 本章の目的

本研究では懸濁植物細胞の糖代謝挙動の解析を行っていくため、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。一般的に、培養液の成分分析等には HPLC 法が用いられる。しかしこの方法は、混合物をクロマトグラフィーにより分離して計測する分析法であるため、測定時間が長く、前処理も必要であり、オンラインのモニタリングには不向きである。また、カラムの性質によって測定できる物質も選択され、得られる情報が限定されてしまうおそれもある。それに対して赤外分光法（FT-IR/ATR 法）は、短時間、非破壊で複数の培地成分の一斉同時計測が可能のため、培地情報のオンラインでのモニタリングに適していることは1章でも触れた。したがって、本研究の培養液成分の測定には、FT-IR/ATR 法を採用する。

ところで、細胞内外で多数の反応が同時進行する複雑な糖代謝機構を理解するには、個々の反応のみ着目するだけでは十分ではなく、細胞全体、さらには植物全体の生物情報や物質収支を定量的に把握する必要がある。Hashimoto ら [17] は、本方法を用いて懸濁植物細胞（TBY-2 細胞）の培養液中に含まれる糖成分の定量を行ってきたが、本研究では培地の炭素源である糖（入り口）だけでなく、代謝産物であるエタノール（出口）にも着目し、Hashimoto らの定量

法を発展させて、糖成分とエタノールを同時に定量できる方法を確立することを目指した。そこで本章では、FT-IR/ATR 法を援用して本研究を通じて扱う TBY-2 細胞の基本培地である MS 培地と、第5章で扱うイネ細胞の基本培地である R2S 培地に含まれる糖代謝成分（糖およびエタノール）を定量する方法をそれぞれ確立することを目的とした。また、成分を調製したサンプルおよび培養液サンプルを、従来法である HPLC 法と FT-IR/ATR 法でそれぞれ測定し、精度を比較することで、FT-IR/ATR 法の有効性を示すことも目的とした。さらに、スペクトルからは官能基の基準振動に基づく分子構造的な情報も得られる。そこで、定量情報以外の様々な情報も同時に取得できる可能性も示していく。

2-3. 実験試料および方法

2-3-1. 供試培地

(1) 培地成分

懸濁植物細胞の生育のために使用する培地は、主要となる無機栄養素、微量元素、鉄源、有機添加物（ビタミン類、植物調製物質）、炭素源で構成される。これまで、研究の目的や培養する植物細胞の種類などによって、さまざまな組成の合成培地が考案され、また改良されてきた。一般によく知られているものでは、MS 培地 [105]、R2 培地 [106, 107]、R2S 培地 [108]、Linsmaier & Skoog (LS) 培地 [109]、White 培地 [110, 111] などがある。表 2-1 にこれら基本培地の組成（成長ホルモンを除く）をまとめた。様々な培地の中から、目的に応じて最適な培地を選ぶ必要がある [112]。また、必要に応じて成長ホルモン（インドール酢酸などのオーキシン、カイネチンなどのサイトカイニンあるいはジベレリンなど）を追加して使用する。本研究では、タバコ BY-2 細胞を 3, 4 および 5 章で、イネ細胞を 5 章で扱う。これらの細胞には、MS 培地と R2S 培地をそれぞれ用いた。そこで、本項ではこれらの培地について述べる。

表 2-1 様々な培地の組成とその含量 [112]
Table 2-1 Components and its content of various media.

		培地の処方 (Prescription of medium) [mg/l]				
物質名 (Material)		MS	LS	White	R2	R2S
無機塩類 (Inorganic salts)	(NH ₄) ₂ SO ₄				330	335
	KNO ₃	1900	1900	80	4040	4000
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O			300		
	NH ₄ NO ₃	1650	1650			
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O			16.5	312(2H ₂ O)	273
	KH ₂ PO ₄	170	170			
	KCl			65		
	Na ₂ SO ₄			200		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	720	247	250
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440		147	150
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8			5.5
	Na ₂ EDTA	37.3	37.3			7.5
	Fe-EDTA				20	
	Fe ₂ (SO ₄) ₃			2.5		
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3	7	1.5(H ₂ O)	1.6
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6(4H ₂ O)	8.6	3	2.2	2.2
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025		0.2	0.125
	H ₃ BO ₃	6.2	6.2	1.5	2.9	3
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25		0.13	0.125
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025			
KI	0.83	0.83	0.75			
有機物 (Organic Matter)	Myo-Inositol	100	100			100
	Thiamine-HCl	0.1	0.4	0.1	1	0.5
	Prydoxine-HCl	0.5		0.1		0.5
	Nicotinic acid	0.5		0.5		0.5
	Glycine	2		3		2
	Sucrose	30000	30000	20000	20000	30000

MS 培地は、タバコの髓組織から誘導されたカルスの増殖を指標にして開発された培地であり、現在タバコのみならず多くの植物組織やプロトプラストなどの培養にもよく用いられている合成培地である。無機窒素源として、硝酸アンモニウム (NH₄NO₃) と硝酸カリウム (KNO₃) が多量に含まれており、とくにアンモニア濃度が高く、また塩類が豊富なのが特徴である [112]。

無機塩類については、MS 培地用混合塩類は市販されている和光純薬工業株式会社の植物培養用培地 ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (1l 用) を使用

した(表 2-1 無機塩類の欄参照)。ビタミンや成長ホルモンなどの有機物は、ストック溶液を調製して最終的な濃度の何倍かの濃厚液を作っておき、それを実験毎に薄めて使うこととした。ストック溶液を調製するための試薬であるリン酸 2 水素カリウム (KH_2PO_4)、Myo-イノシトール (Myo-inositol)、チアミン塩酸塩 (Thiamine-HCl)、エタノール (Ethanol) は、和光純薬工業株式会社の試薬特級を使用した。また、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) はナカライテクス株式会社の試薬を、2 規定の水酸化ナトリウム (2N NaOH) は、和光純薬工業株式会社の容量分析用を使用した。それぞれのストック溶液を調製後、2 g KH_2PO_4 / 100 ml H_2O 、pH 調整剤である 2N NaOH は室温保存する。ビタミン類である 10 g Myo-inositol + 100 mg Thiamine-HCl / 100 ml H_2O は、ろ過滅菌後、室温保存する。成長ホルモンの 100 mg 2,4-D / 10 ml Ethanol は、 -20°C で保存する。ストック溶液の詳しい成分、用量については、表 2-2 に示す。

表 2-2 MS 培地のストック溶液の種類とその用量 (培地 1/ 中)
Table 2-2 Kinds of stock solutions and its volume for MS medium.

ストック溶液の種類 (Kinds of stock solutions)	容量 (volume)
2 g KH_2PO_4 / 100 ml H_2O	10 ml
10 g Myo-inositol + 100 mg Thiamini-HCl / 100 ml H_2O	1 ml
100 mg 2,4-D / 10 ml Ethanol	20 μl
2N NaOH	113 μl

R2S 培地 [108]は, R2 培地を改良した培地である. もとになった R2 培地は, Ohira ら [106, 107]によってイネ懸濁細胞用に改良された培地である. 既往の研究より, R2 培地中におけるイネ懸濁細胞の細胞増殖は, MS 培地中におけるそれと比較して優れていることが実験的に示されている. 特徴としては, MS 培地に比べて, 無機塩類, 有機物の種類が少なくなっている. これは, コバルト, ヨウ素, ピリドキシン, ニコチン酸, イノシトール等の添加が, イネ細胞において効果がないことから, 除去されて簡素化されたからである. 本研究に用いる R2S 培地は, R2 培地に生長促進物質であるピリドキシン, ニコチン酸, イノシトールを加えている.

無機塩類やビタミンなどの有機添加物なども, MS 培地と同様, 必要な物質をあらかじめ決められた割合で調製しておき, 実験毎に必要量培地に入れることとした. 調製粉末およびストック溶液を調製するための試薬については, 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) はナカライテクス株式会社の試薬を, 他はすべて和光純薬工業株式会社の試薬特級を使用した. 調製粉末およびストック溶液の詳しい成分, 用量については, 表 2-3, 2-4 に示す. それぞれの調製粉末, ストック溶液を調製後, A 粉末は室温保存, B 液, C 液, D 液はそれぞれろ過滅菌後に室温保存, E 液は 2,4-D を 5ml のエタノールに溶かし(必要なら超音波洗浄機を用いる), 蒸留水 495 ml で希釈して調製する. 保存は -20°C で行う.

表 2-3 R2S 培地の混合塩類調製粉末の成分
とその含有量（培地 1/ 中）

Table 2-3 Components and its weight (per 1L) of prepared powder
of mixture salt for R2S medium.

調製粉末 A (Powder A)	
成分 (Component)	含有量 (Content)
(NH ₄) ₂ SO ₄	335 mg
KNO ₃	4000 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250 mg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	273 mg

表 2-4 R2S 培地のストック溶液成分とその含有量（培地 1/ 中）

Table 2-4 Components and its contents of stock solutions
for R2S medium.

ストック溶液の種類 (Kinds of stock solutions)	成分 (Component)	含有量 (Content)	容量 (Volume / 1L-medium)
Solution B (/ 500 ml H ₂ O)	MnSO ₄ ·5H ₂ O	864.55 mg	1 ml
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1100 mg	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	62.5 mg	
	H ₃ BO ₃	1500 mg	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	62.5 mg	
Solution C (/ 500 ml H ₂ O)	FeSO ₄ ·7H ₂ O	275 mg	10 ml
	Na ₂ ·EDTA	375 mg	
Solution D (/ 500 ml H ₂ O)	myo-Inositol	5000 mg	10 ml
	Thiamine-HCl	25 mg	
	Prydoxine-HCl	25 mg	
	Nicotinic acid	25 mg	
Solution E (/ 500 ml H ₂ O)	2,4-D	100 mg	10 ml

また、植物細胞は本来光合成 (photosynthesis) を行うので、炭素源として糖を与える必要はない。しかし、培養細胞は一般にクロロフィルやカロチノイドが欠落し、光合成能力を欠いているので、細胞が生育し代謝を行うのに必要な炭素骨格やエネルギーを生産するため、これらの培地にも糖を炭素源として培

地に加える必要がある。糖は、それぞれ和光純薬工業株式会社の試薬特級を使用した。MS 培地や R2S 培地の炭素源は、スクロースを基本としていることから、本研究で採用している糖成分と培養時の濃度について、スクロース 1 分子の炭素数に合わせてそれぞれ設定した。表 2-5 に示す。また、採用した糖成分と代謝産物の主な成分として知られるエタノールの構造式を表 2-6 に示す。

表 2-5 本研究で採用した糖成分と培養時の濃度

Table 2-5 Sugar and its concentration on culture media in this study.

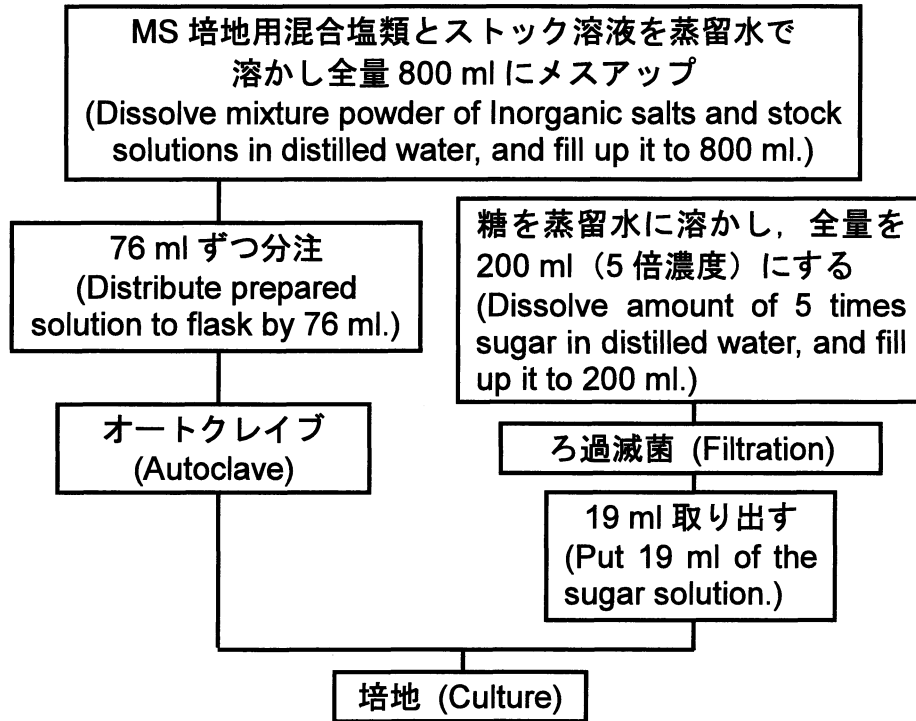
	糖成分 (章番号) (Kinds of sugar (Chapter))	略号 (Symbol)	濃度 (Concentration)
単糖類 (Mono-saccharide)	D-Glucose (2, 3, 4, 5)	Glc	31.58 g/l
	D-Fructose (2, 3, 4, 5)	Fru	
	D-Mannose (3, 4)	Man	
	D-Galactose (3, 4)	Gal	
二糖類 (Di-saccharide)	Sucrose (2, 3, 4, 5)	Suc	30.00 g/l
	Trehalose (3)	Tre	
	Maltose (3)	Mal	
	Lactose (3)	Lac	
混合糖 (Mixture-sugar)	Glucose and Fructose (2, 3, 5)	Glc+Fru	各 15.79 g/l
	Glucose and Mannose (3)	Glc+Man	
	Glucose and Galactose (3)	Glc+Gal	

表 2-6 本研究で採用した糖成分とエタノールの立体構造
Table 2-6 Structural formulas of sugar and ethanol.

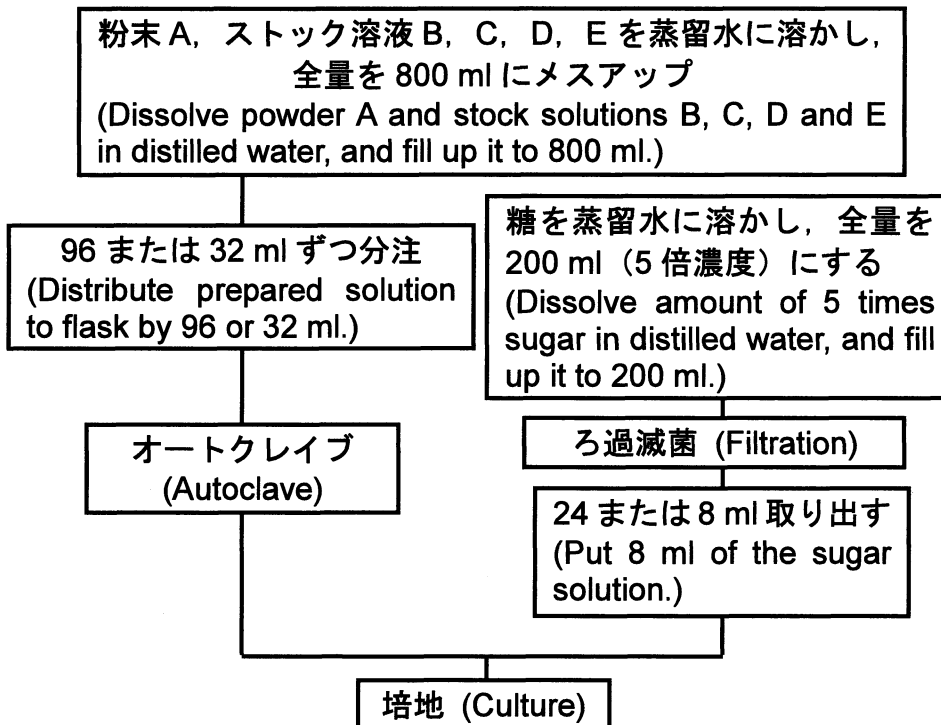
単糖類 (Monosaccharide)		二糖類 (Disaccharide)	
糖成分 (Sugar)	構造式 (Structural formula)	糖成分 (Sugar)	構造式 (Structural formula)
Glc		Suc	
Man		Tre	
Gal		Mal	
Fru		Lac	
代謝産物 (Metabolite)			
EtOH	CH ₃ -CH ₂ -OH		

(2) 培地調製

培地は、糖、混合塩類の調製粉末、ストック溶液を一定量混ぜ合わせて調製する。細胞培養を行う場合は、当然滅菌処理を施さなければならない。糖の滅菌方法は高压滅菌とろ過滅菌の2種類あるが、フルクトースは熱に不安定なため高压滅菌には適さないことがわかっている。そこで本研究では培地の調製条件をそろえるため、糖は各種水溶液を作った後、それぞれを富士写真フィルム株式会社製のディスクカプセル (pore size 0.2 μm) でろ過滅菌して使用する。糖以外の培地成分はそれぞれの成分を純水に溶解させた後、MS 培地の場合は、300 ml 容の三角フラスコに 76 ml 分注して、口を2重のアルミ箔で塞ぎ、R2S 培地の場合は、継代培養用には 300 ml 容の三角フラスコに 96 ml、本培養用には 100 ml 容の三角フラスコに 32 ml 分注し、信越ポリマー社製のシリコン栓で蓋をする。それらをトミー製工のオートクレイブ SS-240 を使用して高压滅菌 (121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min) する。滅菌後、最終濃度の5倍濃度に調製してろ過滅菌された糖水溶液 (MS 培地では 19 ml, R2S 培地では継代培養用で 24 ml, 本培養用で 8 ml) と混合塩類溶液を混ぜ合わせて実験に供する。滅菌作業が必要な際にはクリーンベンチを使用し、器具も必要な場合は乾熱滅菌 (170 $^{\circ}\text{C}$, 90 min) をしてから使用する。図 2-1 に培地調製手順を示す。(a)は MS 培地の場合を、(b)は R2S 培地の場合を示す。



(a) MS 培地の場合



(b) R2S 培地の場合

図 2-1 培地調製手順

Fig. 2-1 Protocol of prepared medium.

2-3-2. 供試細胞

本研究に用いる供試細胞には、懸濁植物細胞のタバコ BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow No.2; TBY-2) 細胞と、イネ細胞 (*Oryza sativa* L. Japonica cv. Nipponbare) を用いた。以下、各々の細胞について説明していく。

(1) タバコ BY-2 細胞

本研究で用いる供試細胞のひとつである TBY-2 細胞は、胚軸より誘導したカルスから確立された株で、オーキシンが増殖に必須である。

一般に、植物の培養細胞は、数十から数百個の細胞の集塊を形成するのが普通で、細胞塊の表面にある細胞のみが分裂、増殖する。したがって、培養細胞は分裂しない細胞を含む不均一な細胞集団である [113]。本研究で用いたもう一つの供試細胞であるイネ細胞がそうである。これに対し、TBY-2 細胞の懸濁培養細胞は、ほとんど全部の細胞が分裂、増殖するほぼ均一な細胞集団より成り [113]、1週間で約100倍と植物細胞としては類を見ない速度で増殖するので、大量の材料を安定に供給することが必須とされる生化学的解析に好適な細胞である。そのため、いろいろなところで研究に用いられており、遺伝情報が多い [114]。また、長年の継代培養の結果、再分化能を失っているにもかかわらず、 $2n = 48$ の正常な染色体数を維持していることや、プロトプラスト化の条件が確立していることも利点としてあげられる [113]。培養細胞を用いる実験では、初代培養を用いるとき以外は、必ず培養細胞を新鮮培地に継代することが必須条件となる。写真 2-1 に 1 週間培養した TBY-2 細胞の状態を示す。

(2) イネ細胞

イネ細胞は、*Oryza sativa* L. Japonica cv. Nipponbare の胚より誘導したカルスから確立された株である。

この細胞は、一般的な植物細胞でよく見られる細胞塊を形成する細胞である。そのため、培養を続けると局部的に嫌氣的な部分ができ、発酵代謝生産物とし

てエタノール (EtOH) を発生する. このエタノール発酵は嫌氣的糖代謝産物として知られている. こうしたことから, イネは代謝工学, 発酵工学あるいは遺伝子工学など多方面にわたって研究がなされている [115]. 本研究で用いたイネ細胞は, 名古屋大学生物分子応答研究センターから提供された細胞で, 同研究センターでは主に α -アミラーゼあるいは糖トランスポーター遺伝子の発現を指標とした, ①糖による転写調節機構, ②糖シグナルを媒介とした遺伝子発現調節の制御機構, ③糖輸送の分子機構, などの研究に用いられている [116-121]. タバコ BY-2 細胞と同様に, 初代培養を用いるとき以外は必ず培養細胞を新鮮培地に継代することが必須である. 写真 2-2 に 2 週間培養したイネ細胞の状態を示す.

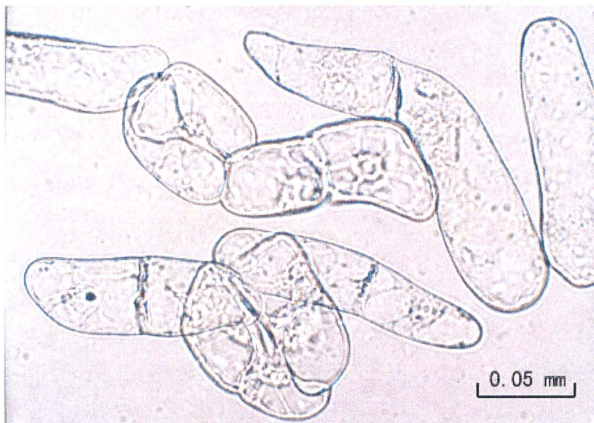


写真 2-1 タバコ BY-2 細胞
Photo 2-1 TBY-2 cell.

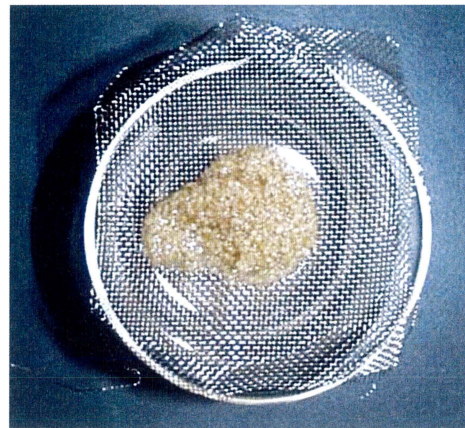


写真 2-2 イネ細胞
Photo 2-2 Rice cell.

2-3-3. 培養方法

(1) タバコ BY-2 細胞

本研究では, MS 培地で継代培養して保存している TBY-2 細胞を実験に供試している. 通常の継代方法では, 1 週間培養後の MS 培地から培養液 1.5 ml を滅菌済みのディスポーザブルピペット (日本インターメッド社製, 5 ml 用) を使用して取りだし, 300 ml 容の三角フラスコに入った 95 ml の新鮮培地に接種

するという方法で行っている。そして、恒温器（日本医化器械製作所製，NK式人工気象器 NC-220-S）内に設置した振盪器（TAITEC 社製，DOUBLE SHAKER NR-30）に培養液の入った三角フラスコをのせて培養を行う。

本培養に供試する場合は，培養1週間後の培養液を取りだして遠心分離（久保田製作所社製）による洗浄を行う（1000 rpm, 1 min, 3回）。洗浄液には糖を含まないMS培地を使用する。洗浄後の培養液の細胞濃度を調製（約12 g-dry cell/l）した後，1.5 mlの培養液を本培養用に準備した各培地に植え継ぎ培養する。後述するが，接種直後および一定期間培養毎に培養液をサンプリングして測定するため，本培養用の培地を必要量準備（およそ5本程度）してすべてに植え継ぐ。培養条件は表2-6に示した。

また，本研究を通じてこのような操作に用いる使用器具は，雑菌の混入を防ぐため，使い捨ての滅菌済みの器具を，そうでないものについてはオートクレイブで処理されたものを使用し，操作においても雑菌が混入しないように注意し，手や使用器具をエタノールで消毒した後，クリーンベンチ内で行うことをここに明記しておく。

（2）イネ細胞

イネ細胞はR2S培地で継代培養されているものを用いる。継代培養の方法は以下のとおりである。まず，2週間培養後の細胞を，オートクレイブした薬匙を使って取りだし，オートクレイブした1 mm四方の金網の上に載せ，糖を含まないR2S培地を上から流すことで洗浄する。その後，細胞を300 ml容の三角フラスコに入った120 mlの新鮮培地に薬匙1杯分（新鮮重量2~3 g程度）接種する。接種した三角フラスコを恒温室内の振盪器にのせ，2週間培養する。

本培養に接種する方法は，継代培養の時と同様の方法で洗浄した後，オートクレイブした1 mm四方の金網で裏ごしを行い，その細胞をNALGENE社製の組織培養フィルターユニット，タイプTA（pore size 0.45 μ m，ガンマー放射線滅菌済み）を使用して吸引ろ過を約10分間する（写真2-3）。つぎに，ろ過後

の細胞をオートクレイブで滅菌した容器（写真 2-4）を使ってすり切れ 1 杯分（乾重量 約 0.05 g）取りだして、120 ml 容の三角フラスコに入った 40 ml 新鮮培地に接種する。接種した三角フラスコは恒温室内の振盪器にのせ、3 週間培養する。イネ細胞では、細胞量の測定に乾重量法を採用しているため（5 章参照）、培養液のサンプリングが出来ない。したがって、1つの培地からは1回の測定しか行えないので、同量同成分の培地を測定回数分用意し、その全てに同量の細胞を接種することとした。そのため、本培養用の培地は測定回数分の培地（10 本程度）を準備する必要がある。培養条件は表 2-7 に示した。

表 2-7 培養条件
Table 2-7 Setup culture conditions.

	TBY-2 cell	Rice cell
Temperature	298 K (25 °C)	
Light	Dark	
Shake	Rotary shaking (150 rpm.)	Rotary shaking (125 rpm.)
Sub-cultivation period	7 days	14 days
Cultivation period	14 days	21 days



写真 2-3 組織培養フィルターユニット，タイプ TA
Photo 2-3 Filter unit for tissue culture, Type TA

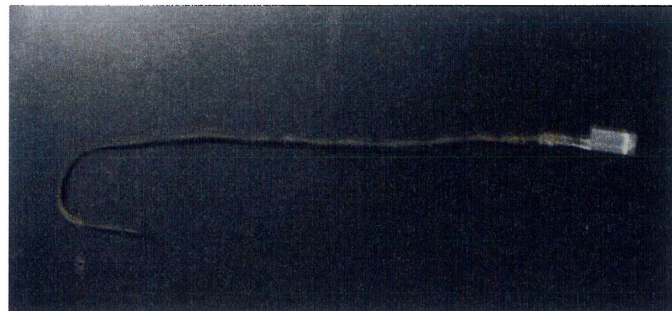


写真 2-4 オートクレイブ可能な自作容器
Photo 2-4 Tube of one's own composition for sterilization.

2-3-4. 糖の定量法

(1) 赤外分光法 (FT-IR/ATR 法)

培養液中の糖濃度およびエタノール濃度の測定には、Nicolet 社製の FT-IR (Magna-IR 750) を使用する。写真 2-5 にその外観を示す。中央の装置が FT-IR である。左側の装置は、測定中における水蒸気の影響を軽減する目的で、測定室に乾燥空気を通風させる装置である。そして、右側の装置は、FT-IR を制御するための Packard Bell 社製のパーソナルコンピュータである。また、使用ソフトには、Nicolet 社製の OMNIC ver. 3.1a を用いた。つぎに、FT-IR 内に取り付けた ATR アクセサリーの外観を写真 2-6 に示す。ATR アクセサリーには、GRASEBY SPECCAC 社製の SPECACLAMP ATR 11080 シリーズを使用した。なお、本研究では、IRE に中赤外領域において $4000\sim 650\text{ cm}^{-1}$ と広い測定範囲を持ち、水に対して不溶の ZnSe を使用した。また、反射回数が 6 回である IRE を使用した。

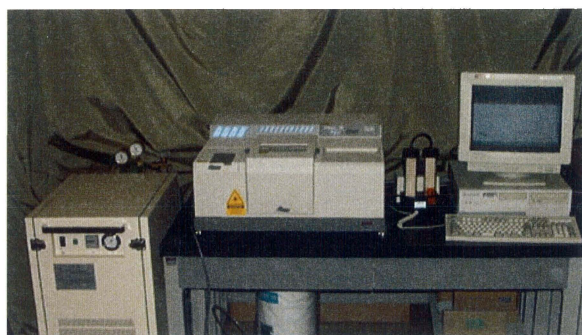


写真 2-5 FT-IR/ATR の外観
Photo 2-5 FT-IR/ATR system.



写真 2-6 ATR アクセサリー
Photo 2-6 ATR accessory.

既報の研究 [122]で、培養液をろ過していない場合とろ過した場合で、スペクトルに差異がほとんど現われないことが確認されている。本研究では、培養液中の糖濃度およびエタノール濃度をより精度よく測定するために、培養液を一度ろ過した試料を用いている。ろ過には富士フィルム社製のディスクカプセル (pore size $5\ \mu\text{m}$) を使用した。

測定は、空気が入らないよう注意して試料をサンプルプレートに流し込む。ここで、赤外光のしみ込み深さは数 μm であるため、IRE 表面を液体薄膜で完全に覆えば十分であり、少量の試料で測定可能である。表 2-8 には、糖濃度およびエタノール濃度測定の測定条件を示す。分解能は、水溶液試料の場合 4 cm^{-1} あるいは 8 cm^{-1} とするのが一般的である。本研究では、より精度の良い水溶液スペクトルを得るために、分解能を 4 cm^{-1} とした。積算回数は、 2^n (n は自然数) とするのが一般的である。そこで、重力の影響で沈殿を起こさない 64 回とした。測定終了後、アスピレータで試料を吸い上げ、綿棒を使用して蒸留水で 3 回洗浄後、水分を完全にふき取る。その後、スペクトルで試料および水の情報が残っていないことを確認する。

表 2-8 測定条件 (FT-IR)

Table 2-8 Measurement conditions of FT-IR spectrometer.

Parameter	Conditions
Measuring range	$4000\sim 800\text{ cm}^{-1}$
Resolving power	4 cm^{-1}
Accumulation	64 times
Measurement method	ATR (ZnSe, 6 times reflection)

(2) HPLC 法

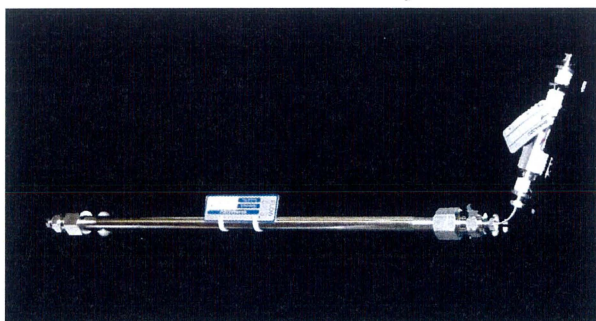
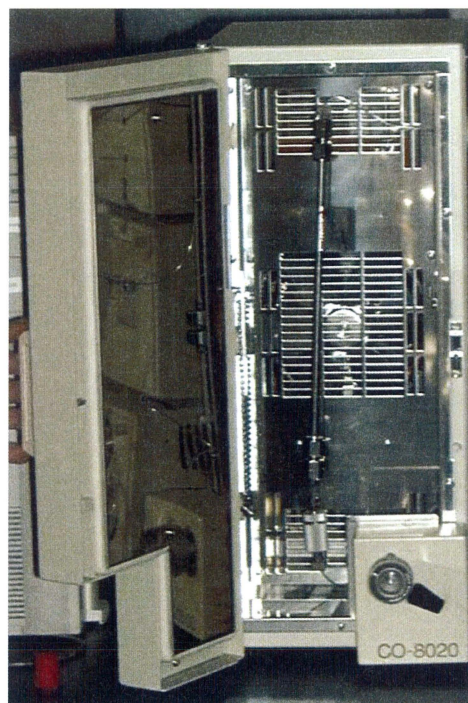
HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 法を用いて、培地中の糖濃度およびエタノール濃度を測定した。HPLC は東ソー社製の示差屈折計 RI-8020, 紫外可視検出器, UV-8020 デュアルポンプ, DP-8020 カラムオーブン CO-8020 の 4 つのシステムと、それらを制御する PC からなる (写真 2-7, 2-8)。カラムには島津製作所製の Shim-pack SCR-101N (size $7.9\text{ mm } \phi \times 30\text{ cm}$) を、同カラム用のガードカラムとともに用いた (写真 2-9)。このカラムの充填剤は、スチレンとジビニルベンゼンの共重合体にスルホン酸基を結合された陽イオン交換樹脂から成り、糖とエタノールを同時に検出できる。溶離液は、日本ミリポア社製の Sinpli Lab 超純水装置で精製した超純水を使用した。溶離液をカラムに

流す時は、エルマ工学社製のデガッサー ERC-3310 で脱気をおこなった。データの取得は HPLC にパソコンを接続させ、出力用のアプリケーション 東ソー社製 Multi Station LC-8020 を使用した。また、この示差屈折計 RI-8020 は屈折率範囲 (1.00~1.80)、測定レンジ 512 S (×10RIU/FS) で測定可能である。測定条件を表 2-9 に示す。

表 2-9 測定条件 (HPLC)

Table 2-9 Measurement conditions of HPLC.

Parameter	Conditions
Column temperature	313 K (40 °C)
RI temperature	308 K (35 °C)
Flow rate	0.5 ml / min
Sample volume	10 μ l
Mobile phase	Pure water
Measurement time	25 min

写真 2-7 HPLC システム全体
Photo 2-7 HPLC system.写真 2-8 カラムとガードカラム
Photo 2-8 Column and guard写真 2-9 カラムオーブン内部
Photo 2-9 Inside of column

測定を行うには、まず測定条件で示した状態でベースラインが一定になるまで溶離液を流し続ける。その後、示差屈折計 RI-8020 にある charge ボタンを押し、示差屈折計内にあるセルのリファレンス側に溶離液を流し、安定してから測定を行う。サンプル注入には、マイクロシリンジを用いる。また、使用するサンプルは富士写真フィルム株式会社製のディスクカプセル (pore size 0.2 μ m) でろ過して用いる。

2-4. 赤外分光法による培地中の糖代謝成分の定量

既報の研究 [17]で、MS 培地中での糖の赤外分光スペクトルの加成性が成り立つことが示され、単回帰による検量線を用いて複数の糖濃度を同時に算出する方法が確立されている。そこで、本研究では R2S 培地において、糖成分に加えて代謝産物として主に生成されるエタノールを含めた系でのスペクトルの加成性を示し、エタノールも含めた複数成分の同時定量の方法の確立を目指した。さらに、MS 培地でも糖とエタノールの同時定量が可能であるか、糖だけの場合とエタノールを含めた場合とを比較しながら検討した。

2-4-1. R2S 培地中の糖代謝成分の定量

(1) 糖, エタノールおよび R2S 培地成分の赤外スペクトル

赤外分光法によって得られるスペクトルについて、図 2-2 より糖 (スクロース) 水溶液と水スペクトルを比較した場合、指紋領域においてスクロース固有のピークが現れていることが確認できる。図 2-3 に R2S 培地のスペクトルを示す。このスペクトルは、スクロース水溶液とほとんど同じであることが確認できる。また、図 2-4 に糖を含まない R2S 培地 (塩類成分) のスペクトルを示す。このスペクトルは、ほとんど水スペクトルと重なっている。これは、塩類成分は含有量が微量であるためであると考えられる。つぎに、図 2-5 (a) に R2S 培地と糖 (スクロース) 水溶液のスペクトルの比較を示す。前述のとおり、両者のスペクトルパターンは非常によく似ていることが確認できる。この両者の差

スペクトルと糖を含まない R2S 培地と水との差スペクトルが、図 2-5 (b) に示されている。これはどちらのスペクトルも糖を含まない R2S 培地の成分（塩類成分）のスペクトルを求めたもので、実際のスペクトルも両者がほとんど同じであることが確認できる。このことから、R2S 培地において加成性が成り立っていることを示唆している。また、図 2-6 に本研究で R2S 培地に添加する糖とエタノールの R2S 培地中での赤外スペクトルを示す。

なお、実際の培養液での測定では、水以外の培地成分の重量を知ることは不可能である。そのため、Factor を求めることはできない。本研究では条件を揃えるために、Factor はすべて 1 としている。

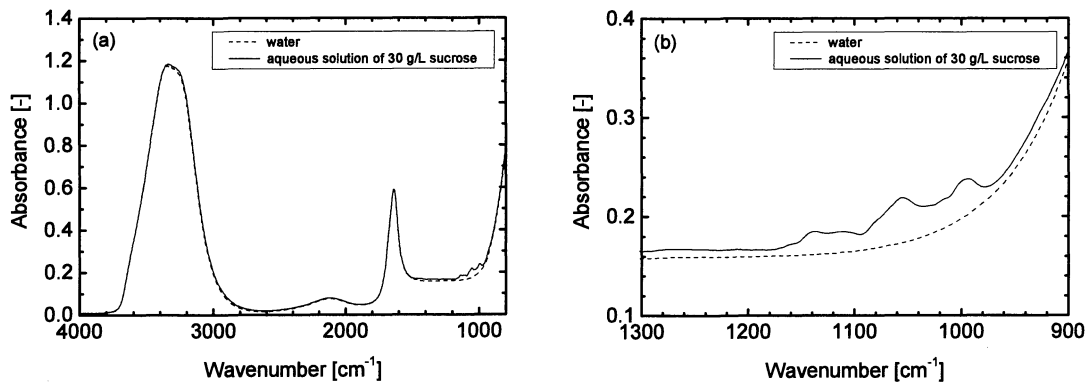


図 2-2 糖水溶液と水スペクトルの比較

(a) 4000 ~ 800 cm⁻¹ (b) 1300 ~ 900 cm⁻¹

Fig. 2-2 ATR spectra of aqueous solution of sucrose and water.

(a) 4000 ~ 800 cm⁻¹ (b) 1300 ~ 900 cm⁻¹

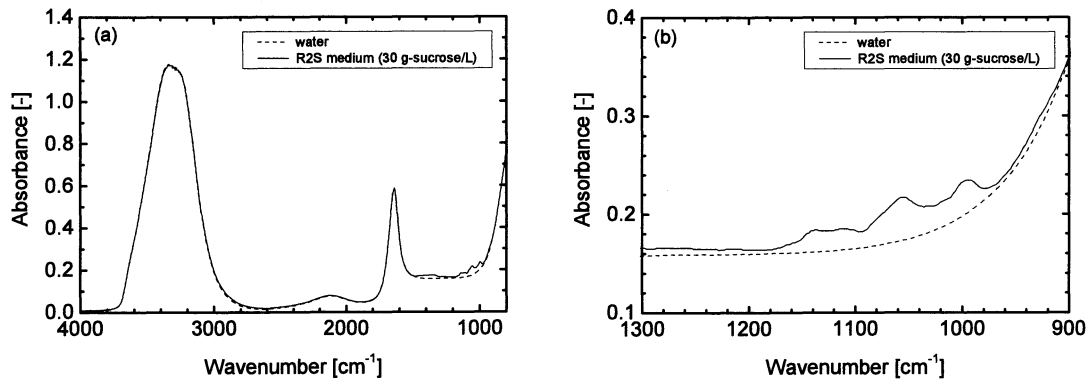


図 2-3 R2S 培地と水スペクトルの比較

(a) 4000 ~ 800 cm⁻¹ (b) 1300 ~ 900 cm⁻¹

Fig. 2-3 ATR spectra of R2S medium with sucrose and water.

(a) 4000 ~ 800 cm⁻¹ (b) 1300 ~ 900 cm⁻¹

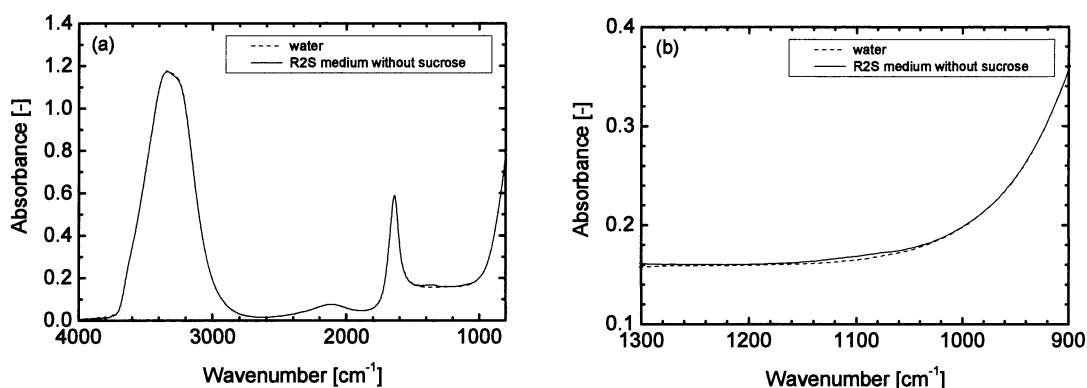


図 2-4 糖を含まない R2S 培地と水スペクトルの比較
 (a) 4000 ~ 800 cm⁻¹ (b) 1300 ~ 900 cm⁻¹

Fig. 2-4 ATR spectra of R2S medium without sucrose and water.
 (a) 4000 ~ 800 cm⁻¹ (b) 1300 ~ 900 cm⁻¹

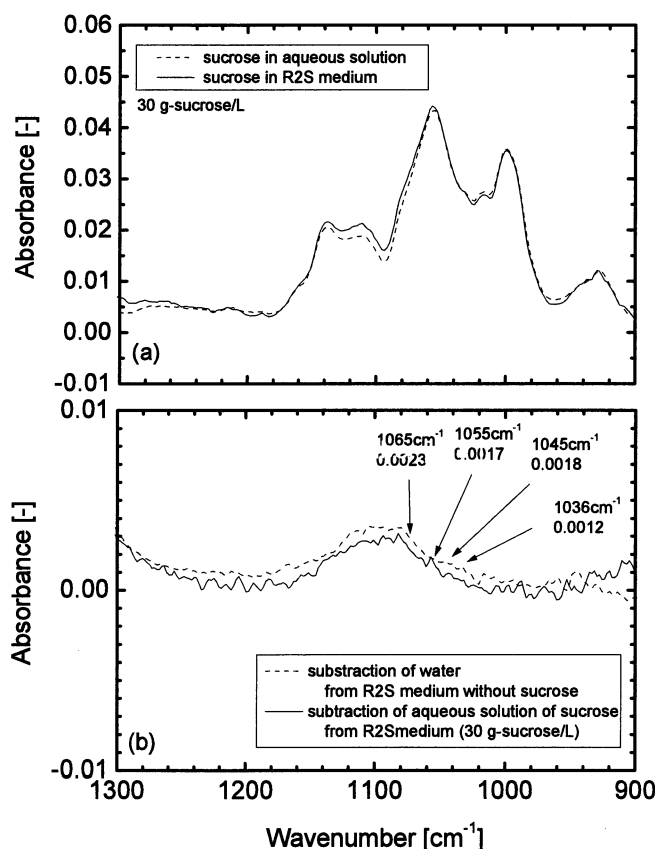


図 2-5 (a) 糖水溶液と R2S 培地 (b) 糖を含まない R2S 培地と水との
 差スペクトルと R2S 培地と糖水溶液との差スペクトル

Fig 2-5. ATR spectra of sucrose and the other components in R2S medium (a) Sucrose in aqueous solution and R2S medium. (b) Subtracted spectra of the components in R2S medium other than sugar.

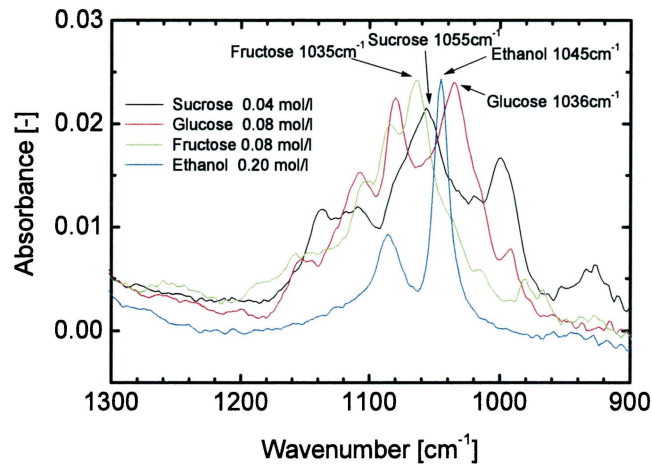


図 2-6 R2S 培地中の糖とエタノールの固有スペクトル
Fig. 2-6 ATR spectra of sugars and ethanol in R2S medium.

(2) R2S 培地中の糖およびエタノールの定量

既に述べたように、糖やエタノールには指紋領域 ($1300\text{ cm}^{-1} \sim 900\text{ cm}^{-1}$) において官能基固有の吸収が現れる。実験に供する糖およびエタノールの赤外スペクトル (図2-6) の各種のピーク波数は、1036 (Glc) , 1065 (Fru) , 1055 (Suc) , 1045 (EtOH) cm^{-1} に認められる。Bouguer-Beerの法則によって、これらの波数の吸光度から、糖およびエタノール濃度を求めることができる。

$$A(\nu) = \sum_i a_i(\nu)C_i + b(\nu) \quad (2-1)$$

ここで、 A は吸光度、 C はモル濃度、 a はモル吸光係数、 b は切片を示す。添え字の i は対象となる糖代謝成分 (糖およびエタノール)、 ν は波数を示す。

各成分について、上述の4つの波数それぞれの吸光度と糖濃度の検量線を作成した (図 2-7)。それぞれの検量線は、精度よくフィッティングすることが出来た。切片は、各波数における糖を含まない R2S 培地 (図 2-5 (b)) の吸光度としている。各パラメータをまとめたものを表 2-10 に示す。各成分とも精度よくフィッティングすることが出来た。

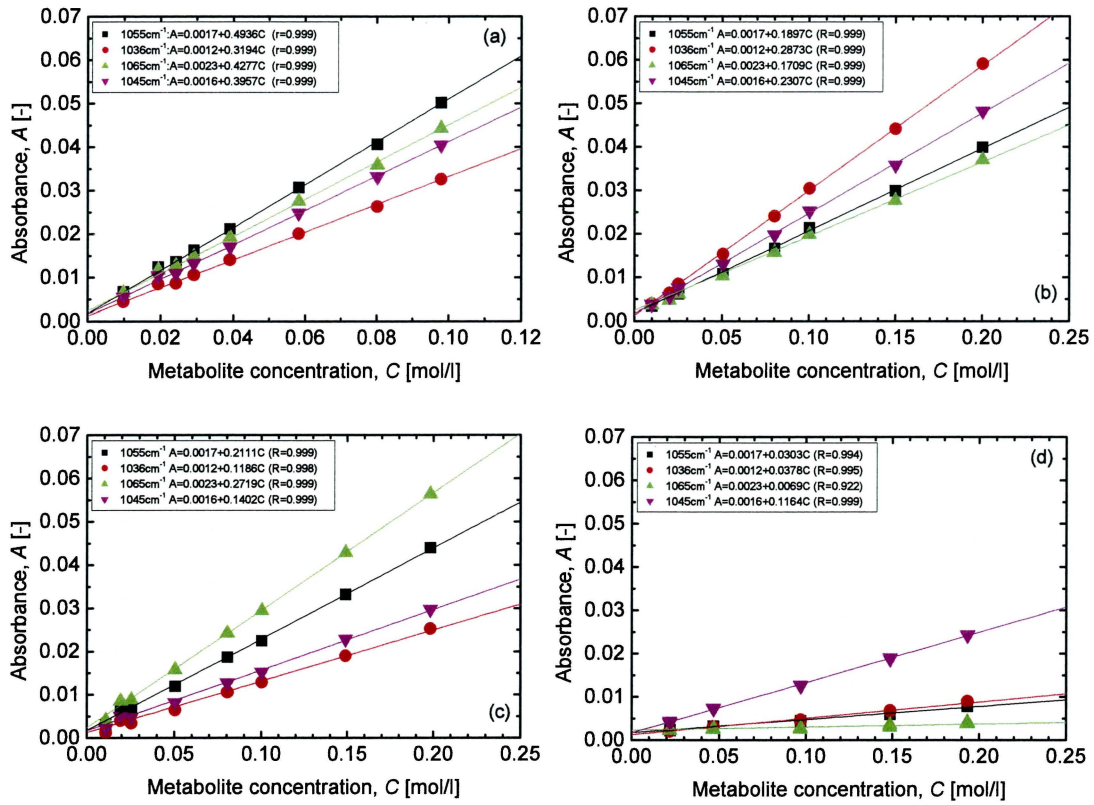


図 2-7 R2S 培地中の検量線 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) EtOH

Fig. 2-7 Calibration curves between absorbance of sugar spectra in R2S medium and sugar and ethanol concentrations. (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) EtOH

表 2-10 検量線のパラメータ (R2S 培地)
 Table 2-10 Fitting parameters and correlations coefficients of calibration curves for the R2S culture medium.

	Wavenumber ν [cm ⁻¹]	Fitting parameter, <i>a</i> [mol/l]	Fitting parameter, <i>b</i> [-]	Correlation coefficient, <i>r</i> [-]
Suc	1054.888	0.4935	0.0017	0.999
	1035.603	0.3194	0.0012	0.999
	1064.531	0.4277	0.0023	0.999
	1045.246	0.3957	0.0016	0.999
Glc	1054.888	0.1897	0.0017	0.999
	1035.603	0.2873	0.0012	0.999
	1064.531	0.1709	0.0023	0.999
	1045.246	0.2307	0.0016	0.999
Fru	1054.888	0.2111	0.0017	0.999
	1035.603	0.1186	0.0012	0.998
	1064.531	0.2719	0.0023	0.999
	1045.246	0.1402	0.0016	0.999
EtOH	1054.888	0.0303	0.0017	0.994
	1035.603	0.0378	0.0012	0.995
	1064.531	0.0069	0.0023	0.922
	1045.246	0.1164	0.0016	0.999

本研究では培養を前提としているので、複数の糖およびエタノールが存在する場合でも、各成分を定量する必要がある。糖の指紋領域において、MS 培地中での糖の赤外分光スペクトルの加成性が成り立つことが分かっている [17]。そこで R2S 培地において、糖とエタノールも含めた 4 種類 (Suc, Glc, Fru, EtOH) の赤外分光スペクトルの加成性について検討した。

まず、あらかじめ設定した濃度になるように調製して得られる調製スペクトルと、各成分を種類別に調製したスペクトルを足し合わせて得られる合成スペクトルの比較を行った。これらのスペクトルは、溶媒を水ではなく培地成分と考えて Factor を計算し、糖以外の培地成分との差によって求めた。サンプルのエタノールの濃度は、本研究で行っているイネ細胞の培養液中の濃度を考慮して、6 g/l とその半分の 3 g/l に設定した (表 2-11)。図 2-8 にエタノール濃度が 3 g/l の場合を、図 2-9 にエタノール濃度が 6 g/l の場合を示した。いずれの場合においても糖の指紋領域では、ほぼ全てのスペクトルが重なり合っていることが分かる。

表 2-11 調製サンプルの各成分濃度

Table 2-11 Sugar and ethanol contents in culture media for infrared spectroscopic measurement.

	Concentration [g/l]			
	Sucrose	Glucose	Fructose	Ethanol
S3E	29.47	---	---	2.72
G3E	---	31.78	---	2.90
F3E	---	---	31.23	2.99
SG3E	15.13	15.32	---	3.00
GF3E	---	15.36	16.11	3.03
SF3E	14.96	---	15.83	2.98
SGF3E	10.11	10.34	10.65	2.96
S6E	29.90	---	---	5.61
G6E	---	31.25	---	6.07
F6E	---	---	31.35	6.05
SG6E	15.16	15.27	---	6.03
GF6E	---	15.27	16.28	6.00
SF6E	15.16	---	16.25	6.11
SGF6E	10.13	10.08	10.90	5.97

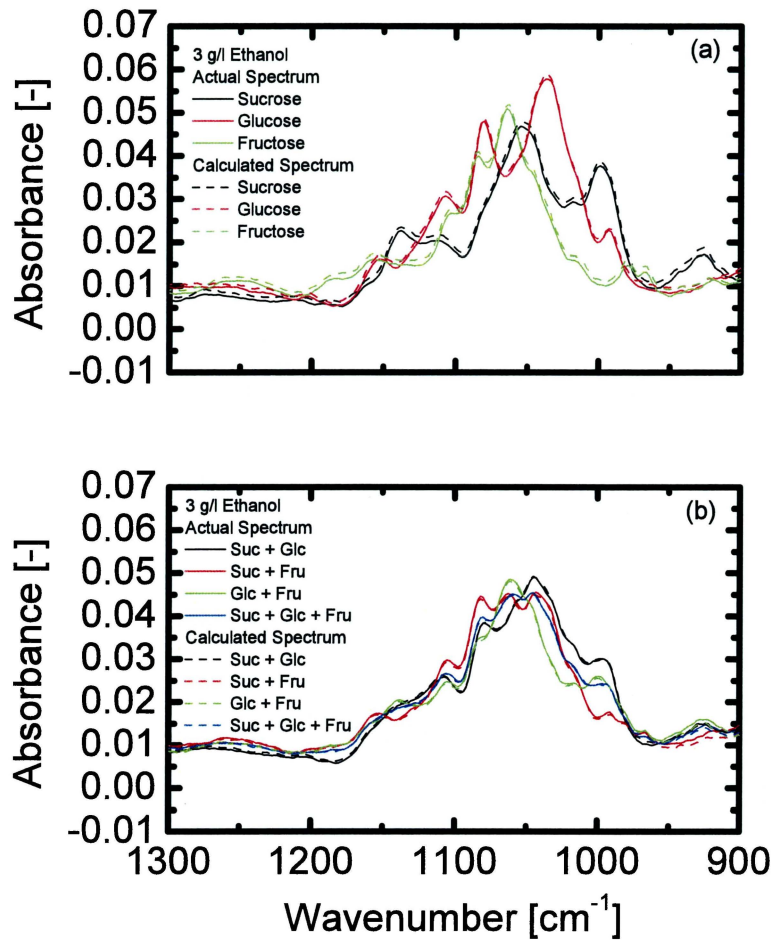


図 2-8 調製スペクトルと合成スペクトルの比較 (R2S 培地)
 エタノール濃度 3 g/l (a) 糖が 1 種類の場合, (b) 複数の場合

Fig. 2-8 Comparison of calculated spectra of R2S media containing 3 g/l ethanol with actual ones. Spectral comparison for (a) one kind of sugar (b) mixture media.

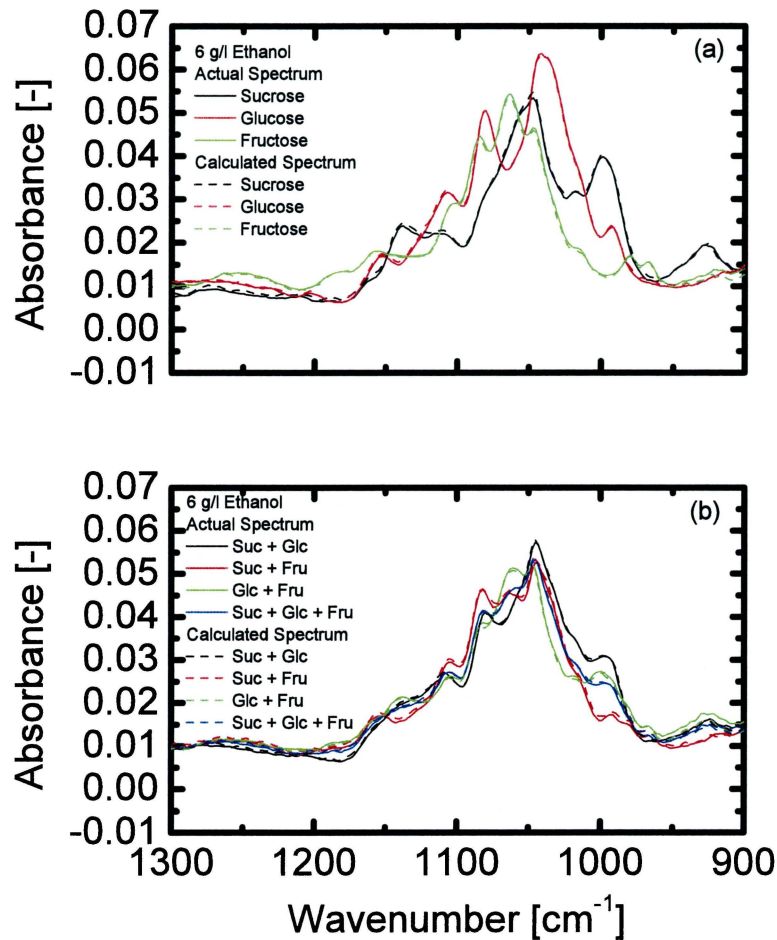


図 2-9 調製スペクトルと合成スペクトルの比較 (R2S 培地)
エタノール濃度 6 g/l (a) 糖が 1 種類の場合, (b) 複数の場合

Fig. 2-9 Comparison of calculated spectra of R2S media containing 6 g/l ethanol with actual ones. Spectral comparison for (a) one kind of sugar, (b) mixture media.

つぎに, 調製スペクトルと合成スペクトルの比を計算した. 図 2-10 に, エタノール濃度が 3 g/l の時と 6 g/l の時の調製スペクトルと合成スペクトルの比を示す. 糖およびエタノール固有のピークがあらわれる $1070\text{ cm}^{-1}\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ 付近で, $100\pm 3\%$ の高精度で重なり合っていることがわかった. このことから, $1070\text{ cm}^{-1}\sim 1030\text{ cm}^{-1}$ においては種類の異なる糖の間での相互作用がほぼ無視でき, 糖およびエタノールスペクトルの加成性が成り立つことが示された.

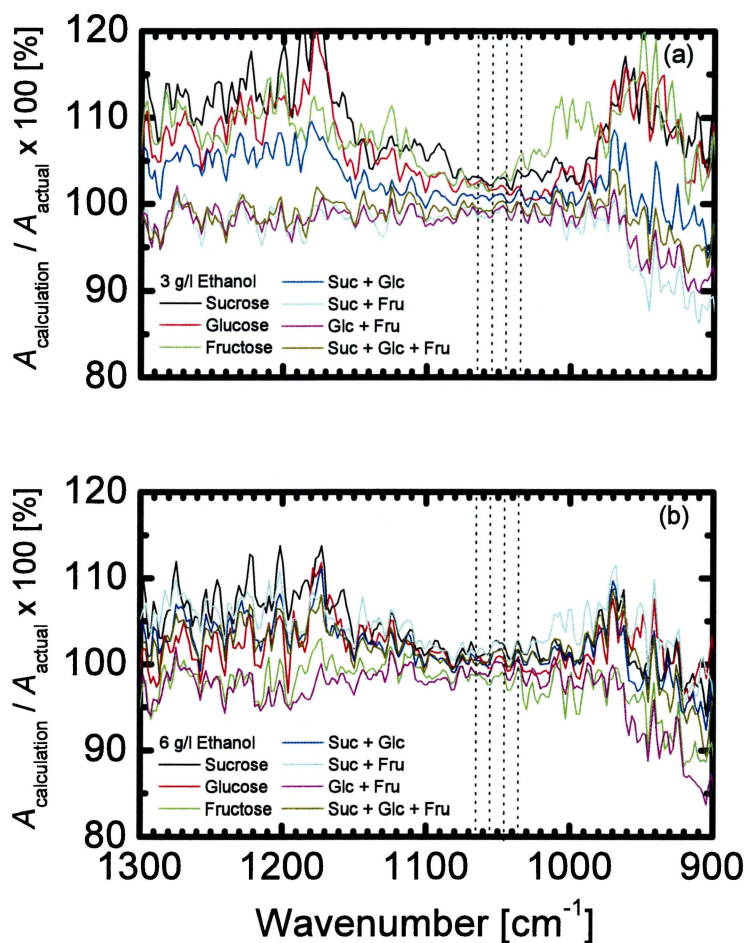


図 2-10 調製スペクトルと合成スペクトルの比 (R2S 培地)
エタノール濃度 (a) 3 g/l, (b) 6 g/l

Fig. 2-10 Absorbance ratios of calculated spectra to actual ones for ternary combinational R2S media containing (a) 3 g/l, (b) 6 g/l ethanol.

このスペクトルの加成性を利用することで、FT-IR/ATR 法によって得られる赤外スペクトルから複数の糖成分とエタノールの同時定量が可能となる。以下に、Suc 培養の場合の算出方法を示す。

培地中の各成分固有の代表的なピークが現れる各波数での吸光度は、式 2-1 をもとに作成した検量線 16 本を組み合わせることで、式 2-2~2-5 のように表せる。

$$A_{1055} = a_{suc,1055} \cdot C_{suc} + a_{glc,1055} \cdot C_{glc} + a_{fru,1055} \cdot C_{fru} + a_{EtOH,1055} \cdot C_{EtOH} \quad (2-2)$$

$$+ \frac{b_{suc,1055} \cdot C_{suc} + b_{glc,1055} \cdot C_{glc} + b_{fru,1055} \cdot C_{fru} + b_{EtOH,1055} \cdot C_{EtOH}}{C_{suc} + C_{glc} + C_{fru} + C_{EtOH}}$$

$$A_{1036} = a_{suc,1036} \cdot C_{suc} + a_{glc,1036} \cdot C_{glc} + a_{fru,1036} \cdot C_{fru} + a_{EtOH,1036} \cdot C_{EtOH} \quad (2-3)$$

$$+ \frac{b_{suc,1036} \cdot C_{suc} + b_{glc,1036} \cdot C_{glc} + b_{fru,1036} \cdot C_{fru} + b_{EtOH,1036} \cdot C_{EtOH}}{C_{suc} + C_{glc} + C_{fru} + C_{EtOH}}$$

$$A_{1065} = a_{suc,1065} \cdot C_{suc} + a_{glc,1065} \cdot C_{glc} + a_{fru,1065} \cdot C_{fru} + a_{EtOH,1065} \cdot C_{EtOH} \quad (2-4)$$

$$+ \frac{b_{suc,1065} \cdot C_{suc} + b_{glc,1065} \cdot C_{glc} + b_{fru,1065} \cdot C_{fru} + b_{EtOH,1065} \cdot C_{EtOH}}{C_{suc} + C_{glc} + C_{fru} + C_{EtOH}}$$

$$A_{1045} = a_{suc,1045} \cdot C_{suc} + a_{glc,1045} \cdot C_{glc} + a_{fru,1045} \cdot C_{fru} + a_{EtOH,1045} \cdot C_{EtOH} \quad (2-5)$$

$$+ \frac{b_{suc,1045} \cdot C_{suc} + b_{glc,1045} \cdot C_{glc} + b_{fru,1045} \cdot C_{fru} + b_{EtOH,1045} \cdot C_{EtOH}}{C_{suc} + C_{glc} + C_{fru} + C_{EtOH}}$$

添字の 1055, 1036, 1065, 1045 は波数を表し, *suc*, *glc*, *fru*, *EtOH* はそれぞれの培地に含まれるスクロース, グルコース, フルクトース, エタノールを表す. また, *A* は添字の波数における吸光度を表し, *C* は培養液中の添字のモル濃度を表す. *a* は添字が指す条件での検量線の傾きを表し, *b* はそのときの切片を表す.

ここで, 検量線の切片は糖以外の培地成分によるものなので, 各培地において *b* は一定となる.

$$b_{suc,1055} = b_{glc,1055} = b_{fru,1055} = b_{EtOH,1055} = b_{1055} \quad (\text{const})$$

$$b_{suc,1036} = b_{glc,1036} = b_{fru,1036} = b_{EtOH,1036} = b_{1036} \quad (\text{const})$$

$$b_{suc,1065} = b_{glc,1065} = b_{fru,1065} = b_{EtOH,1065} = b_{1065} \quad (\text{const})$$

$$b_{suc,1045} = b_{glc,1045} = b_{fru,1045} = b_{EtOH,1045} = b_{1045} \quad (\text{const})$$

したがって, 式 2-2~2-5 は式 2-6~2-9 のように書き直すことができる.

$$A_{1055} = a_{suc,1055} \cdot C_{suc} + a_{glc,1055} \cdot C_{glc} + a_{fru,1055} \cdot C_{fru} + a_{EtOH,1055} \cdot C_{EtOH} + b_{1055} \quad (2-6)$$

$$A_{1036} = a_{suc,1036} \cdot C_{suc} + a_{glc,1036} \cdot C_{glc} + a_{fru,1036} \cdot C_{fru} + a_{EtOH,1036} \cdot C_{EtOH} + b_{1036} \quad (2-7)$$

$$A_{1065} = a_{suc,1065} \cdot C_{suc} + a_{glc,1065} \cdot C_{glc} + a_{fru,1065} \cdot C_{fru} + a_{EtOH,1065} \cdot C_{EtOH} + b_{1065} \quad (2-8)$$

$$A_{1045} = a_{suc,1045} \cdot C_{suc} + a_{glc,1045} \cdot C_{glc} + a_{fru,1045} \cdot C_{fru} + a_{EtOH,1045} \cdot C_{EtOH} + b_{1045} \quad (2-9)$$

さらに、式2-6~2-9を行列式で表すと式2-10となる。

$$\begin{bmatrix} A_{1055} \\ A_{1036} \\ A_{1065} \\ A_{1045} \end{bmatrix} = X \begin{bmatrix} C_{suc} \\ C_{glc} \\ C_{fru} \\ C_{EtOH} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} b_{1055} \\ b_{1036} \\ b_{1065} \\ b_{1045} \end{bmatrix} \quad (2-10)$$

ここで、 $X = \begin{bmatrix} a_{suc,1055} & a_{glc,1055} & a_{fru,1055} & a_{EtOH,1055} \\ a_{suc,1036} & a_{glc,1036} & a_{fru,1036} & a_{EtOH,1036} \\ a_{suc,1065} & a_{glc,1065} & a_{fru,1065} & a_{EtOH,1065} \\ a_{suc,1045} & a_{glc,1045} & a_{fru,1045} & a_{EtOH,1045} \end{bmatrix}$ である。そして、右辺の切片

の項を左辺に移項すると式2-11のようになる。

$$\begin{bmatrix} A_{1055} \\ A_{1036} \\ A_{1065} \\ A_{1045} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} b_{1055} \\ b_{1036} \\ b_{1065} \\ b_{1045} \end{bmatrix} = X \begin{bmatrix} C_{suc} \\ C_{glc} \\ C_{fru} \\ C_{EtOH} \end{bmatrix} \quad (2-11)$$

ここで、 X の逆行列である X^{-1} を求めて両辺の左側から掛けて整理すると

$$\begin{bmatrix} C_{suc} \\ C_{glc} \\ C_{fru} \\ C_{EtOH} \end{bmatrix} = X^{-1} \left(\begin{bmatrix} A_{1055} \\ A_{1036} \\ A_{1065} \\ A_{1045} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} b_{1055} \\ b_{1036} \\ b_{1065} \\ b_{1045} \end{bmatrix} \right) \quad (2-12)$$

したがって、FT-IR/ATR法でスペクトルを取得し、各波数における吸光度を知ることで、式2-12を使って糖およびエタノール濃度を別々に算出することが可能となる。ここで、求めた濃度の単位は体積モル濃度 [mol/l] であるので、体積重量濃度 [g/l] を目的とするときは、分子量(単糖類:180.16, 二糖類:342.30, エタノール:46.07) をかける必要がある。また、Suc培養の場合は、4成分系

(Suc, Glc, Fru, EtOH) で検量線を組み合わせたが、単糖類での培養であれば2成分系 (Glc あるいは Fru と EtOH) なので4本の検量線を組み合わせればよい。このように、必要に応じて表 2-10 のパラメータを組み合わせることで各濃度を求めることができる。

つぎに、この FT-IR/ATR 法を用いた定量法と従来法である HPLC 法の比較を試みた。表 2-11 で示した調製サンプルを、FT-IR/ATR 法と HPLC 法の双方から各成分濃度を算出した。FT-IR/ATR 法で用いるスペクトルは、検量線を作成したときと同様に、水から生スペクトルを Factor 1 でひいた差スペクトルを用いた。図 2-11 に FT-IR/ATR 法と HPLC 法における各成分の調製値と算出値の比較をそれぞれ示す。双方とも調製値と算出値は同程度によく一致しており、FT-IR/ATR 法は HPLC 法と同等の精度を有することが確認できた。

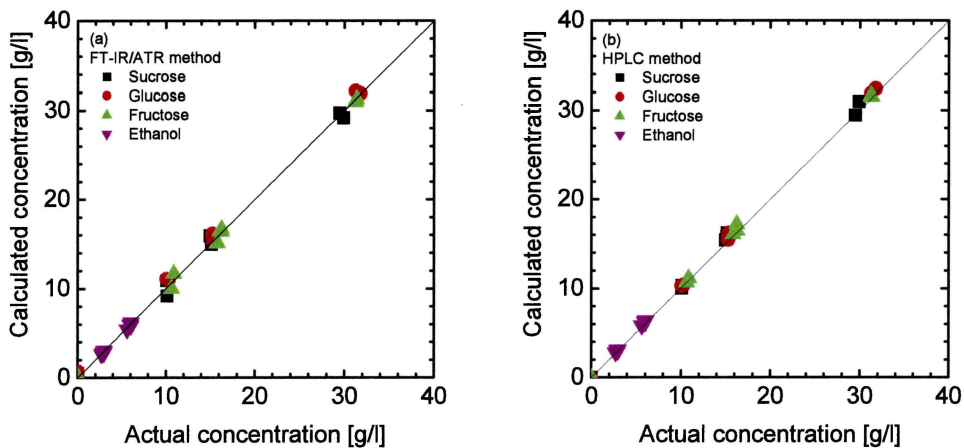


図 2-11 調製値と算出値の相関 (R2S 培地)
(a) FT-IR/ATR 法, (b) HPLC 法

Fig. 2-11 Comparison of evaluated sugar contents in R2S culture media with actual ones. (a) FT-IR/ATR method. (b) HPLC method.

さらに、実際の培養液を用いて、FT-IR/ATR 法と HPLC 法で測定することで双方を比較した。R2S 培地で 2 週間ごとに継代培養しているイネ細胞を用いて、R2S 培地に 3 週間培養し、一定期間毎に培養液のろ液を FT-IR と HPLC の両方で測定した (2-2 参照)。図 2-12 に、糖の指紋領域におけるスペクトルの経日変化を示した。スペクトルパターンが変化しながら吸光度が減少していき、培養中期から後期にかけてエタノール由来のピークが顕著に現れている。図 2-13 に、クロマトグラムの一例として 8 日目のクロマトグラムを示した。そして図 2-14 に、2 つの方法で求めたそれぞれの糖濃度およびエタノール濃度の変化をあわせて示している。両者の測定値を比較すると、よく一致していた。ところで、FT-IR/ATR 法はサンプルの濃度が高いほど分子構造が安定となるため、高濃度の糖の測定には有効である。逆に HPLC 法は高濃度領域を苦手としており、測定にはサンプルの希釈が必要となる場合もある。したがって、高濃度領域 (30 g/l 付近) での両者のずれはサンプルの希釈による誤差と思われる。また、低濃度領域においては、HPLC 法が測定に有利である。培養 12 日目以降、HPLC 法では糖は 0 g/l を示しているが、FT-IR/ATR 法では 0 g/l にならない。これは、培養により培地の糖以外の成分 (微量の塩類など) が変化しているためであると考えられる。また、エタノールにおいては、両者はほぼ一致していた。

以上より、R2S 培地における糖およびエタノール濃度の測定には FT-IR/ATR 法が有効であり、HPLC 法と同等の精度を有していることが示された。

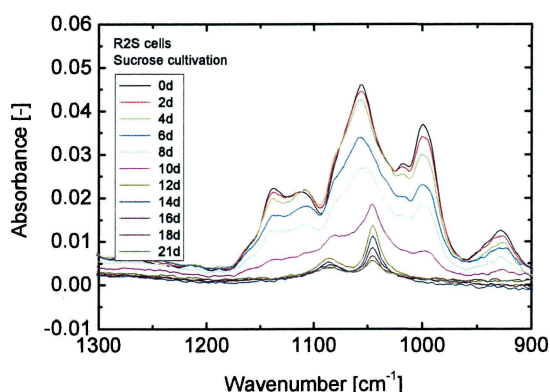


図 2-12 培養液スペクトルの経日変化

Fig. 2-12 Time behavior of ATR spectra of culture media.

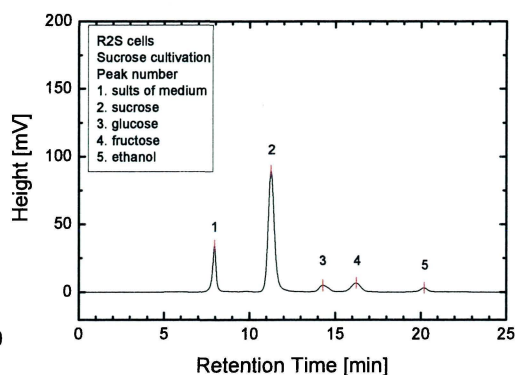


図 2-13 クロマトグラム(8日目)

Fig. 2-13 Chromatogram of culture medium at 8 days.

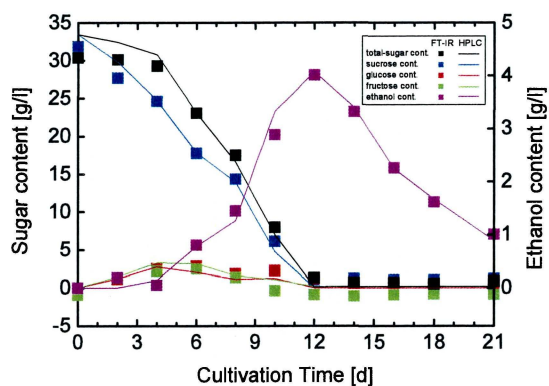


図 2-14 糖濃度およびエタノール濃度の経日変化

Fig. 2-14 Time courses of sugar and ethanol contents during cultivation.

2-4-2. MS 培地中の糖代謝成分の定量

既報の研究 [17]で、赤外分光法を用いた MS 培地中における複数糖成分の同時定量法 (3 成分系) がすでに確立されているが、これを応用して本研究では、前項で示した R2S 培地と同様に MS 培地でもエタノールを含む系 (4 成分系) での定量法の確立を目指す。

図 2-15 に、実験に供する糖およびエタノールの指紋領域 ($1300 \text{ cm}^{-1} \sim 900 \text{ cm}^{-1}$) における赤外スペクトルを示す。本研究で、MS 培地に添加する糖各種と

エタノールのピーク波数は、それぞれ 1036 (Glc) , 1065 (Fru) , 1070 (Man) , 1076 (Gal) , 1055 (Suc) , 993 (Tre) , 1149 (Mal) , 1076 (Lac) , 1045 (EtOH) cm^{-1} に認められた。これらの波数の帰属をまとめたものを、表 2-12 に示す。これらをもとに、各成分についての吸光度とモル濃度の検量線を作成した。図 2-16 に単糖類の、図 2-17 に二糖類の、図 2-18 にエタノールの検量線を示す。それぞれの検量線は、精度よくフィッティングすることが出来た。切片は、各波数における糖を含まない MS 培地の吸光度としている。各パラメータをまとめたものを表 2-13 に示す。

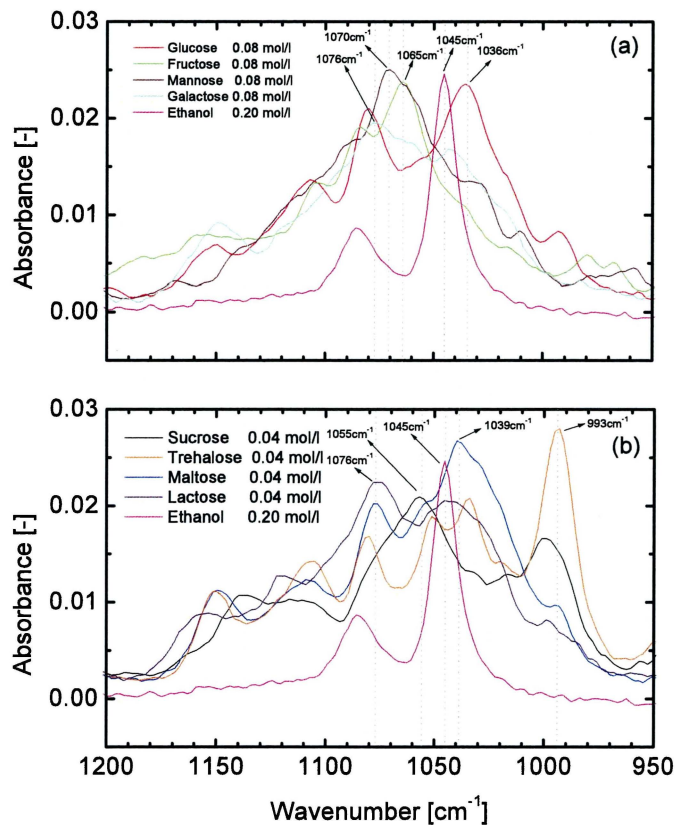


図 2-15 MS 培地中の糖とエタノールの固有スペクトル
(a) 単糖類, (b) 二糖類

Fig. 2-15 ATR spectra of sugars and ethanol in MS medium.
(a) mono-saccharide. (b) di-saccharide

表 2-12 糖の中赤外領域におけるピーク波長の帰属
Table 2-12 Assignment of the major absorbance in the MIR spectrum of sugar.

	Wavenumber	Assignment	Reference		
			Authors	Year	No.
Glc	1036	C-4-OH	Kacurakova M. et al.	1996	[123]
Fru	1065	C-1-OH	Kacurakova M. et al.	1996	[123]
Man	1070	C-1-H	Kacurakova M. et al.	1996	[123]
Gal, Lac	1076	C-1-H	Kacurakova M. et al.	1996	[123]
Suc	1055	C-1-OH (Fru residue)	Kacurakova M. et al.	1996	[123]
		α -D-Glc	Back DM.	1983	[124]
Tre	993	Glycosidic linkage	Zhbankov RG et al.	1997	[123]
		CH ₂ OH	Kacurakova M. et al.	1996	[125]
Mal	1149	Pyranose ring	Cael et al.	1974	[123]
	1080	C-1-H	Kacurakova M.	1996	[126]
EtOH	1045	C-C-O antisymmetric stretch	日本化学会	1993	[127]

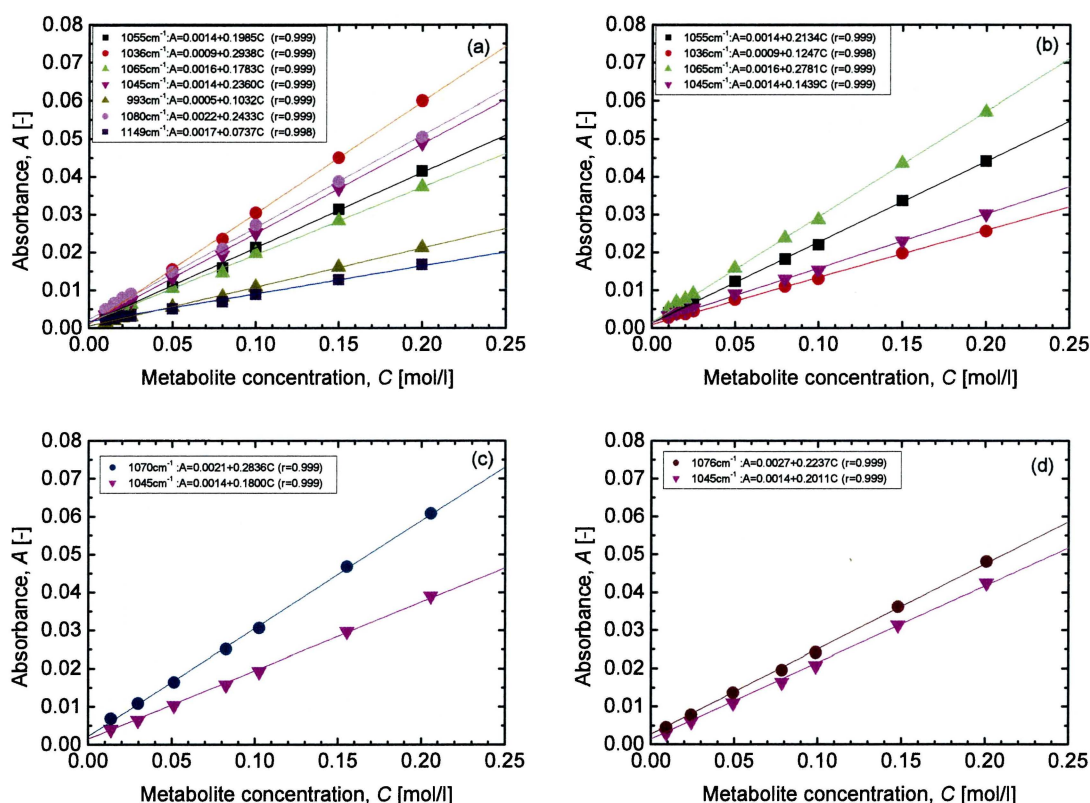


図 2-16 MS 培地中の単糖類の検量線 (a) Glc, (b) Fru, (c) Man, (d) Gal

Fig. 2-16 Calibration curves between absorbance of sugar spectra in MS medium and sugar concentrations. (a) Glc. (b) Fru. (c) Man. (d) Gal.

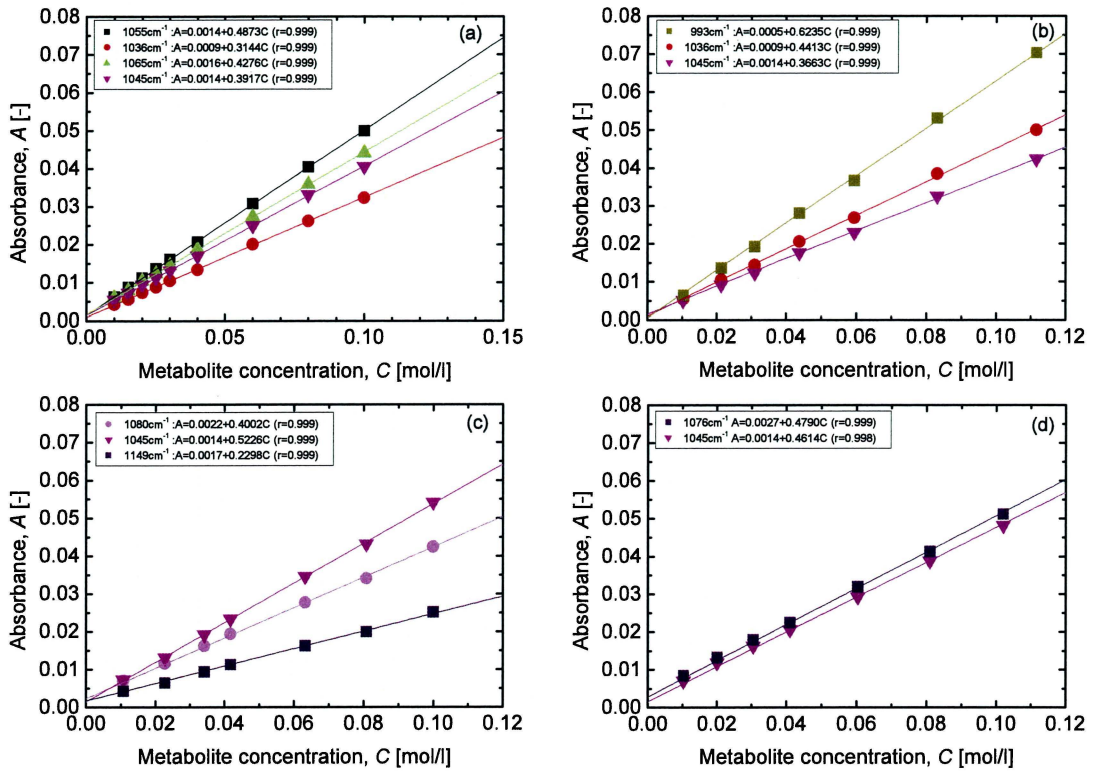


図 2-17 MS 培地中の二糖類の検量線 (a) Suc, (b) Tre, (c) Mal, (d) Lac

Fig. 2-7 Calibration curves between absorbance of sugar spectra in R2S medium and sugar concentrations. (a) Suc. (b) Tre. (c) Mal. (d) Lac.

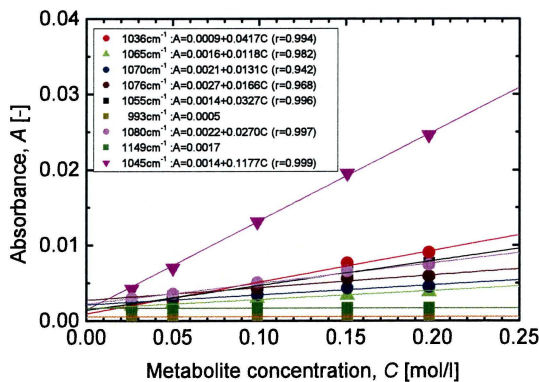


図 2-18 MS 培地中の EtOH の検量線

Fig. 2-18 Calibration curves between absorbance of spectra in MS medium and ethanol concentrations.

表 2-13 検量線のパラメータ (MS 培地)

Table 2-13 Fitting parameters and correlations coefficients of calibration curves for the MS culture medium.

	Wavenumber ν [cm^{-1}]	Fitting parameter, a [mol/l]	Fitting parameter, b [-]	Correlation coefficient, r [-]
Glc	1036 (Glc)	0.2938	0.0009	0.999
	1065 (Fru)	0.1783	0.0016	0.999
	993 (Tre)	0.1032	0.0005	0.999
	1055 (Suc)	0.1985	0.0014	0.999
	1080 (Glc)	0.2433	0.0022	0.998
	1149 (Mal)	0.0737	0.0017	0.999
	1045 (EtOH)	0.2360	0.0014	0.999
Fru	1036 (Glc)	0.1247	0.0009	0.998
	1065 (Fru)	0.2781	0.0016	0.999
	1055 (Suc)	0.2134	0.0014	0.999
	1045 (EtOH)	0.1439	0.0014	0.999
Man	1070 (Man)	0.2836	0.0021	0.999
	1045 (EtOH)	0.1800	0.0014	0.999
Gal	1076 (Gal)	0.2237	0.0027	0.999
	1045 (EtOH)	0.2011	0.0014	0.999
Suc	1036 (Glc)	0.3144	0.0009	0.999
	1065 (Fru)	0.4276	0.0016	0.999
	1055 (Suc)	0.4873	0.0014	0.999
	1045 (EtOH)	0.3917	0.0014	0.999
Tre	1036 (Glc)	0.4413	0.0009	0.999
	993 (Tre)	0.6235	0.0005	0.999
	1045 (EtOH)	0.3663	0.0014	0.999
Mal	1080 (Glc)	0.4002	0.0022	0.999
	1149 (Mal)	0.2298	0.0017	0.999
	1045 (EtOH)	0.5226	0.0014	0.999
Lac	1076 (Lac)	0.4790	0.0027	0.999
	1045 (EtOH)	0.4614	0.0014	0.998
EtOH	1036 (Glc)	0.0417	0.0009	0.994
	1065 (Fru)	0.0118	0.0016	0.982
	1070 (Man)	0.0131	0.0021	0.942
	1076 (Gal)	0.0166	0.0027	0.968
	1055 (Suc)	0.0327	0.0014	0.996
	993 (Tre)	-	0.0005	-
	1080 (Glc)	0.0270	0.0022	0.997
	1149 (Mal)	-	0.0017	-
	1045 (EtOH)	0.1177	0.0014	0.999

つぎに、求めた検量線を用いて、実際に TBY-2 細胞を MS 培地で培養したときの培養液中の各種成分の定量し、HPLC 法と比較することで、FT-IR/ATR 法の有用性を検討した。培養液の赤外スペクトルの経日変化を図 2-19 に示す。TBY-2 細胞と同様、全体的に吸光度が減少しながらスペクトルパターンが変化していることが確認できた。培養後期にはエタノール由来のピークがわずかに確認できたが、イネ細胞ほど顕著ではなかった。図 2-20 に、これらのスペクトルから、FT-IR/ATR 法でエタノールを考慮している方法と、していない方法とでそれぞれ算出した各成分濃度の経日変化を、HPLC 法と比較して示した。いずれの定量法でも、培養が進むにつれて培地には含まれていなかったグルコース、フルクトースが検出され、さらにエタノールを考慮している方法ではエタノールも検出された。

また図 2-21 では、横軸に HPLC 法による算出値を、縦軸に FT-IR/ATR 法による算出値をとり、両者の相関を比較した。TBY-2 細胞では、エタノールはわずかしか検出されていなかったが、FT-IR/ATR 法において、エタノールを考慮していない従来の算出方法（3 成分系）より、エタノールを考慮した算出方法（4 成分系）のほうが、HPLC 法とよく一致していた。そこで、このことを利用して本研究ではこれ以降、エタノールを考慮した定量法を採用することにする。

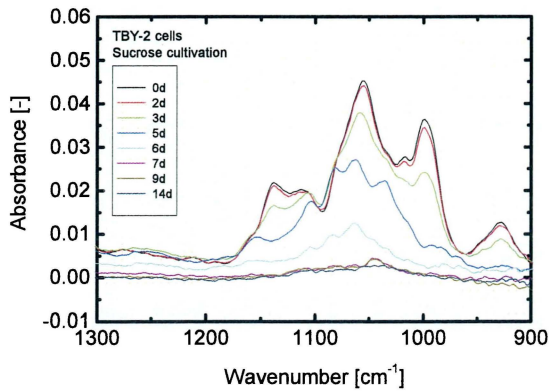


図 2-19 培養液スペクトルの経日変化

Fig. 2-19 Time behavior of ATR spectra of culture media.

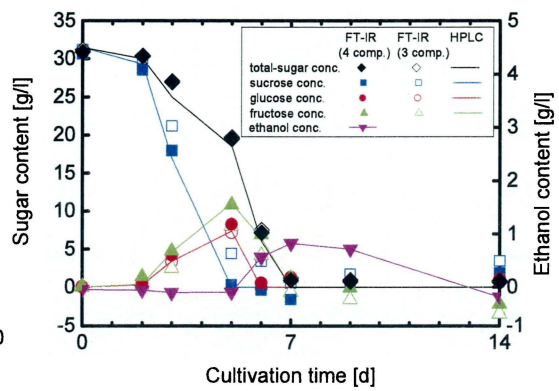


図 2-20 培養液成分の経日変化

Fig. 2-20 Time courses of sugar and ethanol contents during cultivation.

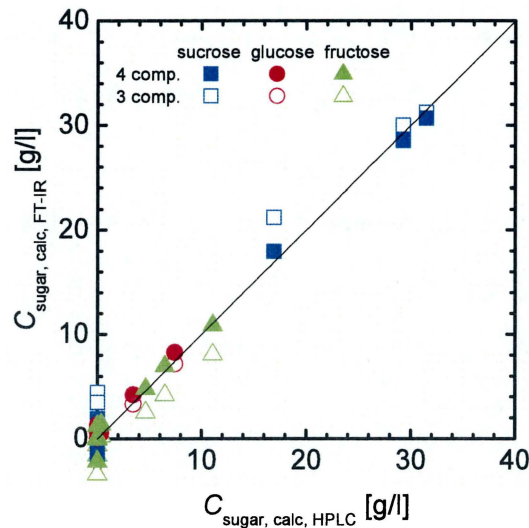


図 2-21 FT-IR/ATR 法 (3 成分系と 4 成分系) と HPLC 法の相関 (図 2-20 より)

Fig. 2-21 Sugar and ethanol contents in culture medium during sucrose cultivation, as evaluated by the FT-IR/ATR method and the HPLC method. The notations *4 comp.* and *3 comp.* indicate whether or not, respectively, the existence of ethanol was considered when the content of sugar was determined using the MIR spectroscopic method.

2-5. 本章の結論

本研究では、イネ細胞では R2S 培地、TBY-2 細胞では MS 培地と 2 種類の培地を使用する。そこで、本章では FT-IR/ATR 法を用いて、これらの培地中で糖代謝成分の定量方法の確立を目指した。

まず、R2S 培地では、各成分を含んだ培地を FT-IR/ATR 法で測定することにより、糖の指紋領域 ($1300\text{ cm}^{-1}\sim 900\text{ cm}^{-1}$) において糖およびエタノールの固有のスペクトルが得られ、それぞれの成分のピーク波数の吸光度とモル濃度の関係から検量線を作成した。さらに、スペクトルの加成性が成り立つことを証明し、作成した検量線を組み合わせることで、スペクトルから培地中の複数の糖とエタノールが同時に定量できることを示した。この方法を、従来法である HPLC 法と比較すると、原理的な関係で、低濃度では HPLC 法の方が、高濃度では FT-IR/ATR 法の方が精度は高かったが、総じて HPLC 法と同等程度の精度があることが確認できた。このことを、培養液で確認するため、実際の R2S 培地でイネ細胞を培養したときの培養液を、両方の測定方法で比較した。その結果、非常に精度よく一致することが確認できた。したがって、R2S 培地中での糖代謝成分の定量法を確立できたと言える。

一方、MS 培地では、既報の研究で培地中での糖の赤外分光スペクトルの加成性と単回帰による検量線を用いた複数の糖濃度を同時に算出する方法が確立されている [17]。そこで、R2S 培地と同様に糖だけでなく、エタノールも同時に定量することを試みた。まず、各成分の検量線を作成し、これを用いて培養液中にエタノールが存在しない場合 (3 成分系 ; Suc, Glc, Fru) と存在する場合 (4 成分系 ; 3 成分 + EtOH) の定量法で、複数成分の定量を行い比較した。その結果、4 成分系 (+EtOH) の方が 3 成分系 (-EtOH) より HPLC 法とよく一致しており精度が高いことが示され、エタノールを考慮した定量モデルの方が有効であることが分かり、より精度の高い定量法を確立できた。

また、双方の培養液において、スペクトルの変化から培養液成分の生化学的な変化 (Suc \rightarrow Glc + Fru) を経時的に読み取ることが出来た。

以上のことから、本章では、赤外分光法による培地成分の定量法を確立するだけでなく、定量情報以外の多様な情報も同時に取得できる可能性を示した。また、本方法は測定時間が非常に短くノンケミカルの測定方法であるため、オンラインによる培地成分測定の可能性も示唆された。

ところで、本章では糖とエタノールを定量の対象成分としているが、培地には他にも様々な成分が含まれている。ここでは示していないが、培地中の pH も、培養が進むにつれ酸側へ変化していた。これは、代謝産物として、有機酸を始めとした多くの成分が放出されていることが関与していると考えられる。理論的にはすべての酸についての分析は可能であるため、研究の発展によりこうした培地成分の変化の把握も可能になるかもしれない。また、MS 培地中における定量で、エタノールを計算に加えることで他成分の定量精度が向上したように、他の代謝産物についても同時定量できるようになれば、本定量法のさらなる精度向上にもつながるはずである。

なお、これ以降の章における培養液中の糖代謝成分の定量には、本章で確立した定量方法を用いることとする。

3章. 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

本章に関する研究は、以下のように投稿および掲載されている。

Yamanaka A., Hashimoto A., Matsuo T., Kanou M., Suehara K., Kameoka T.:
Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by
suspension TBY-2 cells using an FT-IR/ATR method *Bioprocess Biosyst. Eng.*
30:457-468, 2007

3-1. 本章の目的

植物細胞の糖代謝機構は詳細に解明されてきており、糖トランスポーター、センシング、シグナルの研究についても多数報告されていることは1章で述べてきた。しかし、栄養源すなわち炭素源である糖の動的取込み挙動の速度過程については、ほとんど解明されていない。本章では、培地中の炭素源種について着目し、赤外分光法を援用して標準状態の TBY-2 細胞 (Suc による継代培養) による単糖類や二糖類の動的な糖取込み挙動について速度論的に解析を行うこととした。具体的には、単糖類では糖代謝の入り口でもあるグルコースを基準として、そのエピマーであるフルクトース、マンノースおよびガラクトースを、二糖類では主要な高等植物の転流糖としても知られるスクロースを基準として、結合形態がそれぞれ異なるトレハロース (α 1-1 結合)、マルトース (α 1-4 結合) およびラクトース (β 1-4 結合) を採用した。そして、糖の種類 (構造、結合形態による差異) が、TBY-2 細胞の動的糖代謝挙動におよぼす影響を把握することを本章の目的とした。さらに、二糖類を構成する単糖類を組み合わせた混合糖 (Glc+Fru, Glc+Man, Glc+Gal) の培養も行い、結合の有無、あるいは培地中のグルコースの存在が動的糖取込み挙動におよぼす影響について把握することも目的とした。

また、2章において FT-IR/ATR 法を用いれば、TBY-2 細胞の培地である MS

培地中での糖代謝成分（糖およびエタノール）の定量が可能であることはすでに述べた。本章でも培養液成分の定量に FT-IR/ATR 法を用いることで、培養液中の成分変化を分子構造的な視点で把握していく。

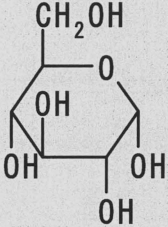
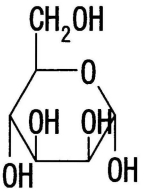
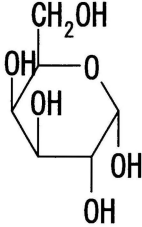
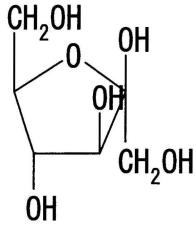
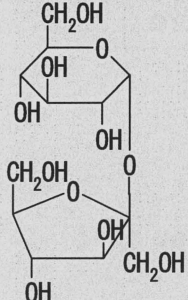
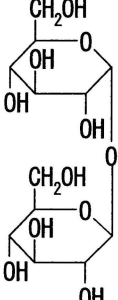
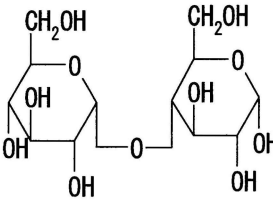
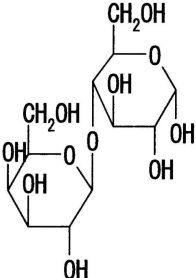
3-2. 実験試料および方法

3-2-1. 実験試料

本章で使用する供試細胞は TBY-2 細胞で、供試培地は MS 培地を基本とする。培地の炭素源として採用する糖は、単糖類では、グルコースを基準として2位の OH 基のエピマーであるマンノース、4 位のエピマーであるガラクトース、五員環のフルクトースとした。二糖類では、スクロースを基準としてグルコースが α -1,1 結合したトレハロース、 α -1,4 結合したマルトース、グルコースとガラクトースが β -1,4 結合したラクトースを採用した。表 3-1 に採用する糖の構造体を示す。また、2 種類の糖を組み合わせた混合糖では、グルコース+フルクトース、グルコース+マンノースおよびグルコース+ガラクトースの 3 種類設定した。調製する培地の糖濃度は表 2-5 に示している。細胞および各試料の詳細は 2 章に紹介したとおりである。

酵素活性測定に用いた試薬は、すべて和光純薬工業株式会社の試薬特級を使用した。インベルターゼはフナコシ株式会社製の *Candida sp.* 由来、マルターゼは和光純薬株式会社製の生化学用 *Saccharomyces sp.* 由来のものを使用した。

表 3-1 本章で採用した糖
Table 3-1 Setup sugar types of culture media.

Monosaccharide			
D-Glc	D-Man	D-Gal	D-Fru
—	C-2 epimer	C-4 epimer	5-ring form
			
Disaccharide			
Suc (Glc-Fru)	Tre (Glc-Glc)	Mal (Glc-Glc)	Lac (Glc-Gal)
α -1,2 glycosidic bond	α -1,1 glycosidic bond	α -1,4 glycosidic bond	β -1,4 galactosidic bond
			

3-2-2. 実験方法

(1) 細胞培養

MS 培地を基本として、前述した単糖類 (4)、二糖類 (4) および混合糖 (3) で調製した 11 種類の培地で TBY-2 細胞を培養した。培養条件を表 3-2 に示す。培地調製および培養方法については 2 章に述べたとおりである。以下に、培養から測定までの手順を示す。まず、1 週間ごとで継代培養されている TBY-2 細胞を遠心分離 (1000 rpm, 1 min, 3 回) を用いて洗浄する。これは、継代培養時の培養液成分の影響を取り除くために行う。この洗浄液には、高圧滅菌済の糖を含まない MS 培地を使用する。洗浄後の培養液の細胞濃度を調製 (約 12 g-dry

cell/1) した後, 1.5 ml の培養液を本培養に供試した. 一定期間培養後の培養液から, 可視分光法を用いて濁度 (Optical Density; OD) を測定 (詳細は 3-2-3) することで細胞濃度を, 培養液のろ液から FT-IR/ATR 法を用いて培養液スペクトルを測定し糖およびエタノール濃度を算出した. 図 3-1 に細胞培養および測定手順を示す.

なお, 培養液を顕微鏡 (IX70, OLYMPUS 社製) で観察し, 取り付けたデジタルカメラ (EOS 10D, Canon 社製) で撮影した. この際, 細胞の生死を判別できるトリパンブルー液で染色し, 細胞の状態を確認した. また, シャーレに培養液を入れて接写写真を (IDC-1000Z, Sanyo 社製), さらに, 培養している三角フラスコの写真 (EOS 10D, Canon 社製) も測定時に合わせて撮影した.

表 3-2 培養条件
Table 3-2 Setup culture conditions.

	Sub-culture	Culture
Temperature	298 K (25 °C)	
Light	Dark	
Shake	Rotary shaking (150 rpm)	
Sugar	Suc	11 types (Table 2-5)
Volume of medium	95 ml	
Volume of inoculums	1.5 ml	
Cultivation period	7 days	Max 120 days

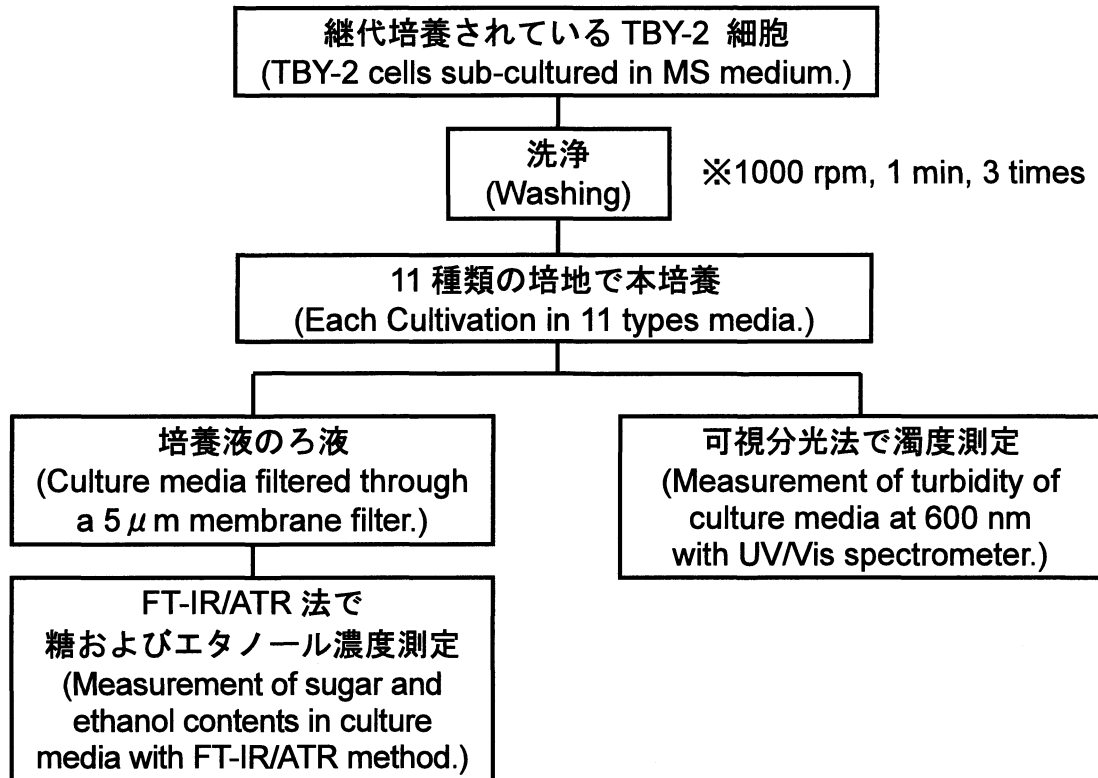


図 3-1 細胞培養および測定手順
Fig. 3-1 Protocol of cultivation and measurement.

(2) 酵素活性測定 (Enzyme assay)

TBY-2 細胞をスクロースとマルトースでそれぞれ培養したとき、これらの糖を分解するために培養液中に生成されると思われるインベルターゼ (Invertase (EC 3.2.1.26)) やマルターゼ (Maltase (= α -Glucosidase) (E.C. 3.2.20)) の活性を測定した。実験手順を図 3-2 に示す。まず、スクロースおよびマルトースで培養を行う。これらから誘導期、対数期、定常期にあたる培養液を各々無菌状態でサンプリングし、組織培養フィルターユニット・タイプ TA (NALGENE 社製, pore size 0.45 μ m) でろ過したものを実験試料として使用した (一部培養液をサンプリングして糖濃度および細胞濃度を測定し、培養液の初期条件を確認)。これら培養液のろ液を表 3-3 に示した条件になるように 1N NaOH あるいは 1N HCl を用いて pH を調製した。つぎに、上澄み液を 4 ml 採取し滅菌済

み試験管に入れた。この試験管にはあらかじめ滅菌されたスクロースあるいはマルトースが入っている。ここで、培養によって消費された糖（培養液の初期状態から算出）を補充し、最終濃度が 30 g/l になるように調製する。その後、恒温層を使って振盪させながら至適温度でインキュベートし、反応させる。一定時間が経過したら、10 分以上氷水内で冷却し、反応を停止させ、反応液中の糖濃度、pH 測定、EC 測定を行う。

一方、培養液中に酵素が存在すれば、問題なく反応することを確認するため、対照実験としてこれらの培養液に実際の酵素溶液（最終濃度が 0.35 U/ml になるように調製）を加えて一定時間反応させ、その活性を測定した。酵素溶液の調製方法を図 3-3 に示す。まず、ろ過した培養液を 2 ml 取り出し、あらかじめ濃度等を調製してある酵素溶液 2 ml を加えて、滅菌されたスクロースあるいはマルトースが入っている滅菌済みの試験管へ入れる。ここでも、糖は最終濃度が 30 g/l になる分だけ加える。後は、培養液だけのときと同様である。

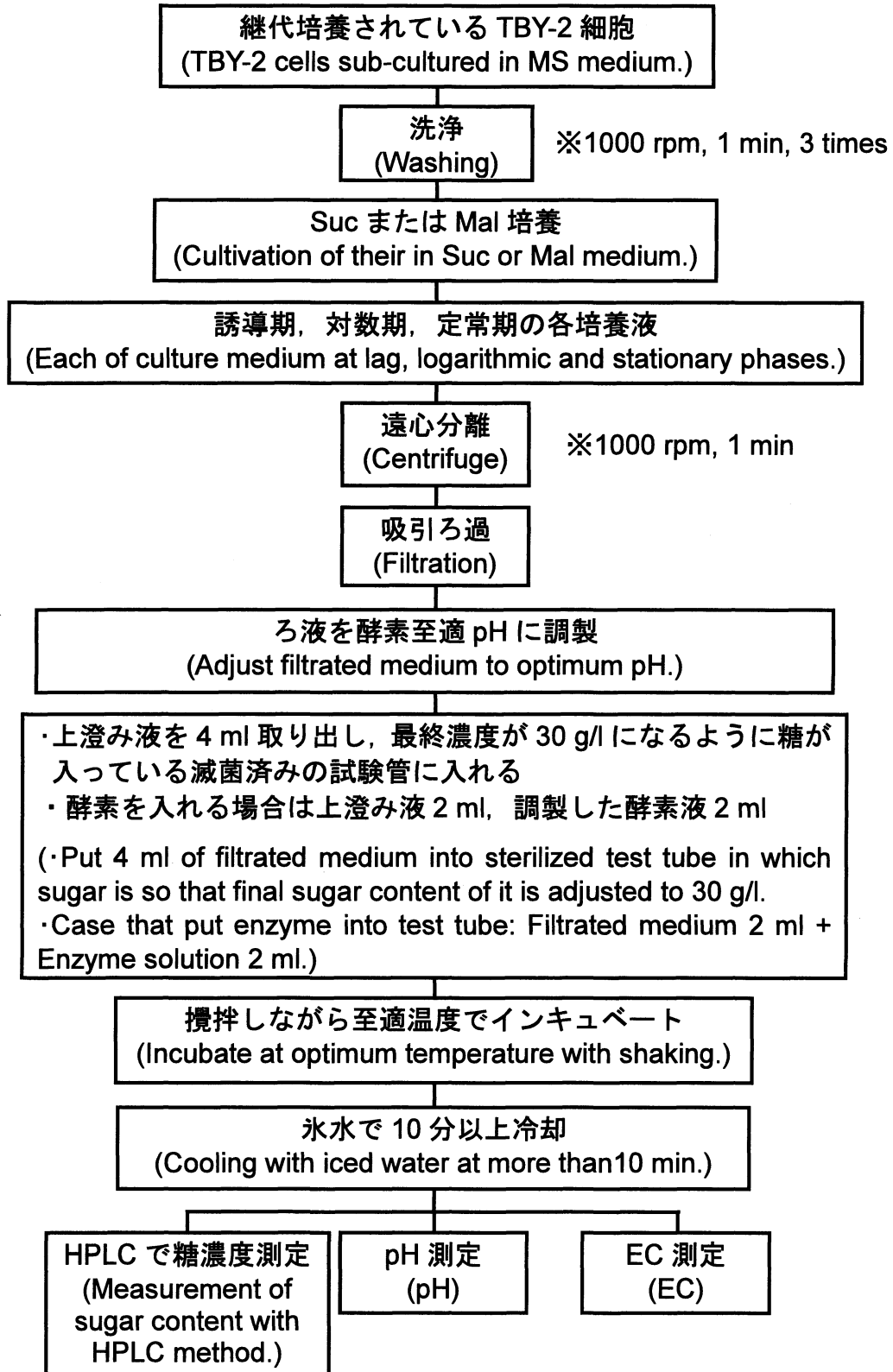


図 3-2 酵素活性測定の手順
Fig. 3-2 Enzyme assay protocol.

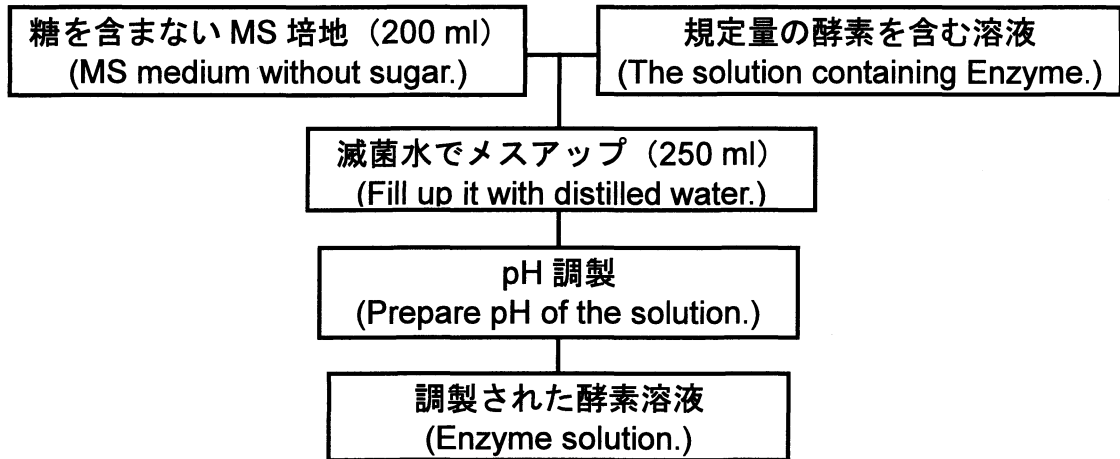


図 3-3 酵素溶液の調製方法

Fig. 3-3 Protocol of preparation of enzyme solution.

表 3-3 酵素活性測定の場合

Table 3-3 Enzyme assay setup conditions.

	Sucrose culture medium	Maltose culture medium
Day	3, 6, 10	14, 19, 28
Sugar concentration	30.00 g/l	30.00 g/l
pH [-]	5.0	6.9
Temperature	303 K	313 K

(3) 糖，エタノールおよび細胞濃度の定量法

(a) 赤外分光法 (FT-IR/ATR 法)

細胞培養でサンプリングした培養液成分の定量には，2 章で述べたとおり赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) を用いる。測定方法も 2 章に準じる。

(b) HPLC 法

酵素活性測定における糖濃度の測定には，HPLC 法を用いた。測定方法の詳細は 2 章に述べたとおりである。酵素活性測定については，前述したようにスクロースおよびマルトースが酵素によって加水分解されているかを検証するために行うが，マルトースとグルコースの赤外スペクトルのパターンはよく似ている。そのため，仮に活性が非常に低くなった場合，定量結果に大きな誤差

が生じる可能性がある。さらに、低濃度領域での定量は FT-IR/ATR 法より HPLC 法の方が有利であると考えられる。これらの理由により、酵素活性測定では HPLC 法を採用している。

(c) 可視分光法

細胞量は可視分光法より求めた。この方法は、培養液の OD を測定することにより、間接的に細胞量を測定する方法である。TBY-2 細胞の培養液の OD 測定には、島津製作所製の自記分光光度計 (UV-1240PC) を使用した。写真 3-1 に自記分光光度計の外観を示す。また、写真 3-2 にセルを試料ホルダーにセットした状態の測定室内を示す。セルには、光路長が 10 mm の石英標準セルを使用した。

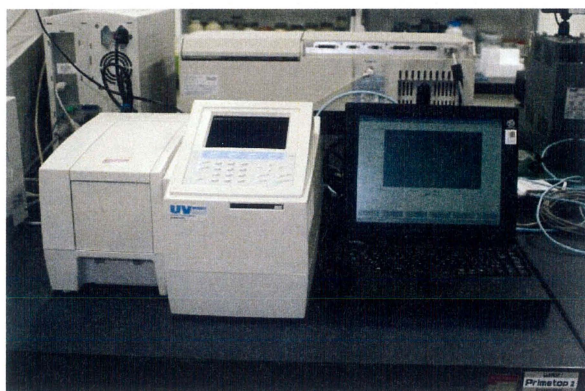


写真 3-1 自記分光光度計
Photo 3-1 UV/Vis spectrometer.

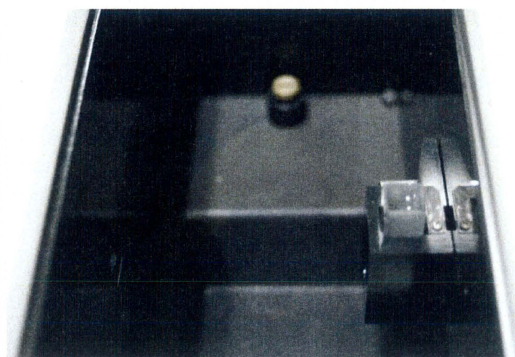


写真 3-2 測定室内
Photo 3-2 Chamber.

試料はピペットで一定量セルに注入する。試料を注入したセルは、測定室内のホルダーにセットする。表 2-13 に OD の測定条件を示す。スキャン速度は、測定中に重力の影響で細胞が沈殿を起こさないよう高速とした。サンプル測定の際には、これに先んじて対照 (蒸留水) となる試料でバックグラウンドを測定しておく必要がある。ここで、培養液の可視分光スペクトルの経日変化を図 3-4

に示す。本研究では、600 nm における OD (O.D.₆₀₀) を採用した。可視分光スペクトルを用いて OD より細胞量を算出する場合、500~660 nm の光がよく使用される。とくに、波長が 600 nm [6, 128], 610 nm [19], 660 nm などにおける OD を使用して求める例が多い。図からわかるように、この付近にはピークはなく培養液成分に影響されないので、培養液の濁度を求める際に一般に用いられることが多い。そこで、まず、この OD と細胞数から細胞濃度 [cell/l] (単位容量あたりの細胞数) との関係を検討した。一般的に、濃度と濁度 (吸光度) との関係は濁度が 1 以下では直線関係にあるが、1 を超えると直線関係が崩れ指数関数的な関係になると言われる。本研究では、培養が進むと最終的に濁度が 3 前後になるので、直線ではなく $Y=A \cdot (\exp O.D._{600} - 1)$ でフィッティングを行った。しかし、高濁度時のセルカウントに誤差が生じやすいためか (細胞量が多すぎて正確なカウントが難しいため)、相関は良くなかった ($r = 0.907$)。そこで、OD と細胞乾重量から細胞濃度 [g-dry cell/l] (単位容量あたりの細胞乾重量) との関係を検討し、上記の式で検量線 (図 3-5) を作成した。その結果、相関係数は改善され 0.983 と高い値が得られた。以上より、本研究では OD から細胞濃度を求めることで細胞量を測定した [122]。

表 3-4 測定条件 (自記分光光度計)

Table 3-4 Measurement conditions of UV/Vis spectrometer.

Parameter	Specification
measuring range	300~900 nm
Slit width	2 nm
Scan speed	High speed

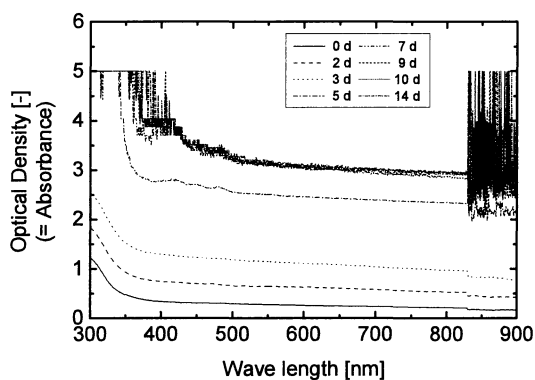


図 3-4 可視分光スペクトルの経日変化

Fig. 3-4 Time behavior of OD spectra of cultured media.

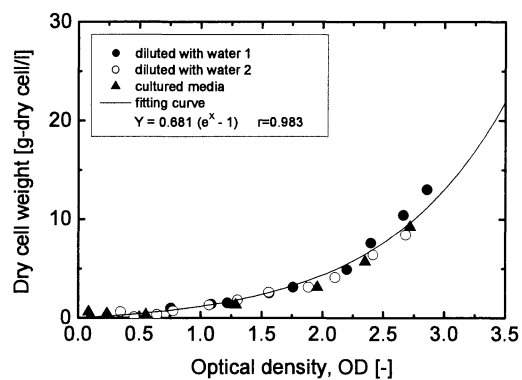


図 3-5 細胞濃度の検量線

Fig. 3-5 Calibration curve between dry cell weight and OD.

3-3. 1 種類の糖で培養したときの動的糖代謝挙動

本章では、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を検証しているが、まず、炭素源である糖が 1 種類の場合について論じていく。

3-3-1. 培養液スペクトル

図 3-6 に単糖類で、図 3-7 に二糖類で培養したときの培養液スペクトルの経日変化を示す。糖の種類によって、代謝されるまでの培養期間が異なるものの、培養の進行とともに指紋領域における吸光度が減少していることが確認できた。とくに、植物には毒性があると報告されているマンノース [29-31]、ガラクトース [34-36]でもそれが確認できた。

単糖類で培養した場合、一部で培養後期にエタノールに起因するピーク (1045 cm^{-1}) が表れる以外、スペクトルパターンに大きな変化は認められなかった。エタノールはもともと培地成分には含まれておらず、代謝産物として生成したものと考えられる。

二糖類で培養した場合、スクロースおよびトレハロースでは培養が進むにつれてスペクトルパターンが変化しながら吸光度が減少していた(図 3-7 (a), (b))。双方とも、 993 cm^{-1} 付近のグリコシド結合由来のピークの減少が顕著に認められ、スクロースではグルコースとフルクトースの、トレハロースではグルコースのスペクトルパターンに変化していた。もともとスクロースはグルコースとフルクトースが、トレハロースはグルコース二分子が結合したものの(表 3-1)であり、この現象は、加水分解によりグリコシド結合が分解されたものと考えられる。一方、マルトースの場合(図 3-7 (c))、スペクトルパターンに大きな変化は認められなかった。また、単糖類同様エタノールに起因するピークも一部で見られた。最後にラクトースの場合は、180 日間培養を試みたがスペクトルにほとんど変化がなく、消費されなかったことを付け加えておく。

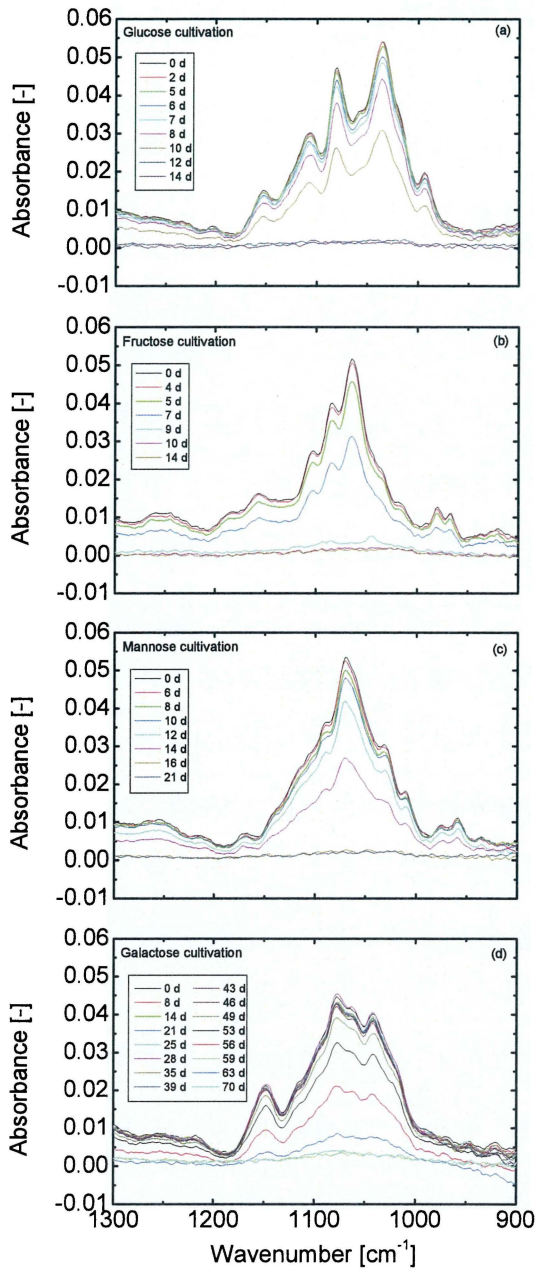


図 3-6 培養液成分の
赤外スペクトル（単糖類）
(a) Glc, (b) Fru, (c) Man, (d) Gal
Fig. 3-6 Time behavior of ATR
spectra of the medium during
(a) Glc, (b) Fru, (c) Man and (d)
Gal cultivation.

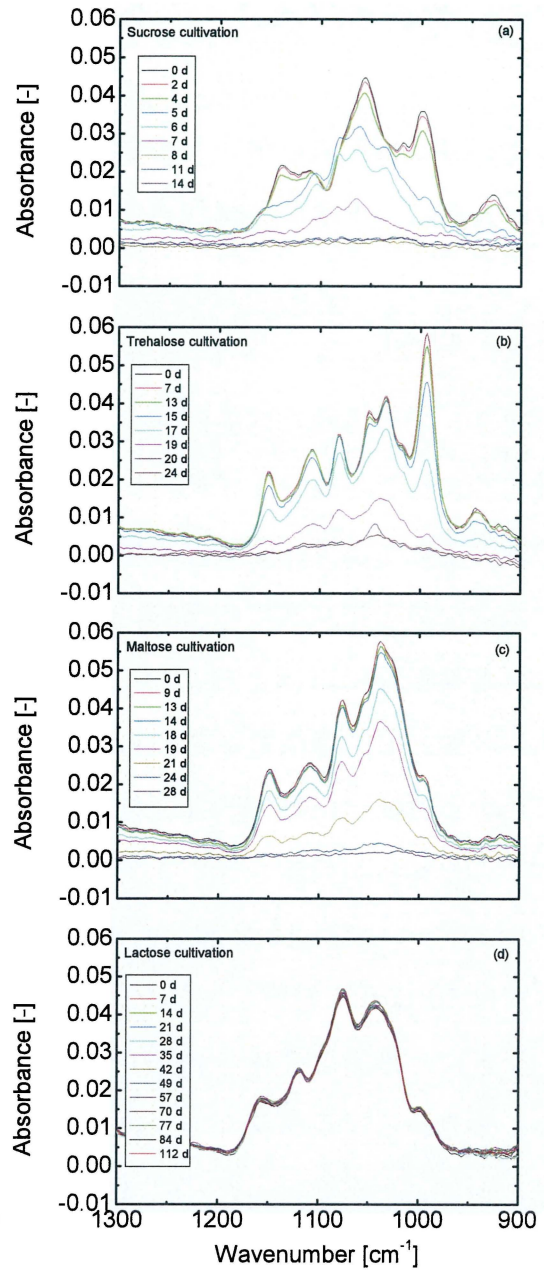


図 3-7 培養液成分の
赤外スペクトル（二糖類）
(a) Suc, (b) Tre, (c) Mal, (d) Lac
Fig. 3-7 Time behavior of ATR
spectra of the medium during
(a) Suc, (b) Tre, (c) Mal and (d)
Lac cultivation.

3-3-2. 糖およびエタノール濃度の経時変化

ここでは、各糖で培養して得られた培養液の赤外スペクトルから、2章で示した FT-IR/ATR 法を用いた定量方法によって糖およびエタノール濃度を算出するとともに、濁度から細胞濃度も求めて比較した。

(1) 単糖類

図 3-6 で得られた培養液スペクトルをもとに、単糖類で培養したときの培養液に含まれる各成分を求めた。図 3-9 にその経日変化を示す。いずれも糖濃度の減少とともに、細胞濃度の増加が認められた。エタノールについては、一部で微量ながら細胞濃度の増加に少し遅れて増加が確認できた。このエタノールも、培養後期にはほとんどなくなっていた。また、毒性があるとされる Man, Gal 培養とともに糖消費が認められたが、スペクトルパターンの変化がなかったことから糖成分に定性的な変化は見られなかった。さらに、培地の糖成分によって、それらが代謝されるまでの期間に大きな差が認められた。グルコースやフルクトースでは 10 日前後ですべて代謝されるのに対して、最長のガラクトースでは 70 日近くを要していた。

つぎに、糖濃度変化をわかりやすくするために、個体群の成長モデルとしてよく知られるロジスティック曲線の一種、ボルツマン関数（式 3-1）で非線形フィッティングを行った [62, 122, 129-132]。

$$W = \frac{W_{ini} - W_{fin}}{1 + e^{(t-t_0)/w}} + W_{fin} \quad (3-1)$$

ここで、 W は糖消費量 [g/l]、 t_0 は変曲点 [d]、 w はきざみ [d]を示している。また、添え字の ini は培養の初期値、 fin は最終値を、 W は糖に関するパラメータであることを表している。また、細胞濃度についても同様の関数を用いた。

$$x = \frac{x_{ini} - x_{fin}}{1 + e^{(t-t_0)/w_x}} + x_{fin} \quad (3-2)$$

ここで、 x は細胞濃度 [g-dry cell/l]で、添え字の x は細胞増殖に関するパラメ

ータであることを表している。式 3-1, 3-2 をそれぞれ培養期間 t で微分すると、糖消費速度 [(g/l)/d] および細胞増殖速度 [(g-dry cell/l)/d] が求まる。以下に、式 3-1 を t で微分して求めた反応速度式を示す。

$$\frac{dW}{dt} = -\frac{W_{ini} - W_{fin}}{\left(1 + e^{\frac{t-t_0}{w}}\right)^2} \cdot \frac{1}{w} \cdot e^{\frac{t-t_0}{w}} \quad (3-3)$$

ここで、 $a = \frac{1}{w}$, $b = W_{ini} - W_{fin}$ とおいて整理すると式 3-4 となる。

$$\frac{dW}{dt} = \frac{a}{b} \cdot (W - W_{ini}) \cdot (W - W_{fin}) \quad (3-4)$$

さらに、 $k = \frac{a}{b} \left(= \frac{1}{w \times (W_{ini} - W_{fin})} \right)$ とおいて整理すると式 3-5 の反応速度式が得

られ、フィッティングパラメータをそれぞれ代入すると、糖消費速度を簡単に求めることが可能となる。このときの k を速度定数と呼ぶ。

$$\frac{dW}{dt} = k \times (W - W_{ini}) \times (W - W_{fin}) \quad (3-5)$$

また、変曲点 $\left(t_0, \frac{W_{ini} + W_{fin}}{2}\right)$ における $\frac{dW}{dt}$ は以下のようなになる。

$$\left(\frac{dW}{dt}\right)_{t=t_0} = \frac{1}{w} \times \frac{W_{fin} - W_{ini}}{4} \quad (3-6)$$

式 3-6 より、きざみ w は変曲点での接線の傾きと反比例の関係にあるパラメータと言える。このように、ボルツマン関数は変曲点 t_0 とその接線の傾きに反比例するきざみ w をパラメータとして表現できるロジスティック関数である。

さらに、式 3-5 をそのときの細胞濃度 (式 3-2) で割ることにより、単位細胞量あたりの糖消費速度にあたる比糖消費速度 [(g/d)/g-dry cell] を求めることができる。比速度を求める式を、式 3-7 に示す。

$$\frac{\left(\frac{dW}{dt}\right)}{x} = \frac{k \times (W - W_{ini}) \times (W - W_{fin})}{\frac{x_{ini} - x_{fin}}{t - t_{x,0}} + x_{fin} + 1 + e^{-wx}} \quad (3-7)$$

一方、式 3-3～3-7 までの W を x に置き換えれば、細胞増殖速度、細胞増殖に関する速度定数および単位細胞量あたりの細胞増殖速度である比増殖速度 $[1/d]$ を求められる。ボルツマン関数でフィッティングすることで、糖消費や細胞濃度の変化を連続的な経時データとして扱うことが可能になる。

図 3-9 より、いずれもボルツマン関数で精度よくフィッティングすることができた。表 3-5～3-8 にフィッティングパラメータを示す。なお、培養実験は複数回行っており、各表には全てのデータを示した（表中 (*) は図 3-6, 3-9 のデータ）。グルコースやフルクトースは糖代謝および細胞増殖が速やかに進行しているのに対して、マンノースやガラクトースではそれらが開始されるまで非常に長いタイムラグを必要とした。とくに、前述したがガラクトースでは 70 日近く要した。長期間、糖が取込まれず飢餓状態が続いていたことになり、ストレス環境下で細胞の代謝特性自体にも変化が表れている可能性も考えられる。

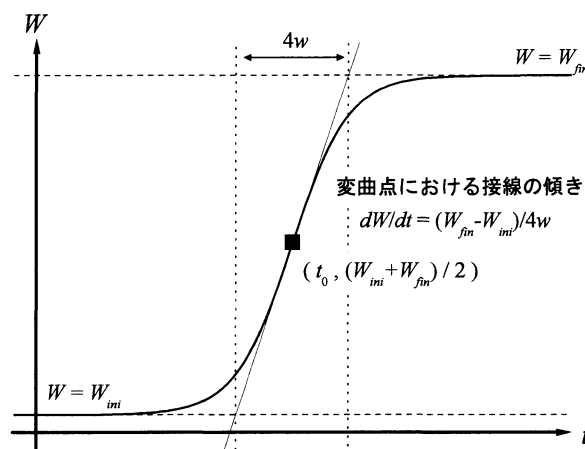


図 3-8 ボルツマン関数
 Fig. 3-8 Boltzmann Function.

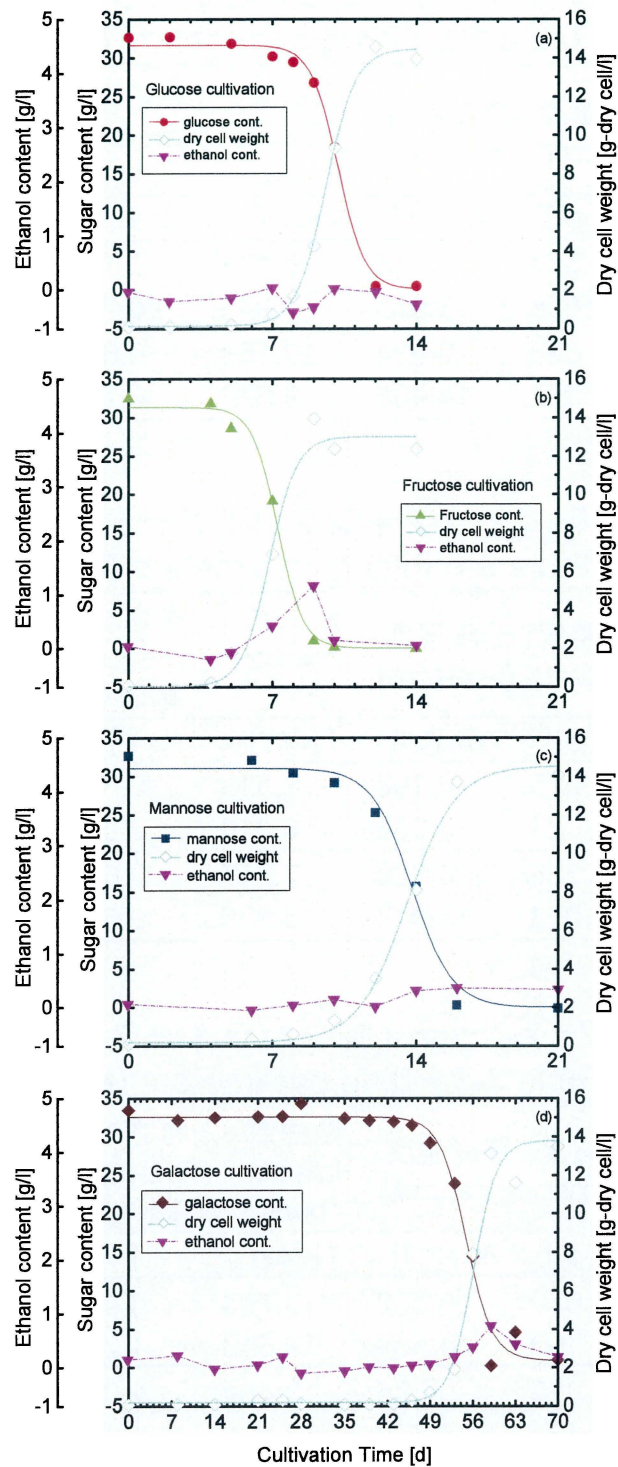


図 3-9 培養液成分と細胞濃度の経日変化（単糖類）
(a) Glc, (b) Fru, (c) Man, (d) Gal

Fig. 3-9 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Glc, (b) Fru, (c) Man and (d) Gal cultivation.

表 3-5 フィッティングパラメータ (Glc)
Table 3-5 Fitting parameters (Glc)

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
No.1	Glc	32.551	0.013	8.434	0.752	0.991	0.041
	Cell	0.015	13.975	7.945	0.796	0.996	-0.090
No.2*	Glc	31.621	0.034	10.158	0.651	0.995	0.049
	Cell	0.158	14.465	9.570	0.709	0.998	-0.099

表 3-6 フィッティングパラメータ (Fru)
Table 3-6 Fitting parameters (Fru)

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
No.1	Fru	31.579	0.108	6.513	0.695	0.992	0.046
	Cell	0.023	15.083	6.110	0.908	0.974	-0.073
No.2*	Fru	31.336	0.028	7.247	0.614	0.996	0.052
	Cell	0.023	13.017	6.835	0.666	0.983	-0.116

表 3-7 フィッティングパラメータ (Man)
Table 3-7 Fitting parameters (Man)

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
No.1*	Man	31.070	0.002	13.794	0.985	0.986	0.033
	Cell	0.199	14.539	13.543	1.208	0.994	-0.058
No.2	Man	31.323	0.035	13.464	1.085	0.986	0.029
	Cell	0.181	13.730	12.820	1.382	0.997	-0.053
No.3	Man	32.080	0.143	13.943	0.939	0.973	0.033
	Cell	0.267	13.801	13.480	1.176	0.990	-0.063
No.4	Man	32.411	0.034	13.950	1.912	0.977	0.016
	Cell	0.153	15.798	13.666	1.956	0.993	-0.033
No.5	Man	32.084	0.010	12.384	1.569	0.977	0.020
	Cell	0.014	15.130	12.188	1.539	0.984	-0.043

表 3-8 フィッティングパラメータ (Gal)
Table 3-8 Fitting parameters (Gal)

		初期濃度	最終濃度	変曲点	きざみ	相関係数	速度定数
		(Initial cont.)	(Final cont.)	(Inflection point)	(Time const. ticking)	(Correlation coefficient)	(Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
No.1	Gal	33.216	0.000	54.541	2.220	0.994	0.014
	Cell	0.071	14.332	55.153	2.510	0.991	-0.028
No.2	Gal	32.962	-0.811	45.682	2.072	0.989	0.014
	Cell	0.273	15.387	46.405	1.686	0.996	-0.039
No.3	Gal	31.736	0.408	48.179	2.056	0.989	0.016
	Cell	0.100	14.117	49.646	2.304	0.985	-0.031
No.4	Gal	32.440	-0.524	48.909	1.400	0.993	0.022
	Cell	0.184	13.287	48.789	1.326	0.998	-0.058
No.5	Gal	32.514	-0.685	60.361	1.408	0.989	0.021
	Cell	0.155	13.392	60.095	2.283	0.993	-0.033
No.6	Gal	32.968	0.281	46.473	1.700	0.990	0.018
	Cell	0.044	13.672	46.614	2.297	0.997	-0.032
No.7*	Gal	32.562	0.898	54.870	2.168	0.982	0.015
	Cell	0.177	13.797	56.072	1.922	0.980	-0.038
No.8	Gal	32.778	0.014	53.151	1.401	0.995	0.022
	Cell	0.014	13.939	53.390	1.477	0.995	-0.049
No.9	Gal	32.980	0.027	70.464	2.424	0.999	0.013
	Cell	0.012	13.818	70.144	2.133	0.999	-0.034
No.10	Gal	32.641	0.075	46.216	1.685	0.993	0.018
	Cell	0.079	16.548	48.146	2.678	0.995	-0.023

* 図 3-6, 3-9 のデータ (The Data (*) of Fig. 3-6 and 3-9.)

(2) 二糖類

図 3-7 で得られたスペクトルをもとに、二糖類で培養したときの培養液成分を算出した。図 3-10 に経日変化を示す。Lac 培養以外は糖濃度の減少とともに細胞濃度の増加が認められた。エタノールについても単糖類同様、一部で微量ながら細胞濃度の増加に少し遅れて増加が確認できた。また、培地の糖成分によって、それらが代謝されるまでの期間に差が認められた。最も一般的な炭素源であり、多くの高等植物にとって転流糖でもあるスクロースでは、7 日前後ですべて代謝されるのに対して、トレハロースやマルトースは 20 日前後を要した。スペクトルが変化しなかったラクトースでは糖消費および細胞増殖は確認できなかった。

各培養で詳しく見ていくと、図 3-7 でスペクトルパターンの変化が見られた Suc 培養では、培地に存在していなかったグルコースとフルクトースが、Tre 培養ではグルコースが検出できた。一方、Mal 培養ではグルコースがほとんど検出されなかった。このことから、スクロース、トレハロースとマルトースとでは糖取込み挙動が異なると考えられる。また、ラクトースについては、培地成分に大きな変化はなく、エタノールも検出されなかった。

スクロースはインベルターゼによって、トレハロースはトレハラーゼによって加水分解されてから取込まれていることは知られている。本研究でもそれが確認できた。マルトースもマルターゼによって加水分解されると言われている [55]。しかし、図 3-7 (c)からはグルコースがほとんど検出されず、マルターゼによる分解がはっきりと確認できなかった。マルトースの糖取込み挙動は、他の二糖類のそれと異なっている可能性があり、詳しく検証する必要がある。細胞濃度については、単糖類のときと同様に精度よくフィッティングすることが出来た。

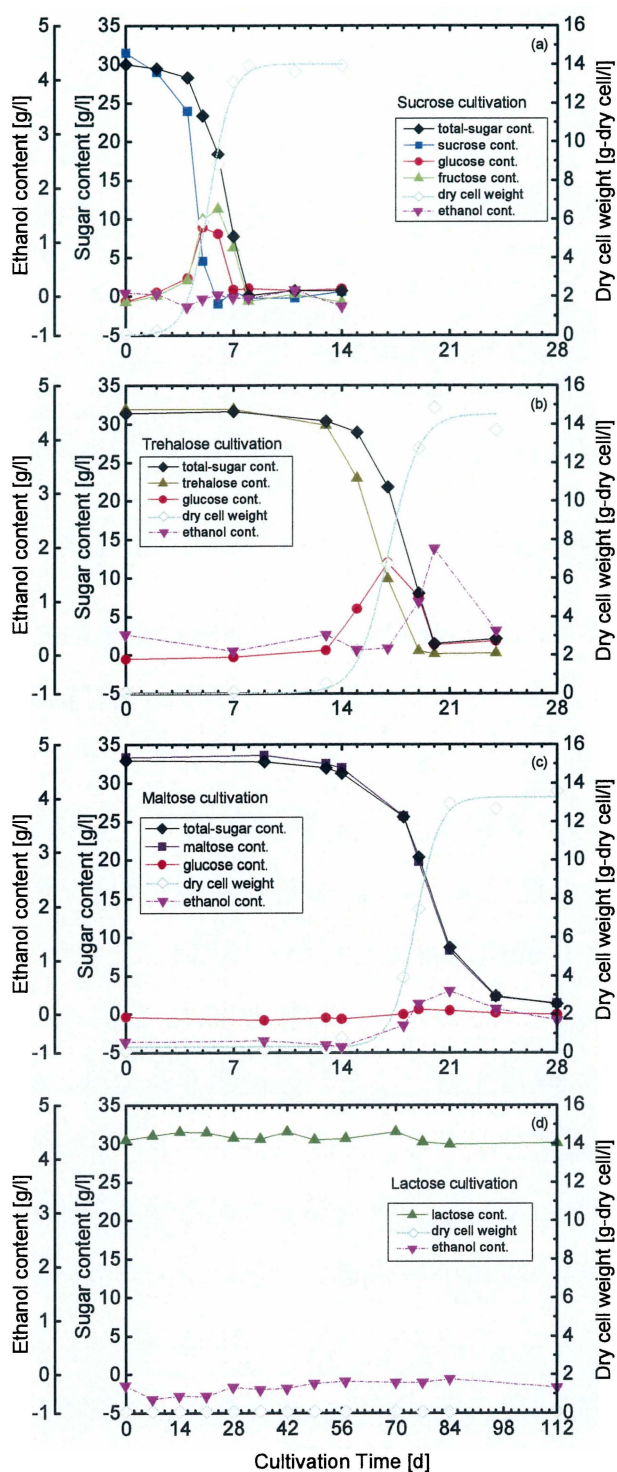


図 3-10 培養液成分と細胞濃度の経日変化 (二糖類)
(a) Suc, (b) Tre, (c) Mal, (d) Lac

Fig. 3-10 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Suc, (b) Tre, (c) Mal and (d) Lac cultivation.

3-3-3. 動的糖代謝挙動特性



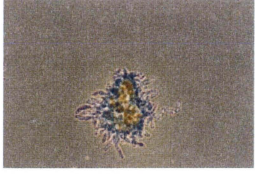


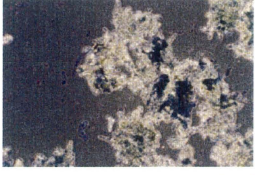






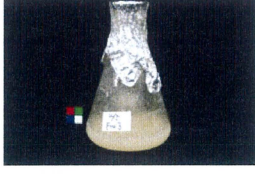
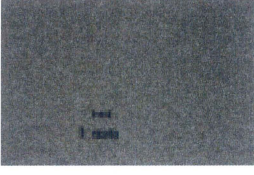


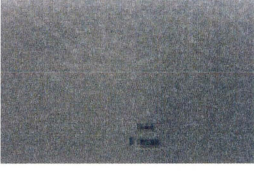

本節では、TBY-2 細胞の 1 種類の糖での動的糖代謝挙動特性を把握することを目的としているが、Gal および Mal 培養における糖代謝挙動は、他の糖成分のそれとは大きく異なることが分かった。そこで、本項ではまず、Gal および Mal 培養における糖代謝挙動を把握し得られた知見を加えながら、本研究で採用した各糖の動的糖代謝挙動を比較していく。

(1) ガラクトース

(a) 細胞増殖




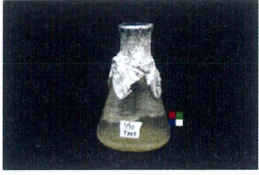
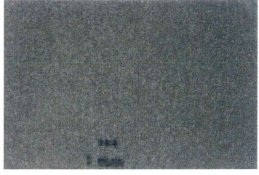


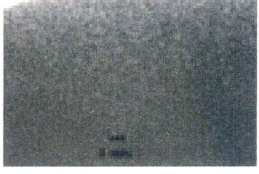

ここでは、Gal 培養における細胞増殖および糖代謝挙動について論じていく。表 3-9 に細胞を培養しているフラスコ、その接写および顕微鏡写真を示した。ガラクトースは培養後 25 日、56 日、63 日の写真を、また、その他は培養終了時の写真である。TBY-2 細胞は、一般的に培地に均一に増殖していく特長を持っている。Gal 以外の培養では、いずれもその特徴どおりの増殖が確認できた。ところが、Gal 培養では細胞は凝集しながら増殖していた。凝集は 20 日を過ぎたあたりから確認できた。このときの細胞濃度は、図 3-7 (d) より非常に低く、増殖過程では誘導期に該当する。また、顕微鏡写真では、凝集した細胞塊の内部で青く染まっている部分がある。これはトリパンブルー染色されたもので、死細胞であることを示しており、塊内部では飢餓状態に陥りながらも増殖を続けていたと考えられる。写真から確認しづらいが、フラスコの全体写真でも違いがあった。細胞が均一に増殖する場合、TBY-2 細胞では誘導期や対数期では光が乱反射して培養液は白っぽく見え、定常期に至り徐々に黄味を帯びるようになる。しかし Gal 培養では、誘導期から対数期の状態で、すでに培養液の色は黄味を帯びていた。これは、細胞が凝集しているため光の乱反射の状態が他と異なるからだと考えられる。

表 3-9 細胞増殖の経時変化の写真 (単糖類)
 Table 3-9 Photographs of the TBY-2 cells (monosaccharide).

	Flask	Close up	Microscope
Gal 25 d			 — 200 μm ×40
Gal 56 d			 — 200 μm ×40
Gal 63 d			 — 200 μm ×40
Glc			 — 40 μm ×200
Fru			 — 40 μm ×200
Man			 — 80 μm ×100

Gal 以外は培養終了後の状態を撮影
 (The end of cultivation time except for Gal cultivation.)

表 3-10 細胞増殖の経時変化の写真 (二糖類)
Table 3-10 Photographs of the TBY-2 cells (monosaccharide).

	Flask	Close up	Microscope
Suc			 — 80 μ m \times 100
Tre			 — 80 μ m \times 100
Mal			 — 40 μ m \times 200

培養終了後の状態を撮影 (The end of cultivation time.)

植物にとって、ガラクトースは、根、子葉鞘、花粉の成長を阻害し、落葉を助長すると言われている。また、多くの植物培養細胞にとって、ガラクトースは炭素源にならないとも言われている [34]。加えて、1-10 mmol/l のガラクトースを植物に与えると高い毒性を示したとの報告もある [35, 36]。ここで、図 3-11 にガラクトース代謝の概略図を示す。ガラクトースが細胞に取込まれると、ガラクトキナーゼ (Galactokinase (E.C. 2.7.1.6)) によって直ちにガラクトース 1-リン酸 (Galactose 1-phosphate; Gal 1-P)、さらに UDP-ガラクトース (uridine diphosphate galactose; UDP-Gal) に変換される [36]。Yamamoto らによると uridine 5'-triphosphate (UTP) の急速な減少とともに、この Gal 1-P が蓄積される。エンバクなどの単子葉類では、この Gal 1-P が UDP-グルコース-ピロホスホラーゼ (UDP-Glc-pyrophosphorylase (E.C. 2.7.7.9)) の活性を抑制してしまい、UDP-

グルコース (uridine diphosphate glucose; UDP-Glc) が減少するが、アズキなどの双子葉類ではそうはならなかったと報告している [133, 134]. このガラクトースの UDP-Glc 生成阻害作用は、細胞の生長阻害と相関していた. また、ガラクトース代謝には、UDP-グルコース 4-エピメラーゼ (UDP-Glc 4-epimerase (= UDP-Gal 4-epimerase) ; UGE (E.C. 5.1.3.2)) が重要な役割を果たしているといわれている. Dörmann [35]らは、シロイヌナズナ (双子葉類) の野生株 (Wild Type; WT) と UGE 活性が高い変異株を用いて Gal 培養すると、双方とも UDP-Glc が多少減少 (炭素源として利用?) し UDP-Gal が増加したが、WT では変異株以上に大幅な増加が認められたと報告している. このことから、WT では UGE の活性は低いいため、Gal 培養すると UDP-Gal が蓄積すると考えられる.

また、ガラクトースは植物にとって毒性が強いが、Smith らはネズミムギ (単子葉類) [135]で、Verma らはニンジン (双子葉類) で [136]でそれぞれ長いタイムラグの後、増殖が確認できたと報告している. さらに、Maretzki ら [36]も、サトウキビ (単子葉類) の培養細胞でガラクトースを長期で培養するとガラクトースを炭素源として利用できる細胞が得られると報告している. 彼らは、100 mmol/l のガラクトースを含む培地で長期間培養すると、ガラクトースに適する細胞に変化し増殖していくことを確認した. この細胞を分析すると、UGE の活性がスクロースで培養された細胞と比べて 10 倍にも達していることが分かった. このことから、ガラクトース代謝には UGE の働きが重要であることがわかる. 本章の TBY-2 細胞における Gal 培養でも、これらと同様、増殖開始まで長いタイムラグがあったが、培養途中で UGE の活性が高まったため増殖できるようになった、つまり、ガラクトースを代謝できる形質の発現が起こったのではないだろうかと推察できる.

ところで、UDP-sugar は細胞壁多糖を構築するための中間物質である [137]. とくに、UDP-Glc は様々な物質の起点となっている. UDP-Glc はセルロースシンターゼ (Cellulose synthase (E.C. 2.4.1.12)) によりセルロースが合成されたり、UGE により UDP-Gal に変換され、これがペクチン、アラビノガラクトタン蛋白質、キシログルカンの側鎖などに、イノシトールと結びつくとガラクトキノ

ールに変化したりしている. この UDP-Glc 生合成には, UTP が必要になる. ガラクトースは Gal 1-P→UDP-Gal と変化し, UDP-Gal が蓄積される過程で UTP も減少することはすでに触れた. この UTP の減少が, UDP-Glc の生成を妨げている [138], あるいはこの過程に必要な UDP-ガラクトース ピロホスホラーゼ (UDP-Gal pyrophosphorylase (E.C. 2.7.7.10)) の反応自体が UDP-Glc 生成に関与する UDP-Glc pyrophosphorylase と競合阻害を起こし, UDP-Glc の生成を妨げている [133, 134], といったことなどが原因で細胞内の UDP-sugar は UDP-Gal が支配的になると思われる. このようなストレス環境下では, UDP-Glc/UDP-Gal 比が変わるため, これらをもとに生合成されるセルロース, グルカン, ペクチンなどの構成比も変わり, 正常な細胞壁が作れず生長阻害の一因となったのかもしれない. また, Kato ら [139]は, アズキ培養細胞においてガラクトースを含む培地で培養を行うと, 細胞内のスクロース濃度が大幅に減少することからスクロースの生合成に関わるスクロースシンターゼ (Sucrose synthase (E.C. 2.4.1.13)) が阻害されると報告している. UDP-Glc を炭素源として活用するには Sucrose synthase が必要であり, これが阻害されると細胞増殖にも影響すると思われる.

Kikuchi らは, 細胞壁の細胞間接着に関する成果を挙げている. ニンジン (双子葉類) の培養細胞で, 不定胚を形成するカルスと形成しないカルスの細胞壁に含まれる成分をそれぞれ分析したところ, アラビノース (Ara) とガラクトースの構成比に差異が認められた. さらに細胞壁の構造を解析したところ, 植物の細胞接着に関連するペクチン多糖の構造に変化 (相対比で Ara は増加, Gal は減少) が見つかった [32]. 本章の TBY-2 細胞 (タバコは双子葉類) では, 表 3-9, 3-10 より Gal 培養のみ細胞塊が観察された. ガラクトースを代謝できたのは, 培養途中で UGE の活性が高まったためであると考えられたが, 上述したとおり, このような状況では, UDP-Glc/UDP-Gal 比が変化している (UDP-Gal 優位) と推察できる. したがって, 細胞壁のペクチン多糖の構成比も変化し, 細胞間接着力が強まったのではないかと考えられる.

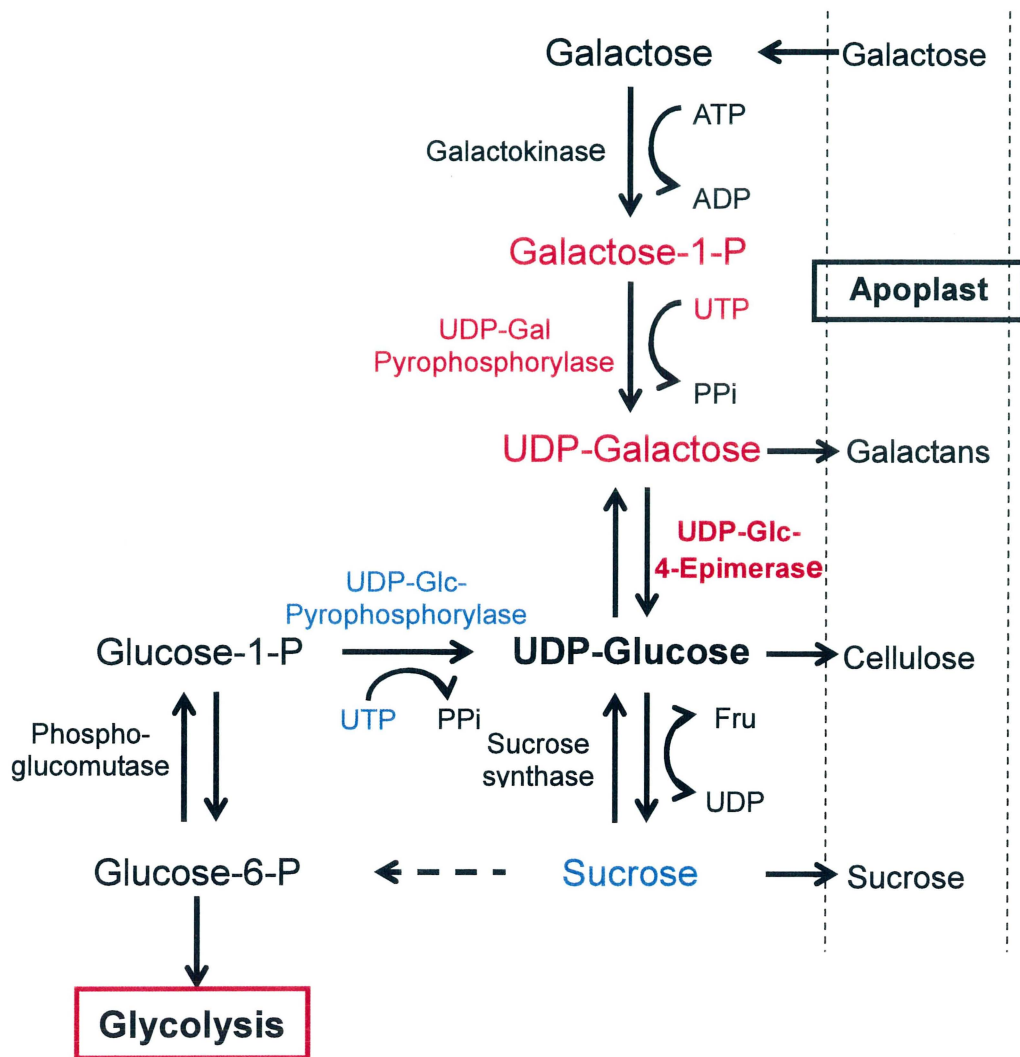


図 3-11 ガラクトース代謝 [38]
Fig. 3-11 Galactose metabolism.

(b) 糖代謝挙動

表 3-8 で示したフィッティングパラメータを式 3-7 に適用し、単位細胞量あたりの糖消費速度である比糖消費速度の経日変化を算出した。図 3-13 (a) に培養実験を行った計 10 回のデータを記している。図より、速度のピーク時期を比較すると、偏差が非常に大きく、最短と最長で約 20 日の差が生じていた。また、いずれのデータも、糖消費開始までの期間（誘導期）が異常ともいえるほど長く、糖をすべて消費するまでに最長で約 80 日要している場合（表 3-8, No. 9）もあった。

つぎに、形質発現により状態が変化した細胞の糖代謝挙動をより詳しく解析するため、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方法を提示する。3-2-2 (1) で示した式 3-2 において、 $(t - t_{0,x})/w_x$ を T と置き、さらに x を最大 1、最小 0 になるように規格化した X を用いて表現しなおすと

$$X = \frac{1}{1 + e^{-T}} \quad \text{or} \quad \frac{e^T}{1 + e^T} \quad (3-2')$$

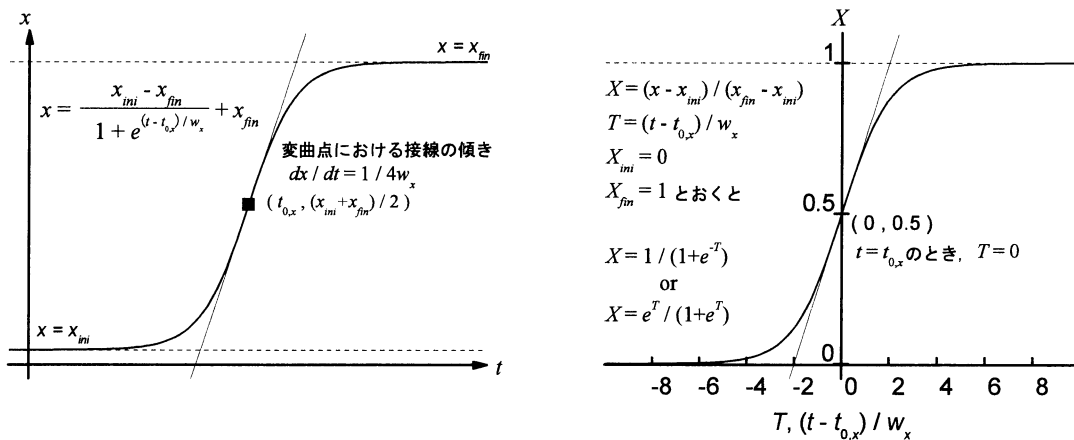


図 3-12 ボルツマン関数 (左) とシグモイド関数 (右)
Fig. 3-12 Boltzmann (left) and Sigmoid (right) Function.

となる。これはシグモイド関数そのものである。シグモイド関数はロジスティック関数の特別な状態にあたり、最も単純化されたロジスティック関数であるといえる。このとき、単位が無次元化された時間軸 T は細胞増殖を基準とした無次元時間軸と考えることができる。

式 3-2 の $t_{0,x}$ および w_x は細胞濃度の変曲点ときざみをそれぞれ示していた。 $t = t_{0,x}$ のとき $T = 0$ となり、このときの増殖速度は最大となる。したがって、その近傍は対数期を示している。また、 $T < 0$ のときは誘導期、 $T > 0$ のときは定常期を指している。また、ボルツマン関数において w_x はきざみであり、 x における変曲点の接線の傾きと反比例の関係にある。 T と w_x の関係においても反比例の関係にある。したがって、 t の変化量 (Δt) が等しいとき、 w_x の値が小さ

い場合は T の変化量 (ΔT) は大きくなり、 w_x の値が大きい場合は ΔT は小さくなる。このように、きざみ w_x によって、 t が標準化された T に変換できる。得られたパラメータを基に $T = (t - t_{0,x})/w_x$ から T を求めれば、培養期間 t における増殖ステージの位置を把握できるため、式 3-2' は増殖ステージを数値化するひとつの方法であると言える。この T を横軸、比糖消費速度 $(dW/dt)/x$ を縦軸として表せば、細胞増殖ステージをそろえた糖代謝挙動の比較が可能となる。

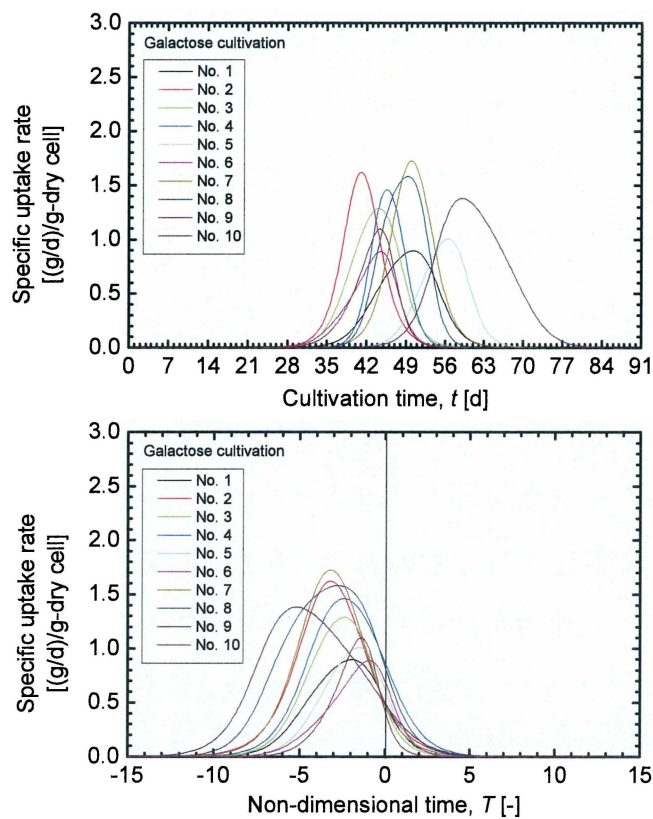


図 3-13 Galactose 培養における比糖消費速度の比較
(a) 実時間, (b) 無次元時間

Fig. 3-13 Specific uptake rates. (a) Time courses of specific uptake rates of sugar during galactose cultivation. (b) Non-dimensional time courses of specific uptake rates during galactose cultivation.

図 3-13 (b) に、Gal 培養における比糖消費速度の比較を示した図 3-13 (a) の横

軸を、培養期間 t から無次元時間 T に置き換え、再計算したものを示した。この図は、細胞の増殖ステージを基準とした糖代謝挙動の特徴を表している。図より、Gal 培養ではすべてのデータで、比糖消費速度のピークにおける T の値はマイナスだった。これは、細胞増殖の前に糖取込み挙動が起こっていることを示している。このように、無次元時間軸による解析により、動的糖代謝挙動に関してさらなる知見が得られた。

以上の結果より、Gal 培養では、培養開始から糖取込み開始までの期間（誘導期）は大変長く、他の糖の培養と比べても大きな差異が認められた。またばらつきもあるが、細胞の増殖ステージを基準とした無次元時間軸でみると、細胞は糖を取込んだ後、増殖することも分かった。これは、糖が取込まれてからの糖代謝過程はほとんど変化していないことを示唆している。

(2) マルトース

マルトーストランスポーターは、植物では細胞内には存在するが、細胞外では一部の植物でしか見つかっていないと言われており、マルトースを細胞内に取込む際は、マルターゼによってグルコースに分解した後、グルコーストランスポーターによって取込まれるものと考えられている [55]。また、SUT がマルトースを取込む際にも利用されるとも言われている [54, 140]。しかし、前述したとおり Mal 培養では他の二糖類での培養で見られた単糖類（グルコース）が検出されなかった。このことから、マルトースの取込み経路として次の2通りの可能性が考えられた（図 3-14）。ひとつめは、マルターゼによる分解速度が非常に低く、グルコース取込み速度が高い場合、もう一つは、マルターゼが全く放出されない、あるいは微量であり、マルトースのほとんどがグルコースに分解されず、マルトーストランスポーターによってマルトースのまま直接取込まれる場合である。前者なら、グルコースが生成されてもすぐに取込まれてしまうため、培養液中にグルコースが検出されにくく、後者なら、マルトースがほとんど分解されないため、グルコースは検出されないと思われる。これを確

認するため、培養液中の酵素の有無を確認し、存在する場合は、その活性を測定して糖取込み速度と比較することで、TBY-2 細胞のマルトース取込み挙動を検証していく。また、細胞が糖を取込むために酵素を生成する場合、細胞増殖に伴って酵素濃度も増加していくことが考えられる。そこで、実験に供試する培養液を、誘導期、対数期、定常期の3種類設定し、酵素活性を測定した。

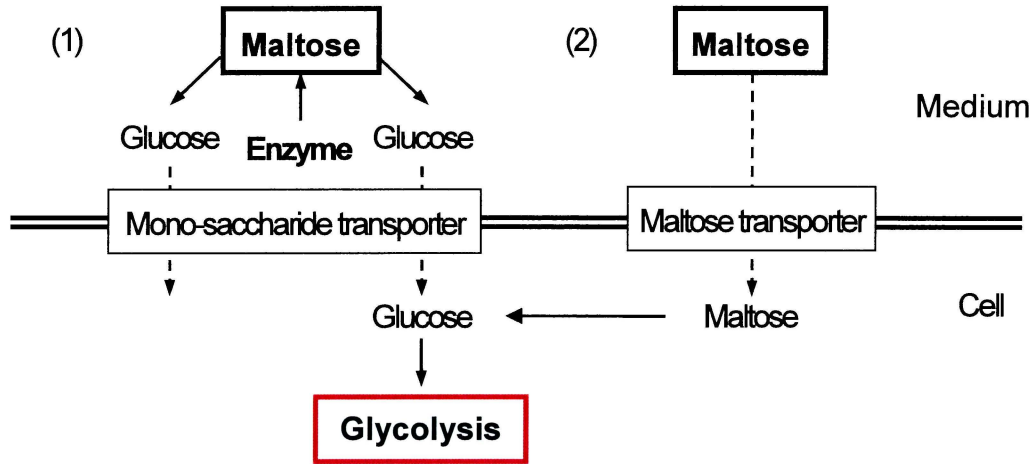


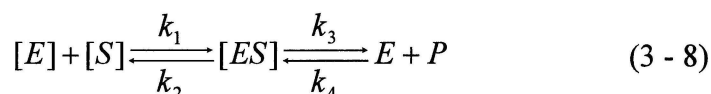
図 3-14 マルトースの取込み経路
Fig. 3-14 Maltose uptake pathway.

(a) スクロース培養液に含まれるインベルターゼの活性

Suc 培養では、インベルターゼによってグルコースとフルクトースに加水分解されてから取込まれることはよく知られている [17, 21, 22, 62].

そこで、3-2-2 (2) の酵素活性測定で示した方法 (図 3-2, 3-3, 表 3-3) にしたがってマルターゼの活性を測定する前に、対照実験として Suc 培養で存在が確認されているインベルターゼの活性を測定する。

ところで、培地中のスクロースやトレハロースのような二糖類はインベルターゼのような酵素によって単糖類に分解される。この酵素反応はミカエルス・メンテンの式によって表現することが出来る



ここで、 $[E]$ は酵素、 $[S]$ は基質、 $[ES]$ は酵素基質複合体、 $[P]$ は生成物の各濃度を示している。また、 $k_1 \sim k_4$ はそれぞれ速度定数を表している。反応速度式は、以下のように表される。

$$v = \frac{v_{\max}[S]_0}{[S]_0 + K_m} \quad \text{ただし、最大速度は } v_{\max} = k_3[E]_0 \quad (3-9)$$

このとき、 v は反応速度、 v_{\max} は最大速度、 K_m はミカエルス定数である。 $[E]_0$ と $[S]_0$ はそれぞれ初期酵素濃度および初期基質濃度である。これらから、生成物濃度 $[P]$ は以下のように表せる。

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] - k_4[E][P] \quad (3-10)$$

ここで、 t は反応時間である。生成物は酵素によって基質を分解する。 P と S の関係は $[P] = [S]_0 - [S]$ で表せる。このとき、定常状態であると仮定すると、次のように書き直すことが出来る。

$$X = \frac{k_1 - k_4}{(k_1 k_3 + k_2 k_4)[E]_0}, \quad Y = \frac{(k_2 + k_3)(k_1 k_4 [S]_0 + k_1 k_3 + k_2 k_4)}{(k_1 k_3 + k_2 k_4)^2}, \quad Z = \frac{k_2 k_4}{k_1 k_3 + k_2 k_4} [S]_0$$

とおくと

$$t = X([S]_0 - [S]) - Y \ln \frac{[S] - Z}{[S]_0 - Z} \quad (3-11)$$

ここで、 $Z' = \frac{1}{[S]_0 - Z}$ とおいて、式 3-11 を整理すると

$$t = X([S]_0 - [S]) - Y \ln \{1 - Z'([S]_0 - [S])\} \quad (3-12)$$

(ただし、 $t \rightarrow \infty$ のとき $Z' < \frac{1}{[S]_0}$)

よって、反応初速度 v_0 は式 3-12 により、以下ようになる。

$$v_0 = \left(\frac{d[S]}{dt} \right)_{t=0} = \frac{1}{X + YZ'} \quad (3-13)$$

図 3-15 に、培養液に含まれる酵素の活性測定の結果を示している。各図について詳しく述べていく。図 3-15 (a) に、実験に用いた細胞の培養時のデータを

示している。このときの3日目（誘導期）、6日目（対数期）、10日目（定常期）の培養液を酵素活性測定に供した。図 3-15 (b) には、培養液に酵素溶液を加えた場合の測定結果を示している。いずれのサンプルも高い活性が認められた。これは、培養液に酵素が存在し、かつ本研究で定めた実験方法および条件を満たせば酵素反応が起こることを示している。最後に、図 3-15 (c) に培養液の酵素活性測定の結果を示す。図より、3日目、6日目、10日目の順で活性が高くなっていった。とくに10日目では、これに該当する図 3-15 (a) の培養液の糖取込み速度がほぼ 0 (g/l)/day であるのに対して、(c)での初速度は約 50 (g/l)/day であった。これは、10日目の培養液では、すでにスクロースが消費されてしまっているため糖取込み速度はほぼ 0 になってしまっているが、培養液には酵素が相当量含まれていたことを示している。

以上のことより、スクロース培養液中にインベルターゼの存在を確認でき、その酵素活性を測定することが出来た。なお、図 3-15 (b)および(c)では上記の式 3-12 でフィッティングを行い、そのパラメータを用いて式 3-13 より初速度を求めたものを、後述する表 3-11 に示している。

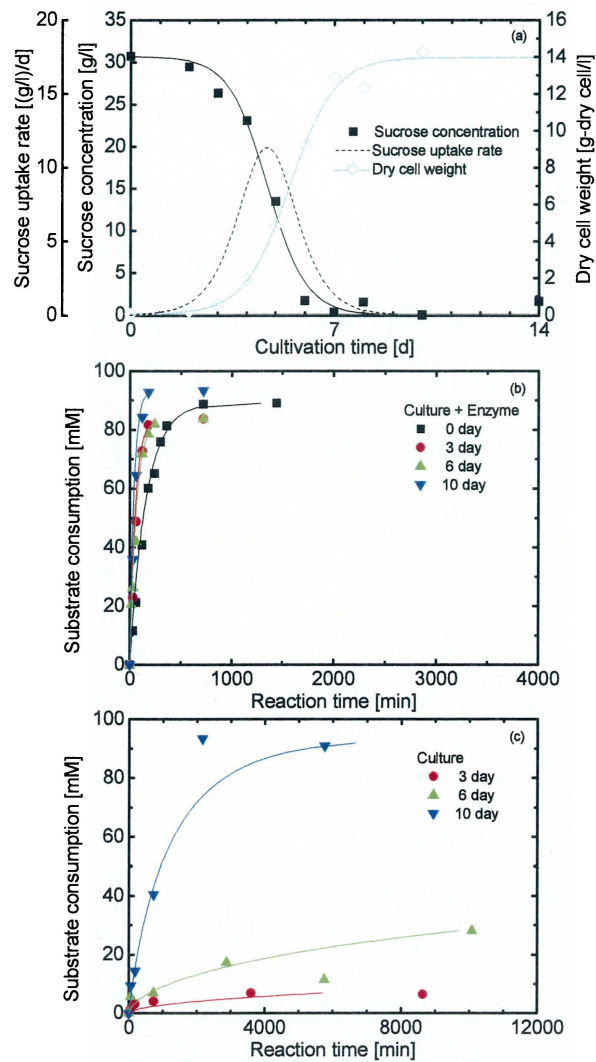


図 3-15 培養液に含まれる酵素の活性測定 (スクロース)
 (a) スクロース濃度, 細胞濃度および糖取り込み速度の経時変化,
 (b) 培養液+酵素の活性測定, (c) 培養液の活性測定

Fig. 3-15 Enzyme assay (Suc).

(a) Time courses of sucrose uptake rates, sucrose concentration and dry cell weight during sucrose cultivation.

(b) Time courses of substrate consumption in the sucrose culture medium filtered and the invertase during incubate.

(c) Time courses of substrate consumption in the sucrose culture medium filtered during incubate.

(b) マルトース培養液に含まれるマルターゼの活性

スクロース培養液と同様にして、マルトース培養液に含まれるマルターゼの活性の測定を試みた。図 3-16 に、培養液に含まれる酵素の活性測定の結果を示している。先ほどと同様にして、各図について述べていく。まず、図 3-16 (a) に、実験に用いた細胞の培養時のデータを示している。このときの 14 日目（誘導期）、19 日目（対数期）、28 日目（定常期）の培養液を、酵素活性測定に供した。図 3-16 (b) には、培養液に酵素溶液を加えた場合の測定結果を示している。いずれのサンプルも高い活性が認められ、培養液に酵素が存在し、かつ本研究で定めた実験方法および条件を満たせば酵素反応が起こることを確認できた。最後に、図 3-16 (c) に培養液の酵素活性測定の結果を示す。図より、いずれの培養液もほとんど活性がなかった。最も大きかった 19 日目の培養液でさえも、スクロースで最も低かった 3 日目の活性よりはるかに低かった。

表 3-11 に、各培養液の反応初速度と培養中の糖取込み速度の最大値を比較したものを示す。実験に使用した酵素は、元々の活性能に由来する差はあるものの培養液中でも十分な活性が認められた。また、培養における二糖類の取込み速度は、各増殖期で同様の傾向が認められたが、培養液に含まれている酵素の活性には大きな差があり、Suc 培養の培養液には高い活性が認められたが、Mal 培養のそれにはほとんど活性が認められなかった。したがって、酵素は含まれていても微量である。このことから、細胞膜にマルトーストランスポーターが存在し、マルトースはグルコースにはほとんど分解されずに取込まれていることが示唆された。本研究では、これ以降マルトースは分解されずに取込まれるものとして扱う。

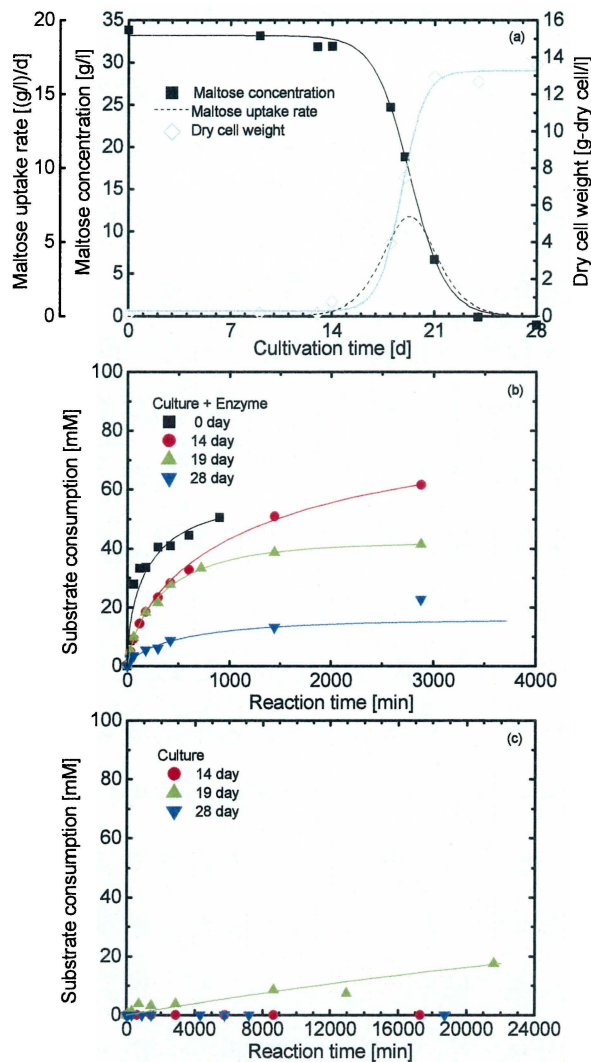


図 3-16 培養液に含まれる酵素の活性測定 (マルトース)
 (a) マルトース濃度, 細胞濃度および糖取込み速度の経時変化,
 (b) 培養液+酵素の活性測定, (c) 培養液の活性測定

Fig. 3-16 Enzyme assay (Mal).

(a) Time courses of maltose uptake rates, maltose concentration and dry cell weight during maltose cultivation.

(b) Time courses of substrate consumption in the maltose culture medium filtered and the invertase during incubate.

(c) Time courses of substrate consumption in the maltose culture medium filtered during incubate.

表 3-11 酵素反応における初速度と培養時の糖取込み速度の比較
 Table 3-11 Initial velocity (v_0) of the enzyme assays and disaccharide uptake rate during cultivation using the sucrose and maltose culture media.

Kind of cultivation	Cultivation period	Culture+Enzyme Initial velocity v_0 [(g/l)/d]	Culture Initial velocity v_0 [(g/l)/d]	Disaccharide uptake rate [(g/d)/d]
Sucrose cultivation	0 day	293	-	-
	3 days	799	9.89	3.10
	6 days	668	20.22	5.06
	10 days	1204	49.38	0.02
Maltose cultivation	0 day	43.8	-	-
	14 days	57.9	0.00	0.50
	19 days	74.6	0.51	5.12
	28 days	75.7	0.00	0.06

(3) 動的糖代謝挙動特性の比較

Mal 培養における動的糖取込み挙動について比較していく。二糖類の中でも、スクロースとトレハロースは単糖類に分解されてから、逆にマルトースは分解されずに取込まれることが分かった。また、ラクトースについては代謝されなかった。ここで、分解される糖の場合についての糖消費速度の求め方を、スクロースを例に示す。

スクロースの濃度変化だけでは、各単糖類の消費量が分からないので、それらの消費速度を求めることは困難である。そこで速度を求めるためには、グルコース、フルクトースの糖消費量を求める必要がある。糖消費量は以下のようにして求めた。まず、スクロースはほとんどがそのままの形では細胞に吸収されず、一度グルコースとフルクトースに加水分解されるため、スクロースの全減少濃度の約半分をグルコース、もう半分をフルクトースの生成濃度と仮定する。つぎに、この生成濃度と測定より求めたグルコース、フルクトース濃度の差を求め、最後に初期のグルコース、フルクトース濃度を加えることで算出した。式 3-14 に糖消費量の算出式を示す。

$$W_{sugar} = C_{sugar,ini} + (C_{suc,ini} - C_{suc}) \cdot \frac{M_{sugar}}{M_{suc}} - C_{sugar} \quad (3-14)$$

ここで、添字の *sugar* はグルコースあるいはフルクトースを表し、*suc* はスクロースを、さらに *ini* は初期値を表す。そして、*W* は添字の糖消費量 [g/l] を、*C* は添字の糖濃度 [g/l] を表し、*M* は添字の分子量 [-] を示している。トレハロースの場合も、グルコース 2 分子に分解されるだけで求め方は同様である。

図 3-17 に、Suc 培養における細胞のグルコース、フルクトースの消費量と Tre 培養におけるグルコースの消費量を示す。Suc 培養におけるグルコース、フルクトースの総消費量は、ほぼ同じ値となっている。また、Tre 培養におけるグルコースの消費量は約 30 g/l となっている。ここでも、糖消費量の変化を解りやすくするため、式 3-1 を用いて各糖消費量のフィッティングを行った。図 3-17 と前述の図 3-10 の結果を元に、二糖類における糖消費量のフィッティングパラメータを細胞濃度の結果と併せて、表 3-12 から表 3-14 にそれぞれ示す。ボルツマン関数を用いることで、いずれの場合の糖消費量の経日変化も高精度でフィッティングすることができた。

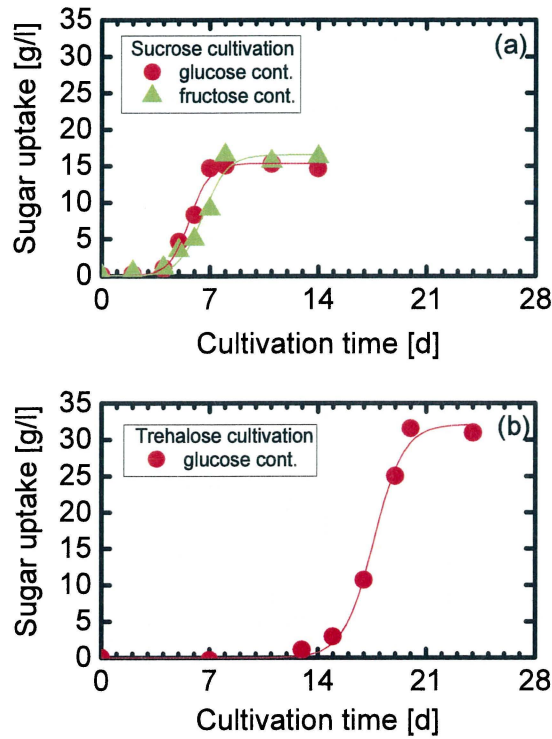


図 3-17 糖消費量の経日変化
(a) Suc, (b) Tre

Fig. 3-17 Time courses of monosaccharide uptake rates during (a) Suc and (b) Tre cultivation.

表 3-12 フィッティングパラメータ (Suc)
Table 3-12 Fitting parameters (Suc).

		初期濃度	最終濃度	変曲点	きざみ	相関係数	速度定数
		(Initial cont.)	(Final cont.)	(Inflection point)	(Time const. ticking)	(Correlation coefficient)	(Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
No.1	Glc	0.170	14.788	5.212	0.649	0.996	-0.105
	Fru	0.225	16.537	5.839	0.617	0.999	-0.099
	Cell	0.067	13.299	5.206	0.695	0.997	-0.109
No.2	Glc	0.546	15.920	6.070	0.975	0.991	-0.067
	Fru	0.155	16.736	6.861	0.893	0.968	-0.068
	Cell	0.047	13.974	5.477	0.774	0.995	-0.093
No.3*	Glc	0.094	15.324	5.697	0.646	0.990	-0.102
	Fru	0.053	16.529	6.559	0.779	0.974	-0.078
	Cell	0.029	14.019	5.414	0.741	0.993	-0.096

表 3-13 フィッティングパラメータ (Tre)
Table 3-13 Fitting parameters (Tre).

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
No.1	Glc	0.053	31.785	15.302	0.730	0.993	0.043
	Cell	0.076	15.253	14.636	0.844	0.987	-0.078
No.2*	Glc	0.022	14.521	17.031	0.992	0.992	-0.070
	Cell	0.029	32.069	17.626	0.959	0.995	0.033

表 3-14 フィッティングパラメータ (Mal)
Table 3-14 Fitting parameters (Mal).

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
No.1	Mal	31.558	0.084	19.877	1.487	0.989	0.021
	Cell	0.092	14.895	19.729	1.389	0.999	-0.049
No.2*	Mal	32.820	0.085	19.334	1.194	0.998	0.026
	Cell	0.303	13.264	18.783	0.776	0.997	-0.099
No.3	Mal	31.770	0.017	17.984	0.960	0.988	0.033
	Cell	0.078	14.012	17.841	1.164	0.993	-0.062

* 図 3-7, 3-10, 3-17 のデータ (The data (*) of Fig. 3-7, 3-10 and 3-17.)

これらのパラメータをもとに簡単に糖消費速度を求め、式 3-7 より比糖消費速度が求めることができる。一方単糖類でも、これまでの結果よりスペクトルに変化がないことから、そのままの形で取込まれていると考えられた。したがって、得られたパラメータ (表 3-5~3-8) により、こちらも糖消費速度から比糖消費速度が求めることができる。

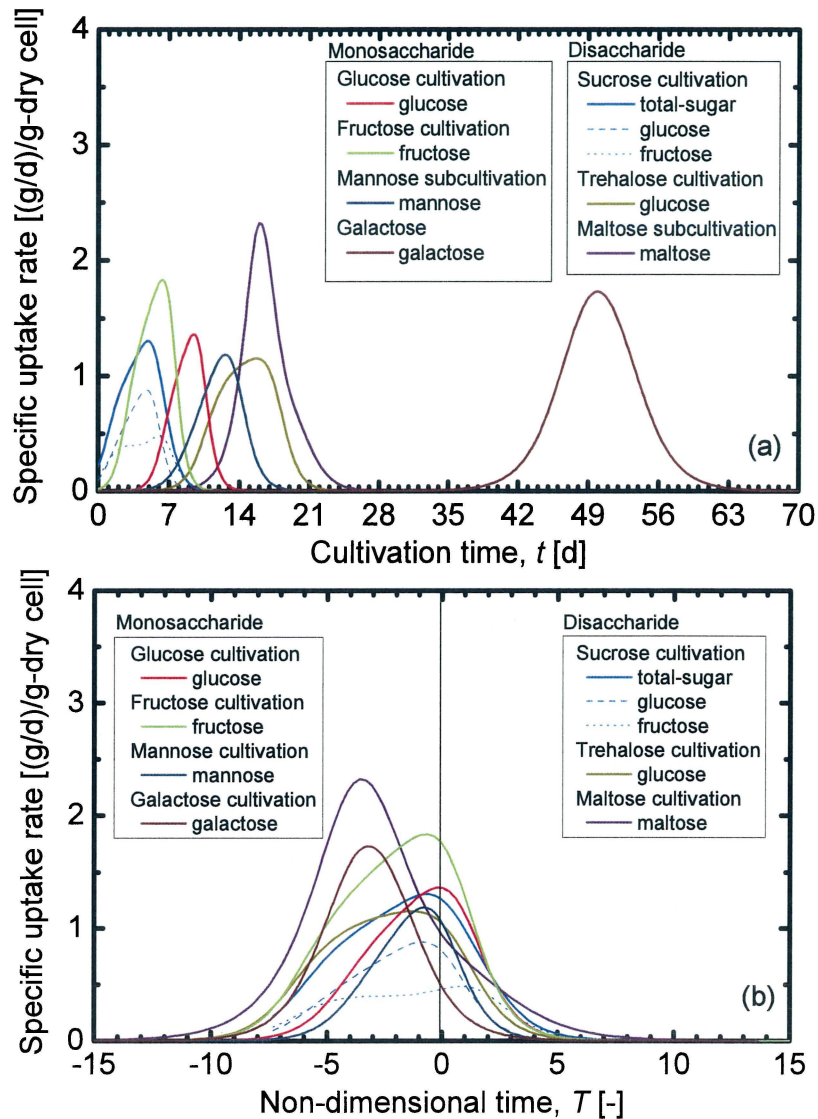


図 3-18 単糖類および二糖類の比糖消費速度の比較
(a) 実時間, (b) 無次元時間

Fig. 3-18 Specific uptake rates. (a) Time courses of specific uptake rates of sugar, and (b) Non-dimensional time courses of specific uptake rates during mono- and di-saccharide cultivation.

図 3-18 (a) に、各糖での培養における比糖消費速度の比較を示す。比糖消費速度のピーク時期が各培養系で大きく異なっていることから、糖の種類によって動的糖代謝挙動が異なっていることが分かる。しかし、それらは糖代謝が早いグループと遅いグループに分類することができた。早いグループでは Suc 培養 (5 days) を始めとして、Fru 培養 (6 days), Glc 培養 (9 days) が分類でき

る。これらは、植物細胞には炭素源としてよく使われる糖で、糖代謝経路の中でも重要な成分である。一方、遅いグループは、Man 培養 (13 days), Tre 培養 (15 days), Mal 培養 (16 days), Gal 培養 (50 days) が挙げられる。とくに、Gal 培養のピークは極めて遅く、2 番目に遅い Mal 培養と比較しても 3 倍以上の差があった。これらの糖は、細胞内外にある分解あるいは転移酵素で上記 3 つの成分 (リン酸化や UDP 化されたもの等を含む) のどれかに変換されなければ、細胞にとって炭素源とはならないと思われる。そのため、代謝に必要な酵素群の活性が重要になるのではないかと考えられる。

二糖類であるスクロースとトレハロースの培養では、TBY-2 細胞は単糖類に加水分解してから消費していた。Suc 培養における比糖消費速度のピークは、その構成糖である Glc および Fru 培養双方と比べても早かった。一方、Tre 培養におけるそれは、Glc 培養と比べて逆に遅いという結果が得られた。また、グルコースとフルクトースが同時に存在する場合、すなわち、Suc 培養においてグルコースがフルクトースより優先的に取込まれていた。しかし、Glc 培養と Fru 培養を比較すると、Fru 培養のほうがピークは早かった。

つぎに、図 3-18 (b) に無次元時間軸で表現した結果を示す。この横軸は、図 3-13 (b) で用いたものと同様である。この無次元時間軸で比較すると、各ピークの T 値は、すべてマイナスであった。これは、培地の糖成分に関わらず、細胞は糖を消費してから増殖することを示している。とくに、Mal と Gal 培養は他と比べて中心から大きく離れており、糖取込み挙動が始まってから細胞増殖に至るまでのタイムラグが長いことを示している。これは、炭素源として用いるために複雑なプロセス (酵素による分解や変換) を要するためであると考えられる。

このように、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することで、TBY-2 細胞の動的糖代謝挙動を解析することができた。さらに、これらの値により無次元時間軸による解析も可能になり、動的糖代謝挙動に関するさらなる知見が得られた。これ以降、上記の方法を用いて動的糖代謝挙動を解析していく。

3-4. 2種類の糖で培養したときの動的糖代謝挙動

つぎに、培地の炭素源を、グルコースを含む2種類の糖にして、TBY-2細胞を培養した場合について論じていく。

3-4-1. 培養液スペクトル

図3-19に、混合糖で培養したときの培養液スペクトルの経日変化を示す。(a)はGlc+Fru培養、(b)はGlc+Man培養、(c)はGlc+Gal培養である。それぞれ、培養の進行とともに指紋領域における吸光度が減少しており、糖が消費されていることが分かる。とくに、二糖類であるLac培養では糖消費が認められなかったが、それを構成するGlc+Gal培養では代謝されることがわかった。このことから、TBY-2細胞はラクトースを直接取込むトランスポーターやラクトースを分解するラクターゼ(Lactase (E.C. 3.2.1.23))を持たないことを示している。また、スペクトルはいずれも僅かながらパターンの変化を伴って減少していた。これは、培地中に2種類の糖が含まれているが、消費される時期や速度がそれぞれの糖で異なっていることを意味している。培養後期には、1種類の糖の培養でも見られたエタノールに由来するピークが認められるものもあった。

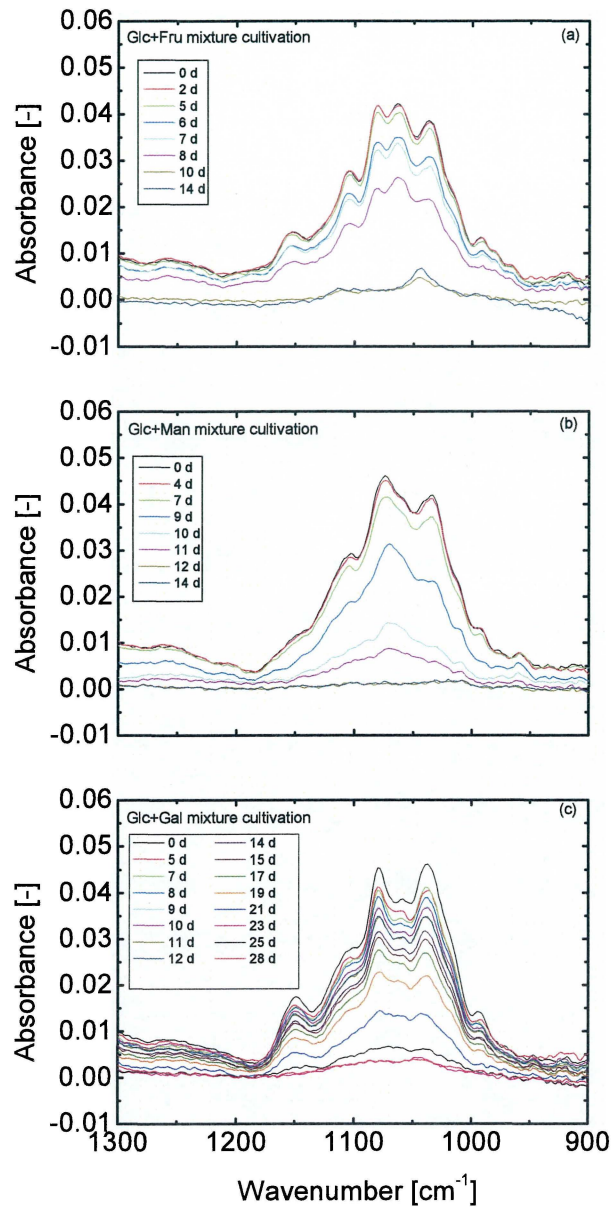


図 3-19 培養液成分の赤外スペクトル（混合糖）
(a) Glc+Fru, (b) Glc+Man, (c) Glc+Gal

Fig. 3-19 Time behavior of ATR spectra of the medium during (a) Glc+Fru, (b) Glc+Man, and (c) Glc+Gal cultivation.

3-4-2. 糖およびエタノール濃度の経時変化

図 3-19 で得られた培養液スペクトルをもとに、図 3-20 に混合糖で培養したときの各成分の経日変化を細胞濃度の変化と共に示す。いずれの培養も二糖類の構成糖であり、代謝の基点でもあるグルコースを組み合わせているが、すべての培養においてグルコースが優先的に消費されていることが分かった。図 3-19 で見られたスペクトルパターンの変化は、これが原因と思われる。また、これらの培養についても他と同様に、糖および細胞濃度の変化を、ボルツマン関数で精度よくフィッティングできた。パラメータについては表 3-15 に示す。

各培養で詳しく見ていく。Glc+Fru 培養と Glc+Man 培養のグルコースの消費時期はほぼ同じであった。しかし、フルクトースやマンノースの消費は、単独の培養のときと大きく異なっていた。一方、Glc+Gal 培養では、グルコースの消費が培養初期から始まっているものの、非常に長期間緩やかに継続していた。これは、きざみである w 値が約 4.0（他はほとんどが 1 以下）であることからわかる。細胞量もこれに沿うように、長期にわたってゆるやかに増加していた。この挙動は、他の培養系とは極めて異なる挙動である。

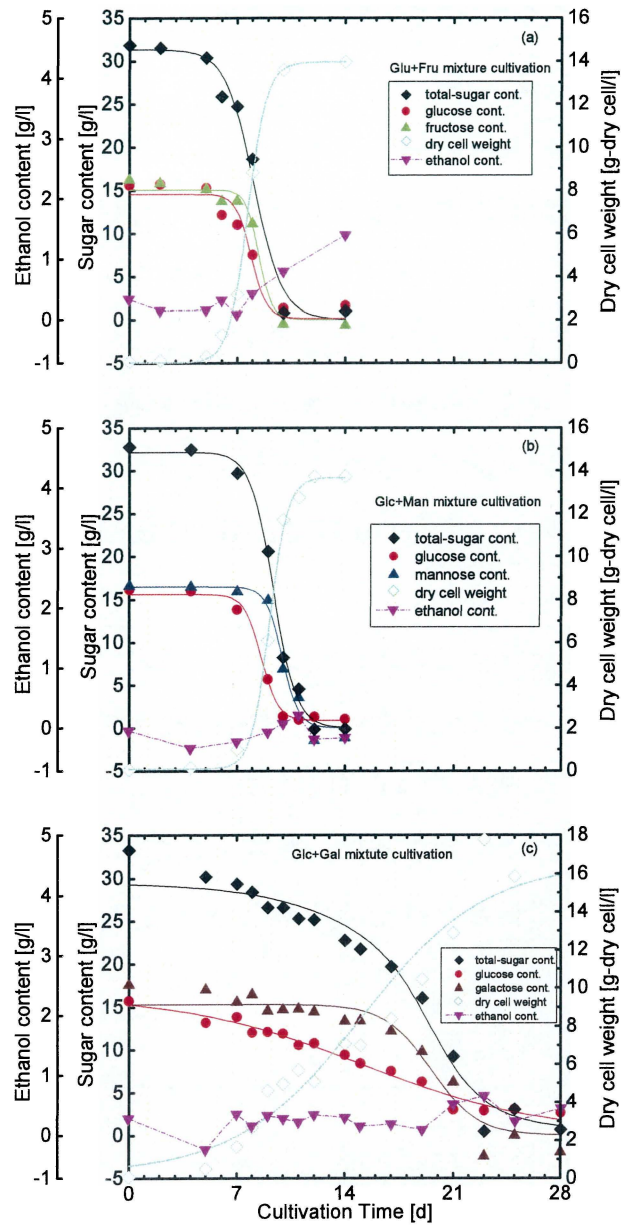


図 3-20 培養液成分と細胞濃度の経日変化 (混合糖)
 (a) Glc+Fru, (b) Glc+Man, (c) Glc+Gal

Fig. 3-20 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Glc+Fru, (b) Glc+Man, and (c) Glc+Gal

表 3-15 フィッティングパラメータ (混合糖)
Table 3-15 Fitting parameters (Mixture-sugar).

	初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
	W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
Glc	14.559	0.159	7.899	0.500	0.946	0.139
Glc+Fru	Fru 15.076	0.070	8.395	0.417	0.984	0.160
Cell	0.021	13.959	7.689	0.621	0.999	-0.115
Glc	15.785	0.764	8.500	0.651	0.995	0.102
Glc+Man	Man 16.493	0.037	9.937	0.528	0.980	0.115
Cell	0.289	13.647	9.119	0.551	0.998	-0.136
Glc	14.229	0.226	16.793	4.007	0.959	0.018
Glc+Gal	Gal 15.297	0.010	19.585	1.498	0.943	0.044
Cell	0.084	15.866	14.800	4.031	0.941	-0.016

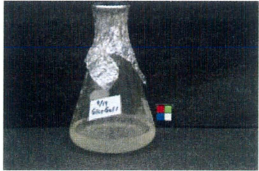




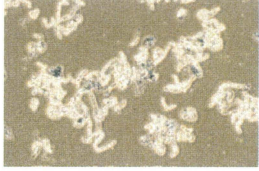
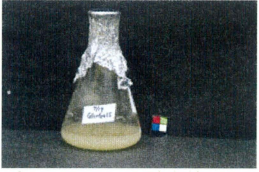

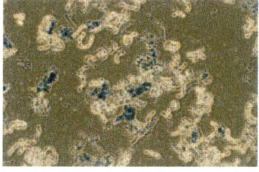

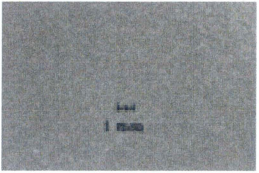
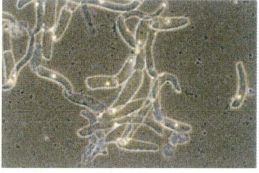

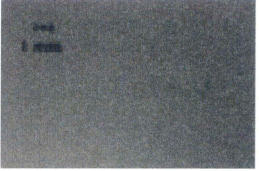

3-4-3. 動的糖代謝挙動特性

(1) 細胞増殖

TBY-2 細胞では、一般的に均一に増殖することが知られている。ところが、3-3-3 で紹介したように Gal 培養では細胞は凝集しながら増殖した。そこで、ガラクトースが含まれている Glc+Gal 培養を中心に、混合糖培養での細胞増殖について検証した。

表 3-16 に、細胞培養時の写真を示した。表より、ガラクトースを含まない培養では、凝集せず均一に増殖していた。一方、ガラクトースを含む培養の時は、Gal 培養と同様に細胞塊が確認できた。これは、誘導期から見られ、凝集を伴いながらの増殖していることが分かる。さらに塊内部では、トリパンブルーで染色されている部分が散見され、糖分が内部まで届かず飢餓状態に陥っていることも示唆された。

表 3-16 細胞増殖の経時変化の写真 (混合糖)
 Table 3-16 Photographs of the TBY-2 cells (mixture-sugar).

	Flask	Close up	Microscope
Glc+Gal 7 d			 — 200 μm ×40
Glc+Gal 14 d			 — 80 μm ×100
Glc+Gal 24 d			 — 80 μm ×100
Glc+Fru			 — 80 μm ×100
Glc+Man			 — 80 μm ×100

Glc+Gal 以外は培養終了後の状態を撮影
 (The end of cultivation time except for Glc+Gal cultivation.)

(2) 動的糖代謝挙動特性の比較

図 3-21 (a) に、各糖での培養における比糖消費速度の比較を、図 3-21 (b) に無次元時間軸での比糖消費速度の比較を示した。まず、すべての培地に含まれているグルコースの取込みに着目すると、いずれの場合もグルコースが優先的に取込まれていることが確認できた。しかし、3-3 ではフルクトースを単独で培養した場合（ピーク：6.4 日）は、グルコースで培養した場合（ピーク：9.4 日）よりも早く消費された。また、Suc 培養（ピーク：Glc 4.8 日, Fru 6.0 日）と Glc+Fru 培養（ピーク：Glc 7.4 日, Fru 8.2 日）とを比べると、加水分解を要するはずの Suc 培養の方が早く消費していた。このことから、細胞はスクロースを最も早く認識し、そのつぎにグルコースを優先的に消費することが分かった。

つぎに、Glc+Man 培養（ピーク：Glc 7.6 日, Man 9.6 日）に着目したところ、グルコースの消費パターンは Glc+Fru 培養と類似していた。ところが、これらの T 値を比較すると、Glc+Fru 培養は原点近くにピークがあるが、Glc+Man 培養では大きくマイナス側へずれが生じている。これは、グルコースの消費と細胞増殖の動きにタイムラグが生じているためである。このことから、マンノースが細胞増殖を阻害していることが考えられる。また、マンノースの消費を Glc+Man 培養と Man 培養（ピーク：12.6 日）とで比較すると、Glc+Man 培養のほうがかなり早く消費されていた。グルコースを先に消費し、増殖し始めていたことが何らかの影響をおよぼしていると考えられる。

一方、Glc+Gal 培養の糖代謝挙動は、極めて異なる挙動を示したと言える。グルコースの消費は早い時期から始まるものの、その速度は非常に遅く、長期間におよんでいた。また、ガラクトースも同様の傾向を示した。このような挙動は他では見られない。グルコースは早い時期から取込まれて炭素源として代謝されるため、細胞は増殖していくが、ガラクトースによる強力な阻害作用のため、その速度が遅かったと考えられる。また、ガラクトースの取込みも Gal 単独培養に比べると早くから行われているが、比速度は非常に低く、決してス

ムーズにガラクトースを代謝しているわけではない。細胞は、グルコースによる炭素源の供給を受けているため緩やかに増殖しており、細胞量がある程度存在する状況であるため、比速度は低くても、系全体としては培地中のガラクトース濃度の減少を検出できる程度の取込みが続いたと考えられる。その証拠に、ガラクトースは主に細胞増殖に遅れて消費されている ($T > 0$ で多くの消費が認められる)。また、ガラクトースを炭素源とするには、UDP-Gal を UDP-Glc に変換する UGE の活性が不可欠であるが、この酵素の活性は通常非常に低い [35]。Gal 培養では、糖が取込まれるまで非常に長いタイムラグを必要としたが、培養が長期におよんだことで UGE が活性化され、ガラクトースが急に代謝されるようになったのではないかと述べてきた (3.3.3 (1) を参照)。このときの比 Gal 消費の最大速度は、他の炭素源の培養時と比べても大きく変わらないほど高かったことからそれが推測できる。しかし、Glc+Gal 混合糖培養では、比 Gal 消費速度は培養期間を通じで非常に低かった。このことから、Glc+Gal 混合糖培養での UGE の活性は、終始低い状態にあり、形質発現は起こっていないと考えられる。

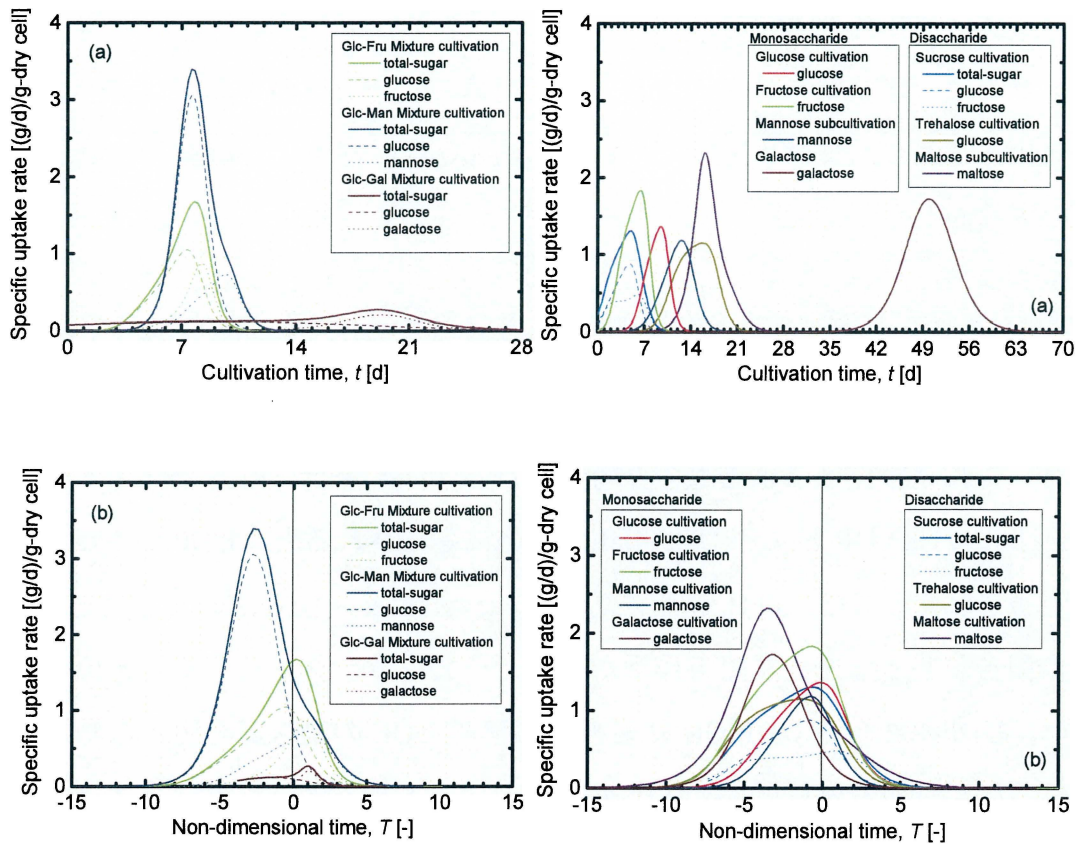


図 3-21 混合糖培養における比糖消費速度の比較 (左)

(a) 実時間, (b) 無次元時間

(参考) 図 3-18 単糖類および二糖類の比糖消費速度の比較 (右)

(a) 実時間, (b) 無次元時間

Fig. 3-21 Specific uptake rates. (a) Time courses of specific uptake rates of sugar, and (b) Non-dimensional time courses of specific uptake rates during mixture-sugar cultivation.

3-5. 本章の結論

本章では、単糖類の分子構造および二糖類の結合形態の差異が、TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響について、FT-IR/ATR 法および酵素活性測定法を用いて検討した。

単糖類では、マンノース [29, 30, 141]とガラクトース [34-36]は植物の生長には毒性を示すといわれていたが、本研究において TBY-2 細胞に消費された。しかし、糖消費および細胞増殖が起こるまで非常に長いタイムラグを要した。これは、生長阻害作用によるものと考えられる。Gal 培養では、ガラクトースが取込まれ、Gal 1-P および UDP-Gal が細胞に蓄積されると、UDP-Glc の生合成が阻害されたり [133, 134], 細胞内の Sucrose synthase を阻害されたりする [139], との報告があるなど生長阻害作用がある。一方、ガラクトースを炭素源とするには、UDP-Gal から UDP-Glc に変換する酵素 UGE の働きが必要になるが、通常はその活性が非常に低い [35]。Maretzki ら [36]は、ガラクトースに適応させたサトウキビ培養細胞では、この酵素活性が 10 倍以上高まったと報告していた。本章での TBY-2 細胞の Gal 培養においても、これらの阻害作用のためおよそ 20 ~30 日間もの長期間、細胞量はほとんど増加しなかったが、培養途中で UGE 活性が高まったことから、ガラクトースを代謝できるようになったと考えられた。また、一般的に TBY-2 細胞は均一に増殖するといわれているが、Gal 培養時のみ、細胞は小さな細胞塊を無数に形成しながら増殖していた。ガラクトースは細胞壁を構成する糖類の一つであり、ペクチン多糖の構成比が細胞間接着力に関与しているとの報告 [32]があるが、Gal 培養を行うことで細胞内の UDP-Glc/UDP-Gal 比が変化し、細胞壁のペクチン多糖の構成比も変化したため、細胞間接着力が強まり細胞凝集がおこったのではないかと推測された。マンノースの代謝メカニズムに関しては、次章での実験結果と共に詳述する。

二糖類について、Suc 培養と Tre 培養では、細胞によって単糖類に加水分解されてから取込まれるが、Mal 培養ではマルトースが分解されれば生成されるはずのグルコースがほとんど検出されなかった。そこで、培養液中のマルター

ゼ活性を測定したところ、マルターゼはほとんど存在していないことが分かった。このことから、マルトースは分解されずマルトーストランスポーターによって直接細胞内に取り込まれていることが示唆された。したがって、本研究では、マルトースは加水分解をされずに直接取込まれると仮定して糖代謝速度の解析を行った。しかし、マルトースの輸送はスクローストランスポーターによって行われる場合がある [54]。今後、このトランスポーターの働きがスクローストランスポーターによるものなのか、Niittylä らがシロイヌナズナで発見した [55] ようなマルトースのみに作用するマルトーストランスポーターによるものなのかを、遺伝子工学的に検証する必要がある。また、ラクトースに関して、TBY-2 細胞は消費しないことも分かった。

本章では、培養液中の成分の定量に FT-IR/ATR 法を用いたが、この方法は瞬時に測定できる方法であるため、経時的なデータを豊富に取得しやすい。そのため、上記の培養実験の結果をもとに、培養液中の糖濃度と細胞濃度の予測モデルとしてロジスティック関数の一種であるボルツマン関数を適用し、比糖消費速度を算出できた。これにより、細胞の糖代謝挙動を経時的な連続データとして扱うことが可能になった。そこで、それぞれの比糖消費速度を比較することで、培地中の炭素源種（単糖類・二糖類）が、TBY-2 細胞の動的糖代謝挙動におよぼす影響を検討した。比糖消費速度のピーク時期に着目すると、Suc 培養（5 日）、Fru 培養（6 日）、Glc 培養（9 日）、Man 培養（13 日）、Tre 培養（15 日）、Mal 培養（16 日）、Gal 培養（50 日）の順であった。このように、培養開始から糖消費が始まるまでのラグタイムが培養によって異なることがわかった。この結果から、糖代謝が早いグループ（Suc, Glc, Fru）と遅いグループ（Tre, Mal, Man, Gal）に分類することができた。早いグループの糖成分は、糖代謝に欠かせない主要な成分で、糖代謝経路の中でも重要な位置を占めているため、細胞にとって炭素源として用いやすかったと考えられる。したがって、このグループでは広義な意味で糖代謝挙動の差異は小さかったと言える。一方、遅いグループの糖成分は、糖代謝までに複雑なプロセスを必要とする成分であるため、細胞はストレス（飢餓）状態であったと言える。これは、取込まれた後の

糖やそれに由来する物質が、阻害作用を引き起こしていると考えられる報告があることから、代謝が停滞状態に陥っていることが類推できる。このような糖類を活用するには構造的な変化 (Suc, Glc, Fru あるいはこれらのリン酸化, UDP 化されたもの等) が必要であり、それに関与する酵素の活性レベルを能動的に高めることで、ストレス状態を解消していたと考えられる (Tre は取込み前の分解酵素が関与)。このとき、ストレス状態を伝達し、必要な酵素の活性レベルを高めるなどの対応に時間を要していると思われる。すなわち、この挙動は、糖認識→糖取込み→糖シグナル→糖代謝とつづく糖代謝機構の中で、糖取込み、あるいは糖シグナル部分に遅延が起きていると考えられた。

つぎに、細胞増殖を基準とした無次元時間軸で比較すると、すべての培養で共通の特徴が認められた。それは、増殖の前に糖を消費し、また細胞増殖に少し遅れてエタノール濃度が増加するという特徴である。さらに Mal 培養と Gal 培養では、糖を消費してから細胞増殖が起こるまでに要する時間が、他の培養と比べて長いという特徴もわかった。

このように、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することで、動的糖代謝挙動を解析することができた。さらに、これらの値から無次元時間軸による増殖ステージをそろえた解析も可能にし、動的糖代謝挙動に関するさらなる知見が得られることが分かった。これ以降における動的糖代謝挙動の解析にも、上記の解析手法を用いることとする。

以上の結果を踏まえた上で、混合糖 (Glc+Fru, Glc+Man および Glc+Gal) 培養も試みた。すると、全ての場合でグルコースが優先的に取込まれていることが分かった。また、Glc+Fru 培養, Glc+Man 培養ではグルコースの消費のピークのタイミングがほぼ同じであった (Glc+Gal 培養は他と極めて異なる挙動であったため判然としない)。Fru 単独では Glc 培養より早く消費され、Man 単独ではかなり遅くなっていたが、グルコースを含む混合糖での培養をすることで、フルクトースは消費が遅れ、マンノースは逆に早まった。また、グルコース自身は単独での培養より、他の糖との混合培養の方が消費のピークが早まった。Gal 培養では、細胞の凝集塊が見られたが、Glc+Gal 培養でもそれは確認できた。

しかし、グルコースの存在により糖消費および細胞増殖が早くから開始されるが、その速度は非常に低かった。これは、細胞に炭素源としてグルコースが供給されたため、細胞量も増加したが、ガラクトースによる強力な阻害作用により、速度は低かったと考えられた。またガラクトース代謝は、比速度が非常に低い状態であったものの、細胞量の増加に伴い、系全体としては消費量が増加したため消費開始が Gal 培養より早くなったと思われる。しかし、比速度は Gal 培養のように長いタイムラグの後上昇することではなく、培養期間を通じてほとんど変化しなかった。これは、UGE の活性化が起きなかったことを示唆している。このように、ガラクトース存在下では、代謝系に変化が起こり、グルコースの取込みやそれ以降の経路に何らかの影響をおよぼしている可能性が大きい。ガラクトースは、認識糖や細胞壁多糖の構成糖などの役割が知られ、一般的には炭素源としての役割はあまり報告されていない。しかし、培養条件によっては炭素源になり得るが、その一方で、細胞の凝集を伴うことも分かった。これは、標準状態では炭素源としての働きが小さいことを示唆している。しかし、炭素源として活用される場合は、ガラクトースが関与する他の働き（細胞骨格の形成）に大きな影響をおよぼすものと思われる。

マンノースやガラクトースの阻害作用に関しては、これまで紹介してきたように様々な報告があるが、本研究の培養条件における代謝の阻害作用のメカニズムや実際の代謝経路などを、今後、実験を通じて（関連する酵素の活性レベルの確認など）検証していく必要がある。また、Lac 培養では代謝されなかったが、それを構成している Glc+Gal 培養では糖は消費され、TBY-2 細胞はラクトースを直接取込むトランスポーターやラクターゼを有していないことが示唆された。

これらのことから、糖代謝の起点であるグルコースを含む混合糖で培養するとグルコースが優先的に代謝されることが分かった。しかし、糖代謝を阻害するような成分と培養を行うと、グルコースの代謝や細胞増殖にも大きな影響をおよぼす場合があることがわかった。このように、混合糖培養から興味深い成果が得られた。また、増殖阻害作用が強い糖での培養では、増殖速度が遅すぎ

てその挙動を把握しにくかったが、グルコースと混合培養することで炭素源が供給され細胞濃度が高まったことで、結果として阻害作用の強い糖の動きが把握しやすくなった。このことから、増殖阻害作用の強い糖では、初期細胞濃度の設定を上げて培養実験を行うことで、新たなことがわかるかもしれない。

以上のように、FT-IR/ATR 法および酵素活性測定法を用いて、単糖類の分子構造および二糖類の結合形態の差異が、TBY-2 細胞の動的糖代謝挙動におよぼす影響について把握することができることが示唆された。

しかし、本章で用いた供試細胞は 3-2 で示したように、いずれも Suc 培地で継代培養されたものである。このことが、糖代謝挙動に影響していることも考えられるが、この点については、次章で詳しく検証していく。

また、本章での問題点もあった。Gal を含む培地の培養では、細胞が凝集することは何度も述べた。このときも、細胞量は濁度で算出しているが、細胞塊内部ではトリパンブルー染色により死細胞も散見されていた。濁度による細胞濃度算出では、細胞の生死まで考慮できないため、単位細胞量あたりの速度である比速度の算出が正確ではない（低い値になる）恐れがある。さらに、細胞が凝集する理由として、細胞壁中のペクチン多糖の構成比が関与していると推測したが、今後それを確かめていく必要がある。

4章. 前培養条件が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響

4-1. 本章の目的

3章では、培地中の炭素源種について着目し、標準状態の TBY-2 細胞の単糖類や二糖類の動的糖取込み挙動について糖代謝の速度論的な解析を行った。その結果、糖成分によって糖代謝挙動が大きく異なるばかりか、ガラクトースのように細胞が凝集するような変化も認められた。このことから、TBY-2 細胞で形質発現が起こり、糖認識機構その他に変化があらわれている可能性が示唆された。しかし、このような糖代謝挙動の変化が起こる具体的な環境・条件は詳しく検証されていない。

そこで本章では、前培養条件（糖成分、培養期間）が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響を検討する。赤外分光法を援用して、具体的には、前培養の糖成分を標準のスクロースと異なる糖を用いて、本培養ではその糖での培養と Suc 培養を比較して、糖代謝挙動の変化を確認する。これは、スクロースで継代培養されていることでスクロースに適応している細胞を、異なる糖で前培養することで、糖取込み挙動から糖代謝挙動に変化が起こるかを確認するためのものである。また、前培養期間も誘導期、対数期、定常期の3種類設定し、前培養期間がおよぼす影響もあわせて検証していく。以上のことから、本章では、前培養によって形質発現させた TBY-2 細胞の炭素源に対する応答を把握することを目的とした。

4-2. 実験試料および方法

4-2-1. 実験試料

本章で使用する供試細胞は TBY-2 細胞で、供試培地は MS 培地を基本とする。培地の炭素源として採用する糖は、基本となるスクロース、単糖のグルコースとそのエピマーであるマンノース、ガラクトース、五員環のフルクトースとし

た (表 3-1 参照). 培地の糖濃度は, 単糖類の場合は 31.58 g/l, 二糖類であるスクロースのみ 30.00 g/l とする. 細胞および各試料の詳細は 2 章に紹介している.

4-2-2. 実験方法

(1) 細胞培養

MS 培地を基本として, 前培養用および本培養用の培地を準備し, 表 4-1 で示した培養条件にしたがって TBY-2 細胞を培養した. 培地調製および培養方法については 2 章に述べたとおりである. 培養から測定までの手順を以下に示す.

まず, 継代培養されている TBY-2 細胞を遠心分離 (1000 rpm., 1 min, 3 回) で洗浄し, 4 種類 (Glc, Fru, Man, Gal) の糖で前培養を行う. 前培養期間は, 誘導期, 対数期, 定常期に対応する 3 つの期間をそれぞれで設定する. これは, 前培養を行いながら増殖状況を確認して決定した. 一定期間培養後の培養液を, 複数の滅菌済み試験管にサンプリングし, 遠心分離 (1500 rpm, 1 min, 3 回) で洗浄した. 洗浄液には 2 章と同様, 高压滅菌済の糖を含まない MS 培地を用いた. 誘導期や対数期の培養液には, 細胞があまり含まれていないため, 多めに試験管を準備する必要がある. つぎに, 複数の試験管の培養液を一つにまとめて, 必要量の細胞を集める. その後, 細胞濃度を確認してから, 試験管を静置して細胞を沈殿させ, 上澄み液を取り除いて細胞濃度を調製 (約 12 g-dry cell/l) する. 調製した培養液 1.5 ml を, 本培養の培地にそれぞれ接種する. 本培養で用いる培地は, 前培養で用いた糖と同じ糖の培地と Suc 培地の 2 種類ずつで 8 種類, さらに前培養では前述したように, 培養期間を 3 種類設定しているので計 24 種類ある. 各成分の測定のため, 2 および 3 章と同様に, 接種直後と一定期間培養後の培養液からサンプリング (20~30 ml 程度) し, 可視分光法を用いて OD から細胞濃度を (詳細は 3-2-3), 培養液のろ液から FT-IR/ATR 法を用いて培養液スペクトルを測定し, 糖およびエタノール濃度を算出した. 図 4-1 に細胞培養および測定手順, 図 4-2 に前培養と本培養の概略図を示す.

なお, 3 章と同様に培養液を顕微鏡で観察し, 取り付けたデジタルカメラで

撮影した。この際、細胞の生死を判別できるトリパンブルー液で染色し、細胞の状態を確認した。また、シャーレに培養液を入れて接写写真を、さらに、培養している三角フラスコの写真も測定時に合わせて撮影した。

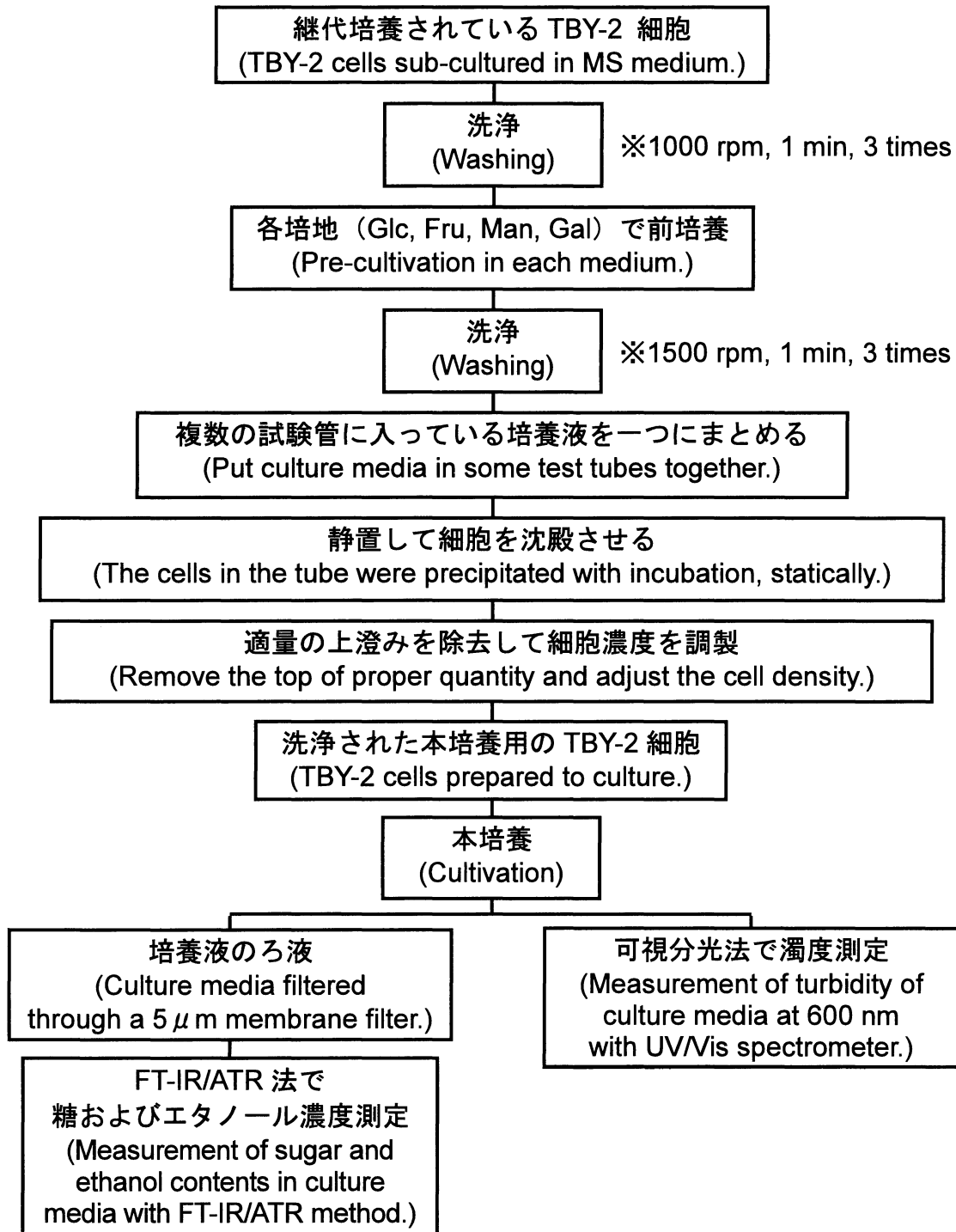


図 4-1 細胞培養および測定手順
Fig. 4-1 Experimental protocol.

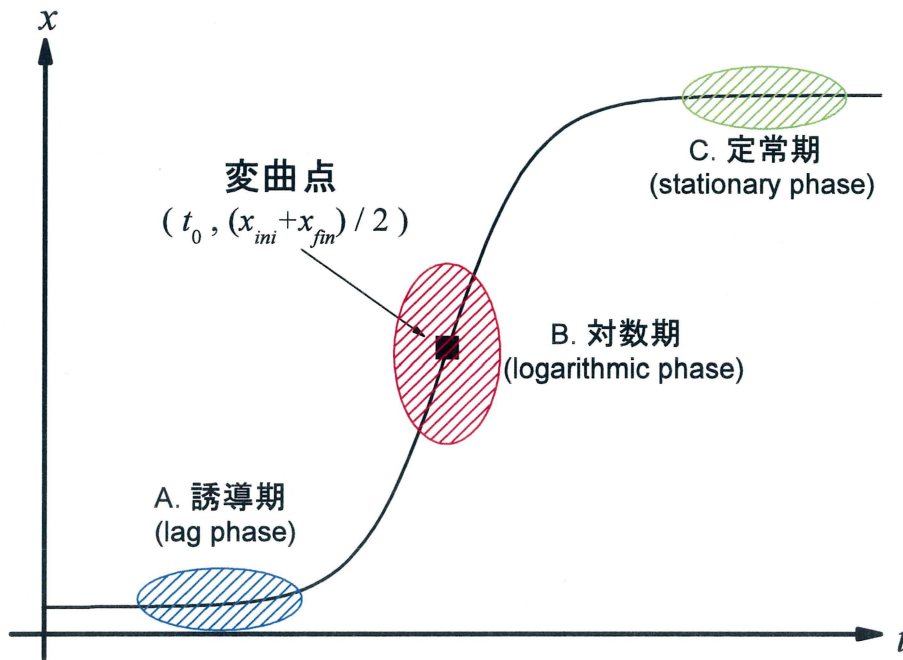
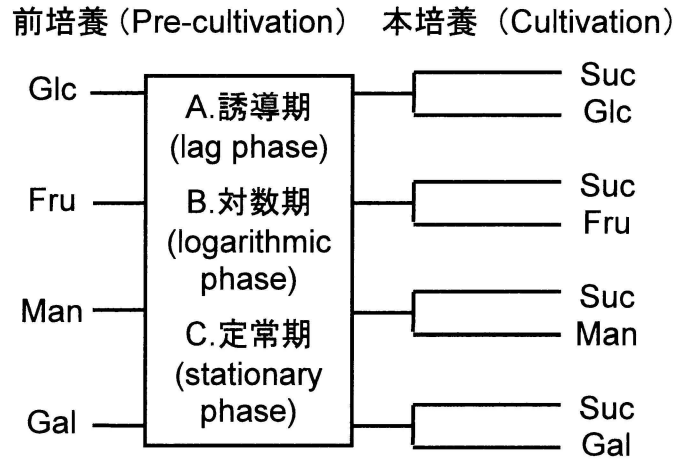


図 4-2 前培養と本培養

Fig. 4-2 Pre-cultivation and cultivation.

表 4-1 培養条件
Table 4-1 Culture conditions.

	Pre-culture	Culture
Temperature	298 K (25 °C)	
Light	Dark	
Shake	Rotary shaking (150 rpm)	
Sugar	Glc, Fru, Man, Gal	Suc, Same type sugar in pre-culture medium
Volume of medium	95 ml	
Volume of inoculums	1.5 ml	
Cultivation period	According to the cases	

(2) 糖, エタノールおよび細胞濃度の定量法

(a) 赤外分光法

細胞培養でサンプリングした培養液の成分定量には, 2 章でも採用した赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) を用いる. 測定方法も, 2 章に詳細を述べたとおりである.

(b) 可視分光法

細胞量は可視分光法より求めた. 測定方法は 3 章で詳細に記している.

4-3. 前培養の糖成分が動的糖代謝挙動におよぼす影響

4-3-1. グルコースによる前培養

2 章で示した MS 培地での各成分の検量線を用いて, 培養液スペクトルから各成分を定量した. 図 4-3 にグルコースで培養したときの糖, エタノールおよび細胞濃度の経日変化を示す. この培養を前培養とし, 図中の青, 赤, 緑で示した地点, すなわち, 2 日後, 10 日後, 14 日後の培養液をサンプリングし, 図 4-1, 4-2, 表 4-1 にしたがって本培養に供した.

図 4-4 (a) に Suc 培養したときの, (b) に Glc 培養したときの比糖消費速度の比較を示す. 図中の A, B, C は, それぞれ前培養時の誘導期, 対数期, 定常

期を指している。スクロースで前培養をした場合（標準）と比較すると、Suc 培養した場合、B のみグルコースとフルクトースの消費時期の差が他よりも大きかった。Glc 培養を行うと、標準と比較して A ではやや早まるものの、B でかなり遅れる（約7日）ことが分かった。

図 4-5 (a) に Suc 培養したときの無次元時間軸における比糖消費速度の比較を示した。図より B のみグルコースではピークの T 値がマイナス (-3, 他は -1 程度) に、フルクトースではプラスにと、大きく離れていることが分かった。

図 4-5 (b) に Glc 培養したときを示す。図より、C のみピークの T 値がプラスになっていたが、全体的に 0 付近にピークが位置していた。

以上のことから、グルコースで前培養した場合、Suc 培養するとグルコースの認識が早まりフルクトースは逆に遅くなったこと、Glc 培養したときは、消費はやや遅れ、しかも C では糖消費よりも増殖が先に行われることが分かった。また、実時間で見ると B の結果は他と大きく異なる。これは、糖取込みおよび増殖が活発に行われている対数期において様々な変化が起こっていることを示唆していると考えられる。

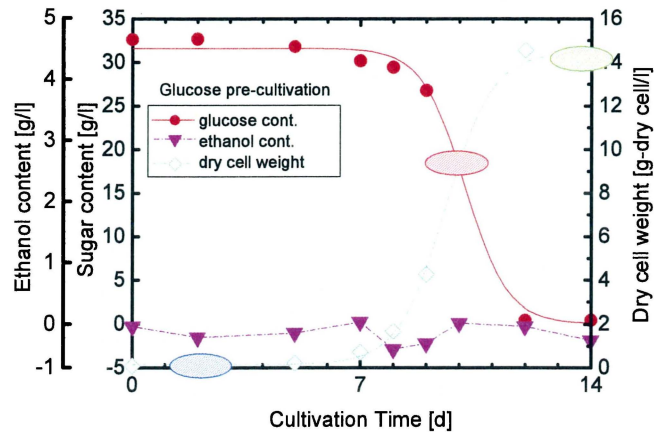


図 4-3 培養液成分および細胞濃度の経日変化 (Glc 前培養)

Fig. 4-3 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during glucose pre-cultivation.

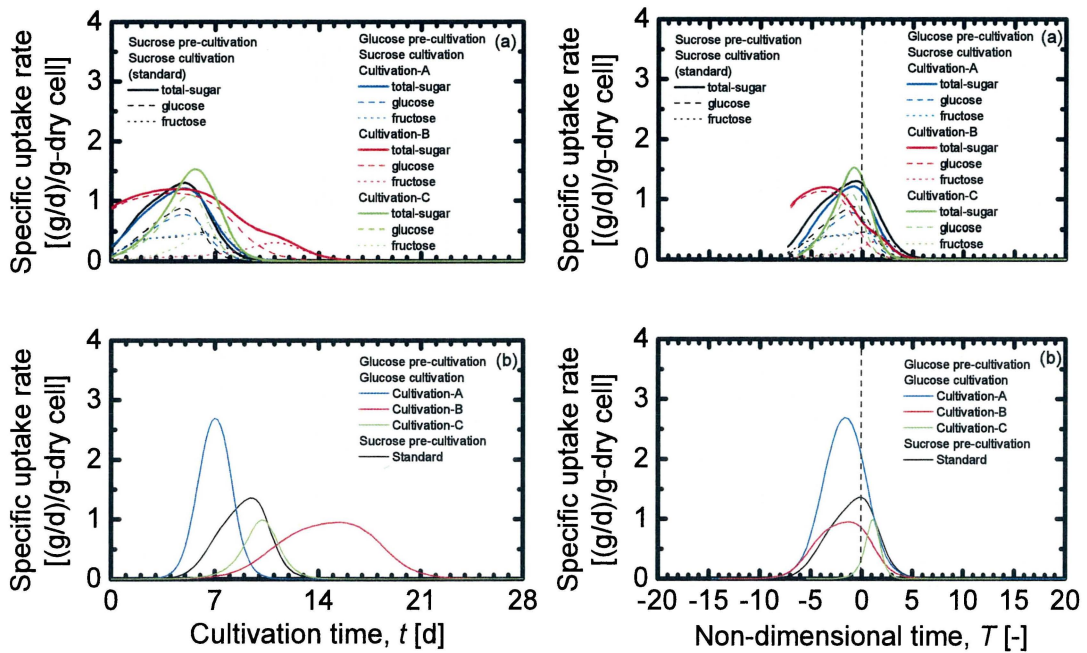


図 4-4 Pre-Glc 培養時の比糖消費速度の比較 (実時間)

(a) Suc, (b) Glc

Fig. 4-4 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc and (b) Glc cultivation after Glc pre-cultivation.

図 4-5 Pre-Glc 培養時の比糖消費速度の比較 (無次元時間)

(a) Suc, (b) Glc

Fig. 4-5 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc and (b) Glc cultivation after Glc pre-cultivation.

4-3-2. フルクトースによる前培養

図 4-6 にフルクトースで培養したときの糖，エタノールおよび細胞濃度の経日変化を示す。この培養を前培養とし，図中の青，赤，緑で示した地点，すなわち，4 日後，7 日後，10 日後の培養液をサンプリングし，図 4-1，4-2，表 4-1 にしたがって本培養に供した。

図 4-6 (a) に Suc 培養したときの比糖消費速度の比較を示す。図中の A，B，C は，それぞれ前培養時の誘導期，対数期，定常期を示す。標準と他を比較すると，A でピークがやや遅れる傾向を示したものの，消費時期には大きな差は認められなかった。図 4-6 (b) では Fru 培養したときを示している。A，B ではあまり変化はないが，C でピークが早まる傾向を示した。

図 4-7 (a) では Suc 培養したときの無次元時間軸での比較を示した。図より B のピーク値が他の約 3 倍になっており，ピークの T 値も他よりマイナス側（-3 程度）にあった。糖取込み時期は他と変わっていなかったことから，増殖が遅れていることが原因と思われる。図 4-7 (b) には Fru 培養したときを示す。図より，C のピークの T 値が大きくマイナス側に偏っていた。実時間でも早まる傾向を示していたが，このことから，フルクトースで前培養することで，フルクトースの認識が早まることが示唆された。

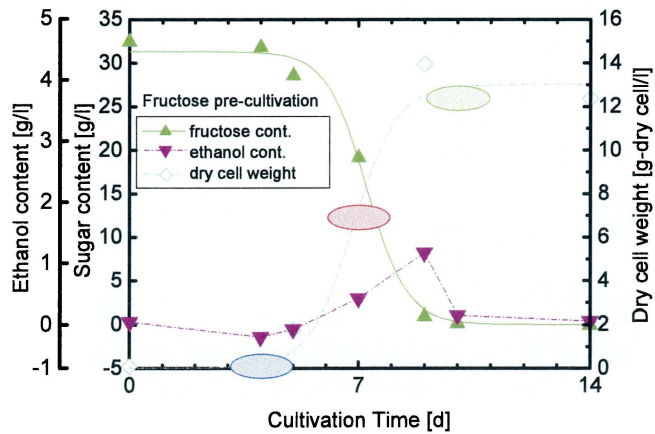


図 4-6 培養液成分および細胞濃度の経日変化 (Fru 前培養)

Fig. 4-6 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during fructose pre-cultivation.

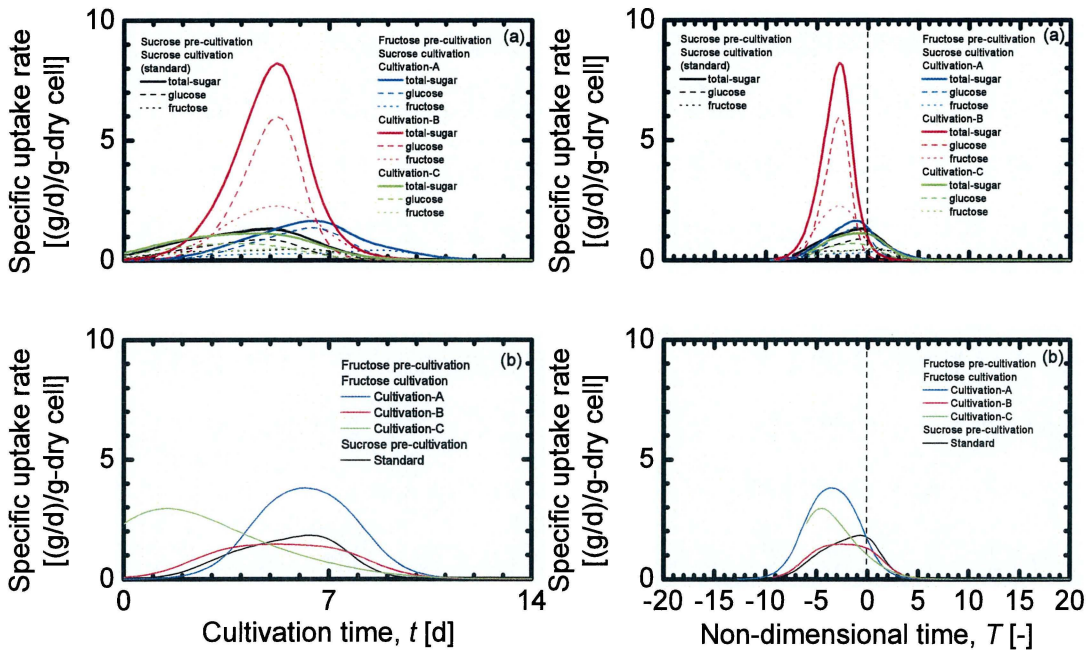


図 4-7 Pre-Fru 培養時の比糖消費速度の比較 (実時間)
(a) Suc, (b) Fru

Fig. 4-7 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc and (b) Fru cultivation after Fru pre-cultivation.

図 4-8 Pre-Fru 培養時の比糖消費速度の比較 (無次元時間)
(a) Suc, (b) Fru

Fig. 4-8 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc and (b) Fru cultivation after Fru pre-cultivation.

4-3-3. マンノースによる前培養

図 4-9 にマンノースで培養したときの糖，エタノールおよび細胞濃度の経日変化を示す。この培養を前培養とし，図中の青，赤，緑で示した地点，すなわち，4 日後，13 日後，21 日後の培養液をサンプリングし，図 4-1，4-2，表 4-1 にしたがって本培養に供した。

図 4-10 (a) に Suc 培養したときの比糖消費速度の比較を示す。図中の A, B, C は，それぞれ前培養時の誘導期，対数期，定常期を示す。図より，標準と比べるとグルコースとフルクトースの消費時期に大きなタイムラグが認められた（5~7 日程度，標準で約 2 日）。また，B, C で消費が大きく遅れることが分かった。図 4-10 (b) では，Man 培養したときを示している。図より，標準と比べて A, B, C の順で消費が遅れていくという結果となった。

図 4-11 (a) では，Suc 培養したときの無次元時間軸での比較を示した。いずれのピークの T 値も，標準よりマイナスであった。また，グルコースのピーク値が高いが，これは消費と増殖のピークのタイムラグが大きいため，結果として比糖消費速度が上がったと考えられる。一方，フルクトースが消費されるときには対数期を迎えており，比糖消費速度を求める上での分母となる細胞数が多いため，その値は低くなっている。図 4-11 (b) では Man 培養したときを示している。A と C は標準と同様，ピークの T は大きくマイナス側に位置しており（約 5~7），特徴に変化はないが，B のみやや原点側（約 3）にピークが移動していた。

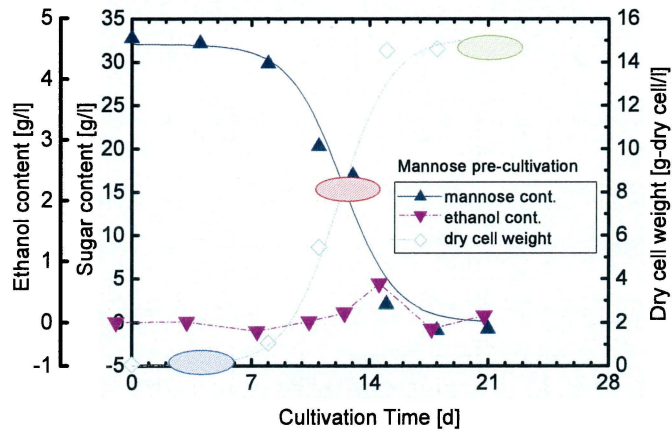


図 4-9 培養液成分および細胞濃度の経日変化 (Man 前培養)

Fig. 4-9 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during mannose pre-cultivation.

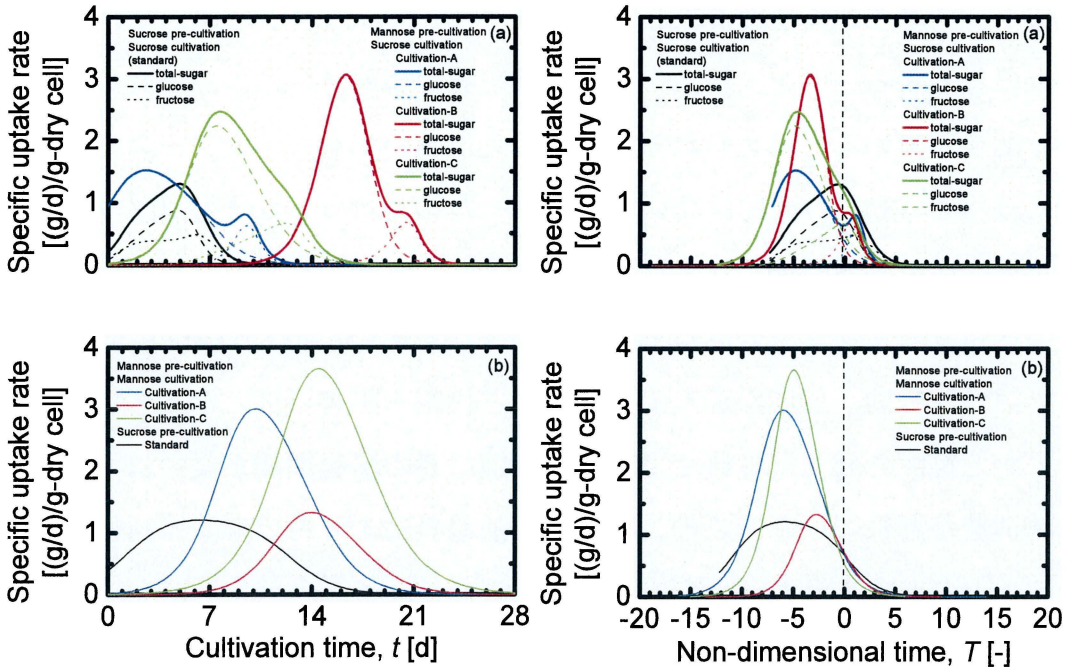


図 4-10 Pre-Man 培養時の比糖消費速度の比較 (実時間)
(a) Suc, (b) Man

Fig. 4-10 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc and (b) Man cultivation after Man pre-cultivation.

図 4-11 Pre-Man 培養時の比糖消費速度の比較 (無次元時間)
(a) Suc, (b) Man

Fig. 4-11 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc and (b) Man cultivation after Man pre-cultivation.

以上、マンノースで前培養した場合について述べてきた。いずれの場合も Suc 培養の際、グルコースとフルクトースとの間の消費のタイミングに大きなタイムラグが生じていたが、その原因について考察したい。まず、マンノース代謝の概略図を図 4-12 に示す。1 章でも触れたが、マンノースは細胞内に取込まれるとヘキソキナーゼにより Man 6-P になった後、PMI により Fru 6-P に変換されて解糖系へ入っていく。マンノースは毒性があると言われているが、ほとんどの植物は PMI が存在しない、あるいは活性レベルが非常に低いため、細胞内では Man 6-P が蓄積すると同時にリン酸も減少してしまう。そのため、これ以上代謝が進まないの、植物の生長を阻害するといわれている [29-31]。しかし、Kato らは、マンノースで長期間培養されたアズキ培養細胞は PMI の活性が高まり、マンノースを炭素源として利用できるようになる」と述べている [142]。以上のことから、マンノースが関係する培養の糖取込みには、PMI の活性が大きく関与していると考えられるが、本研究においても、マンノースで前培養された細胞の PMI の活性は高い状態にあったのではないかと推測できる。PMI は可逆反応をする酵素である。このとき、Suc 培養を行うとスクロースを分解して得られたフルクトースは Fru 6-P になった後、解糖系へ移行せず PMI により一部は逆方向へ反応が進んでしまうなど代謝の阻害要因となっているのではないかと推測される。本研究でも、Man 前培養の培養期間が長いほど本培養での糖消費が遅れていた。このことから、前培養により特定酵素が活性化されていることが示唆された。

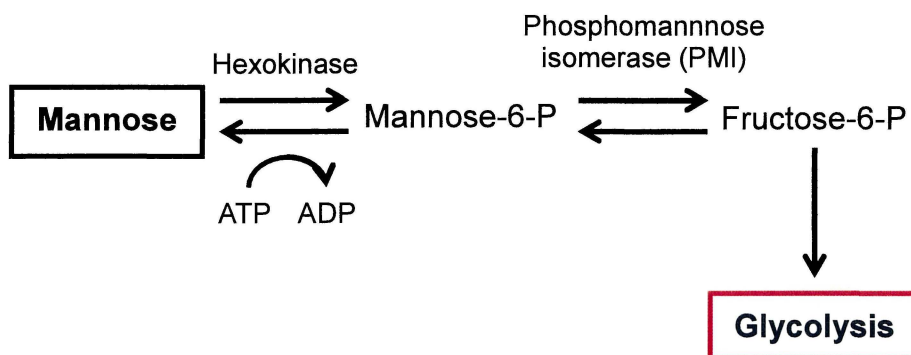


図 4-12 マンノース代謝 [31]
Fig. 4-12 Mannose metabolism.

4-3-4. ガラクトースによる前培養

図 4-13 にガラクトースで培養したときの糖, エタノールおよび細胞濃度の経日変化を示す. この培養を前培養とし, 図中の青, 赤, 緑で示した地点, すなわち, 25 日後, 56 日後, 63 日後の培養液をサンプリングし, 図 4-1, 4-2, 表 4-1 にしたがって本培養に供した.

表 4-2 に, Suc 培養したときの細胞の様子を撮影した写真を示す. Gal 前培養の影響で, 培養の初期状態ではいずれも細胞は凝集していた. A では 70 日まで培養を試みたが, 増殖が認められなかった. 写真から, 細胞が餓死していることが分かる. B, C では凝集を起こさずに増殖している様子が観察できた. 一方, 表 4-3 の Gal 培養したときは, 先ほどと同様に A では細胞が餓死していたが, B, C では凝集を起こしながら増殖していることが確認できた.

つぎに, 図 4-14 (a) に Suc 培養したときの比糖消費速度の比較を示す. 標準と比較すると, B のみグルコースの比消費速度が高かった. 図 4-14 (b) では, Gal 培養したときを示している. 図から, 標準と比べて糖取込みの時期が大幅に早まっていることが分かった. また, その速度も他の培養と比べて同程度の値を示しており, Gal 前培養によって UGE の活性が十分高まっていることが示唆された. このことから, B と C の細胞は, ガラクトースを炭素源として利用できるように形質発現されている可能性が考えられる. 逆に A は, UGE の活性が低いままだったため, 増殖できなかったと思われる.

最後に, 無次元時間軸での比較について示す. 図 4-15 (a) より, Suc 培養したときは, C は標準と非常によく似ていたが, B ではグルコース, フルクトースの消費のピークの T 値がともに標準よりもマイナス側に位置していた. 一方, Gal 培養したときは, B, C とともに標準とよく近似していた (図 4-15 (b)). このことから, ガラクトースで前培養を行うことで UGE が活性化され, その後の Gal 培養でスクロースと同様にガラクトースを炭素源として代謝できると考えられた. また, これらが凝集を形成しながら増殖していくことにも変わりがなかった.

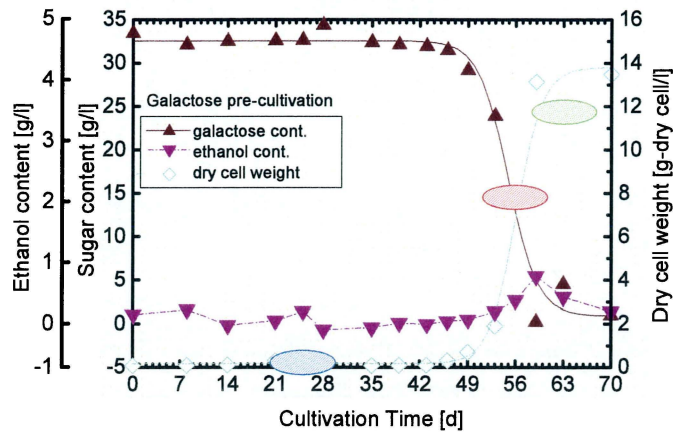


図 4-13 培養液成分および細胞濃度の経日変化 (Gal 前培養)

Fig. 4-13 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during galactose pre-cultivation.

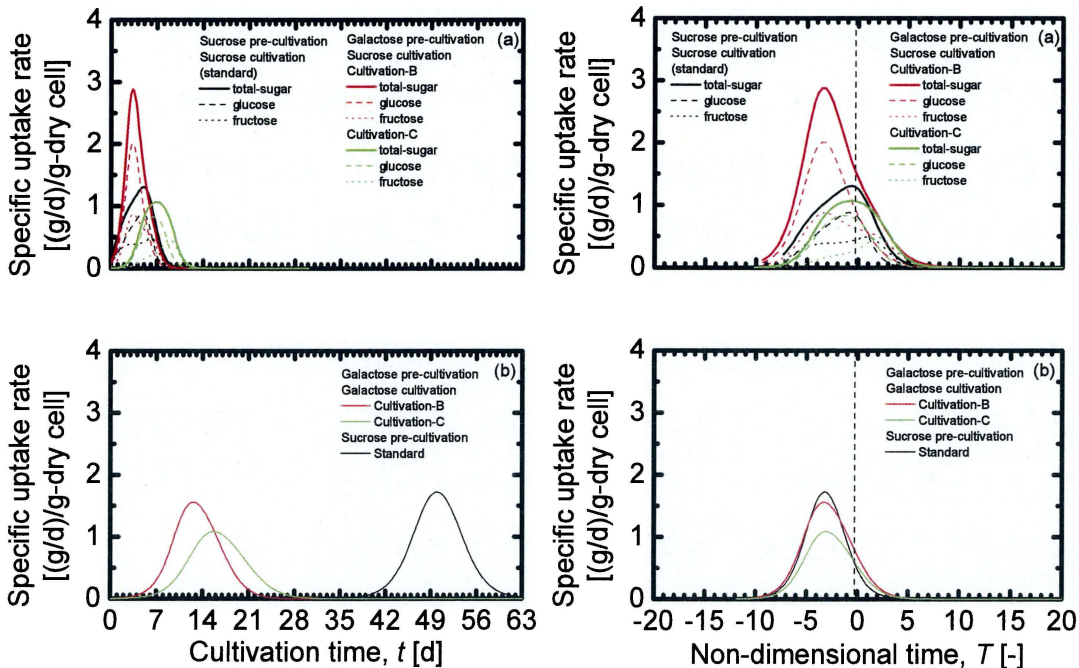


図 4-14 Pre-Gal 培養時の比糖消費速度の比較 (実時間)

(a) Suc, (b) Gal

Fig. 4-14 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc and (b) Gal cultivation after Gal pre-cultivation.

図 4-15 Pre-Gal 培養時の比糖消費速度の比較 (無次元時間)

(a) Suc, (b) Gal

Fig. 4-15 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc and (b) Gal cultivation after Gal pre-cultivation.

表 4-2 細胞増殖の経時変化の写真 (Pre-Gal, Cul-Suc)
 Table 4-2 Photographs of the TBY-2 cells (Pre-Gal, Cul-Suc).

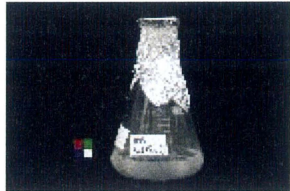




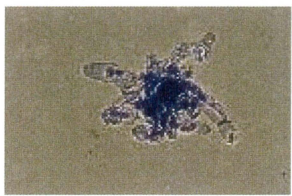
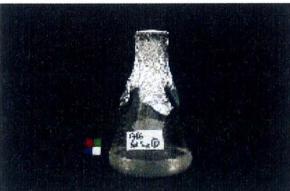

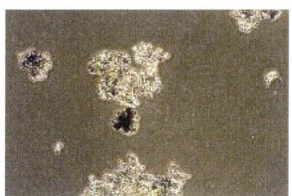
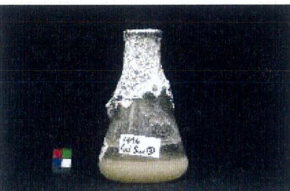





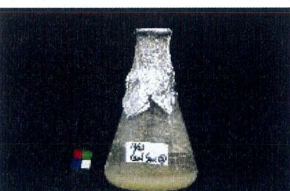
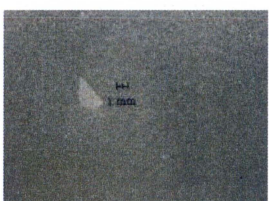
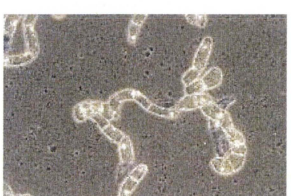
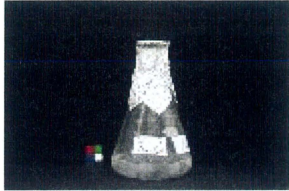
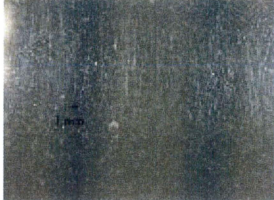

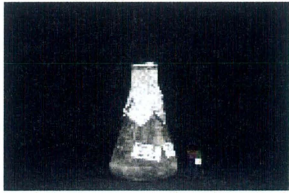


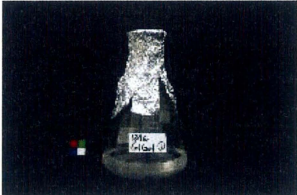



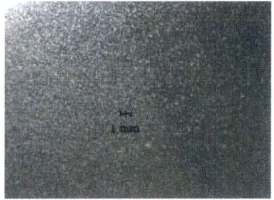
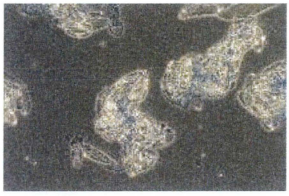
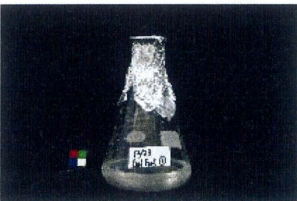
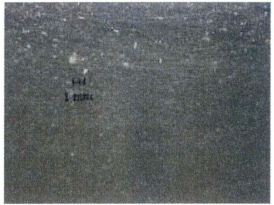
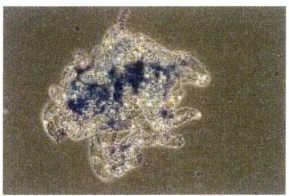
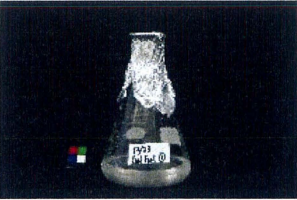

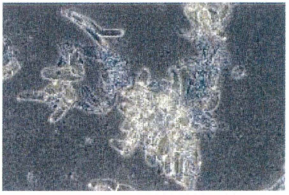
	Flask	Close up	Microscope
Pre-Gal Cul-Suc A 0 d			 — 80 μ m $\times 100$
Pre-Gal Cul-Suc A 70 d			 — 80 μ m $\times 100$
Pre-Gal Cul-Suc B 0 d			 — 200 μ m $\times 40$
Pre-Gal Cul-Suc B 14 d			 — 80 μ m $\times 100$
Pre-Gal Cul-Suc C 0 d			 — 80 μ m $\times 100$
Pre-Gal Cul-Suc C 14 d			 — 80 μ m $\times 100$

表 4-3 細胞増殖の経時変化の写真 (Pre-Gal, Cul-Gal)
 Table 4-3 Photographs of the TBY-2 cells (Pre-Gal, Cul-Gal).

	Flask	Close up	Microscope
Pre-Gal Cul-Gal A 0 d			 — 80 μ m ×100
Pre-Gal Cul-Gal A 70 d			 — 80 μ m ×100
Pre-Gal Cul-Gal B 0 d			 — 80 μ m ×100
Pre-Gal Cul-Gal B 28 d			 — 80 μ m ×100
Pre-Gal Cul-Gal C 0 d			 — 80 μ m ×100
Pre-Gal Cul-Gal C 35 d			 — 80 μ m ×100

以上、ガラクトース前培養についてまとめたが、ここで、ガラクトース代謝について3章の結果を含めて整理する。

これまでの結果より、ガラクトース培養では30日以下の短期培養では、消費、増殖は認められず、30～40日以上長期培養することで、これらが確認できた(図3-13(a))。本章での培養期間A(25日、誘導期)の後の本培養では増殖しなかったが、このときは短期培養に相当していた。また、3章のGlc+Gal培養では比Gal消費速度が非常に低く、上昇しなかった。このときの培養期間は28日で終了しており、この場合も短期培養に相当していた。これらの場合、UGEが活性化していなかったと考えられ、上記の結果は、それを裏付けるものとなっている。このことから、ガラクトースを含む培地でTBY-2細胞を30日以上培養すれば、形質発現が起きてUGEを活性化できるようになり、ガラクトースに適応した細胞になることがわかった。

4-4. 前培養期間が動的糖代謝挙動におよぼす影響

4-4-1. 誘導期 (A: Log phase)

ここでは、前培養の3つの期間（誘導期、対数期、定常期）ごとの動的糖代謝挙動を比較していく。まず誘導期について、図 4-16 (a) に Suc 培養の、(b) に Suc 以外の糖での培養の実時間軸の比較を、図 4-17 (a) に Suc 培養の、(b) に Suc 以外の糖の培養での無次元時間軸の比較を示す。前述したとおり、誘導期においては、Gal 前培養を本培養に植え継いでも増殖しなかった。これは、UGE の活性が低いためだと思われた。また図より、Suc 培養では Man 前培養のみグルコースとフルクトースの消費時期に大きなずれが認められた。無次元時間軸で見ても、Man 前培養のみグルコースのピークの T 値が大きくマイナス側に偏っていた。それ以外は標準と類似した傾向を示しており、前培養による影響はほとんどなかったと考えられる。

Suc 以外の培養においても、Man 前培養のみ消費がやや遅れる傾向が見られたものの、それ以外では各糖の前培養と本培養で類似した傾向を示していた。

以上のことから、誘導期では Gal および Man 前培養以外の場合は、代謝に大きな変化は起こらなかった。Man 前培養はその期間が短くとも糖代謝挙動に影響をおよぼしていることが示唆された。また、Gal 前培養では増殖しなかったが、前培養期間が短かったため、UGE 活性が変化しなかったと考えられる。

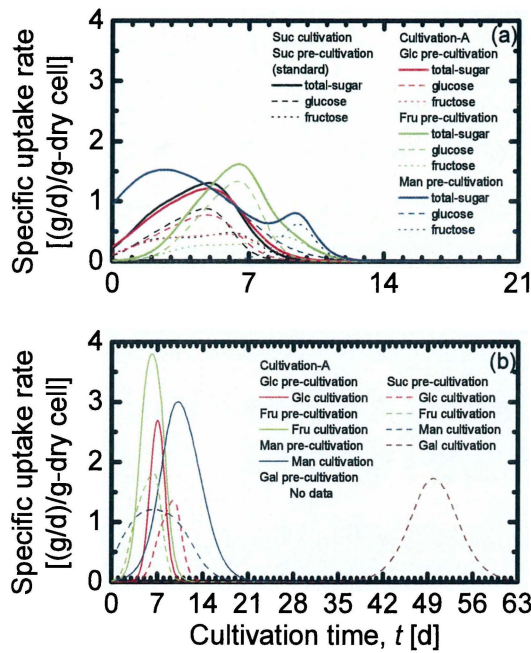


図 4-16 前培養の誘導期にある細胞を本培養したときの比糖消費速度の比較（実時間）
(a) Suc, (b) Suc 以外

Fig. 4-16 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) sucrose and (b) the other sugar cultivation after pre-cultivation for lag phase.

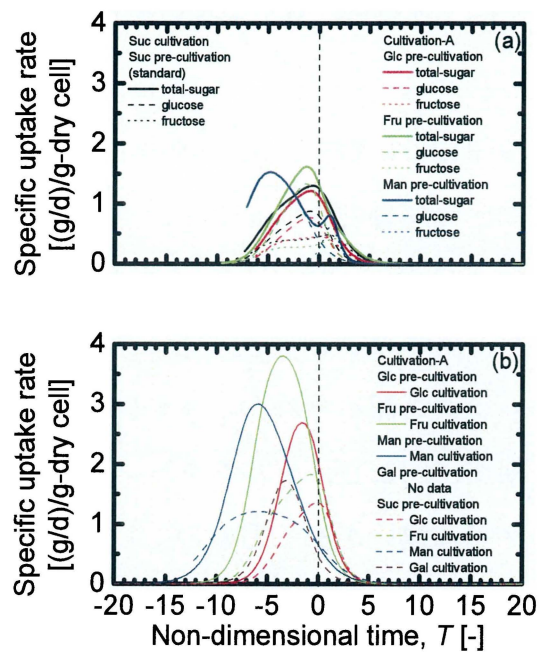


図 4-17 前培養の誘導期にある細胞を本培養したときの比糖消費速度の比較（無次元時間）
(a) Suc, (b) Suc 以外

Fig. 4-17 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) sucrose and (b) the other sugar cultivation after pre-cultivation for lag phase.

4-4-2. 対数期 (B: Logarithmic phase)

対数期について、図 4-18 (a) に Suc 培養の、(b) に Suc 以外の糖での培養の実時間軸の比較を、図 4-19 (a) に Suc 培養の、(b) に Suc 以外の糖の培養での無次元時間軸の比較を示す。

図より、実時間の Suc 培養では、Man 前培養のみ明らかに大きく遅れていた。また、誘導期のときと同様にグルコースとフルクトースの消費時期に大きなタイムラグが認められた。さらに、Glc 前培養で、グルコースの消費が標準より長期間におよび、フルクトースの消費開始時期も遅れていた。これら以外はピーク値に違いがあるものの、ピーク時期は標準と近似していた。

一方、無次元時間軸の Suc 培養では、いずれの培養もピークの T 値が標準よりマイナスであり、しかも、グルコースのピークの T 値がいずれも -3 前後を示していた。Man 以外の前培養では、実時間での消費時期が標準とあまり差がないことから、糖の取込みから増殖までのタイムラグが長くなり、その部分の代謝過程に時間を要していることが考えられる。

Suc 以外の培養において、実時間では Gal 培養で消費時期が劇的に早期化した。逆に、Glc および Man 培養でやや遅れた。しかし、無次元時間軸では、実時間の比較で大きな差があった Gal 培養も含めて前培養と本培養で大きな差があまりなく、Man 培養では本培養が前培養よりかなり T 軸の原点方向にピークが移動していた。

以上のことから、対数期では糖代謝挙動に変化が起きはじめていることが示唆された。

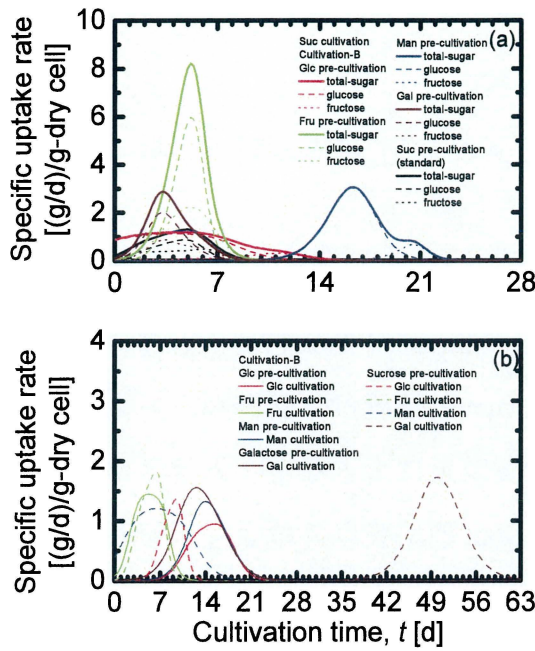


図 4-18 前培養の対数期にある細胞を本培養したときの比糖消費速度の比較（実時間）
(a) Suc, (b) Suc 以外

Fig. 4-18 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) sucrose and (b) the other sugar cultivation after pre-cultivation for logarithmic phase.

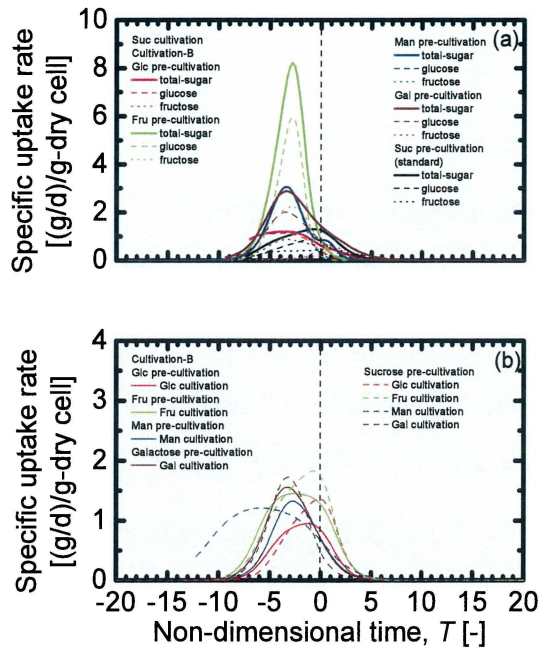


図 4-19 前培養の対数期にある細胞を本培養したときの比糖消費速度の比較（無次元時間）
(a) Suc, (b) Suc 以外

Fig. 4-19 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) sucrose and (b) the other sugar cultivation after pre-cultivation for logarithmic phase.

4-4-3. 定常期 (C: Stationary phase)

定常期について、図 4-20 (a) に Suc 培養の、(b) に Suc 以外の糖での培養の実時間軸の比較を、図 4-21 (a) に Suc 培養の、(b) に Suc 以外の糖の培養での無次元時間軸の比較を示す。

図より、実時間では Suc 培養では Man 前培養以外のピークは多少の差異はあるものの標準とよく近似していた。また、Man 前培養は他よりも遅れていたものの、対数期ほどではなかった。また、Man 前培養は、誘導期、対数期のときと同様にグルコースとフルクトースの消費時期に大きなタイムラグが認められた。一方、無次元時間軸の Suc 培養でも、Man 前培養以外はよく近似してした。これらことから、Suc 培養での前培養の糖成分の影響は、マンノース以外ほとんどなかったと解釈できる。しかし、Man 前培養のみ、グルコースのピークがフルクトースのそれと大きく離れ、また T 値も大きくマイナス側に偏っており、誘導期、対数期と同様、糖代謝の阻害作用が確認された。

Suc 以外の培養において、実時間では、Gal 培養が対数期と同様に大幅に消費時期が早まった。また、Fru 培養でも早まっていた。逆に、Man 培養で消費時期がやや遅れた。しかし、無次元時間軸では、Glc 培養でピークの T 値がプラスになったものの、Fru 培養以外で前培養と本培養で大きな差があまりなかった。Fru 培養ではピークの T 値が大きくマイナスへ移動した。

以上のことから、定常期では、Suc 培養は Man 前培養以外で変化がほとんどなく、Suc 以外の培養では、実時間では大きな変化はあったものの、無次元時間軸で比較した場合、Fru 培養以外で前培養と本培養で大きな差は認められなかった。

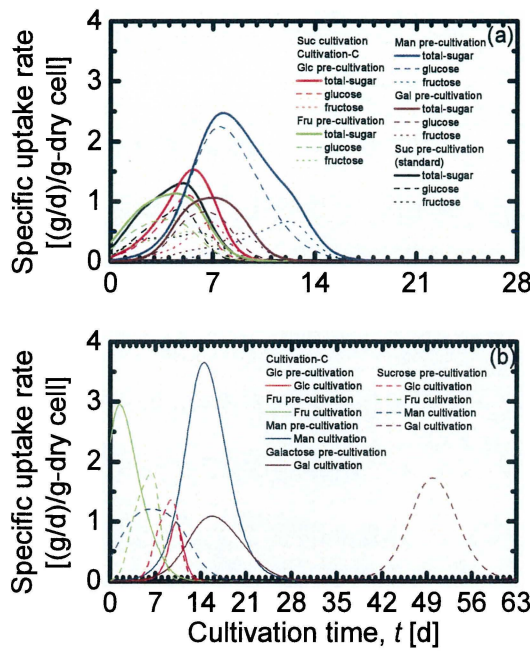


図 4-20 前培養の定常期にある細胞を本培養したときの比糖消費速度の比較（実時間）
(a) Suc, (b) Suc 以外

Fig. 4-20 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) sucrose and (b) the other sugar cultivation after pre-cultivation for stationary phase.

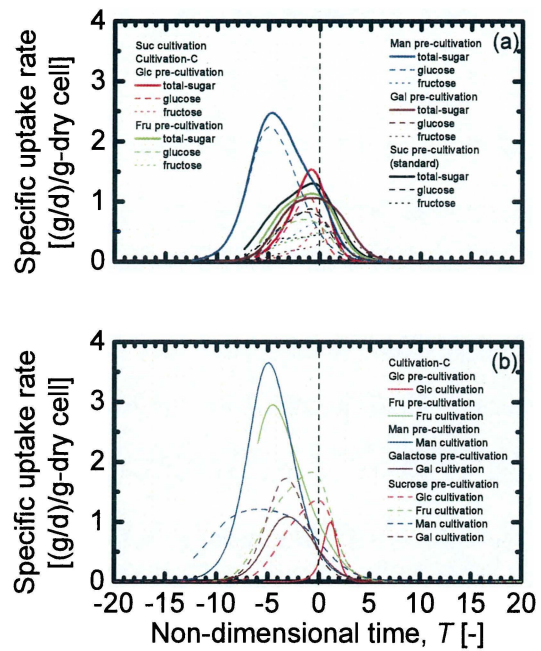


図 4-21 前培養の定常期にある細胞を本培養したときの比糖消費速度の比較（無次元時間）
(a) Suc, (b) Suc 以外

Fig. 4-21 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) sucrose and (b) the other sugar cultivation after pre-cultivation for stationary phase.

4-5. 本章の結論

本章では、前培養の糖成分を標準のスクロースと異なる糖を用いて、その培養期間を誘導期、対数期、定常期と設定し、本培養ではその糖とスクロース（標準）で培養を行った。そして、赤外分光法を援用して糖代謝挙動を比較することで、前培養条件（糖成分・培養期間）が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響を検討した。

まず、前培養の糖成分で比較した場合について述べる。前培養期間が長くなると、グルコースでは代謝が遅く、フルクトースでは早まる傾向が示された。

マンノースで前培養を行うと、本培養の Suc, Man 培養とも、前培養期間が長くなれば全体の糖消費が遅れる傾向が見られた。誘導期では大きな差はないが、Suc 培養で対数期および定常期では他の場合に比べて大幅に遅れ、Man 培養でも標準の Suc 前培養と比較して大きく遅れることが分かった。また、Suc 培養でのフルクトースの消費がグルコースより大きく遅れる傾向があった。

マンノース代謝には、マンノースをフルクトースに変換する酵素の PMI の活性が関与しているが、マンノースで前培養を行うことで PMI の活性が高まり、フルクトースの取込みに変化が起きている可能性が考えられる。さらにマンノースの代謝特性を理解するには、Man 前培養後に Fru 培養を試みるなど、マンノースとフルクトースの関係性をより明らかにする必要があるだろう。

ガラクトースで前培養を行うと、Suc 培養で大きな変化はないが、Gal 培養では劇的に消費が早まった。ガラクトースの代謝には、UGE の活性が関与している可能性がある、として3章でも触れたが、ガラクトース前培養でこの酵素の活性が高まり、ガラクトースの代謝時期が早まったのではないかと考えられる。また、ガラクトースで前培養しても Suc 培養であれば凝集は起こらないが、Gal 培養であれば、前培養に関係なく凝集が起こることがわかった。3章の結果と合わせて考察すると、およそ30日以上培養することで、ガラクトースに適応した細胞に変化すると考えられる。

つぎに、前培養期間で動的糖代謝挙動を比較した場合について述べる。前述

したように、Man 前培養で他と異なる挙動をしていた。個別で見ていくと、誘導期ではガラクトースが増殖しなかったことを除けば大きな変化はなかった。この時期の細胞のほとんどが、糖が代謝される前の段階であり、本培養の糖代謝挙動にはあまり影響がなかったものと思われる。

一方、対数期では、Suc 培養は Man 前培養以外の消費時期が似ているように見えるが、グルコースとフルクトースの消費時期のタイムラグが標準よりやや大きい。無次元時間軸で見ると、グルコースのピークの T 値がよく似ており、標準と比べてマイナス側にある。Suc 以外の培養においては Fru 培養では変化がなかったが、Glc, Man 培養では遅くなり、Gal 培養では大幅に早くなるなど様々な変化が見られた。

定常期では、Suc 培養において Man 前培養以外は類似した傾向を示していた。また、Suc 以外の培養では、対数期と同様に Gal 培養が劇的に早くなり、Man 培養が遅くなるなど大きな変化が見られたが、無次元時間軸で比較すると Fru 培養以外で前培養と本培養で大きな差があまりなかった。

以上のことから、赤外分光法を援用して前培養条件（糖成分・培養期間）が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響を以下のように把握することが出来た。

① 前培養の糖成分による変化

- ・ ガラクトース … 消費，増殖の劇的な早期化
- ・ マンノース … Suc 培養における Fru 消費のタイムラグ

② 前培養の培養期間による変化

- ・ 誘導期 … 影響が小さい
- ・ 対数期，定常期 … 影響が大きい

これらは代謝に関連する酵素の活性レベルの変化によるものであることが示唆された。この結果から、本章では前培養条件（糖成分，培養期間）を変化させることで形質発現させた細胞の炭素源に対する応答を把握できた。

本研究では、前培養の培養期間を誘導期，対数期，定常期に分けて実験を行ってきたが、前培養の期間を長くする（複数回植え継ぐ）などをすれば、さらなる知見が得られるかもしれない。

5章. 異なる植物細胞種による糖代謝挙動の比較

本章に関する研究は、以下のように投稿および掲載されている。

Hashimoto A., Yamanaka A., Kanou M., Nahar F., Kameoka T.: Effects of Pre-cultivation on Sugar Metabolic Kinetics of Suspension Plant Cells Measured by Mid-infrared Spectroscopy. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 1:168-175, 2003

Yamanaka A., Hashimoto A., Kanou M., Kameoka T.: MIR Spectroscopic Analysis on Sugar Metabolic and Ethanol Productive Kinetics of Suspension TBY-2 and Rice Cells Pre-Cultured in Various Media. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27:125-133, 2005

5-1. 本章の目的

植物細胞は、種、器官、組織などに違いにより、細胞の大きさ、分裂周期、増殖の仕方、糖代謝、アルコール発酵などの特徴が異なる。TBY-2細胞やイネ細胞は、嫌気的な環境になると、エタノールを生成し、培地に排出することが知られている [28, 143, 144]。しかし、TBY-2細胞は、2章で述べてきたとおり増殖が速く、培地中に均一に増殖するため、通常はほとんどすべての細胞が好気的な条件下で容易に呼吸が出来る。結果として、このような環境ではアルコール発酵は起こりにくい。一方、イネ細胞は小さな細胞塊を形成しながら増殖する傾向がある。そのため、細胞塊内部の環境が好気的から嫌気的な環境へ変化するので、容易にアルコール発酵が起きやすい。このように、糖代謝は糖取込み挙動だけでなくエタノール生成にも関連している。これまで、懸濁植物細胞の動的糖代謝挙動について検証し、4章では前培養の糖成分や培養期間がTBY-2細胞の動的糖代謝挙動に影響をおよぼしていることが示唆された。

そこで本章では、前培養により形質発現させた異なる細胞種の炭素源に対する応答を比較することを目的とした。具体的には、前培養および本培養の糖成分が糖取込み挙動およびエタノール生成におよぼす影響を異なる細胞種（TBY-2細胞とイネ細胞）で比較し、各細胞で共通する特徴、細胞固有の代謝

特性，細胞増殖とエタノール発酵の関係を把握する。

また，2章において，FT-IR/ATR法を用いれば TBY-2 細胞およびイネ細胞の培地である MS および R2S 培地中の糖代謝成分（糖およびエタノール）の定量がそれぞれ可能であることを示した。本章で本方法を援用し，各細胞種で培養液成分の糖代謝成分の定量を行い，糖代謝挙動を検証していく。

5-2. 実験試料および方法

5-2-1. 実験試料

本章で使用する供試細胞は TBY-2 細胞とイネ細胞で，供試培地はそれぞれ MS 培地と R2S 培地を基本とする。培地の炭素源として採用する糖は，基本となるスクロースとそれを構成する単糖類のグルコースとフルクトースとした。前培養ではこの3種類を，本培養ではこれらにグルコースとフルクトースの混合糖を加えた4種類の培地を設定した。培地の糖濃度は，これまでと同様スクロースの炭素数に合わせて設定している（単糖類：31.58 g/l，二糖類：30.00 g/l，（表 2-5 参照））。各細胞および試料の詳細は2章で紹介したとおりである。

5-2-2. 実験方法

（1）細胞培養

TBY-2 細胞では MS 培地，イネ細胞では R2S 培地を基本としてそれぞれの前培養および本培養用の培地を準備し，表 5-1 および 5-2 で示した培養条件にしたがってそれぞれの細胞を培養した。培地調製については2章に準じる。以下に，培養方法から測定までの手順について示す。

まず，TBY-2 細胞について述べる。図 5-1 に TBY-2 細胞の培養および測定手順を示した。前培養および本培養へ植え継ぐ方法は，2章（2-3-3. (1)）の継代培養から本培養へ供試する方法と基本的に同じである。まず，1週間ごとに継代培養されている TBY-2 細胞を洗浄（1000 rpm., 1 min, 3 回）し，3 種類（Suc, Glc,

Fru) の培地で前培養を行う。前培養期間は、糖が完全に消費されるまでを考慮して2週間とした。前培養後の細胞を再び洗浄し、4種類の培地 (Suc, Glc, Fru, Glc+Fru) で2週間本培養を行う。前培養および本培養に供試する際の洗浄液は、これまでと同様に高压滅菌済みの糖を含まない MS 培地を使用する。洗浄後の培養液の細胞濃度を調整 (約 12 g-dry cell/l) した後、1.5 ml の培養液を準備した各培地に植え継ぐ。本培養では、各種成分の測定のため、2~4章と同様に接種直後と一定期間培養後の培養液からサンプリング (20~30 ml 程度) する。測定回数分の培養液を確保するため、本培養では培地を5本準備し、すべて植え継ぐ。これまで同様、サンプルの糖およびエタノール濃度測定には FT-IR/ATR 法を、細胞濃度の測定には可視分光法を採用している。

つぎに、イネ細胞について述べる。イネ細胞の培養および測定手順を図 5-2 に示した。継代培養から前培養へ植え継ぐ方法は、2章 (2-3-3. (2)) の継代培養の植え継ぎ方法と、また、前培養から本培養へ供試する方法も2章の継代培養から本培養へ供試する方法と基本的に同様である。まず、継代培養されている培養2週間後の細胞を、培地から乾熱滅菌済の薬匙を使って細胞を取りだし、高压滅菌済の糖を含まない R2S 培地で洗い流すことで洗浄する。洗浄後の細胞を、R2S 培地を基本とした3種類の培地 (Suc, Glc, Fru) にそれぞれ薬匙1杯分 (新鮮重量 2~3 g 程度) 接種し、2週間前培養する。前培養後の細胞を洗浄、裏ごしし、さらに NALGENE 社製の組織培養フィルターユニット、タイプ TA (pore size 0.45 μ m) を使用して吸引ろ過を約10分間行う。ろ過後の細胞を、オートクレイブ (121 $^{\circ}$ C, 15 min) で滅菌した容器 (写真 2-6) を使って、すり切れ1杯分 (乾重量 約 0.05 g) 取りだし、本培養用の4種類の培地 (Suc, Glc, Fru, Glc+Fru) にそれぞれ接種し、3週間の本培養を行う。こちらも、接種直後と一定期間培養後の培養液から各種成分の測定を行う。イネ細胞では、細胞量の測定には乾重量法 (後述する) を採用しているため、培養液のサンプリングが出来ない。そのため、1つの培地からは1回の測定しか出来ない。そこで同量同成分の培地を測定回数分用意し、その全てに同量の細胞を接種することとする。したがって、本培養用の培地は測定回数分 (10本程度) 準備する必要がある。

表 5-1 TBY-2 細胞の培養条件

Table 5-1 TBY-2 cell cultured conditions.

	Pre-culture	Culture
Temperature	298 K (25 °C)	
Light	Dark	
Shake	Rotary shaking (150 rpm)	
Sugar	Suc, Glc, Fru	Suc, Glc, Fru, Glc+Fru
Volume of medium	95 ml	
Volume of inoculums	1.5 ml	
Cultivation period	14 days	

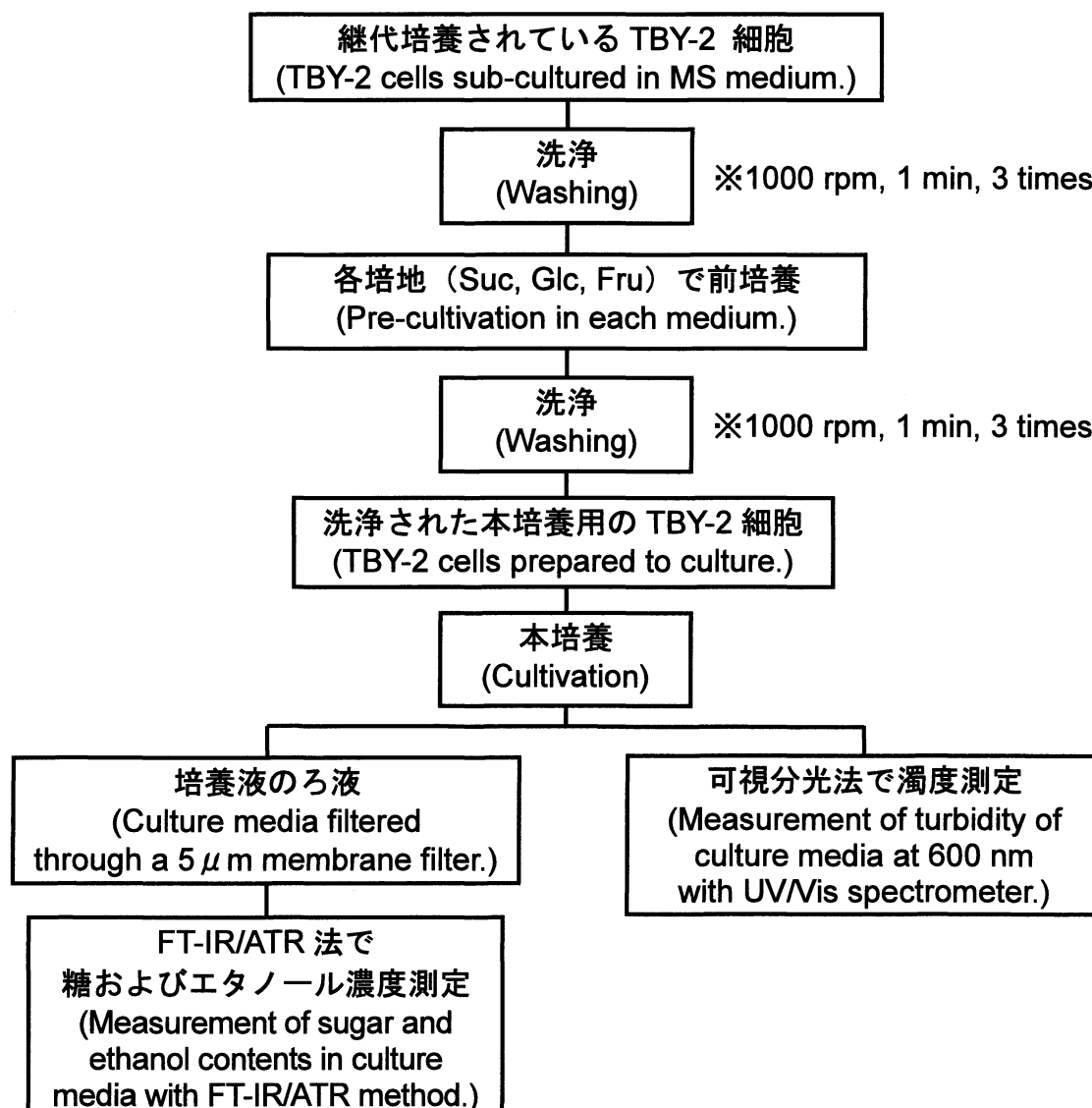


図 5-1 TBY-2 細胞の培養および測定手順

Fig. 5-1 Experimental protocol for TBT-2 cells.

表 5-2 イネ細胞の培養条件

Table 5-2 Rice cell cultured conditions.

	Pre-culture	Culture
Temperature	298 K (25 °C)	
Light	Dark	
Shake	Rotary shaking (125 rpm)	
Sugar	Suc, Glc, Fru	Suc, Glc, Fru, Glc+Fru
Volume of medium	120 ml	
Volume of inoculums	3 g-fresh cell weight	0.05 g-dry cell weight
Cultivation period	14 days	21 days

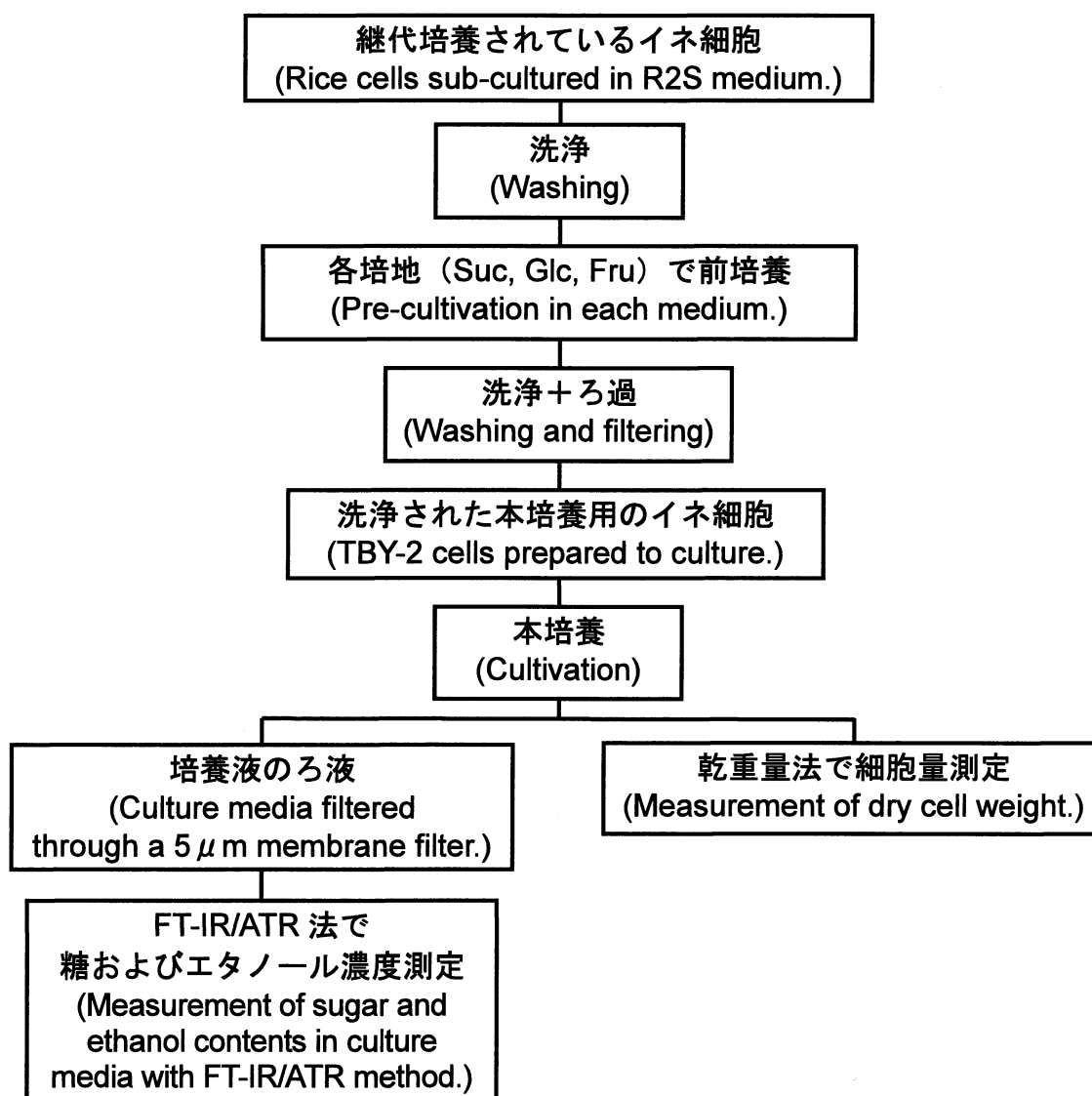


図 5-2 イネ細胞の培養および測定手順

Fig. 5-2 Experimental protocol for rice cells.

(2) 糖, エタノールおよび細胞濃度の定量法

(a) 赤外分光法

細胞培養でサンプリングした培養液の成分定量には, 2章でも採用した赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) を用いる. 測定方法も2章で詳細を述べたとおりである.

(b) 可視分光法

TBY-2 細胞の細胞量は可視分光法より求めた. 測定方法は3章で詳細に記したとおりである.

(c) 乾重量測定法

イネ細胞の細胞量の測定には, 乾重量測定法を採用した. 本方法は, 細胞の乾燥重量を求める方法である. 細胞が含まれている培養液を, 遠心分離やろ過分離することで細胞を分離させ, これを乾燥させて重量を測定する. 本研究のイネ細胞の乾重量測定には, ADVANTEC 社製の標準ろ紙 No.2 (pore size 5 μ m) を使用した. まず, 測定に使用するろ紙を, あらかじめオーブンで 110 $^{\circ}$ C, 24 時間乾燥させ, ろ紙の乾燥重量を測定する. 重量を測定したろ紙を使って, 培養液をろ過する. ろ過後のろ紙をオーブンで 110 $^{\circ}$ C, 24 時間乾燥させて重量を測定し, その値からろ過前のろ紙の重量を差し引いた値を細胞の乾重量とした.

5-3. 異なる植物細胞種による糖代謝挙動の比較

5-3-1. 培養液スペクトル

FT-IR/ATR 法を用いて培養液成分の赤外スペクトルを取得した。図 5-3, 5-4 に TBY-2 細胞とイネ細胞の Suc 前培養, 図 5-5, 5-6 に Glc 前培養, 図 5-7, 5-8 に Fru 前培養の培養液スペクトルの経日変化を示す。いずれの図も, 経時変化とともに全体的に吸光度が減少していくのが確認できた。単糖類による培養では, スペクトルパターンはほとんど変化せず糖成分の定性的な変化がなかったことが示唆された。また, 二糖類である Suc 培養のときは, これまで述べてきたとおり, 培養期間と共にスペクトルパターンが変化し, グルコースやフルクトース由来のピークが出現していた。また, TBY-2 細胞ではエタノール由来の 1045 cm^{-1} 付近に現れるピークは確認できても非常に小さいが, イネ細胞ではほとんどの場合で強く現れていた。また, このようなスペクトルの変化は, 本培養の糖成分にのみ依存しており, 前培養の糖成分と培養液の定性的な変化には関連性がなかった。

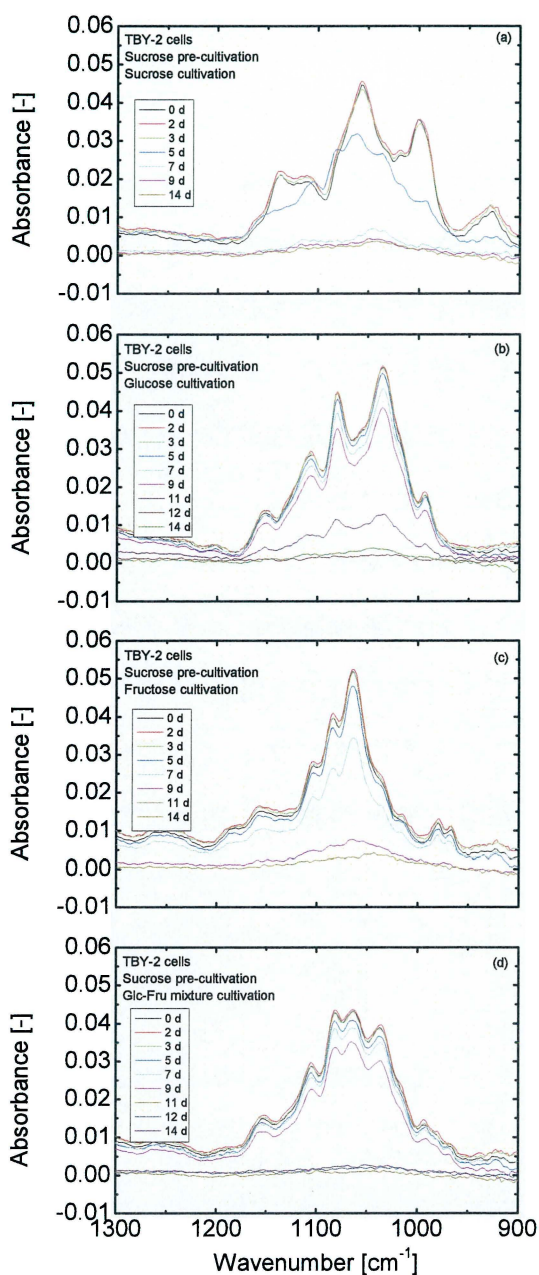


図 5-3 TBY-2 細胞の Pre-Suc 培養における培養液成分の赤外スペクトル (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-3 Time behavior of ATR spectra of the medium during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Suc pre-cultivation in TBY-2 cells.

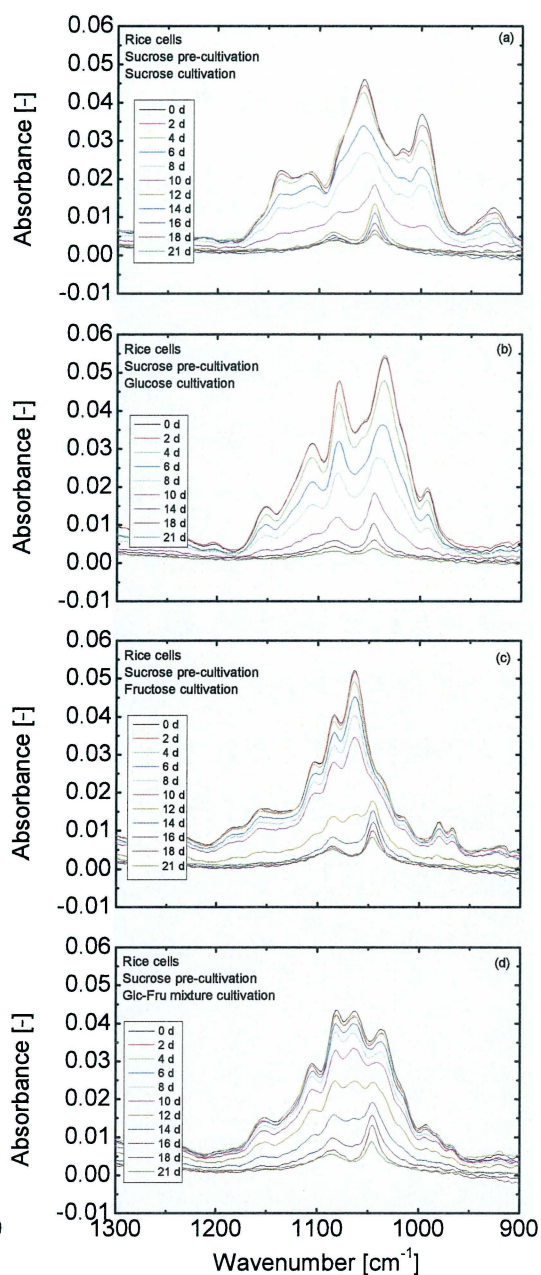


図 5-4 イネ細胞の Pre-Suc 培養における培養液成分の赤外スペクトル (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-4 Time behavior of ATR spectra of the medium during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Suc pre-cultivation in rice cells.

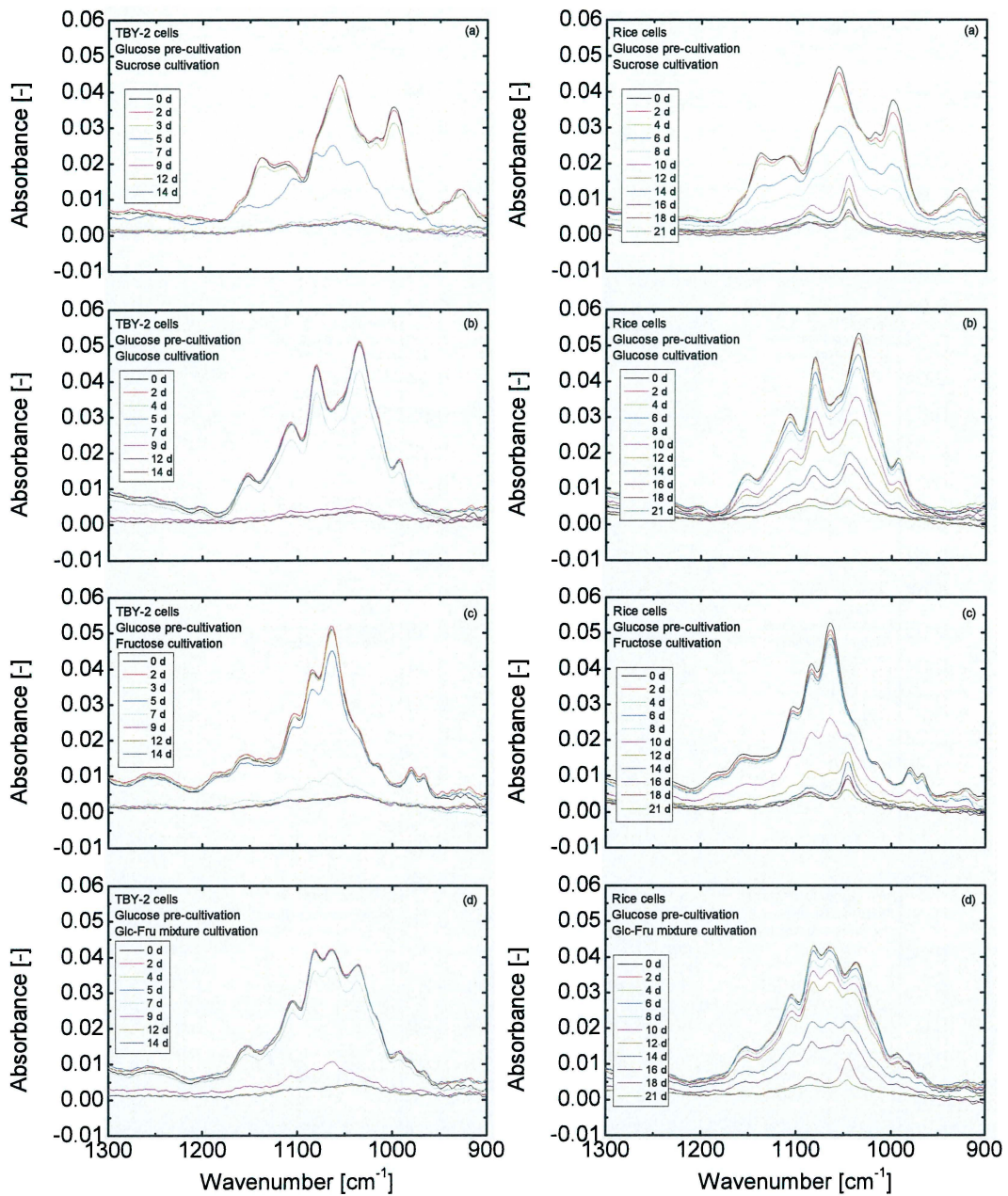


図 5-5 TBY-2 細胞の Pre-Glc 培養における培養液成分の赤外スペクトル (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-5 Time behavior of ATR spectra of the medium during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Glc pre-cultivation in TBY-2 cells.

図 5-6 イネ細胞の Pre-Glc 培養における培養液成分の赤外スペクトル (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-6 Time behavior of ATR spectra of the medium during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Glc pre-cultivation in rice cells.

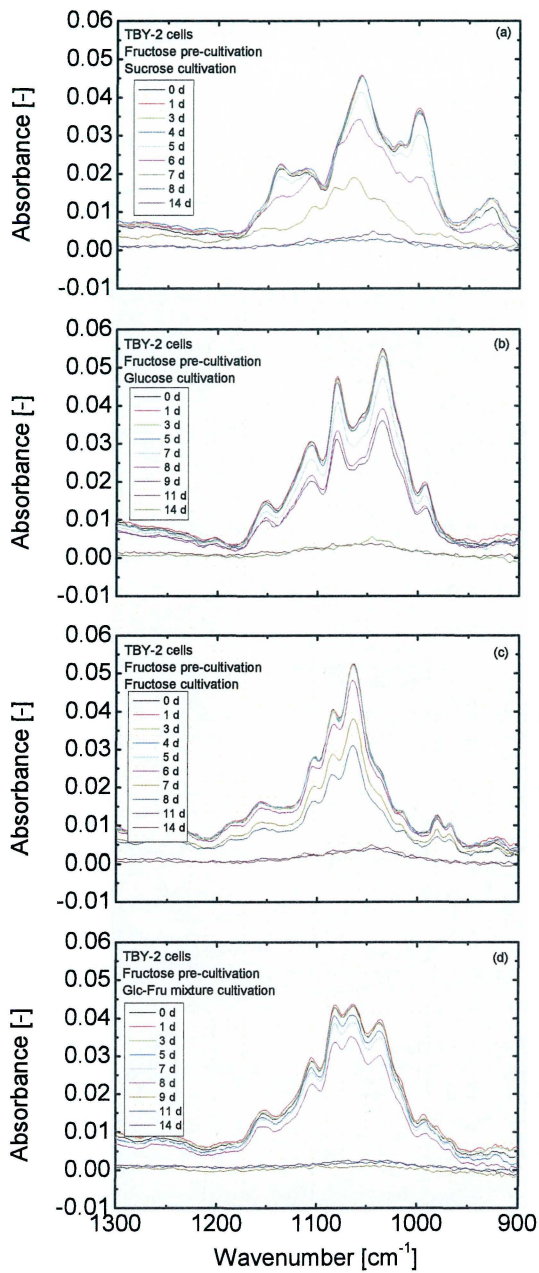


図 5-7 TBY-2 細胞の Pre-Fru 培養における培養液成分の赤外スペクトル (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-7 Time behavior of ATR spectra of the medium during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Glc pre-cultivation in TBY-2 cells.

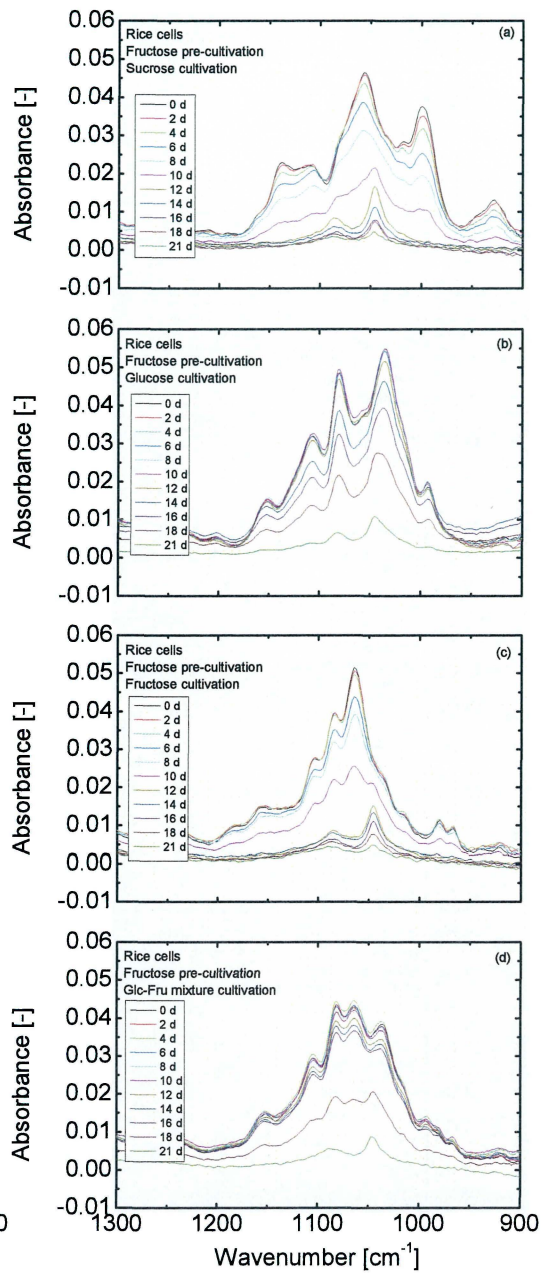


図 5-8 イネ細胞の Pre-Fru 培養における培養液成分の赤外スペクトル (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-8 Time behavior of ATR spectra of the medium during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Glc pre-cultivation in rice cells.

5-3-2. 糖およびエタノール濃度の経時変化

2章で示した各培地での検量線を用いて、培養液の赤外スペクトルから各成分を定量した。図5-9, 5-10に TBY-2 細胞とイネ細胞の Suc 前培養, 図5-11, 5-12に Glc 前培養, 図5-13, 5-14に Fru 前培養したときの糖, エタノールおよび細胞濃度の経日変化をそれぞれ示す。図より, いずれも糖の減少とともに細胞濃度の増加が確認できた。TBY-2 細胞では遅くとも10日程度ですべての糖が消費されるが, イネ細胞では20日近く要していた。そのため, イネ細胞のほうが糖消費, 細胞増殖とも緩やかに進行していた。培養後期には培地には存在していないエタノールの増加も認められた。とくに, イネ細胞では顕著で約4 g/l程度まで増加した。一方, TBY-2 細胞でも発生するもののその濃度は低く, 1 g/l未満であった。また, 本章の培養条件では2章で紹介したように, TBY-2 細胞は均一に, イネ細胞では細胞塊を形成しながら増殖していたことが確認できた。さらに, Suc 培養では各培養液で培養の経過とともにスクロース濃度が減少し, グルコースとフルクトースが増加した後, 減少することが確認できた。これは, スクロースがグルコースとフルクトースに加水分解されてから取込まれていることを示しており, 2~4章で見られた現象と同じである。

なお, 3および4章で行ったのと同様に, 糖濃度および細胞濃度の変化をわかりやすくするために, ロジスティック曲線でフィッティングを行っている。いずれも精度よくフィッティングできた。表5-3~5-8にフィッティングパラメータを示す。

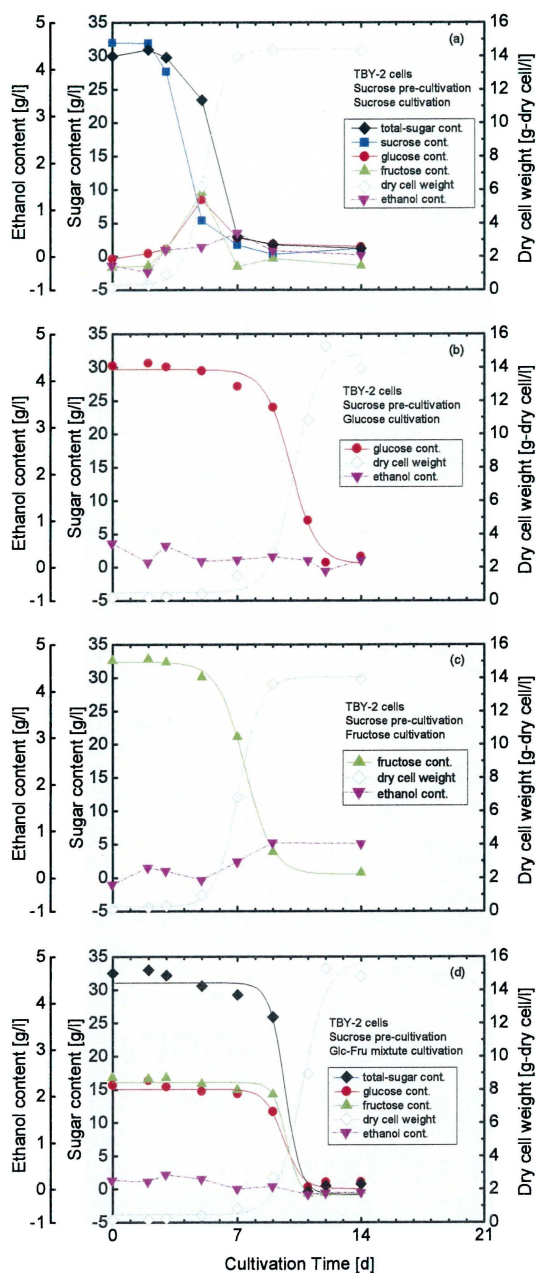


図 5-9 TBY-2 細胞の Pre-Suc 培養における培養液成分および細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-9 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Suc pre-cultivation in TBY-2 cells.

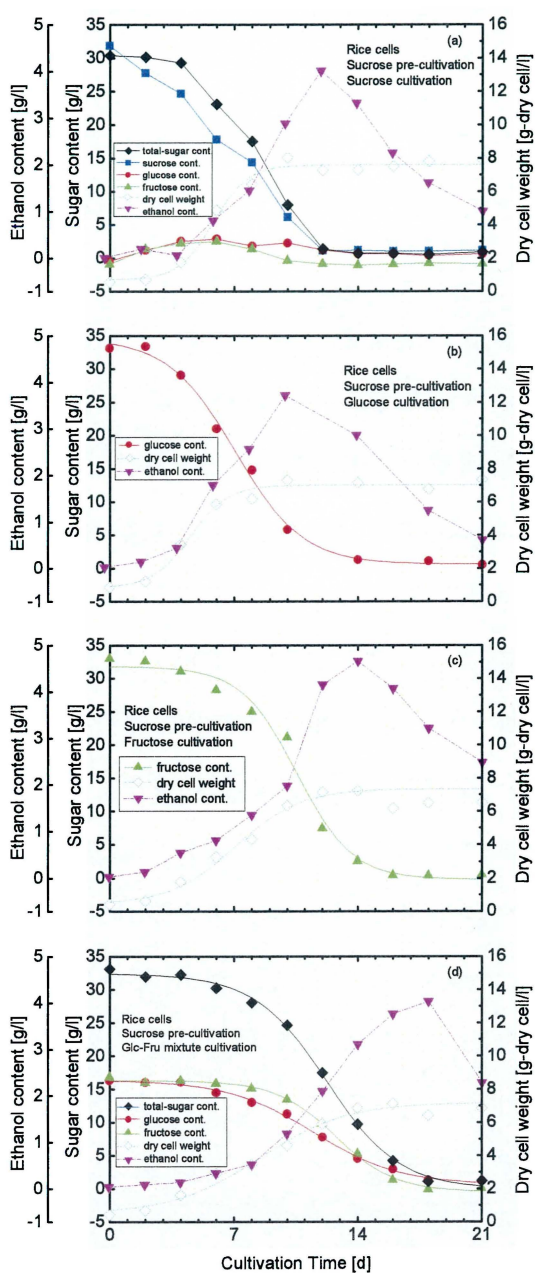


図 5-10 イネ細胞の Pre-Suc 培養における培養液成分および細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-10 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Suc pre-cultivation in rice cells.

表 5-3 フィッティングパラメータ (Pre-Suc, TBY-2 細胞)

Table 5-3 Fitting Parameters (Pre-Suc, TBY-2 cells)

		初期濃度	最終濃度	変曲点	きざみ	相関係数	速度定数
		(Initial cont.)	(Final cont.)	(Inflection point)	(Time const. ticking)	(Correlation coefficient)	(Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
Suc	Glc	-0.304	14.539	5.411	0.792	0.997	-0.085
	Fru	-0.272	16.054	5.668	0.428	0.998	-0.143
	Cell	0.302	14.392	5.191	0.586	0.999	-0.121
Glc	Glc	29.636	0.460	10.015	0.730	0.993	0.047
	Cell	0.482	14.836	10.183	0.689	0.994	-0.101
Fru	Fru	32.382	0.539	7.429	0.768	0.999	0.041
	Cell	0.263	14.057	7.053	0.627	0.999	-0.116
Glc+Fru	Glc	15.016	0.048	9.606	0.531	0.987	0.126
	Fru	16.032	-0.903	9.757	0.366	0.994	0.161
	Cell	0.459	15.710	10.641	0.710	0.992	-0.092

表 5-4 フィッティングパラメータ (Pre-Suc, イネ細胞)

Table 5-4 Fitting Parameters (Pre-Suc, Rice cells)

		初期濃度	最終濃度	変曲点	きざみ	相関係数	速度定数
		(Initial cont.)	(Final cont.)	(Inflection point)	(Time const. ticking)	(Correlation coefficient)	(Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
Suc	Glc	-0.023	15.207	8.173	1.720	0.998	-0.038
	Fru	0.132	16.360	8.184	1.341	0.997	-0.046
	Cell	0.687	7.580	5.819	0.965	0.994	-0.150
Glc	Glc	34.615	0.579	7.052	1.905	0.998	-0.015
	Cell	0.820	7.007	4.524	1.065	0.993	-0.152
Fru	Fru	31.821	-0.245	10.538	1.573	0.996	-0.020
	Cell	0.414	7.340	7.082	1.841	0.996	-0.078
Glc+Fru	Glc	16.351	0.523	11.506	2.447	0.999	-0.026
	Fru	16.263	-0.555	12.759	1.699	0.999	-0.035
	Cell	0.488	7.166	8.444	2.428	0.993	-0.062

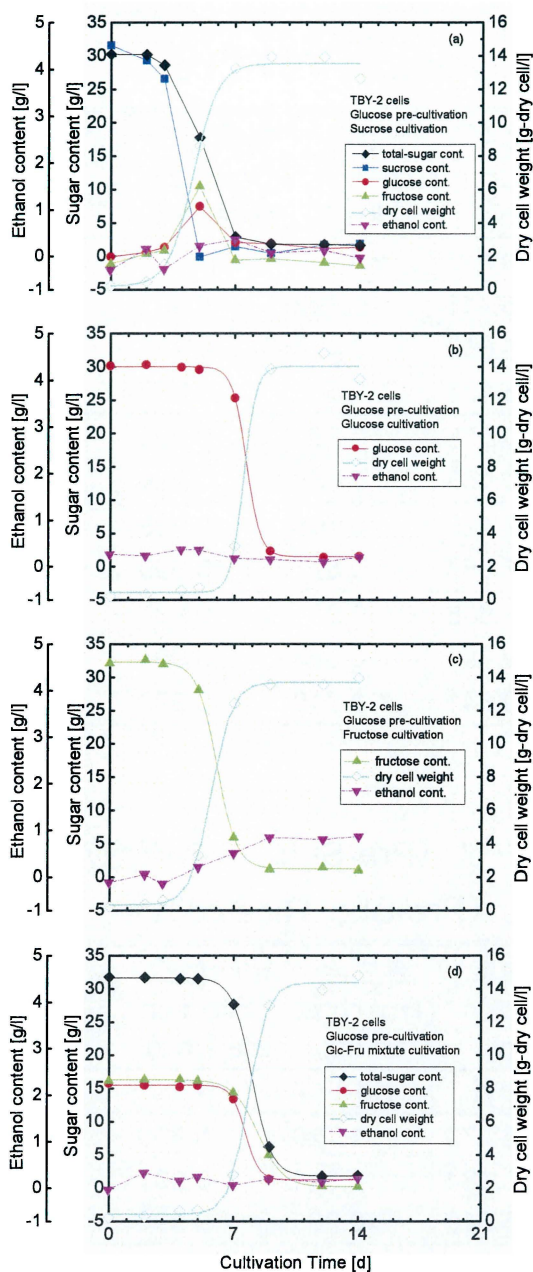


図 5-11 TBY-2 細胞の Pre-Glc 培養における培養液成分および細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-11 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Glc pre-cultivation in TBY-2 cells.

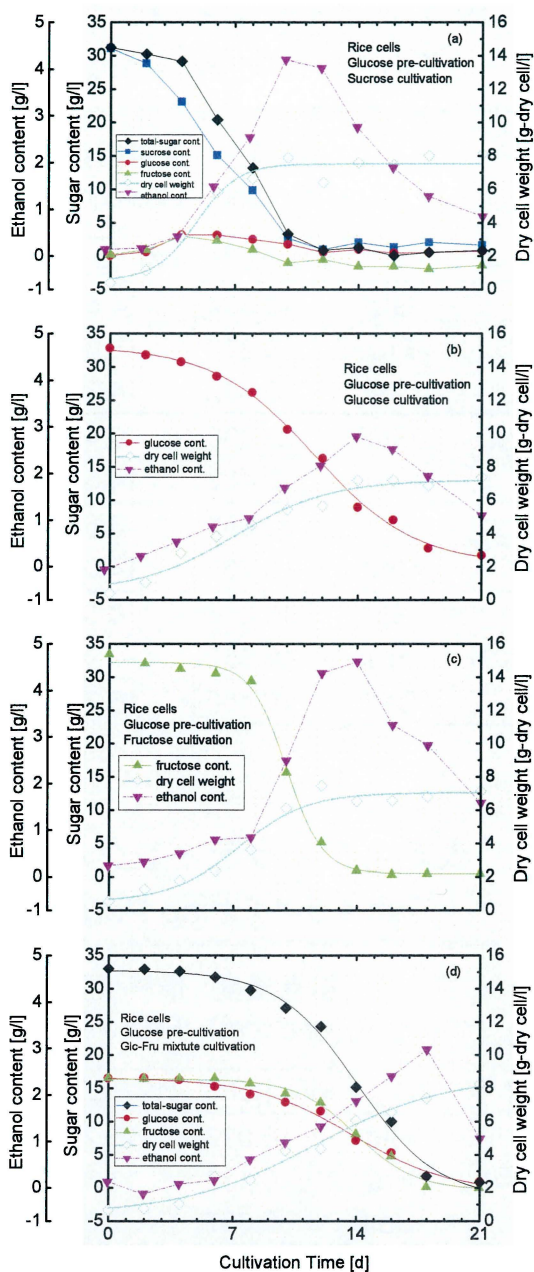


図 5-12 イネ細胞の Pre-Glc 培養における培養液成分および細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-12 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Glc pre-cultivation in rice cells.

表 5-5 フィッティングパラメータ (Pre-Glc, TBY-2 細胞)
Table 5-5 Fitting Parameters (Pre-Glc, TBY-2 cells)

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
Suc	Glc	0.017	14.358	4.618	0.712	0.999	-0.098
	Fru	0.031	15.721	5.369	0.491	0.999	-0.130
	Cell	0.213	13.536	4.619	0.698	0.998	-0.108
Glc	Glc	29.946	1.419	7.644	0.396	0.999	0.089
	Cell	0.443	14.027	7.480	0.354	0.998	-0.208
Fru	Fru	32.252	1.070	6.038	0.561	0.999	0.057
	Cell	0.325	13.684	5.725	0.577	0.999	-0.130
Glc+Fru	Glc	15.426	1.174	7.667	0.386	0.998	0.182
	Fru	16.240	0.147	8.390	0.698	0.999	0.089
	Cell	0.411	14.365	7.840	0.532	0.999	-0.135

表 5-6 フィッティングパラメータ (Pre-Glc, イネ細胞)
Table 5-6 Fitting Parameters (Pre-Glc, Rice cells)

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
Suc	Glc	-0.055	15.088	7.201	1.506	0.997	-0.044
	Fru	0.194	17.317	7.202	1.367	0.997	-0.043
	Cell	0.541	7.524	4.848	1.161	0.985	-0.123
Glc	Glc	32.995	0.285	11.547	2.858	0.999	-0.011
	Cell	0.470	7.197	7.025	2.704	0.984	-0.055
Fru	Fru	32.161	0.443	10.004	1.017	0.999	-0.031
	Cell	0.506	7.038	7.326	1.935	0.984	-0.079
Glc+Fru	Glc	16.508	-0.680	13.812	2.787	0.996	-0.021
	Fru	16.334	-0.353	14.019	1.686	0.996	-0.036
	Cell	0.418	8.725	11.684	3.738	0.991	-0.032

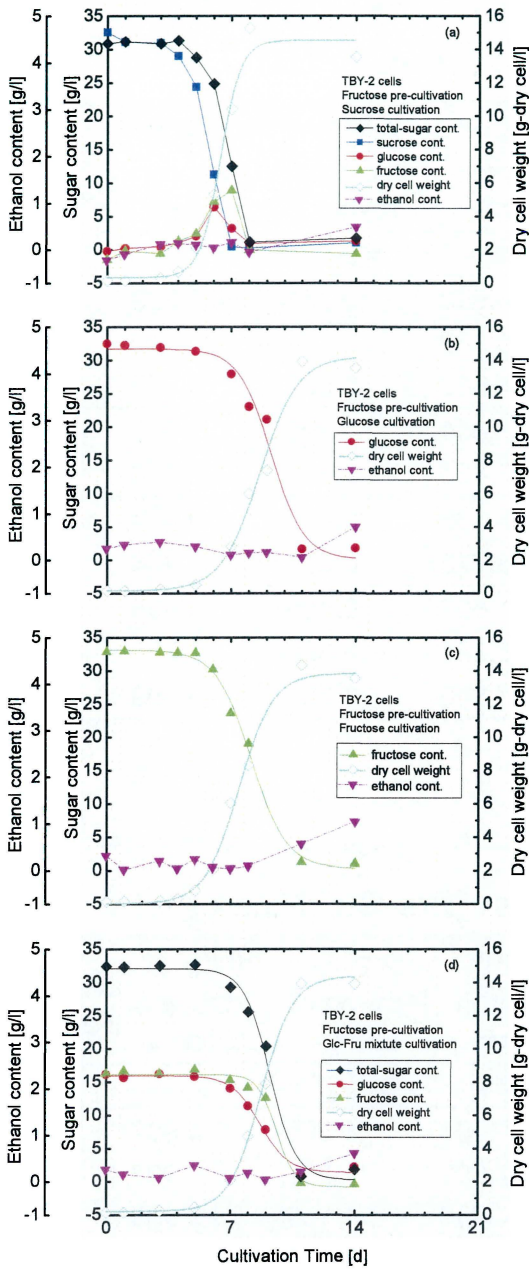


図 5-13 TBY-2 細胞の Pre-Fru 培養における培養液成分および細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-13 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Fru pre-cultivation in TBY-2 cells.

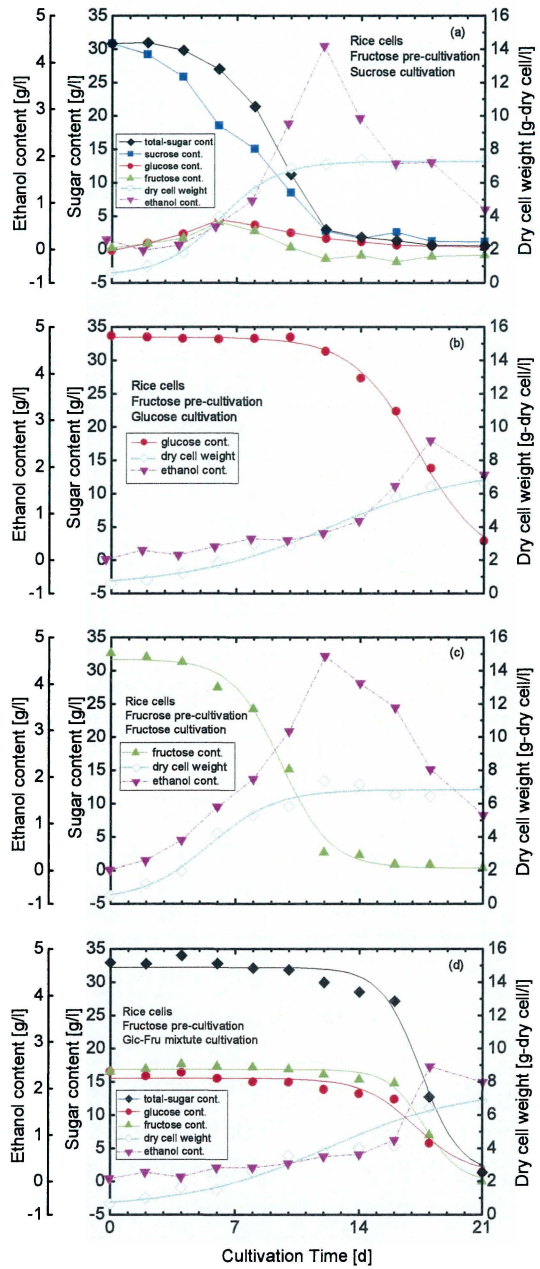


図 5-14 イネ細胞の Pre-Fru 培養における培養液成分および細胞濃度の経日変化 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-14 Time courses of sugar and ethanol concentration, and dry cell weight during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation after Fru pre-cultivation in rice cells.

表 5-7 フィッティングパラメータ (Pre-Fru, TBY-2 細胞)

Table 5-7 Fitting Parameters (Pre-Fru, TBY-2 cells)

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
Suc	Glc	0.534	15.653	6.341	0.382	0.994	-0.173
	Fru	-0.062	16.362	7.086	0.438	0.987	-0.139
	Cell	0.351	14.542	6.351	0.580	0.993	-0.122
Glc	Glc	31.697	0.092	9.257	0.921	0.979	0.034
	Cell	0.213	14.200	8.623	1.053	0.994	-0.068
Fru	Fru	33.123	0.245	8.148	0.994	0.996	0.031
	Cell	0.129	13.798	7.507	0.900	0.997	-0.081
Glc+Fru	Glc	15.942	1.345	8.689	0.804	0.991	0.085
	Fru	16.103	-0.802	9.602	0.518	0.991	0.114
	Cell	0.219	14.363	8.744	0.889	0.999	-0.079

表 5-8 フィッティングパラメータ (Pre-Fru, イネ細胞)

Table 5-8 Fitting Parameters (Pre-Fru, Rice cells)

		初期濃度 (Initial cont.)	最終濃度 (Final cont.)	変曲点 (Inflection point)	きざみ (Time const. ticking)	相関係数 (Correlation coefficient)	速度定数 (Rate const.)
		W_{ini} [g/l]	W_{fin} [g/l]	t [day]	w [-]	r [-]	k [-]
Suc	Glc	-0.221	14.823	9.188	1.590	0.999	-0.042
	Fru	0.155	16.928	8.802	1.363	0.998	-0.044
	Cell	0.451	7.279	6.067	1.603	0.999	-0.091
Glc	Glc	33.433	-0.414	17.208	1.863	0.999	-0.016
	Cell	0.444	7.512	12.241	3.989	0.990	-0.035
Fru	Fru	31.673	0.344	9.570	1.375	0.997	-0.023
	Cell	0.223	6.838	5.587	1.856	0.989	-0.081
Glc+Fru	Glc	15.507	1.050	17.220	1.498	0.985	-0.046
	Fru	16.844	-0.158	17.714	1.025	0.995	-0.057
	Cell	0.440	7.586	12.245	3.900	0.985	-0.036

5-3-3. 動的糖代謝挙動特性

(1) 実時間軸で比較したときの各細胞種の特性

表 5-3～5-8 で示したフィッティングパラメータを用いて比糖消費速度が求め、それらを比較していくことで動的糖代謝挙動を解析していく。図 5-15 に TBY-2 細胞の、図 5-16 にイネ細胞の結果を示す。図より、双方の細胞種とも、前培養の糖成分が異なると本培養での比糖消費速度が変化することが確認された。

これらの実験結果について、まず細胞種間における共通の特徴をまとめる。

①いずれの糖で前培養しても、グルコースとフルクトースが同時に培地に存在する場合 (Suc 培養, Glc+Fru 培養) は、グルコースが優先的に取込まれることが確認できた。②Fru 培養の場合のみ、比糖消費速度がピーク時間にほとんど差がなく、前培養の影響をあまり受けないことが示唆された。③Suc 培養において、Fru 前培養を行ったときのみ代謝が遅れる傾向があった、といったことが分かった。

一方、細胞固有の特徴として、TBY-2 細胞では、①本培養の糖成分に関係なく、グルコースで前培養をした場合は、他の糖で前培養したときよりも比糖消費速度のピークが早まることがわかった (Fru 培養を除く)。②Glc 培養と Fru 培養を比較したとき、前培養の糖成分に関係なく、フルクトースのほうがグルコースより消費される時期が早いことも確認できた。イネ細胞では、Glc 培養のときに前培養の影響が最も表れていた。Glc 培養および Glc+Fru 培養で、Fru 前培養時の糖認識が遅れる傾向を示したが、前培養によってグルコースの認識が遅れたことが原因であると思われる。このとき、Glc+Fru 培養のフルクトースの取込みは、グルコースが優先されているため、さらにその後に行っている。

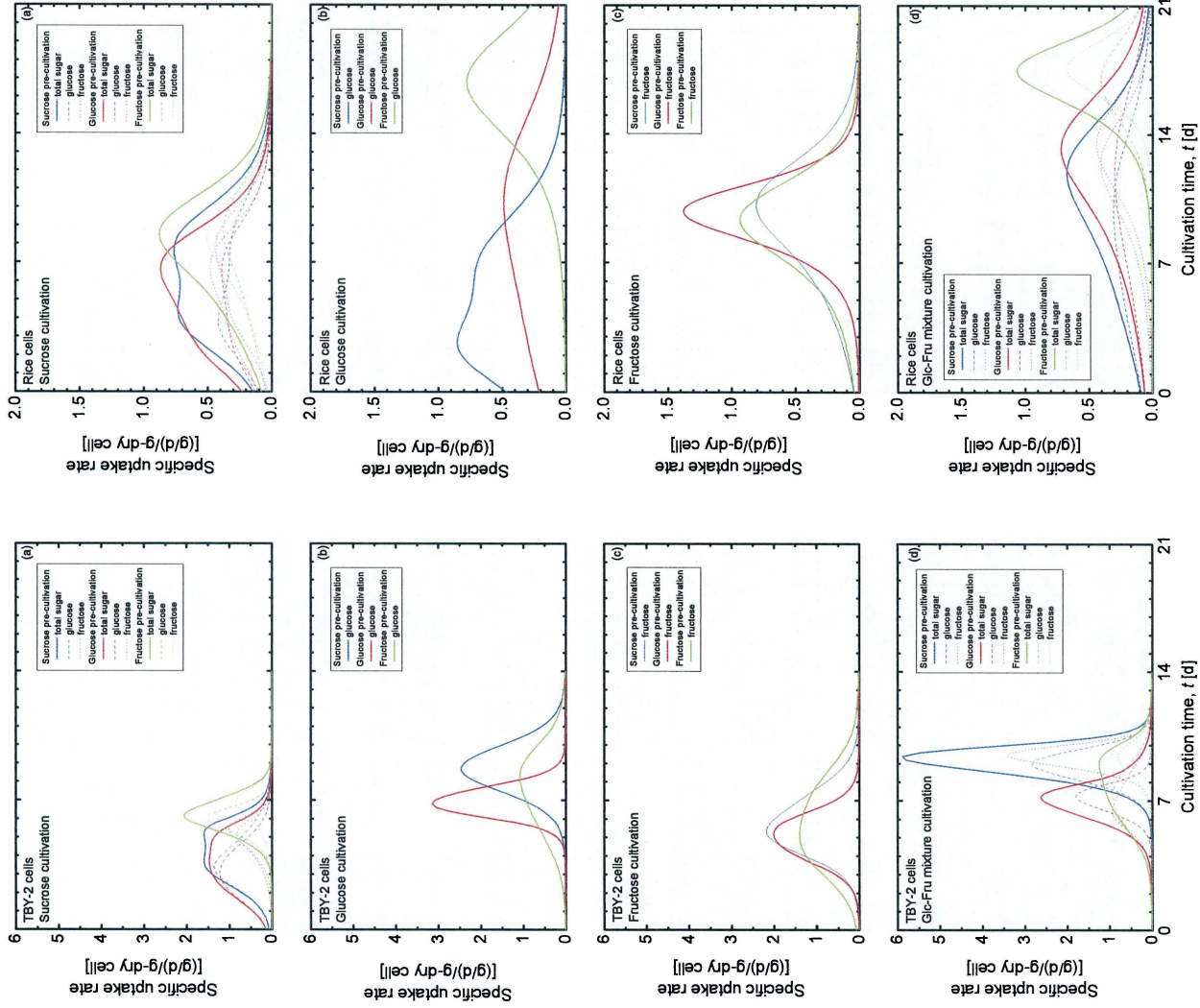


図 5-15 TBY-2 細胞の比糖消費速度の比較 (実時間) (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Gic+Fru

Fig. 5-15 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Gic+Fru cultivation in TBY-2 cells.

図 5-16 イネ細胞の比糖消費速度の比較 (実時間) (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Gic+Fru

Fig. 5-16 Time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Gic+Fru cultivation in rice cells.

(2) 無次元時間軸で比較したときの各細胞種の特徴

植物に限らず、細胞は種によって、大きさ、分裂周期、増殖の仕方、糖代謝、アルコール発酵などで特徴は異なる。これは、あらゆる動作や現象で、その過程や処理能力などに様々な差異があるからである。したがって、異なる植物細胞種の糖代謝挙動を比較するには、(1)で示した実時間によるデータでは十分な比較はできない。そこで本章でも、3、4章で採用した細胞増殖を基準とした無次元時間軸を用いて、比糖消費速度を比較した。この解析方法は、増殖ステージをそろえた比較を行うことができるため、代謝特性の異なる細胞を比較する方法として有効であると思われる。これを用いて、各細胞種の特徴を検証した。

表 5-3~5-8 に示したフィッティングパラメータを用いて、無次元時間軸による比糖消費速度の比較を行った。TBY-2 細胞は図 5-17 に、イネ細胞は図 5-18 に示す。TBY-2 細胞では、各ピークの T 値はほとんどマイナス ($T < 0$) であったが、イネ細胞では、逆にプラス ($T > 0$) がほとんどだった。これは、①TBY-2 細胞では細胞増殖よりも糖消費が早く、②イネ細胞では遅いということを示唆しており、各細胞の固有の特徴を示していると言える。また、これらは前培養および本培養の糖成分に関わらず見られる特徴であることから、培養開始から糖取込みまでに要する時間は前培養および本培養の糖成分によって変化するが、細胞増殖を基準として考えると、糖取込み以降の糖代謝過程には大きな変化はない、ということも示唆している。

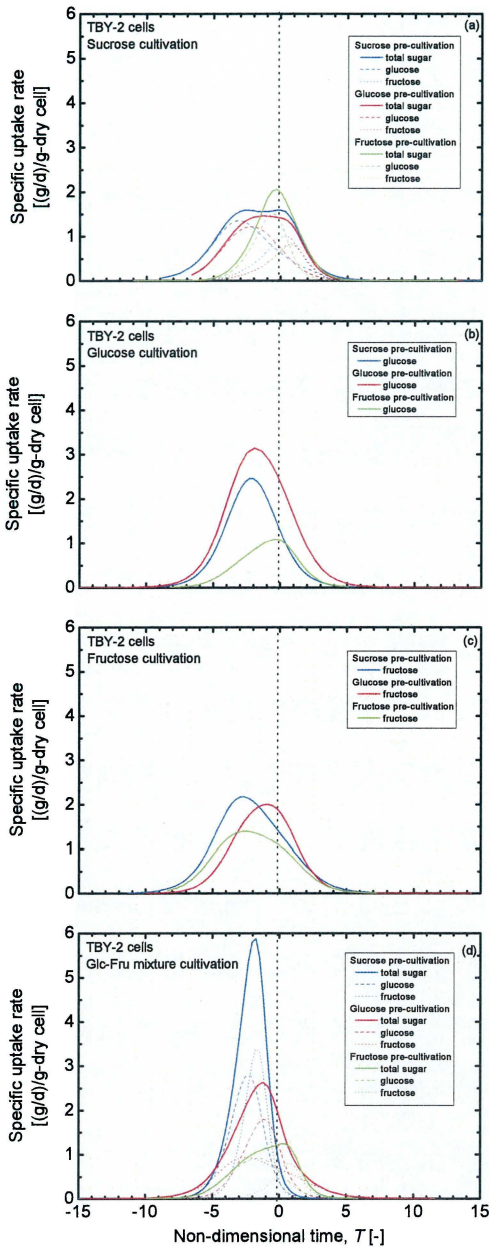


図 5-17 TBY-2 細胞の比糖消費速度の比較（無次元時間）
 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-17 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation in TBY-2 cells.

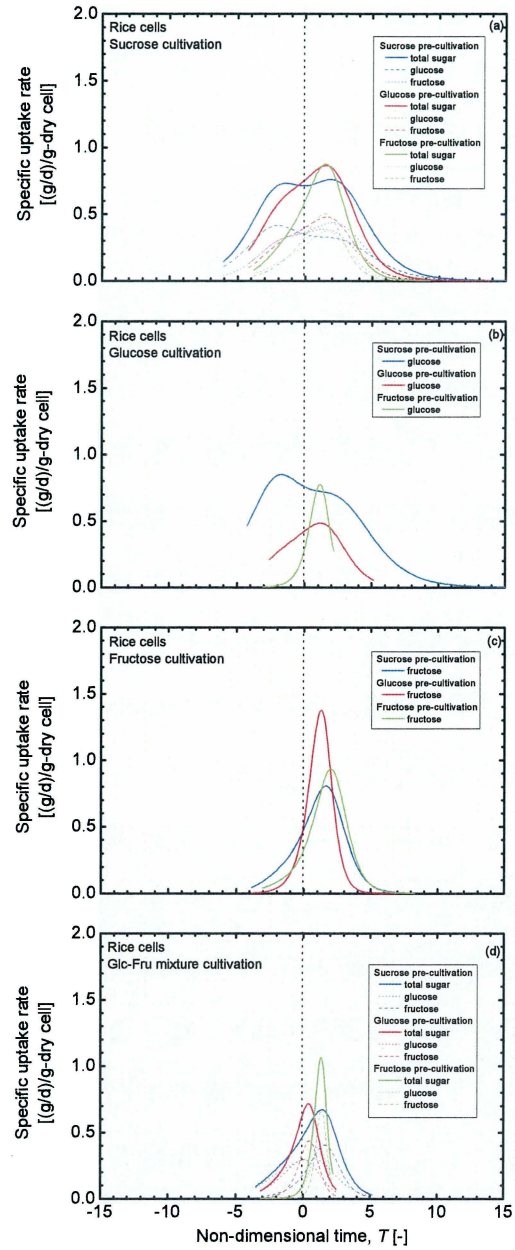


図 5-18 イネ細胞の比糖消費速度の比較（無次元時間）
 (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-18 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation in rice cells.

5-3-4. エタノール濃度の比較

各細胞種でのエタノール発酵の特性を把握するため、ここでも細胞増殖を基準とした無次元時間軸を採用し、それぞれを比較した。図 5-19 に TBY-2 細胞での、図 5-20 にイネ細胞での、培養液中のエタノール濃度の変化を無次元時間軸でそれぞれ示した。培養液中に含まれる最終的な細胞量（乾重量）は TBY-2 細胞のほうが多いにもかかわらず、TBY-2 細胞よりイネ細胞のほうが多量のエタノールを放出していることがわかった。これは、イネ細胞は凝集しながら増殖しているため、嫌気的な条件になりやすい、あるいは、5-3-3 の結果から、イネ細胞は糖消費よりも先に増殖を行っていたが、これは、十分な炭素源を供給される前に増殖していることを示唆しており、発酵代謝が起こりやすくなる、などが原因として考えられる。また、TBY-2 細胞では、発生するエタノールが少ないので傾向はつかめないが、イネ細胞では、培養条件によってエタノール濃度の最大値は多少ばらついているものの、濃度変化は類似した傾向を示していた。具体的には、 T が 0 を越えたあたりから濃度が上昇し始めることや、その傾きも酷似していることが分かった。このことは、イネ細胞では細胞増殖をした後、少し遅れてエタノールが発生していることを示している。以上のことから、イネ細胞では糖を取りこんでから代謝していく過程については酷似しており、この部分は前培養や本培養の糖成分の影響をあまり受けないことが示唆された。このように、時間軸を実時間から無次元時間に変えたことで、細胞固有の代謝特性が把握できた。

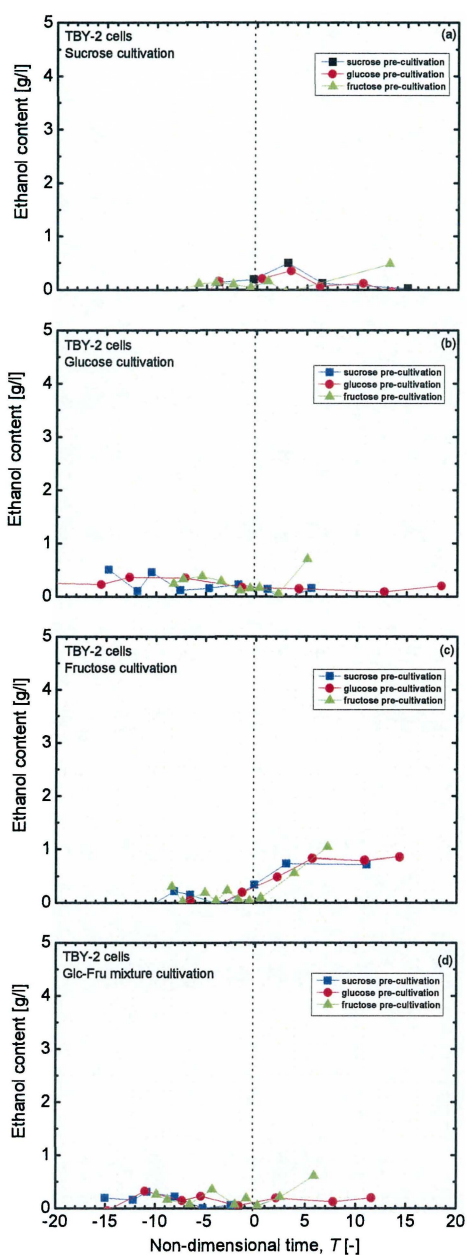


図 5-19 TBY-2 細胞のエタノール濃度の比較（無次元時間）
(a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-19 Non-dimensional time courses of ethanol content during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation in TBY-2 cells.

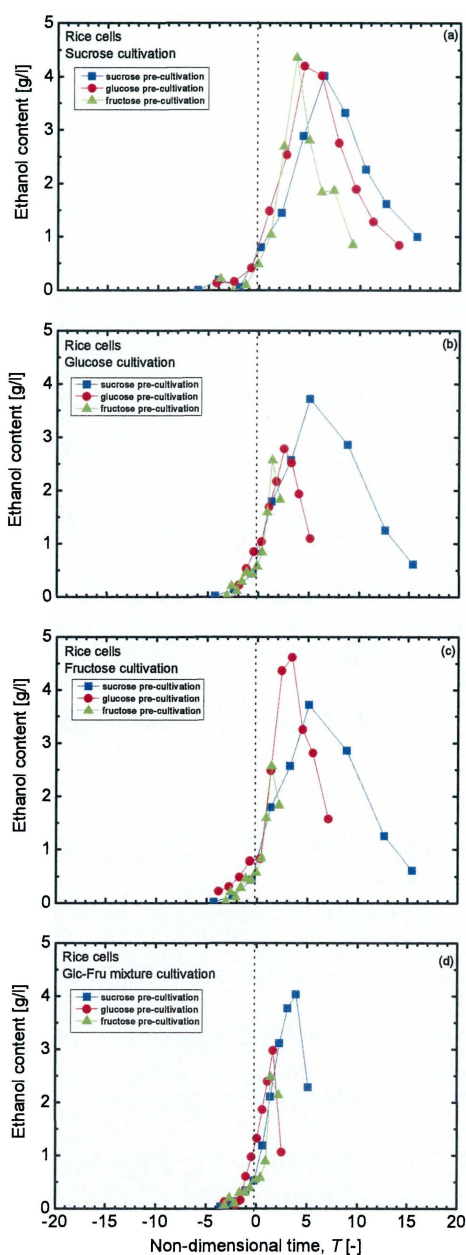


図 5-20 イネ細胞のエタノール濃度の比較（無次元時間）
(a) Suc, (b) Glc, (c) Fru, (d) Glc+Fru

Fig. 5-20 Non-dimensional time courses of ethanol content during (a) Suc, (b) Glc, (c) Fru and (d) Glc+Fru cultivation in rice cells.

5-4. 本章の結論

本章では、2章で定量法を確立した赤外分光法を援用して、異なる植物細胞種（TBY-2細胞とイネ細胞）の前培養と本培養の糖成分が動的糖代謝挙動におよぼす影響を把握することで、前培養により形質発現させた細胞の炭素源に対する応答を比較した。この解析にも、3、4章のTBY-2細胞と同様、イネ細胞においても培養液中の糖濃度と細胞濃度の予測モデルとしてロジスティック関数を適用し、比糖消費速度を算出することで行った。さらに、細胞増殖を基準として時間軸の無次元化を行うことで、増殖ステージをそろえた比較も行い、細胞種間での動的糖代謝挙動の比較を試みた。得られた結果を以下にまとめる。

細胞種間の共通の特徴として、

- ① 前培養の糖成分に関わらず、グルコースとフルクトースが同時に培地中に存在する場合（Suc培養、Glc+Fru培養）、グルコースが優先的に取り込まれる
- ② Fru培養の場合のみ、比糖消費速度がピーク時間にほとんど差がなく、前培養の影響をあまり受けない
- ③ Suc培養において、Fru前培養を行ったときのみ代謝が遅れる

といったことが挙げられた。

また、各細胞種の特徴として、TBY-2細胞では、

- ④ 本培養の糖成分に関係なく、グルコースで前培養をした場合は他の糖で前培養したときよりも比糖消費速度のピークが早まる
- ⑤ Glc培養とFru培養を比較したとき、前培養の糖成分に関係なく、フルクトースのほうがグルコースより先に消費される
- ⑥ 糖消費の後に、細胞増殖が起こる
- ⑦ エタノールの発生量は、イネ細胞よりも少量だった

などの特徴があった。

一方、イネ細胞では、

- ⑧ Glc培養した場合、前培養の影響（とくにFru前培養）が大きい。

- ⑨ 細胞増殖の後に、糖消費が行われる
- ⑩ エタノール発生量が TBY-2 細胞より多く、細胞増殖に少し遅れて濃度が増加する

といった特徴が把握できた。

これらのことから、TBY-2 細胞もイネ細胞も糖取込み挙動に前培養および本培養の培地の糖成分が影響をおよぼしていることがわかった。しかし、無次元時間軸による比較で、糖消費と細胞増殖の関係が各細胞種で共通した特徴(⑥, ⑦, ⑨, ⑩)を有していることから、糖取込み後の代謝過程にはあまり影響が見られないことがわかった。

以上のように、異なる植物細胞種の動的糖代謝挙動を比較することで、各細胞種で共通する特徴、細胞固有の代謝特性、細胞増殖とエタノール発酵の関係が把握できた。また、ここで用いた無次元時間軸による解析方法は、異なる細胞種間を比較するための有効な手段となりうることも示された。

ところで、本研究では細胞増殖の特徴として対照的(凝集の有無)な細胞を選択したが、2種類しか扱っていなかった。これらの中に位置するような植物細胞、例えばシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) など他の種類の植物細胞でも同様の実験を行い、本章の成果を検証する必要があると考えられる。

6章. 結言

6-1. 本研究の成果

本研究の成果をまとめたものを図 6-1 に示す. この図に沿って, 本研究の成果を, 2 章: 赤外分光法による糖代謝成分の定量法の確立, 3 章: 培地中の炭素源種が TBY-2 細胞の糖代謝におよぼす影響, 4 章: 前培養条件が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響, 5 章: 異なる植物細胞種による糖代謝挙動の比較の順に整理する.

6-1-1. 赤外分光法による糖代謝成分の定量法の確立

2 章では, 赤外分光法による培地中の糖代謝成分 (糖およびエタノール) の同時定量法の確立を目指した.

R2S 培地の指紋領域におけるスペクトルの加性が実験的に確かめられ, 各ピーク波数における検量線を組み合わせることで糖 (Suc, Glc, Fru) とエタノールの同時定量法を確立した. また, 調製サンプルと培養液サンプルを用いて, 従来法である HPLC 法と比較することで, FT-IR/ATR 法は HPLC 法と同等程度の精度があることが確認できた. さらに, スペクトルから分子構造的な情報も得られ, 定量情報以外の様々な情報も同時に取得できる可能性も示し, 本方法の優位性を明らかにした.

MS 培地においては, 既報の研究で, 複数の糖成分 (Suc, Glc, Fru) の同時定量法が示されている [17]. そこで R2S 培地と同様に, 糖だけでなくエタノールも同時に測定できる定量モデルを作成した. さらに, このモデルの有効性を確認するため, エタノールが存在しない場合 (3 成分系; Suc, Glc, Fru) と存在する場合 (4 成分系; 3 成分+EtOH) の定量モデルをそれぞれ用いて, 培養液中の成分定量を行い比較した. その結果, 4 成分系 (+EtOH) の方が 3 成分系 (-EtOH) より HPLC 法とよく一致しており, 精度が高いことが示され, エタノールを考慮した定量モデルの有効性が確認された. この定量モデルをもとに MS 培地中における Glc, Fru, Man, Gal, Suc, Tre, Mal, Lac, EtOH の検量

線をそれぞれ作成し、3章以降の培地成分の定量に活用した。

6-1-2. 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

3章では、単糖類の分子構造および二糖類の結合形態の差異が標準状態の TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響について検討した。

単糖類では、マンノース [29-31]とガラクトース [34-36]は、植物の成長には毒性を示すといわれていたが、本研究においては、TBY-2 細胞に消費されたものの長いタイムラグが必要であった。その原因として、取込まれたガラクトースが原因で、UDP-Glc の生合成を阻害するなどの影響が考えられた。しかし、ガラクトースで長期間培養を続けたことにより、UDP-Gal を UDP-Glc に変換する酵素である UGE の活性が高まり、ガラクトースを炭素源として利用できるようになったと推察できた。UGE はガラクトース代謝では鍵となる酵素であると言える。一方、Gal 培養時のみ各細胞が小さな細胞塊を無数に形成しながら増殖していた。これは、ガラクトースの阻害作用により、細胞内の UDP-Glc/UDP-Gal 比が変化したためではないかと考えられた。この構成比が変わると、これらを基にして合成される細胞壁のペクチン多糖の構成比も変化するため、細胞間接着力が強まり、細胞凝集がおこったのではないかと推測された。

二糖類について、Suc 培養と Tre 培養では細胞によって単糖類に加水分解されてから取込まれたことが確認できた。しかし、Mal 培養では構成糖であるグルコースがほとんど検出されなかった。培養液中のマルターゼ活性を測定したところ、マルターゼはほとんど存在せず、マルトースはマルトーストランスポーターによって直接細胞内に取込まれている可能性が示唆された。また、TBY-2 細胞はラクトースを分解、消費しないことも分かった。

本研究では、培養液中の成分の定量に FT-IR/ATR 法を用いたが、この方法は瞬時に測定できるため、経時的なデータを豊富に取得しやすい。そのため、培養液中の糖濃度と細胞濃度の予測モデルとして、ロジスティック関数の一種であるボルツマン関数を適用し、比糖消費速度を算出することができた。これによ

り、細胞の糖代謝挙動を経時的な連続データとして扱うことを可能にした。この解析方法を用いて、培地中に含まれる単糖類と二糖類の種類が動的糖代謝挙動におよぼす影響を検討した。比糖消費速度のピーク時期に着目すると、Suc 培養 (5 日), Fru 培養 (6 日), Glc 培養 (9 日), Man 培養 (13 日), Tre 培養 (15 日), Mal 培養 (16 日), Gal 培養 (50 日) の順であり、培養開始から糖消費が始まるまでのラグタイムは、培地の糖成分によって差があることがわかった (Lac 培養では糖消費および増殖が認められず)。これを整理すると、糖代謝が早いグループ (Suc, Glc, Fru) と遅いグループ (Tre, Mal, Man, Gal) に分類することができた。早いグループの糖成分は、糖代謝に欠かせない主要な成分で、炭素源として用いやすかったと考えられる。一方、遅いグループの糖成分は、炭素源として活用するには、複雑なプロセス (Suc, Glc, Fru あるいはこれらのリン酸化, UDP 化されたもの等への変換) が必要なため代謝までタイムラグが発生したと考えられる。代謝が開始されるまでの細胞はストレス (飢餓) 状態で、代謝に必要な酵素の活性レベルを能動的に高めることで、これを解消していたと思われる (Tre は取込み前の分解酵素が関与)。このとき、ストレス状態を伝達し、必要な酵素の活性レベルを高めるなどの対応に時間を要していたと思われる。

つぎに、フィッティングすることで得られたパラメータを用いて、細胞増殖を基準とした時間軸の無次元化を行い、増殖ステージをそろえた比較を行った。その結果、すべての場合で増殖の前に糖を消費し、さらに増殖に少し遅れてエタノール濃度が増加するという特徴が確認できた。このように、時間軸の無次元化で、動的糖代謝挙動に関するさらなる知見が得られることが分かった。

これらの特徴を踏まえた上で、混合糖 (Glc+Fru, Glc+Man および Glc+Gal) での培養を試み、以下のことが分かった。全ての場合でグルコースが優先的に取込まれていること、Glc+Fru 培養, Glc+Man 培養ではグルコースの消費のピークのタイミングがほぼ同じであったこと (Glc+Gal 培養は極めて異なる変化だったため判然としない)、グルコースを含む混合糖での培養をすることで、フルクトースは消費が遅れ、マンノースは早まったとこと、さらに、グルコース

自身は単独での培養より，他の糖との混合培養の方が消費のピークが早まることである．また，Glc+Gal 培養では，細胞の凝集塊が見られた．グルコースの存在が影響して，糖消費および細胞増殖が早くから開始されるものの，その速度は非常に遅く，ガラクトースの阻害作用が影響していると考えられた．また，このときのガラクトースの消費速度も，培養期間を通じて非常に低い状態であった．したがって，この培養系では UGE の活性レベルも低い状態のままであったことが示唆された．一方，Lac 培養では代謝されなかったが，それを構成している Glc+Gal 培養では糖は消費された．このことから，TBY-2 細胞はラクトースを直接取込むトランスポーターやラクダーゼを有していないと思われる．

ところで，細胞量は培養液の濁度から算出しているが，Gal を含む培地の培養では細胞が凝集するため塊内部では死細胞も散見されていた．しかし，濁度による細胞濃度算出では細胞の生死まで考慮できないため，比速度の算出が正確ではない（低い値になる）恐れがある．また，細胞が凝集する理由として，細胞壁中のガラクトース濃度が関与していると推測したが，今後それを確かめていく必要がある．

6-1-3. 前培養条件が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響

3 章で，培地中の炭素源種が糖代謝挙動に影響をおよぼすことが明らかとなったが，このような変化が起こる具体的な環境・条件は詳しく検証されていない．そこで，4 章では，前培養条件（糖成分・培養期間）が TBY-2 細胞の糖代謝挙動におよぼす影響を検討し，形質発現させた細胞の炭素源に対する応答の把握を試みた．具体的には，前培養の糖成分を標準のスクロースと異なる糖を用い，本培養ではその糖での培養と Suc 培養を比較して，糖代謝挙動が変化する炭素源を確認する．前培養期間も，誘導期，対数期，定常期の 3 種類設定し，前培養期間がおよぼす影響もあわせて検証した．

前培養の糖成分による変化について以下にまとめる．グルコースによる前培養期間が長くなると代謝が遅く，フルクトースでは早くなる傾向が示された．

また、マンノースで前培養を行うと、Suc 培養でのグルコースとフルクトースの消費に大きなタイムラグが生じたことから、マンノースに関わる培養では、マンノースをフルクトースに変換する酵素である PMI の活性が関与している可能性が示唆された。ガラクトースで前培養を行うと、Gal 培養で劇的に消費が早まった。ガラクトース代謝には、UGE の活性が関与している可能性がある、として3章で指摘したが、ガラクトースによる前培養で活性が高まったため、ガラクトースに適応した細胞に変化したのではないかと考えられた。さらに、このような形質発現は、ガラクトースを含む培地で約30日以上培養することで起こった。また、ガラクトースで前培養しても Suc 培養であれば凝集は起こらないが、Gal 培養であれば、前培養に関係なく凝集が起こることもわかった。この現象は3章でも触れたが、4章でより詳しい成果が得られた。

つぎに、前培養期間が異なる培養条件で比較した場合について述べる。誘導期では Gal 前培養後の細胞が増殖しなかったことを除けば、大きな変化はなく、対数期では、Suc 培養は Man 前培養以外の消費時期が似ているが、Suc 以外の培養においては、Fru 培養では変化がなかったが、Glc, Man 培養では遅くなり、Gal 培養では大幅に早くなるなど様々な変化が見られた。定常期では、Suc 培養は Man 前培養以外で変化がほとんどなく、Suc 以外の培養でも実時間では大きな変化があった。これらのことから、前培養の培養期間による変化は、誘導期では小さく、対数期、定常期では大きくなることが分かった。一方で、無次元時間軸で比較すると、Fru 培養以外で前培養と本培養で大きな差があまりなく、糖取込み後の代謝過程には、大きな変化がなかったことも示唆していた。

以上のことから、赤外分光法を援用して前培養条件（糖成分・培養期間）を変化させることで形質発現させた TBY-2 細胞の炭素源に対する応答を把握することが出来た。

6-1-4. 異なる植物細胞種による糖代謝挙動の比較

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。また、4章では前培養の糖成分や培養期間が TBY-2 細胞の動的糖代謝挙動に影響をおよぼしていることが示唆された。そこで、5章では異なる植物細胞種（TBY-2 細胞とイネ細胞）による動的糖代謝挙動、特に前培養と本培養の糖成分がおよぼす影響を比較した。この解析にも、3章同様ボルツマン関数を適用し、比糖消費速度を算出することで動的糖代謝挙動を把握した。さらに、細胞増殖を基準とした無次元時間軸を用いることで、細胞種間の比較を行った。

両細胞種とも、前培養の糖成分が異なると本培養での比糖消費速度が変化することが確認された。まず、前培養の糖成分に関わらず、グルコースとフルクトースが同時に培地に存在する場合は、グルコースが優先的に取込まれることが確認できた。しかし、フルクトースで本培養を行った場合のみ、前培養の影響をあまり受けないことが示唆された。また、Suc 培養ではフルクトースで前培養を行ったときのみ代謝が遅れた。

TBY-2 細胞では、本培養の糖成分に関係なく、グルコースで前培養をした場合は他の糖で前培養した場合よりも比糖消費速度のピークが早まることなどがわかった。また、イネ細胞では、Glc 培養時に前培養の影響（とくに Fru 前培養）が大きくなった。さらに、培養時間を無次元化して両者を比較すると、前培養および本培養の糖成分に関わらず、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という細胞固有の特徴も把握できた。さらに、この解析手法を用いて各細胞でのエタノール発酵を比較すると、TBY-2 細胞ではエタノール発生量が少なく、その特徴をつかむことは困難であったが、イネ細胞では、細胞増殖後にエタノール発酵が起こるという共通の特徴が認められた。これらから、TBY-2 細胞もイネ細胞も糖取込み挙動に前培養および本培養の培地の糖成分が影響をおよぼすが、細胞増殖を基準とした無次元時間軸で比較すると、糖取込み後の代謝過程にはあまり影響がないことがわかった。

以上のように、異なる植物細胞種の動的糖代謝挙動を比較することで、各細胞種で共通する特徴、細胞固有の代謝特性、細胞増殖とエタノール発酵の関係が把握できた。また、無次元時間軸を用いた解析方法は、細胞種間で動的糖代謝挙動を比較する方法として有効であることも示された。

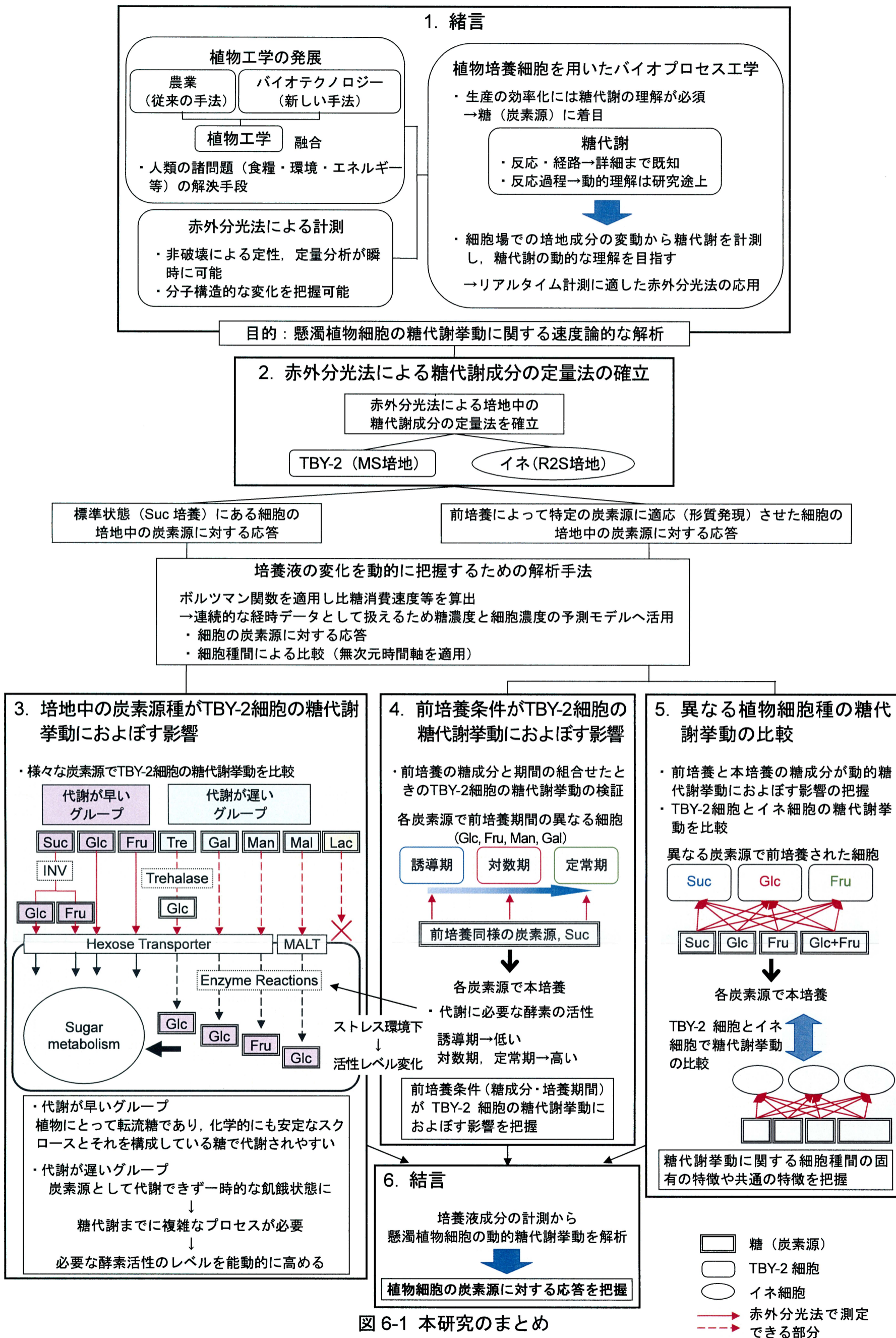


図 6-1 本研究のまとめ

Fig. 6-1 Conclusion.

6-1-5. 本研究の結論

これまで、本節では本研究の成果を示してきた。本項ではこれらの成果から総合的な考察を行い、最終的な結論を述べていく。

細胞の生理学的現象は代謝を通じて行われるが、糖代謝経路についてはいわゆる代謝マップによりかなり詳細に解明されてきており、遺伝子の構造と機能が分かれば人為的に代謝経路を作成、改変する代謝工学も可能である。しかし、これまでに構築されてきた代謝マップには、いろいろな見地からの解釈や複雑性が内在している。細胞の各器官で起こる生化学反応も、細胞を破壊的に処理し、*in vitro* で計測することによって解明したに過ぎず、細胞の局在的な部分しか理解できていない。したがって、個々の生化学反応が明らかになったとしても、それらを実際に *in vivo* で計測できない部分が多々あり、ある特定の条件化での実際の経路を特定することも困難である。また、経路やエネルギーの変化はある程度分かるものの、速度論的な研究がされていないため、細胞全体の生物情報や物質収支の流れ (Flux) もほとんど分かっていない。そのため代謝工学では、代謝経路だけではなく、代謝フラックス (Metabolic Flux) という考え方が重要である。これは、インプットの代謝物質が経路を経てアウトプットを生成するときの反応速度のことである。代謝フラックスを解析することは、細胞全体の代謝プロセスの中で用いられている経路を解析することになる [145]。

このような解析を行うためには、細胞場である培養液成分の定性、定量的な情報を経時的に把握することが求められる。一般的に、このような測定には HPLC 法が用いられる。HPLC 法は定量の精度は高いものの、測定に時間を要するため、オンライン測定には適していない。そこで、2 章では赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) を援用した培養液成分の定量法を確立し、この方法を用いて培養液中の栄養分である糖と代謝産物であるエタノールを同時定量できることを示した。この手法は、HPLC 法に比べて測定時間が格段に短く、非破壊による測定が可能であることから、オンラインモニタリングの可能性を有している。また、スペクトルパターンの変化から、理論的には培養液成分のすべての変化

を分子レベルで構造的に把握できることから、培養液に含まれている糖の立体構造や結合状態も経時的に捉えることができた。これは、カラムの選択、前処理および測定条件によって得られる情報が限定的になってしまう従来法の HPLC 法と比べて大きな利点である。一方、測定精度に関して、原理的には従来法である HPLC 法は低濃度領域の、FT-IR/ATR 法は高濃度領域の定量に適している。そこで、本研究では、これらの測定法を調製サンプルと培養液サンプルを用いて比較したところ、FT-IR/ATR 法は HPLC 法と同等程度の精度があることを実験的に確認した。

この赤外分光法を援用して、本研究では細胞場である培養液成分を定量的、かつ経時的に計測することで、細胞の炭素源（入力）に対する応答（出力）を速度論的に解析し、細胞全体として炭素源の流れを把握することを試みた。

FT-IR/ATR 法は前述したとおり、簡便かつ瞬時に測定できるため、経時的なデータを豊富に取得できる。そのため、培養液成分や細胞量の変化をボルツマン関数でフィッティングすることができ、比糖消費速度等を求めることができた。これを用いれば、細胞の糖代謝挙動を連続的な経時データとして扱うことが可能になり、得られたデータから細胞の炭素源に対する動的糖代謝解析することができた。以下にそれらを示す。

TBY-2 細胞を様々な炭素源で培養して糖代謝挙動を比較した結果、糖成分による差異が認められたが、それらは糖代謝の早いグループ (Suc, Glc, Fru) と遅いグループ (Tre, Mal, Man, Gal) に分類できた。この分類には、細胞が糖を炭素源として速やかに活用できるかどうか深く関与していることが示唆されたことはすでに述べた。多くの植物にとって、スクロースは転流糖であるため植物体内に広く分布している。そのためスクロースは、糖代謝を行うには最も扱いやすい炭素源であり、構造的にも安定しているため、本研究でも最も早く代謝されたと考えられる。また、スクロースを構成するグルコース、フルクトースに関しても同様に、糖代謝に組み込みやすい糖であるといえる。しかし、細胞はこれらと異なる炭素源を供試されると、その種類によっては糖代謝までに複雑なプロセスを要する場合がある。このような場合、細胞が互いに凝集した

りするなど、Suc 培養では起こらない現象も確認できた。

また、フィッティングにより得られたパラメータを用いて時間軸の無次元化を行った。これは、増殖ステージをそろえた比較を行うためである。その結果、細胞は糖取込み開始までの時間には大きな差異があるものの、その後の代謝過程には大きな差がないことが分かった。また細胞は、先に糖消費してから増殖し、さらにそれに少し遅れてエタノール発酵を起こすこともわかった。このように、無次元時間軸による比較をすることで、動的糖代謝挙動に関するさらなる知見を獲得することができた。

つぎに、前培養によって特定の炭素源に適応（形質発現）させた細胞や、種が異なる細胞の培地中の炭素源に対する応答を比較した。このような、糖代謝特性や種類が異なる細胞の比較にも、増殖ステージをそろえた比較を行うことができる細胞増殖を基準とした無次元時間軸を用いた。その結果、スクロースとは異なる炭素源で前培養することで、新たな形質を発現することが確認できた。さらに、種の異なる細胞（TBY-2 細胞とイネ細胞）の糖代謝挙動を比較して、それらに共通する特徴や細胞固有の特徴も把握できた。

これらのことから、細胞の炭素源をコントロールすることで遺伝子発現が起こり、Suc 培養時には活性化していない酵素群を活性化させて別経路の反応を形成することで、新たな形質を持った細胞が得られる可能性を示した。

以上のことから、本研究の結論としてつぎのことが得られた。代謝フラックスを理解するためには *in vivo* での計測が必須となるが、本研究の培地成分の測定に赤外分光法を援用することによって、非破壊で短時間に、しかも複数成分を同時に高精度で定量できることが分かった。このことから、赤外分光法が培養液成分のオンラインでモニタリングに適していると考えられる。しかも、取得したスペクトルからは既知成分の定量情報だけにとどまらず、生化学反応の分子構造的な変化等も把握でき、さらには未知成分の情報をもスペクトルの形で保存することができる。このような多様な情報は、計測面だけではなく制御面においても有益であると思われる。また、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

を実験的に示した。炭素源などの培養条件によって代謝機構を制御し、細胞の潜在的な能力を引き出すことで、品種改良や有用資源などの効率的な獲得につながれば、従来の代謝工学である遺伝子工学的手法を用いた代謝経路の改変と同等の効果が得られると思われる。

6-2. 本研究の課題

ここでは、本研究での課題を挙げていき、それに対する解決策を提示していく。本研究の糖代謝成分の定量には赤外分光法を援用してきた。その際、各成分のピーク波数における吸光度とモル濃度の関係による検量線（単回帰）を組み合わせることで、赤外分光スペクトルから糖およびエタノール濃度の定量が可能であることを2章で示した。しかしこの定量法では、対象となる成分のピーク波数が互いに近い場合、これらの説明変数は高い相関性（共線性）を持ってしまい、回帰性能が劣化する恐れがある。本研究においても、3章で TBY-2 細胞による Mal 培養を行っているが、仮にマルトースが分解されれば培地中にはマルトースとグルコースが同時に存在することになる。ところがこれらのスペクトルパターンはよく似ており、そのピーク波数も非常に近いため正確な定量が難しい。この章ではマルターゼの酵素活性測定を行っており、マルトースとグルコースの微量定量が必要となったが、その測定に HPLC 法を活用せざるを得なかった。このような場合でも、赤外分光法を用いた精度の高い定量法を確立することは、本研究の課題である。そこで、解決策として、ピーク波数を複数採用した線形重回帰による定量法の可能性を検討した。

まず、従来法（単回帰）による精度を確認する。図 6-2 に、試料調製したサンプルの調製値とそのサンプルから従来法による定量を行ったときの算出値の比較を示した。これは、R2S 培地での Suc 培養を想定して調製したサンプル（表 2-10, 図 2-8, 2-9 参照）であるが、非常に精度が高いことが分かる。

つぎに、TBY-2 細胞での Mal 培養を想定（MS 培地）して調製したサンプルで確認した。TBY-2 細胞は、エタノールはあまり発生しないことを考慮して 0, 1, 2 g/l の場合を設定した。試料調製時の真濃度を表 6-1 に示す。このサンプルをもとにした調製値と従来法により得られた算出値の比較を図 6-3 に示す。図 6-2 と比較すると、精度が低下していることが分かる。

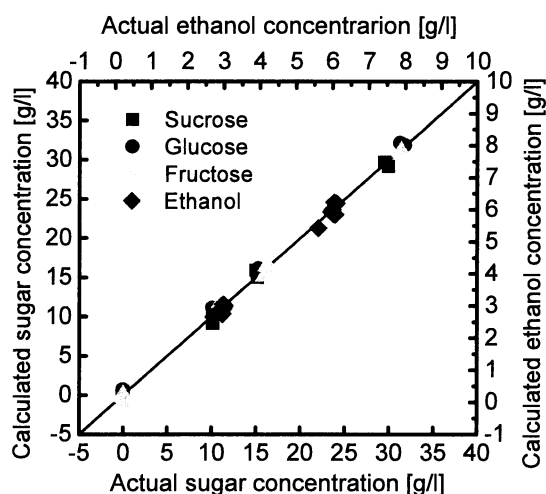


図 6-2 調製値と算出値（従来法）の比較（R2S 培地）

Fig. 6-2 Comparison of calculated sugar and ethanol contents in R2S media with actual ones using simple linear regression analysis as usual.

表 6-1 調製サンプルの各成分濃度

Table 6-1 Sugar and Ethanol contents in MS culture media for infrared spectroscopic measurement.

	Concentration [g/l]		
	Maltose	Glucose	Ethanol
M4G0E0	29.81	---	---
M3G1E0	22.29	7.96	---
M2G2E0	14.75	15.48	---
M1G0E0	7.40	23.99	---
M0G4E0	---	31.08	---
M4G0E1	29.46	---	0.87
M3G1E1	22.29	7.88	0.80
M2G2E1	15.00	15.86	0.93
M1G0E1	7.38	25.33	0.71
M0G4E1	---	31.25	1.03
M4G0E2	29.67	---	2.21
M3G1E2	23.93	7.82	2.13
M2G2E2	14.80	15.56	1.95
M1G0E2	7.36	25.31	2.07
M0G4E2	---	31.31	2.05

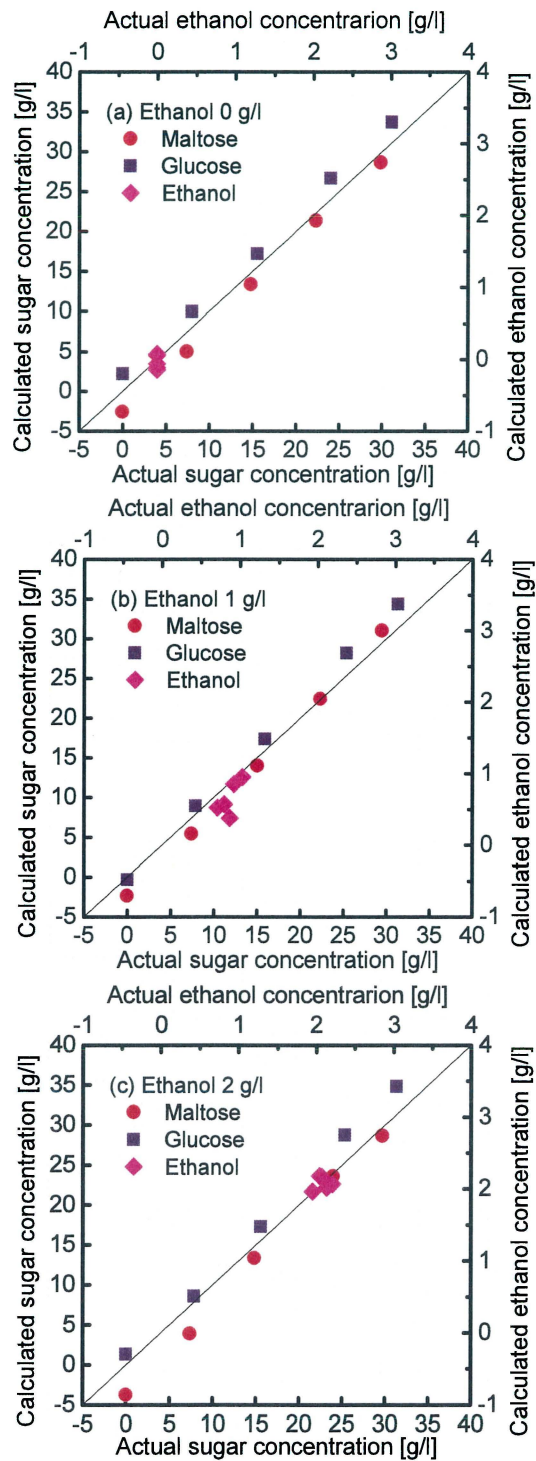


図 6-3 調製値と算出値（単回帰分析）の比較（MS 培地）
エタノール (a) 0 g/l (b) 1 g/l, (c) 2 g/l

Fig. 6-3 Comparison of calculated sugar and ethanol contents in MS media with actual ones using simple linear regression analysis as usual. Containing (a) 0 g/l, (b) 1 g/l and (c) 2 g/l ethanol.

つぎに、線形重回帰を用いて各成分を定量する方法を示す。ある波数 ν における各成分のスペクトルの加成性が成り立つと仮定すると、マルトース培養液の吸光度 $A(\nu)_{sample}$ は、以下のように示される。

$$A(\nu)_{sample} = \alpha(\nu)_{mal} \cdot C_{mal} + \alpha(\nu)_{glc} \cdot C_{glc} + \alpha(\nu)_{EtOH} \cdot C_{EtOH} + A(\nu)_{medium} \quad (6-1)$$

ここで、 $A(\nu)$ と $\alpha(\nu)$ はそれぞれ添え字の成分の波数 ν における吸光度とモル吸光度を示す。 C は培養液中の添字の濃度を示す。また、添字の mal , glc , $EtOH$, $medium$ は、マルトース、グルコース、エタノール、培地を示す。この式6-1をもとに、ある波数 ν におけるマルトース培養液の吸光度を目的変数とし、モル吸光度スペクトルの吸光度を説明変数として線形重回帰を行い、マルトース培養液中のマルトース、グルコース、エタノール濃度を求める。

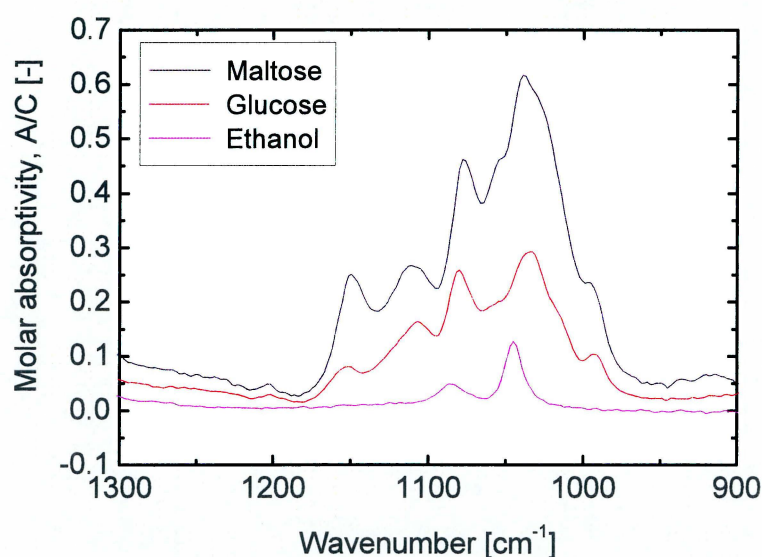


図 6-4 モル吸光度スペクトル

Fig. 6-4 Molar absorptivity of Mal, Glc and EtOH.

まず図 6-4 に、マルトース、グルコースおよびエタノールの指紋領域におけるモル吸光度スペクトルを示す。これは、マルトース、グルコース、エタノールそれぞれの 1 mol/l あたりの吸光度スペクトルに相当する。これをもとに、マルトースのピーク波数 (997.033 cm^{-1} , 1039.460 cm^{-1} , 1078.030 cm^{-1} , 1110.814 cm^{-1} , 1149.384 cm^{-1})、グルコースのピーク波数 (993.176 cm^{-1} , 1033.675 cm^{-1} ,

1079.958 cm^{-1} , 1106.958 cm^{-1} , 1151.313 cm^{-1}), エタノールのピーク波数 (1045.246 cm^{-1} , 1085.744 cm^{-1}) の12波数を採用し, これらの波数におけるモル吸光度 $\alpha(\nu)$ を求めた. モル吸光度をまとめたものを表 6-2 に示す. これらのパラメータを用いて, 表 6-1 で示した調製サンプルを線形重回帰による定量を再度行った. 図 6-5 にそれぞれ調製値と算出値の比較を示す.

表 6-2 ピーク波数とモル吸光度
Table 6-2 Peak wavenumber and molar absorptivity.

Wave number, ν [cm^{-1}]	Molar absorptivity, α [-]		
	Maltose	Glucose	Ethanol
993.176 (Glc)	0.21435	0.10362	0.00399
997.033 (Mal)	0.22347	0.09654	0.00248
1035.603 (Glc)	0.60087	0.29723	0.04801
1039.460 (Mal)	0.60999	0.28387	0.07767
1045.246 (EtOH)	0.54386	0.23965	0.12732
1078.030 (Mal)	0.44923	0.24991	0.03790
1079.958 (Glc)	0.43555	0.25885	0.04235
1085.744 (EtOH)	0.30899	0.21399	0.04913
1106.958 (Glc)	0.25768	0.16259	0.01594
1110.814 (Mal)	0.26224	0.15672	0.01343
1149.384 (Mal)	0.24514	0.07511	0.00899
1151.313 (Glc)	0.24286	0.07787	0.00905

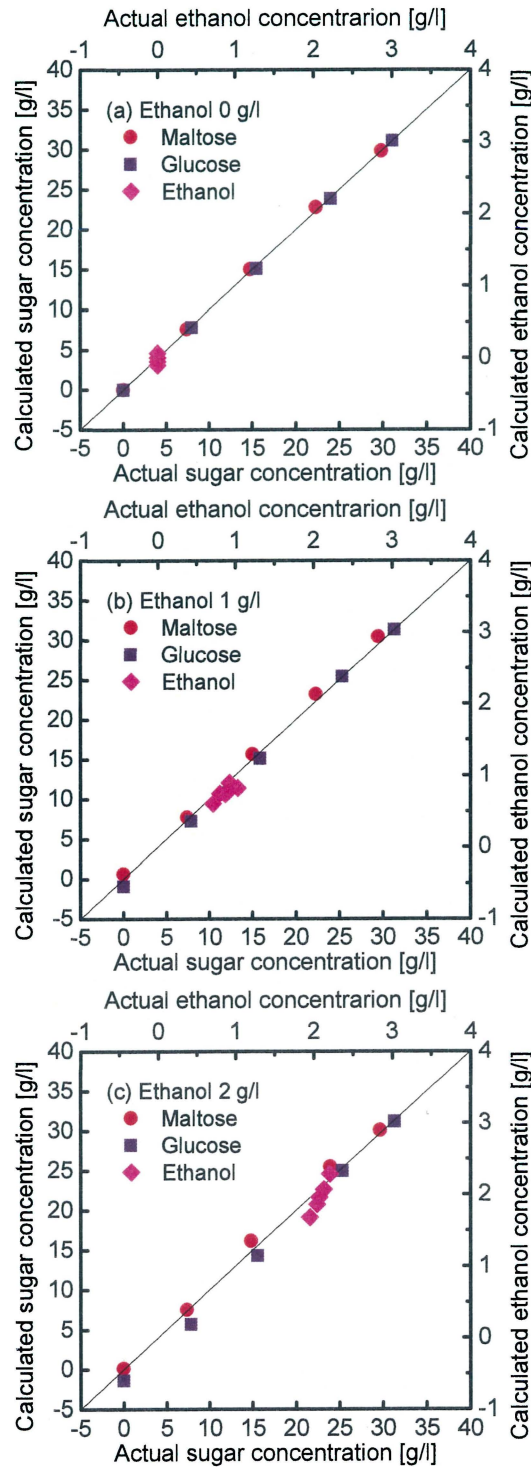


図 6-5 調製値と算出値（重回帰分析）の比較
エタノール (a) 0 g/l, (b) 1 g/l, (c) 2 g/l

Fig. 6-5 Comparison of calculated sugar and ethanol contents in MS media with actual ones using multiple linear regression analysis. Containing (a) 0 g/l, (b) 1 g/l, and (c) 2 g/l ethanol.

以上のように、重回帰分析による定量は良好な結果が得られることが確認できた。また、従来法（単回帰分析）による結果と比較しても、重回帰分析による定量のほうが、より精度が高いことが分かった。

最後に、この重回帰分析による定量法を、実際のマルトース培養における培養液成分の定量に適用を試みた。ここで、培養液サンプルは、調製サンプルのように調製値、すなわち真値が求められないので、糖濃度測定の方法であるHPLC法によって求めた測定値との比較を行っている。図6-6にHPLC法と従来法（単回帰分析）との算出値の比較を、図6-7にHPLC法と重回帰分析による算出値の比較をそれぞれ示す。なお、この培養液サンプルは、3章で用いたサンプル（表3-14, No. 2）に該当する。図より、マルトースとグルコースについてはほとんど変わらなかったが、エタノールについては明らかに精度が向上していることが確認できた。

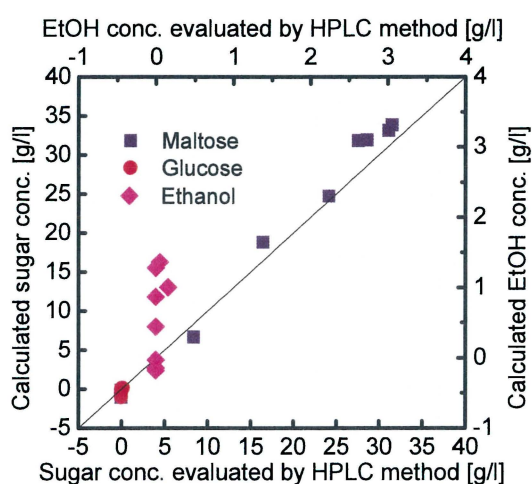


図 6-6 HPLC 法と単回帰分析との算出値の比較 (Mal 培養)

Fig. 6-6 Comparison of calculated sugar and ethanol contents in Mal culture media with actual ones using simple linear regression analysis as usual.

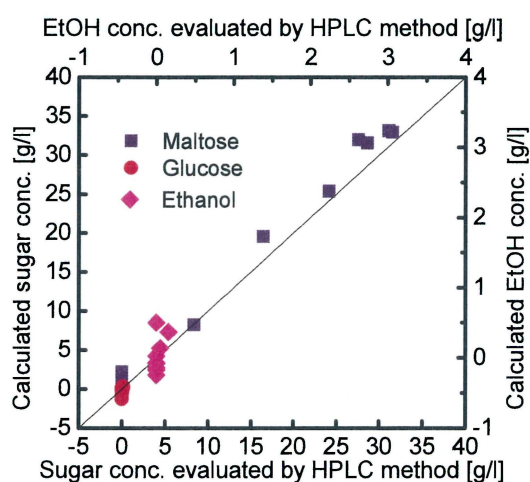


図 6-7 HPLC 法と重回帰分析との算出値の比較 (Mal 培養)

Fig. 6-7 Comparison of calculated sugar and ethanol contents in Mal culture media with actual ones using multiple linear regression analysis.

以上のことをまとめる。FT-IR/ATR 法による定量分析は、HPLC 法と同等の精度があると言えるが、低濃度領域では HPLC 法が、高濃度領域において FT-IR/ATR 法が優位性をもつ。Mal 培養は、3 章で触れたように培養液中でマルトースの分解がほとんど行われておらず、グルコースはわずかしか検出されていない。また、エタノールも微量しか検出されなかった。このことから、この培養系での測定は、低濃度領域に特化した定量が必要となった。さらに、マルトースとグルコースのスペクトルパターンが近似していることで、各々の説明変数が高い相関性（共線性）を持ってしまい、本研究で示した FT-IR/ATR 法による定量法では、精度の上でやや難があった。しかし、スペクトルによる分析に線形重回帰を用いることで定量の精度をより高めることができる可能性が示唆された。

一方で、FT-IR/ATR 法による定量方法の細部に着目すると、培養液成分の定量結果でマイナスの濃度になっているものもあった。このような誤差の主因は培地成分の変動や細胞からの排出物（代謝産物）にあると考えられる。なせなら、調製サンプルでは精度が高かったが、培養液サンプルになると精度がわずかに低下しているからである。もともと培地成分の吸光度は低く、対象物質が高濃度領域であれば無視できるが、低濃度領域になると、培地成分などの変化が定量結果に与える影響が大きくなる。これは、FT-IR/ATR 法を用いる場合、考慮していかなければならない問題である。このような問題も、波数の選定方法を見直せばさらに精度が向上するかもしれない。

つぎに、3 章で取り上げた Gal 培養について、その代謝機構ならびに細胞凝集現象にさまざまな考察を行った。その中で、Gal 培養における増殖阻害要因として考えられた、UDP-Gal-pyrophosphorylase の UDP-Glc-pyrophosphorylase に対する活性阻害がどのように起こっているのか、また、UGE の活性が培養を通じてどのように変化しているのかを実験的に確認していく必要がある。さらに、これを Glc+Gal 培養における UGE の活性レベルの変化と合わせて検証したい。加えて、細胞壁のペクチン多糖類の構成比と細胞凝集の関係について明らかにするため、ペクチン多糖類の成分を分析する必要がある。また、Glc+Man 培養で

確認されたマンノースの阻害作用についても, PMI の活性レベルとの相関関係, マンノースとフルクトースとの関連性についても確認しなければならないだろう. このように, 混合糖培養についても興味深い結果が得られた. また, 増殖阻害作用が強い糖での培養では, 増殖速度が遅すぎてその挙動が分かりにくかったが, グルコースと一緒に培養することで炭素源が供給され, 細胞濃度も高まり, 結果として阻害作用の強い糖の動きが把握しやすくなった. このことから, 増殖阻害作用の強い糖は, 初期細胞濃度をある程度上げた状態で培養実験を行うことで新たなことがわかるかもしれない. 一方, Gal を含む糖での培養時に見られた, 細胞が凝集した状態における細胞濃度の測定について, 本研究では, この場合でも細胞量を濁度で算出しているが, 細胞塊内部では死細胞も散見されていたため正確とはいえない. このような場合は別の方法で測定する必要があるかもしれない. Mal 培養ではマルトースがほぼ直接取込まれている可能性が示唆されたが, これが他の糖と関連性のないマルトーストランスポーターによるものなのか, スクローストランスポーターによる取込みなのかを確認するには, 遺伝子工学的な手法による同定が必要になるだろう.

4 章では, 前培養条件が TBY-2 細胞の糖代謝挙動に影響をおよぼすことが示された. その原因として, 必要な酵素群の活性レベルが変化するのではないかと考えられた. それを確認, 理解するため, 糖代謝に関わると思われる各酵素の活性レベルを実験的 (酵素活性あるいは遺伝子発現の確認) に検証する必要がある.

異なる植物細胞種 (TBY-2 細胞とイネ細胞) による糖代謝挙動を比較した 5 章では, それぞれの懸濁植物細胞の固有の特徴, 共通の特徴を把握することでできた. しかし, 対象とした細胞はわずか 2 種類に過ぎない. TBY-2 細胞は均一で比較的早く増殖するのに対し, イネ細胞はゆっくりと凝集しながら増殖する細胞であり, これらは対照的な性質を持っている. 今後は, この間に位置するような性質の細胞, 例えばシロイヌナズナなどを対象とした実験を行えば, より理解が深まると考えられる.

6-3. 今後の展開

6-1-5 で示した本研究の結論より、植物の糖代謝挙動に関する速度論的な理解が深まり、炭素源をコントロールすることで細胞の潜在的な能力を引き出せる可能性があることを実験的に示した。また、測定に用いた赤外分光法は測定時間が短く、非破壊による測定が可能であることから、この技術がオンラインモニタリングへ応用できる可能性も示された。そこで、ここでは①赤外分光法の発展によるバイオプロセス工学への貢献について述べた後、これを用いて糖代謝の速度論的な研究が進むことで、本研究における②植物工学的な応用を論じた後、農学および工学的な面における今後の展開を述べていく。

6-3-1. 赤外分光法のバイオプロセス工学における展開

バイオプロセス工学において、計測と制御は最も重要であるためさまざまなセンサーの研究開発が行われてきた。これまで、本研究のような培地成分などの分析には一般的に HPLC などが用いられてきた。しかし、測定精度は高いものの測定に時間を要するため、制御にタイムラグが発生する欠点があった。本研究により FT-IR/ATR 法による複数の培地成分を同時計測の手法を確立できた。本方法は培地成分を非破壊で短時間に計測できることから、データの速度論的な解析に好適な方法である。そのため、アクセサリ等が発展により、*in vivo* によるリアルタイムでのオンラインモニタリングへの可能性も有した計測法であると言える。

また、培地成分を前処理することなく、瞬時にスペクトルの形で理論的には全ての成分情報を取得できるため、定量を目的とした情報以外にも、培地で起こっている生化学的な反応を分子レベルでリアルタイムに確認、記録できる。現在、赤外分光法は食品成分分析や糖の構造分析等にも利用されているが、生体内での糖の機能的な働きや糖と水との相互作用 [146, 147] についての研究もなされ、植物にとって重要な単糖類あるいは二糖類の水溶液中での赤外特性も明らかにされつつある。さらに、イオン解離状態などの把握にも応用でき、ス

ペクトルから解離反応と密接な関係にある生体情報 (pH・温度等) までも同時に得られることがわかっている [96-98]. 植物細胞の動的な糖代謝挙動を理解するには, 細胞全体の生物情報や物質収支を定量的に把握する必要があるが, 赤外分光法を用いることで, 将来的にこれらの知見とリンクさせることも可能になる. このように, 赤外分光法を用いることで多様な情報を経時的に得られるため, その解析データは培養工学において有意義であり, 変化に即応した制御にも有益である. これは, 植物のモデル化の研究や有用物質生産のためのシステム化にも貢献すると考えられる. このようなことから, 赤外分光法は, バイオプロセス工学の発展に寄与するものと思われる.

さらに, 分光計測のような光を用いた計測は, 薬品を伴った化学反応を全く必要としないノンケミカルな測定手法であり, グリーンケミカルの観点においても大きな利点を有している. 現在, 分光機器には多様なアクセサリーが開発されている. 近赤外分光法には光ファイバーを利用した拡散反射型や透過型のプローブが開発されており, 工場などの現場で品質管理に利用されている. 赤外分光法においても, 近年 ATR プローブが開発されており, こうしたアクセサリーを用いればバイオリアクター等にも応用可能である [8, 148].

6-3-2. 植物工学における展開

ここでは, 植物の糖代謝挙動に関する速度論的な理解が深まることで, 植物工学的についてどのような展開が出来るかを論じる. 植物細胞の糖代謝機構について, 個々の反応についてはかなり詳細に解明されているが, 速度論的な研究は進んでいない. 本研究により, 糖代謝の速度論的な研究が進めば, 細胞全体の代謝の物質的な流れ (炭素, 窒素, エネルギー, 情報など) を把握できるようになると思われる. また, 本研究のように赤外分光法を援用した測定法を用いれば, 生化学的な反応を分子構造的に捉えることができ, 糖代謝機構の解明に新たな知見を与えることができるかもしれない. 今後, このような代謝ネットワークへの理解が進めば, 反応速度まで含めた糖代謝機構全体の解明へと

つながると思われる。このような知見をもとに、糖代謝機構が詳細に解明されれば、植物細胞の潜在的な能力を代謝工学に基づいて任意に引き出すことも可能になると考えられる。つまり、代謝経路の改良をデザインし、それに基づいた最適な培養条件を設定することで形質発現を促し、目的となる物質を効率的に得る、といったことが可能になるかもしれない。また、遺伝子工学的な手法を用いた代謝経路の改変についても、細胞の特性を科学的根拠の示唆に基づいてシステマティックに改良できる（過度なランダム変異処理やスクリーニング技術に依存しない）方法が開発されていくものと考えられる。さらに、このように新たな能力を発現させた細胞を大量培養すれば、有用資源の大量生産も行うことも可能である。本研究のように、懸濁植物細胞を用いてマイクロである細胞レベルでの知見を得ることで、マクロである植物体全体の動的な糖代謝挙動の理解にリンクさせることができれば、その理解に基づいた植物体の制御も可能になると思われる。したがって、本研究の成果は農学的、工学的に展開できる成果であるといえる。それらについて以下に述べる。

植物体の利用方法は多岐にわたるが、まず農学的な観点で考察する。本研究の成果より、細胞レベルの理解が進むことで、その集合体である植物体の制御が可能になると思われる。これは、植物体あるいはその果実や種子（いわゆる農産物）の収量を高めるための品種改良や栽培方法の開発の助けとなると考えられる。また、分化の全能性を利用すれば、特徴的な機能を有した細胞から、新たに品種改良された植物体を獲得することにもつながると考えられる。現在、新興国の台頭に伴い人口爆発が危惧されて久しいが、そこから発生する問題として食糧問題がある。植物の栽培には、ときに大いなる労力と時間が必要となるが、季節・天候・病害など自然条件に左右されることが多く、その収量は安定しない。そのため、農産物は必要不可欠なものであるにもかかわらず、価格が変動しやすい難点がある。しかし、その一方で、栽培に必要な作付け可能な農耕地は、砂漠化の進行などで減少している。そのため、収量を上げることはもちろん、不毛の地といわれるような地域の耕地化も必要であり、悪条件にも耐性をもつ品種の開発も重要となる。したがって、その収量を上げること

はますます重要となっている。

また、貯蔵技術を高めることも重要である。収穫した農産物を、鮮度を保って貯蔵することで、無駄なく、新鮮に、かつ広範囲にわたって供給できるからである。これまでも、様々な技術革新（冷蔵設備、輸送技術など）によって、飛躍的に技術が高められてきた。本研究の成果により、ミクロレベルの植物細胞の糖代謝の精密な制御が可能になれば、マクロレベルの農産物（植物体）にフィードバックさせることで、農産物の代謝をコントロールできるはずである。代謝速度を最小限にコントロールすることで、農産物をより“長生き”させることが可能になる。このことは、貯蔵技術の向上につながるものと思われる。

ところで、このような食糧問題を解決する手段として、最近、植物工場の技術がホットな話題になっている。もともと、1957年のデンマーク・クリステンセン農場が起源とされており、「環境制御や自動化などのハイテクを利用した植物の周年生産システム」と定義される [149]。つまり、植物工場とは、光、温度、湿度等を人工的に制御できる農業設備である。そのため、気候などに左右されず、安全で安定的に高収量を実現可能であるなどのさまざまな利点を有する。日本でも、1974年ごろから日立製作所の高辻らによって研究が始められ、主に野菜（レタスなどの葉菜類、キノコ、モヤシなど）を中心として、一部で実用化されるようになってきた [150]。一方で、コストが高いこと、法的に参入が難しいことなどの問題があり、日本ではそれほど普及はしてこなかった。しかし、近年、バイオテクノロジーの発展や空調、照明器材（LED）などの技術革新から、普及の現実性が増している。加えて、世界的に食糧・環境問題がクローズアップされている状況（特に、我が国の食糧自給率は40%程度で先進国最低レベル）から、にわかに脚光を浴びている。したがって、食糧問題の解決には不可欠の技術であると考えられ、その発展に大いなる期待が寄せられている。バイオテクノロジーの面では、植物工場に適した種苗の開発や栽培方法の改良が必要であり、そのための植物の代謝経路の解析・制御・機能改変技術の開発に、本研究の成果が寄与するものと思われる。

つぎに、工学的な観点として、有用物質の生産が挙げられる。植物細胞の二

次代謝を利用した物質は広く活用されている。そのなかには、希少で高価な品種にしか存在しなかったり、抽出が難しく獲得が困難であったりする物質もある。とくに、植物細胞は成長が遅いため収集効率が悪い。そこで、必要な組織や細胞のみを培養する植物培養技術を用いることで、生産効率を高める努力がなされてきた。本研究により糖代謝過程の速度論的な理解が進めば、有用物質の効率的な誘導発現系の構築といったことが可能になり、工業的な生産につなげることができると考えられる。科学技術が発達した現代においても、生物を介さない合成化学的な手法のみで生産できる物質は限られており、ほとんどの物質は、微生物を利用して生産させたり、それをもつ生物（ここでは植物）から直接抽出したりして獲得するしか方法がない。こうした物質は、生物の代謝活動によって生産された物質に他ならない。本研究の成果を発展させ、代謝機構が動的に理解されていけば、有用物質の獲得が容易になっていくと思われる。こうして獲得した物質は、食品、医薬品、化学、化粧品など様々な分野で応用できる可能性を秘めている。

また、1章でも述べたが、近年では食糧問題と双璧をなす環境問題についても大きくクローズアップされている。植物は炭素源を取込んで光合成によってエネルギーを生み出し、様々なものを作り出しているが、このような生物資源は地球上に大量に存在している。過去にこの一部が堆積したものが石油に代表される化石燃料となっているといわれているが、そのほとんどが未利用のままの生物資源、すなわちバイオマスにあたると言われている。こうしたバイオマスから様々なものを作り出せる。たとえば、セルロースでできた稲ワラを分解させるとブドウ糖ができ、酵母を利用して発酵させることでメタンなどの天然ガスやアルコールができる [151]。このような分野においても、本研究の成果が生かせれば、大気中のCO₂をより多く固定化させることができる品種、成長が早い品種、あるいは微生物に分解、発酵されやすい品種などを効率的に作り出す、といった利用も考えられる。

また、一方で微生物により石油を作る、といった研究もされている [152]。この人工石油の研究には緑藻が利用されている。微細緑藻の細胞膜や葉緑体ラ

メラには種々の脂質が含有しており、これらから炭化水素を抽出して化学的に変換することで石油が得られる。この手法を効率化するため、より脂質含蓄性の高い細胞株や光合成能や増殖能が高い細胞株などを探索する、栄養条件を変える、といったことで収率を改善させたり、また、遺伝子工学を用いてそうした株を作製する、といった研究がされたりしている。人工石油を生物的に大量生産することができれば、効率のよい代替燃料（現行の燃料利用体系に組み込めるため）として利用できる。このような研究にも、代謝工学を応用した生産の効率化や品種改良といった点で、本研究の成果を応用できると思われる。このような、バイオマスから炭素源を得る方法は、石油のように長い年月をかけて炭化水素に変換されていくものとは異なり、圧倒的に短期間で精製することができ、しかもクリーンな生物エネルギーを獲得できる方法であることから、大きな成果が期待されている。

以上のように、本研究の成果を今後さらに発展させていけば、代謝工学、ひいては植物工学の発展に寄与し、農学的、工学的にも広く展開可能であることを示した。

研究業績

原著論文

1. Hashimoto A., Yamanaka A., Kanou M., Nahar F., Kameoka T.: Effects of Pre-cultivation on Sugar Metabolic Kinetics of Suspension Plant Cells Measured by Mid-infrared Spectroscopy. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 1:168-175, 2003 (第5章)
2. Yamanaka A., Hashimoto A., Kanou M., Kameoka T.: MIR Spectroscopic Analysis on Sugar Metabolic and Ethanol Productive Kinetics of Suspension TBY-2 and Rice Cells Pre-Cultured in Various Media. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27:125-133, 2005 (第5章)
3. Hashimoto A., Yamanaka A., Kanou M., Nahar F., Kameoka T.: Simple and Rapid Determination of Metabolite Content in Plant Cell Culture Medium Using an FT-IR/ATR Method. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27:115-123, 2005 (第2章)
4. Yamanaka A., Hashimoto A., Matsuo T., Kanou M., Suehara K., Kameoka T.: Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells using FT-IR/ATR method *Bioprocess Biosyst. Eng.* 30:457-468, 2007 (第3章)

国際学会プロシーディングス (プロシーディングスの審査あり)

1. Hashimoto A., Nakanishi K., Yamanaka A., Nahar F., Motonaga Y., Kameoka T.: Mid-Infrared Spectroscopic Analysis of Sugar Metabolism by Rice Cells Suspending in Culture Medium., *Computer Applications in Biotechnology 2001* (Proceedings of 8th International Conference on Computer Applications in Biotechnology, Quebec, June 2001), Dochain, D. and Perrier, M. ed., pp.379-384, Elsevier Science, Oxford 2002
2. Hashimoto A., Mori H., Kanou M., Yamanaka A., Kameoka T.: Mid-Infrared Spectroscopic Analysis on Brewed Coffee Characteristics., *Proceedings of 10th*

- Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Conference*, (CD-ROM version) 3P-01-068, Kitakyushu, October 2004
3. Kanou M., Yamanaka A., Hashimoto A., Kameoka T.: Infrared spectroscopic analysis of saccharides in aqueous solutions with alkaline metal salts., *Proceedings of 10th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Conference*, (CD-ROM version) 3P-01-056, Kitakyushu, October 2004
 4. Hashimoto A., Asada K., Matsuo T., Teraura C., Yamamura T., Yasui K., Yamanaka A., Kanou M., Kameoka T.: Mid-Infrared Spectroscopic Characteristics of Glycine in Aqueous Solution., *Asia-Pacific Conference of Biochemical Engineering*, CUR-06, Jeju Island, May 2005

国際学会アブストラクト（アブストラクトの審査あり）

1. Hashimoto A., Yamanaka A., Kanou M., Nakanishi K., Kameoka T.: Mid-infrared spectroscopic analysis on Sugar metabolic kinetics of suspension plant cells., *2nd International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy*, Nottingham, August 2003
2. Hashimoto A., Pan T., Yamanaka A., Kanou M., Kameoka T.: Mid-Infrared Spectroscopic Quantification of Ionic Dissociative Metabolites for Glycolytic Reaction System., *Metabolic Engineering V: Genome to Product*, California, Sep. 19th-23rd, 2004
3. Yamanaka A., Hashimoto A., Kanou M., Nakanishi K., Kameoka T.: Mid-Infrared Spectroscopic Analysis on Kinetic sugar uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells., *Metabolic Engineering V: Genome to Product*, California, Sep. 19th-23rd, 2004
4. Hashimoto A., kanou M., Yamanaka A., Kameoka T., Kobayashi K., Shimazu H.: Mid-Infrared Spectroscopic Analysis for Characterizing Wines., *Abstracts of 3rd International Conference of Vibrational Spectroscopy*, P11.14, Delavan, August 2005

5. Yamanaka A., Matsuo T., Suehara K., Kanou M., Kameoka T., Hashimoto A.: Influences of Pre-Cultivation Conditions on Kinetic Sugar Uptake by TBY-2 Cells Suspending in Liquid Media., *Asia Pacific Biochemical Engineering Conference 2009*, Kobe, November 2009 (submitted)

国内学会口頭発表

1. 黒野康生, Faizun Nahar, 山中淳, 橋本篤, 亀岡孝治: 中赤外分光法による植物細胞の糖代謝挙動の把握, *化学工学会第32回秋季大会*, 金沢, 1999年9月
2. 山中淳, Faizun Nahar, 中西健一, 橋本篤, 亀岡孝治: 中赤外分光法を利用したイネ培養細胞の糖代謝計測, *平成12年度日本生物工学会大会*, 札幌, 2000年8月
3. 橋本篤, 中西健一, 山中淳, Faizun Nahar, 亀岡孝治: 中赤外分光法を利用した懸濁植物細胞の動的糖代謝挙動に関する研究, *化学工学会第66年会*, 東広島, 2001年4月
4. 山中淳, 狩野幹人, 橋本篤, 亀岡孝治: タバコBY-2細胞による単・二糖類の取込み挙動に関する中赤外分光解析, *化学工学会第36回秋季大会*, 仙台, 2003年9月
5. 狩野幹人, 寺浦千暁, 山中淳, 橋本篤, 亀岡孝治: 糖-アルカリ金属イオン混合水溶液中の糖類の赤外分光特性, *日本食品工学会第5回(2004年度)年次大会*, 東京, 2004年8月
6. 狩野幹人, 山中淳, 橋本篤, 亀岡孝治: 糖類の赤外分光特性に及ぼすアルカリ金属塩の影響, *化学工学会第69年会*, 大阪, 2004年4月
7. 橋本篤, 狩野幹人, 山中淳, 亀岡孝治, 小林香織, 島津秀雄: 中赤外分光法によるワインの特性同定, *日本食品工学会第6回(2005年度)年次大会*, 大津, 2005年7月
8. 山中淳, 松尾知美, 梅田優子, 狩野幹人, 橋本篤, 亀岡孝治: 中赤外分光

- 法を利用したタバコBY-2細胞によるガラクトース代謝挙動に関する研究,
化学工学会第70年会, 名古屋, 2005年3月
9. 狩野幹人, 山中淳, 橋本篤, 亀岡孝治: 糖-アルカリ金属イオン混合水溶液の赤外分光特性, 化学工学会第70年会, 名古屋, 2005年3月
 10. 山中淳, 松尾知美, 狩野幹人, 橋本篤, 亀岡孝治: 中赤外分光法を利用したタバコBY-2細胞による二糖類の取込み挙動に関する研究, 化学工学会第71年会, 東京, 2006年3月
 11. 橋本篤, 松尾知美, 山中淳, 狩野幹人, 末原憲一郎, 亀岡孝治: タバコBY-2細胞の動的糖代謝挙動に及ぼす前培養の影響, 化学工学会第39回秋季大会, 札幌, 2007年9月

参考文献

1. 小学館『大辞泉』編集部（編）：大辞泉（増補・新装）. 松村明（監修），小学館, 1998
2. 長田敏行（編）：植物工学の基礎. 東京化学同人, pp.1-16, 2002
3. 森川弘道, 入船浩平: 植物工学概論. コロナ社, 1996
4. 西本功, 松本武: 植物の組織培養入門. 工業調査会, 1987
5. 大寺純蔵: グリーンケミストリー.
<http://www.ous.ac.jp/DAC/otera/gc.index.html>（参照 2008-12-29）, 1999
6. 飯田芳男, 田中誠之: 機器分析. 裳華房, pp.319-323, 1996
7. 亀岡孝治, 橋本篤: 農作物・食品の赤外分光分析とその応用. 農業情報研究, **12**:167-188, 2003
8. Hashimoto A., Kameoka T.: Applications of Infrared Spectroscopy to Biochemical, Food, and Agricultural Processes. *Appl. Spectrosc. Review*, **43**:416-451, 2008
9. 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄: 化学者のための多変量解析. 講談社, pp.50-71, 2002
10. 尾崎幸洋, 河田聡: 近赤外分光法. 学会出版センター, pp.16-21, 1996
11. 臼田秀明: 植物代謝工学ハンドブック. 新名惇彦, 吉田和哉（監修）, エヌ・ティー・エス, pp.380-394, 2002
12. 田中秀夫, 高山真策, 真野佳博, 林隆久, 猪口雅彦: 植物細胞工学. オーム社, 1992
13. Ter Kuile BH.: Carbohydrate metabolism and physiology of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis* studied in chemostats. *Microbiol.*, **140**:2495-2502, 1994
14. Ter Kuile BH.: Regulation and Adaptation of Glucose Metabolism of the Parasitic Protist *Leishmania sonovani* at the Enzyme and mRNA Levels. *J. Bacteriol.*, **181**:4863-4872, 1999
15. Xavier KB., Peist R., Kossmann M., Boos W. Santos H.: Maltose Metabolism in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Purification and

- Characterization of Key Enzymes. *J. Bacteriol.*, **181**:3358-3367, 1999
16. 吉田敏臣: 培養工学. コロナ社, 1998
 17. Hashimoto A., Kameoka T.: Mid-Infrared Spectroscopic Determination of Sugar Contents in Plant-Cell Culture Media Using an ATR Method. *Appl. Spectrosc.*, **54**:1005-1011, 2000
 18. 高山眞策: 有用物質生産のための大量培養. “植物細胞培養の有用物質”, 駒嶺穆 (監修), シー・エム・シー, pp.9-28, 2000
 19. 駒嶺穆, 野村港二 (編): 植物細胞工学. 学会出版センター, 1998
 20. 新井雅雄: 芽ばえの成長とショ糖代謝酵素の発現. 植物の化学調節, **28**:41-51, 1993
 21. Glasziou KT., Gayler KR.: Storage of Sugars in Stalks of Sugar Cane. *Bot. Rev.*, **38**:471-490, 1972
 22. Amino S., Tazawa M.: Uptake and Utilization of Sugars in Cultured Rice Cells. *Plant Cell Physiol.*, **29**:483-487, 1988
 23. Sagishima K., Kubota K., Ashihara H.: Uptake and Metabolism of sugars by Suspension-Cultured *Catharanthus roseus* Cells. *Ann. Cot.*, **64**:185-193, 1989
 24. Kanabus J., Bressan RA., Carpita NC.: Carbon Assimilation in Carrot Cells in Liquid Culture. *Plant Physiol.*, **82**:363-368, 1986
 25. Zamski E., Wyse RE.: Stereospecificity of Glucose Carrier in Sugar Beet Suspension cells. *Plant Physiol.*, **78**:291-295, 1985
 26. Daie J., Chin C.-K., Pitcher L.: Differential Rates of Sucrose and Hexose Transport by Asparagus Cell Cultures. *Plant Science*, **53**:101-107, 1987
 27. 駒嶺穆 (監修): 植物細胞培養と生物学—植物バイオテクノロジーの基礎—. 朝倉書店, pp.135-137, 1993
 28. Perata P., LoSchiavo F., Alpi A.: Ethanol production and toxicity in suspension-cultured carrot cells and embryos. *Planta*, **173**:322-329, 1988
 29. SheuHwa CS., Lewis DH., Walker DA.: Stimulation of photosynthetic starch formation by sequestration of cytoplasmic orthophosphate. *New Phytol.*,

- 74:383-392, 1975
30. Herold A., Lewis DH., Walker DA.: Sequestration of cytoplasmic orthophosphate by mannose and its differential effect on photosynthetic starch synthesis in C3 and C4 species. *New Phytol.*, **76**:397-407, 1976
 31. Herold A., Lewis DH.: Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. *New Phytol.*, **79**:1-40, 1977
 32. Kikuchi A., Satoh S., Nakamura N., Fujii T.: Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. *Plant cell reports*, **14**:279-284, 1995
 33. 平林淳: 糖鎖の成り立ちから糖の起源を推理する. *Viva Origino*, **29**:119-133, 2001
 34. Loughman BC., Ratcliffe RG., Schwabe JWR.: Galactose metabolism in Zea mays root tissues observed by ³¹P NMR spectroscopy. *Plant Sci.*, **59**:11-23, 1989
 35. Dörmann P., Benning C.: The role of UDPglucose epimerase in carbohydrate metabolism of Arabidopsis. *The Plant Journal*, **13**:641-652, 1998
 36. Maretzki A., Thom M.: Characteristics of a galactose adapted sugarcane cell line grown in suspension culture. *Plant Physiol.*, **61**:544-548, 1978
 37. 櫻井実, 井上義夫: 細胞のストレス耐性と糖の役割—トレハロースは特異な保護剤か—. *表面*, **34**:213-219, 1996
 38. 櫻井実, 井上義夫: 糖の水和とトレハロースの生理機能. *生物物理*, **47**:426-440, 1997
 39. Conn EE., Stumpf PK., Bruening G., Doi RH.: コーン・スタンプ生化学. 第5版, 田宮信雄, 八木達彦 (訳), 東京化学同人, pp.38-39, 567-569, 1988
 40. Schröder R., Nicolas P., Vincent SJ., Fischer M., Reymond S., Redgwell RJ.: Purification and characterisation of a galactoglucomannan from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Carbohydr. Res.*, **331**:291-306, 2001
 41. 水野卓, 西沢一俊: 図解糖質化学便覧. 共立出版, pp.81, 1971

42. 錦田晃一, 岩本令吉: 赤外分光法による材料分析. 講談社, pp.1-99, 1986
43. 田隅三生: FT-IRの基礎と実際. 東京化学同人, pp.1-95, 1994
44. 田中誠之, 寺前紀夫: 赤外分光法. 共立出版, pp.1-71, 1993
45. Kameoka T., Okuda T., Hashimoto A., Noro A., Shiinoki Y., Ito K.: FT-IR Analysis of Sugars in Aqueous Solutions Using ATR Method. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **45**:192-198, 1998
46. Kameoka T., Okuda T., Hashimoto A., Noro A., Shiinoki Y., Ito K.: A rapid FT-IR/ATR Method for Sugar Content Determination in Food. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **45**:199-204, 1998
47. 津田孝雄: 化学セミナー・クロマトグラフィー—分離と応用—. 丸善, 1995
48. Mohr H., Schophfer P.: Plant Physiology. Amino S., Komamine A. (Eds.), Springer-Verlag: Tokyo, pp.117-259 (in Japanese), 1998
49. Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick JW., Frommer WB., Ward JM.: The Dual Function of Sugar Carriers: Transport and Sugar Sensing. *The Plant Cell April*, **11**:707-26, 1999
50. Rolland F., Moore B., Sheen J.: Sugar Sensing and Signaling in Plants. *The Plant cell*, **14**:S185-S205, 2002
51. Buttner M., Sauer N.: Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1465**:265-274, 2000
52. Lemoine R.: Sucrose transporters in plant: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**:246-262, 2000
53. 廣瀬竜郎, 青木直大: 糖の輸送. “植物細胞工学シリーズ18 植物の膜輸送システム—ポンプ・トランスポーター・チャネル研究の新展開—”, 加藤潔, 島崎研一郎, 前島正義, 三村徹朗 (編), 秀潤社, pp.88-96, 2003
54. Riesmeier JW., Willmitzer L., Frommer WB.: Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.*, **11**:4705-4713, 1992
55. Niittylä T., Messerli G., Trevisan M., Chen J., Smith AM., Zeeman SC.: A

- Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. *Science*, **303**:87-89, 2004
56. Sauer N., Tanner W.: The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eucaryotic H⁺ cotransporter. *FEBS Lett.*, **259**:43-6, 1989
 57. Sauer N., Friedländer K., Gräml-Wicke U.: Primary structure, genomic organization and heterologous expression of a glucose transporter from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.*, **9**:3045-3050, 1990
 58. Riesmeier JW., Hirner B., Frommer WB.: Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicates a Role in Phloem Loading. *Plant Cell*, **5**:1591-1598, 1993
 59. Sauer N., Stolz J.: SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.*, **6**:67-77, 1994
 60. Gahrtz M., Stolz J., Sauer N.: A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *Plant J.*, **6**:697-706, 1994
 61. Hirose T., Imaizumi N., Scofield GN., Furbank RT., Ohsugi R.: cDNA Cloning and Tissue Specific Expression of a Gene for Sucrose Transporter from Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.*, **38**:1389-1396, 1997
 62. Hashimoto A., Nakanishi K., Motonaga Y., Kameoka T.: Sugar Metabolic Analysis of Suspensions of Plant Cells Using an FT-IR/ATR method. *Biotechnol. prog.*, **17**:560-564, 2001
 63. Zimmermann MH., Ziegler H.: List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In *Encyclopedia of plant physiology*, N. S., vol. 1, Transport in plants I, Zimmermann, M.H., Milburn, J.A., eds. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 480-503, 1975
 64. Sarah M. Sherson, Heather L. Alford, Susan M. Forbes, Graham Wallance, Steven M. Smith: Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters

- in the growth and development of Arabidopsis. *J. Experimental Botany*, **54**:525-531, 2003
65. Schluepmann H., van Dijken A., Aghdasi M., Wobbes B., Paul M., Smeekens S.: Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. *Plant Physiology Preview*, **135**:879-890, 2004
66. Eastmond PJ., Graham IA.: Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate?. *Current Opinion in Plant Biology* 2003, **6**:231-235, 2003
67. Eastmond PJ., Li Y., Graham IA.: Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants?. *J. Exp. Bot.*, **54**:533-537, 2003
68. Goddijn O., Smeekens S.: Sensing trehalose biosynthesis in plants. *The Plant Journal*, **14**:143-146, 1998
69. Servaites JC., Geiger DR.: Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport. *J. Experimental Botany*, **53**:1581-1591, 2002
70. Biggs DA.: Milk Analysis with the Infrared Milk Analyzer. *J. Dairy Sci.*, **50**:799-803, 1967
71. van de Voort FR., Kermasha S., Smith JP., Mills BL., Ng-Kwai-Hang KF.: A Study of the Stability of Record of Performance Milk Samples for Infrared Milk Analysis. *J. Dairy Sci.*, **70**:1515-1523, 1987
72. Ng-Kwai-Hang KF., Moxley JE. van de Voort FR.: Factors Affecting Differences in Milk Fat Test Obtained by Babcock, Rose-Gottlieb, and Infrared Methodss ano in Protein Test from Infrared Milk Analysis. *J. Dairy Sci.*, **71**:290-298, 1988
73. Darwish GS., van de Voort FR., Smith JP.: Proximate Analysis of Fish Tissue by Mid-Infrared Transmission Spectroscopy. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**:644-649, 1989
74. Martel R., Paquin P., Buijs H.: Water Absorption in Fluid Milk Using Fourier

- Transform Infrared Spectroscopy. *J. Dairy Sci.*, **74**:2073-2078, 1991
75. Hop E., Luinge H-J., Hemert HV.: Quantitative Analysis of Water in Milk by FT-IR Spectrometry. *Appl. Spectrosc.*, **47**:1180-1183, 1993
76. van de Voort FR., Sedman J., Emo G., Ismail AA.: A Rapid Ftir Quality Control Method for Fat and Moisture Determination in Butter. *Food Res. Int.*, **25**:193-198, 1992a
77. Van de Voort FR.: Fourier Tranform Infrared Spectroscopy Applied to Food Analysis. *Food Res. Int.*, **25**:397-403, 1992b
78. McQueen DH., Wilson R., Kinnunen A., Jensen EP.: Comparison of Two Infrared Spectroscopic Methods for Cheese Analysis. *Talanta.*, **42**:2007-2015, 1995
79. Wilson RH.: Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy for Food Analysis. *Trends Anal. Chem.*, **9**:127-131, 1990
80. Back DM., Michalska DF., Polavarapu PL.: Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Powerful Tool for the Study of Carbohydrates in Aqueous Solutions. *Appl. Spectrosc.*, **38**:173-180, 1984
81. Belton PS.: Spectroscopic Approaches to the Measurement of Food Quality. *Pure & Appl. Chem.*, **69**:47-50, 1997
82. Cadet F., Bertland D., Robert P., Maillot J., Difudonne J., Rough C.: Quantitative Determination of Sugar Cane Sucrose by Multidimensional Analysis of their Mid-Infrared Attenuated Total Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc.*, **45**:166-172, 1991
83. Dupuy N., Meurens M., Sombret B., Legrand P., Huvenne JP.: Determination of Sugars and Organic Acids in Fruit Juices by FT Mid-IR Investigation of Dry Extract. *Appl. Spectrosc.*, **46**:860-863, 1992
84. Dupuy N., Huvenne JP., Sombret B., Legrand P.: Quantitative Analysis by Mid-Infrared Spectrometry in Food and Agro-Industrial Fields. *J. Mol. Struct.*, **294**:223-226, 1993

85. Mirouze FDL., Boulou JC., Dupuy N., Meurens M., Huvenne JP., Legrand P.: Quantitative Analysis of Glucose Syrups by ATR/FT-IR Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, **47**:1187-1191, 1993
86. Hashimoto A., Kameoka T., Shiinoki Y., Ito K.: MID-Infrared Spectroscopic Determination of Sugar Contents in Culture Media. IFAC Computer Applications in Biotechnology 1998, Elsevier Science Ltd., Oxford, pp.411-416, 1998
87. Alberti JC., Phillips JA., Fink DJ., Wacasz FM.: Off-Line Monitoring of Fermentation Samples by FTIR/ATR: A Feasibility Study for Real-Time Process Control. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**:689-722, 1985
88. Hashimoto A., Takada S., Motonaga Y., Nakanishi K., Kameoka T.: Spectroscopic Determination of Acid and Sugar Content in Fruit Juice. Control Applications in Post-harvest and Processing Technology 2001, Elsevier Science Ltd., Oxford, pp.209-214, 2002
89. Abbott TP., Wu YV., Kleiman R.: Evidence of A and E1 Normal Mode Absorbances in the Infrared Spectrum of Hemoglobin. *Appl. Spectrosc.*, **44**:899-900, 1990
90. Castresana J., Miga A., Arrondo JLR.: The Structure of Proteins in Aqueous Solutions: An Assessment of Triose Phosphate Isomerase Structure by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **152**:69-75, 1988
91. Carpenter JF., Crowe JF.: An Infrared Spectroscopic Study of the Interactions with Dried Proteins. *Biochemistry*, **28**:916-922, 1989
92. Kumosinski TF., Farrell Jr. HM.: Determination of the Global Secondary Structure of Proteins by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Trends Food Sci. Tech.*, **4**:169-175, 1993
93. Turula VE., de Haseth JA.: Evaluation of Particle Beam Fourier Transform Infrared Spectrometry for the Analysis of Globular Proteins: Conformation of

- β -Lactoglobulin and Lysozyme. *Appl. Spectrosc.*, **48**:1255-1264, 1994
94. Goormaghtigh E., de Jongh HHJ., Ruyschaert J.: Relevance of Protein Thin Films Prepared for Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Significance of the pH. *Appl. Spectrosc.*, **50**:1519-1527, 1996
95. Hewavitharana AK., Brakel BV.: Fourier Transform Infrared Spectrometric Method for the Rapid Determination of Casein in Raw Milk. *Analyst*, **122**:701-704, 1997
96. Pan T., Hashimoto A., Kanou M., Nakanishi K., Kameoka T.: Mid-infrared spectroscopic quantification system of ionic dissociative materials in the glycolytic pathway using an FT-IR/ATR method. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **26**:133-139, 2003
97. Nakanishi K., Pan T., Hashimoto A., Kameoka T.: Quantification system of ionic dissociative materials in glycolytic pathway using infrared spectroscopic information. In Proceedings of the 6th SCI, Callaos, N., Whymark, G., and Lesso, W. (eds.); International Institute of Informatics and Systemics, Orlando, Vol. XIII, pp.268-273, 2002
98. Nakanishi K., Hashimoto A., Pan T., Kanou M., Kameoka T.: Mid-infrared Spectroscopic Measurement of Ionic Dissociative Materials in the Metabolic Pathway. *Appl. Spectrosc.*, **57**:1510-1516, 2003
99. 福井作蔵: 生化学実験法 I 還元糖の定量法. 学会出版センター, pp.8-14, 44-54, 1978
100. Nelson N.: A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**:375-380, 1944
101. Somogyi M.: Notes on Sugar Determination. *J. Biol. Chem.*, **195**:19-23, 1952
102. Morris DL.: Quantitative Determination of Carbohydrates with Dreywood's Anthrone Reagent. *Science*, **107**:254-255, 1948
103. Dobois M., Gilles K., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F.: A Colorimetric Method for Determination of Sugars. *Nature*, **168**:167, 1951

104. 原昭二（訳）：入門クロマトグラフィー. 東京化学同人, 1994
105. Murashige T., Skoog F.: A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco tissue Culture. *Physiol. Plant*, **15**:473-497, 1962
106. Ohara K., Ojima K., Fujiwara A.: Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant cell physiol.*, **14**:1113-1121, 1973
107. Ohara K., Ojima K., Saigusa M., Fujiwara A.: Studies on the nutrition of rice cell culture II. Microelement requirement and the effects of deficiency. *Plant cell physiol.*, **16**:73-81, 1975
108. Kyojuka J., Shimamoto K.: Transformation and regeneration of rice protoplasts. In *Plant Tissue Culture Manual*, B1, K. Lindsey, ed (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp.1-16, 1991
109. Linsmaier EM., Skoog F.: Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, **18**:100-127, 1965
110. White, P.R.: *A Handbook of Plant Tissue Culture*. J. Cattell, Lancaster, pp.277, 1943
111. White PR.: The nutrients. in *The Cultivation of Animal and Plant Cell*, 2nd ed., pp. 55-77, Ronald Press, 1963
112. 小島邦彦: 植物組織培養の栄養学. 朝倉書店, pp.37-59, 1993
113. 建部到, 長田敏行, 岡田和也: 同調培養系. “蛋白質核酸酵素別冊30 植物の細胞生物学的研究法”, 赤沢堯, 杉浦昌弘, 西村幹夫 (編), 共立出版, pp.102-108, 1987
114. 竹内正幸, 石原愛也, 古谷力: 植物組織培養. 朝倉書店, pp.113-119, 1976
115. 社団法人・日本生物工学会: 生物工学会誌・ミレニアム特別号「発酵工学・20世紀のあゆみ」ーバイオテクノロジーの源流を辿るー. 日本生物工学会, 2001
116. Guglielminetti L., Yamaguchi J., Perata P., Alpi A.: Amylolytic Activities in Cereal Seeds under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Plant Physiol.*,

- 109:1069-1076, 1995
117. Perata P., Matsukura C., Vernieri P., Yamaguchi J.: Sugar repression of a gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *The plant cell*, **9**:2197-2208, 1997
118. 豊福恭子, 山口淳二, 光永伸一郎: α -アミラーゼ遺伝子の発現制御—植物ホルモンと糖によるシグナル伝達過程を解明のための分子指標として—. *植物の化学調節*, **32**:132-143, 1997
119. Umemura T., Perata P., Futsuhara Y., Yamaguti J.: Sugar sensing and α -amylase gene repression in rice embryos. *Planta*, **204**:420-428, 1998
120. Morita A., Umemura T., Kuroyanagi M., Futsuhara K., Perata P., Yamaguchi J.: Functional dissection of a Sugar-Repressed Amylase gene (RAmyl A) Promoter in Rice Embryos. *FEBS Letters*, **423**:81-85, 1998
121. Sugimoto N., Takeda G., Nagato Y., Yamaguti J.: Temporal and spatial expression of the α -amylase gene during seed germination in rice and barley. *Plant cell Physiol.*, **39**:323-333, 1998
122. 神谷貴洋: 植物細胞の呼吸速度に関する研究. 修士論文, 三重大学大学院, 1999
123. Kacurakova M., Mathlouthi M.: FTIR and Laser-Raman Spectra of Oligosaccharides in Water: Characterization of the Glycosidic Bond. *Carbohydrate Res.*, **284**:145-157, 1996
124. Back DM., Polavarapu PL.: Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Sugars. Structural Changes in Aqueous Solutions. *Carbohydrate Res.*, **121**:308-311, 1983
125. Zhibankov RG., Andrianov VM., Marchewka MK.: Fourier Transform IR and Raman Spectroscopy and Structure of Carbohydrates. *J. Mol. Struct.*, **436-437**:637-654, 1997
126. Cael J., Koenig J., Blackwell J.: Infrared and Raman Spectroscopy of Carbohydrates Part IV. *Carbohydrate Res.*, **32**:79-91, 1974

127. 日本化学会（編）：化学便覧 基礎編Ⅱ. 改訂4版, 丸善, pp.Ⅱ-590, 1993
128. 原田宏, 駒嶺穆: 植物細胞組織培養 実際・応用・展望. 理工学者, pp.55-57, 1990
129. Hashimoto A., Nakanishi K., Yamanaka A., Nahar F., Motonaga Y., Kameoka T.: MID-Infrared Spectroscopic Analysis of Sugar Metabolism By Rice Cells Suspending in Culture Medium. IFAC Computer Applications in Biotechnology 2001, Elsevier Science Ltd., Oxford, pp.379-384, 2002
130. Hashimoto A., Yamanaka A., Kanou M., Nahar F., Kameoka T.: Effect of Pre-Cultivation on Sugar Metabolic Kinetics of Suspension Plant Cells Measured by Mid-Infrared Spectroscopy. *J. Food Agric. Environ.* **1**:168-175, 2003
131. Yamanaka A., Hashimoto A., Kanou M., Kameoka T.: MIR Spectroscopic Analysis on Sugar Metabolic and Ethanol Productive Kinetics of Suspension TBY-2 and Rice Cells Pre-Cultured in Various Media. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **27**:125-133, 2005
132. Yamanaka A., Hashimoto A., Matsuo T., Kanou M., Suehara K., Kameoka T.: Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells using FT-IR/ATR method. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **30**:457-468, 2007
133. Yamamoto R., Inouhe M., Masuda Y.: Galactose Inhibition of Auxin-Induced Growth of Mono- and Dicotyledonous Plants. *Plant Physiol.*, **86**:1223-1227, 1988
134. Inouhe M., Yamamoto R., Masuda Y.: Inhibition of IAA-induced cell elongation in Avena coleoptile segments by galactose: Its effect on UDP-glucose formation. *Physiologia Plantarum*, **66**:370-376, 1986
135. Smith MM., Stone BA.: Studies on Lolium multiflorum endosperm in tissue culture I . Nutrition. *Austr. J. Biol. sci.*, **26**:123-33, 1973
136. Verma DC., Dougall DK.: Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiol.*,

- 59:81-85, 1977
137. Reiter WD, Vanzin GF.: Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Molecular Biology*, **47**:95-113, 2001
138. Inouhe M., Yamamoto R., Masuda Y.: Effects of indoleacetic acid and galactose on the UTP level and UDP-glucose formation in *Avena* coleoptile and *Vigna* epicotyl segments. *Physiologia Plantarum*, **69**:579-585, 1987
139. Kato A., Tohoyama H., Joho M., Inouhe M.: Different effects of galactose and mannose on cell proliferation and intracellular soluble sugar levels in *Vigna angularis* suspension cultures. *J. Plant Res.*, **120**:713-719, 2007
140. Reinders A, Ward JM.: Functional characterization of the α -glucoside transporter Sut1p from *Schizosaccharomyces pombe*, the first fungal homologue of plant sucrose transporters. *Molecular Microbiology*, **39**:445-454, 2001
141. Kemsley EK., Holland JK., Defernez M., Wilson RH.: Detection of Adulteration of Raspberry Purees Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*, **44**:3864-3870, 1996
142. Kato A., Inouhe M.: Mannose accommodation of *Vigna angularis* cells on solid agar medium involves its possible conversion to sucrose mediated by enhanced phosphomannose isomerase activity. *J. Plant Res.*, **121**:339-349, 2008
143. Wray V., Schiel O., Berlin J., Witte L.: Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Investigation of the in vivo Regulation of Intracellular pH in Cell Suspension Cultures of *Nicotiana tabacum*: The Effects of Oxygen Supply, Nitrogen, and External pH Change. *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**:731-740, 1985
144. Igaue I., Yagi M.: Alcohol Dehydrogenase from Cultured Rice Cells. *Plant Cell Physiol.*, **23**:213-225, 1982
145. Gregory NS., Aristos AA., Jens N.: 代謝工学 ー原理と方法論ー. 清水浩, 塩谷捨明(訳), 東京電機大学出版, 2002
146. Kanou M., Nakanishi K., Hashimoto A., Kameoka T.: Infrared Spectroscopic Analysis of Disaccharides in Aqueous Solutions. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*,

- 50:57-62, 2003
147. Kanou M., Nakanishi K., Hashimoto A., Kameoka T.: Influences of Monosaccharides and Its Glycosidic Linkage on Infrared Spectral Characteristics of Disaccharides in Aqueous Solutions. *Appl. Spectrosc.*, **59**:885-892, 2005
 148. Kondepati VR., Heise HM.: The Potential of Mid- and Near-infrared Spectroscopy for Reliable Monitoring of Bioprocesses. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, **2**:117-132, 2008
 149. 農林水産省 水産技術会議事務局（編）：進化する施設栽培—大規模施設から植物工場まで—。農林水産研究開発レポートNo.14, 2005
 150. 高辻正基：完全制御型植物工場。オーム社, 2007
 151. 山川祥秀：新しい植物をつくる —植物バイオテクノロジーの世界—。コロナ社, 1995
 152. 朴明玉, 宮本和久：微生物で石油を作る。“グリーンバイオテクノロジー—持続的社会的のための生物工学—”, 海野肇, 岡畑恵雄（編）, 講談社, pp.83-91, 2002

學術論文

MIR spectroscopic analysis on sugar metabolic and ethanol productive kinetics of suspension TBY-2 and rice cells pre-cultured in various media.

Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells using an FT-IRATR method.

Atsushi Yamanaka · Atsushi Hashimoto
Mikihito Kanou · Takaharu Kameoka

MIR spectroscopic analysis on sugar metabolic and ethanol productive kinetics of suspension TBY-2 and rice cells pre-cultured in various media

Received: 30 July 2004 / Accepted: 8 September 2004 / Published online: 15 January 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract The influence of sugars in pre-cultivation media suspended plant cells on the kinetics of the sugar uptake and the ethanol production was studied by mid-infrared spectroscopy using a Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) equipped with an attenuate total reflection accessory (ATR). We performed the plant cell cultivation with *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow No.2 (TBY-2) cells and *Oryza sativa* L., Japonica, cv. Nipponbare (rice) cells, respectively, in pre-culture and culture media, which had various types of glucose, fructose, sucrose or glucose fructose mixtures. The results confirmed the kinetic differences between the TBY-2 cells and rice cells. These results suggested that the TBY-2 cells consumed sugar before growth and the rice cells consumed sugar after growth, moreover, the ethanol content increased just after cell growth was activated based on the non-dimensional cultivation time for the cell growth behavior.

Keywords Mid-Infrared Spectroscopy · Metabolic Kinetics · Sugar · Ethanol · Tabacum cells · Rice cells · Pre-cultivation

Introduction

Recently, plant-cell cultivation technology has been developing and played a wide role in various fields, from plant physiology to bioprocess engineering. The precision control of the cultivation process is one of the most important subjects in both scientific and engineering fields. Most of the biochemical reactions of the

glycolysis within plant cells are understood [1] and there are a number of studies on sugar transport, sugar sensing and signaling in plants [2, 3]. However, the kinetic transport phenomena of nutrimental sugars from a liquid medium to suspension plant cells are not completely understood.

The application of spectroscopy, especially in the infrared region, to the above measurement has high potential. Incidentally, in parallel developments of Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometers and attenuated total reflection (ATR) techniques [4, 5], the spectroscopic method using the FT-IR equipped with an ATR accessory (FT-IR/ATR) provided substantial potential as a quantitative analytical tool for liquids. Therefore, various FT-IR/ATR spectroscopic methods are under development for the analysis of bioproducts [6–10]. We also studied the quantitative analysis of sugars in aqueous solutions using the FT-IR/ATR method [11–13].

The MIR spectrum using the FT-IR/ATR method has shown that the spectral additivity was applicable for sucrose, glucose and fructose in the MS media, experimentally. In addition, we examined the potential of the sugar content determination in culture media suspended *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow No.2 (TBY-2) cells using the FT-IR/ATR method by a comparison with the high-performance liquid chromatography (HPLC) method to analyze the sugar uptake rate of the suspension TBY-2 cells [14]. We then discovered the importance of understanding the influence of sugar in the sub- and pre-culture media on the sugar uptake kinetic phenomena during cultivation [15].

The characteristics of cellular size, cycle, growth, sugar metabolic kinetics and alcohol production vary for each plant cell. In a partial or total anaerobic environment, the TBY-2 and *Oryza sativa* L., Japonica, cv. Nipponbare (rice) cells are known as plant cells that produce ethanol and release it into the culture medium [16]. However, since the TBY-2 cells have a homogeneous distribution in the culture media, almost all of them can respire easily in aerobic conditions. Consequently, in such conditions, alcohol fermentation

A. Yamanaka · A. Hashimoto (✉) · M. Kanou · T. Kameoka
Department of Sustainable Resource Sciences,
Faculty of Bioresources, Mie University,
1515 Kamihama-cho, Tsu, Mie, 514-8507 Japan
E-mail: hashimoto@bio.mie-u.ac.jp
Tel.: +81-59-2319603
Fax: +81-59-2319603

rarely occurs. The rice cells tend to form a number of small aggregates that have a heterogeneous distribution in the culture media. Therefore, since the intracellular condition of the rice cell aggregate changes from the aerobic environment to an anaerobic environment, alcohol fermentation occurs easily. Thus, the sugar metabolism in plant cells relates not only to the sugar uptake phenomena, but also to the ethanol production. Therefore, Hashimoto et al. [17] attempted to measure the nutrient and product contents in the culture medium using the FT-IR/ATR method, simultaneously. As a result, evaluation of the sugar contents using the FT-IR/ATR method under the assumption of ethanol existence was superior in quantitative analysis to that under assumption of no ethanol in the culture media of not only rice cells (high ethanol content), but also TBY-2 cells (low ethanol content). In this study, we determined the metabolite contents in the MS and the R2S mediums using the FT-IR/ATR method under an assumption of ethanol existence on the basis of the studies developed by Hashimoto et al. [17].

The objective of the present work was to study the influence of sugar species in the pre-culture and culture media on the kinetic sugar uptake phenomena and the ethanol production by comparing the characteristics of the TBY-2 cells with the rice cells. Furthermore, we aimed to understand and compare the common and varying points of sugar metabolic kinetics and the relationships between cell growth behavior and ethanol production for each plant cell simultaneously.

Materials and methods

Plant cell cultivation

This study was carried out with the TBY-2 and rice cells, which were essentially sub-cultured under the same condition as that described in the previous paper [14, 15, 18, 19].

In the TBY-2 cell cultivation, 1.5 ml of the 7-day-old inoculums in the Murashige-Skoog (MS) [20] medium was inoculated into 95 ml of each fresh medium in a 300 ml flask, and the pre-cultivation was carried out at 298 K on the rotary shaker (150 rpm) in the dark for 14 days. Those pre-cultured cells were then inoculated and cultured in the above conditions for 14 days.

In the rice-cell cultivation, 0.05 g (dry-cell weight) of 14-day-old inoculums in the R2S [21–23] medium was inoculated into 120 ml of each sugar medium in a 300 ml flask and pre-cultivation was carried out at 298 K on the rotary shaker (125 rpm) in the dark for 14 days. The pre-cultured cells were then inoculated and cultured using the method above for 21 days. Before pre-cultivation and cultivation, the suspension-cultured cells were washed in the MS or R2S medium without sugar. At specified time intervals, the metabolite contents and the dry cell weight in the culture medium were measured.

Culture media

The MS and R2S media were used as standard mediums, while sucrose was used as the typical carbon source for the TBY-2 cell and rice-cell cultivations. A glucose, fructose or binary mixture was substituted, respectively, for sucrose in the other media. Three types (sucrose, glucose and fructose) of media were prepared at pre-cultivation, and four types (plus glucose fructose mixture) of media at cultivation (Table 1). The experimental patterns for each plant cell were 3×4 ways. The sugar and the other components in the medium were prepared as separate solutions and each sugar was solved into pure water. Next, they were mixed after being sterilized. The sugar solution was sterilized by filtration using a 0.2- μm membrane filter and the medium without sugar was autoclaved for 15 min at 394 K.

Analysis

The sugars and ethanol contents in the culture medium were determined by the FT-IR/ATR method as described previously [14, 17, 19]. For analysis by mid-infrared spectroscopy, an FT-IR spectrometer (Nicolet, Magna 750) was equipped with a KBr beam splitter and a deuterated triglycine sulfate KBr detector was used to obtain the spectra. The ATR spectra were obtained with a horizontal zinc selenide ATR sampling accessory (GRASEBY SPECAC, SPECACLAMP ATR 11080). The dry cell weight was compared to the turbidity of the culture medium using a UV-VIS-NIR scanning spectrophotometer as previously described [14, 15, 18, 19].

Results and discussion

ATR spectral analysis of culture medium

We applied the MIR spectroscopic method developed by Hashimoto et al. [14, 17] to the metabolite content determination. The outline for this method was shown below.

Focusing on the wavenumbers around 1,036, 1,065, 1,055 and 1,045 cm^{-1} , we made calibration curves between the absorbance and the metabolite concentrations in the medium, and the following straight line fits all curves.

Table 1 Setup sugar conditions of culture media

Culture media	Sugar concentration (g l^{-1})		
	Glucose	Fructose	Sucrose
Glucose	31.58	0.00	0.00
Fructose	0.00	31.58	0.00
Sucrose	0.00	0.00	30.00
Glucose fructose	15.79	15.79	0.00

$$\begin{aligned} A_{\text{metabolite,wavenumber}} &= a_{\text{metabolite,wavenumber}} \\ C_{\text{metabolite,wavenumber}} + b_{\text{metabolite,wavenumber}} \end{aligned} \quad (1)$$

Here, A and C are, respectively, the absorbance and the concentration of the metabolite at the wavenumber. The slope, a , of the straight line relates to the kind of metabolite, and the value of b theoretically shows the absorbance of the medium without metabolite. All correlation coefficients were greater than 0.92 [17]. Hence, each metabolic concentration is calculated by the following matrix equation:

$$\begin{pmatrix} A_{1055} \\ A_{1035} \\ A_{1065} \\ A_{1045} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{\text{suc},1055} & a_{\text{glc},1055} & a_{\text{fru},1055} & a_{\text{EtOH},1055} \\ a_{\text{suc},1035} & a_{\text{glc},1035} & a_{\text{fru},1035} & a_{\text{EtOH},1035} \\ a_{\text{suc},1065} & a_{\text{glc},1065} & a_{\text{fru},1065} & a_{\text{EtOH},1065} \\ a_{\text{suc},1045} & a_{\text{glc},1045} & a_{\text{fru},1045} & a_{\text{EtOH},1045} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_{\text{suc}} \\ C_{\text{glc}} \\ C_{\text{fru}} \\ C_{\text{EtOH}} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} b_{1055} \\ b_{1035} \\ b_{1065} \\ b_{1045} \end{pmatrix} \quad (2)$$

Here, the subscripts suc, glc, fru and EtOH, respectively, mean sucrose, glucose, fructose and ethanol. Then, each metabolite concentration is calculated by using the parameters of calibration curves at four wavenumbers.

For the validity of the above MIR spectroscopic method, Hashimoto et al. [17] reported that the spectral additivity was experimentally observed for four metabolic components in MS and R2S media, respectively. Additionally, the excellent agreement between the actual metabolite contents and those estimated using the MIR spectroscopic method were observed, and their correlation coefficients were all higher than 0.99.

Figure 1a, b shows the time behavior of the ATR spectra which were obtained after spectral subtraction of water and during the sucrose (MS and R2S) cultivation of the TBY-2 and rice cells, respectively. At the beginning of the cultivation with each plant cell (0 day), the ATR spectra had the same characteristics as that of sucrose. In the finger print region from 1,300 to 900 cm^{-1} , many peaks were observed such as the CO and C OH stretching modes, which complicatedly overlap each other [11, 12, 24], especially in the region from 1,200 to 950 cm^{-1} . The peaks depend on the sugar structure and on the interaction between the sugar molecules and their environments. In addition, ethanol had a significant sharp peak around 1,045 cm^{-1} , which did not overlap with the sugar peaks [19]. During the cultivation of each plant cell, the absorbance decreased almost over the finger print region with the changes in the spectral patterns. The percentage of decreasing absorbance in the cultured TBY-2 cells was different from that in the cultured rice cells. The spectrum of the TBY-2 cells at 5 days and that of rice cells at 6 days

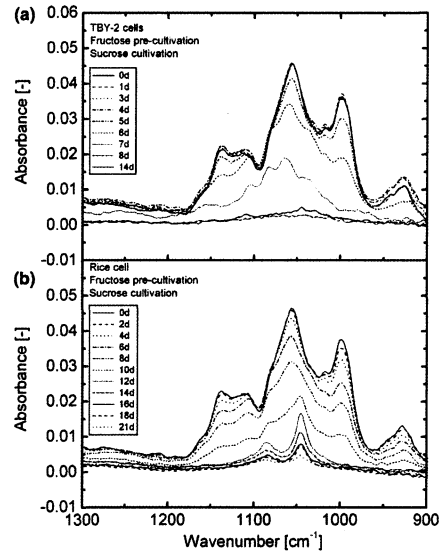


Fig. 1 Time behavior of the ATR spectra of the medium component during sucrose cultivation a in TBY-2 and b rice cells

were quite different from each spectrum at 0 day. Those spectra had qualitatively the same spectral characteristics as those of the glucose and fructose mixture in the medium, respectively. Around 1,045 cm^{-1} appeared a sharp peak identifying ethanol, the sharp peaks after 10 days in the cultured rice cells were observed as shown in Fig. 1b, and the slight peaks after 7 days in the cultured TBY-2 cells as shown in Fig. 1a. The ethanol production of the cultured rice cells was different from that of the cultured TBY-2 cells. Finally, the ATR spectrum of the culture media for each plant cell was almost identical to that of each medium without sugar. In comparison to the period of time when sugar in the medium was consumed completely with each plant cell, one in the TBY-2 cells was shorter than the other in the rice cells.

Thus, the spectral change shown in Fig. 1 gives evidences for a biological process in which ethanol is produced after sucrose in the medium is hydrolyzed and consumed by the cells. However, the biological process was different for each plant cell. In particular, the amount of ethanol production greatly differed between the cultured cells of TBY-2 and rice. We recognized that the rice cells produced much more ethanol than the TBY-2 cells.

Here, we describe the data processing procedure for the sucrose cultivation instances. In order to determine the metabolite contents in the culture media, the calibration curves between the absorbance and metabolite contents, developed using the MIR spectroscopic method, were applied to the spectral data shown in Fig. 1. The calibration curves used in the absorbance at

the spectral peaks around 1,036, 1,065, 1,055 and 1,045 cm^{-1} are attributed to the glucose, fructose, sucrose and ethanol spectra, respectively.

Figure 2 shows the time courses for the sugar and ethanol contents evaluated by the above method and the dry cell weight in the culture media during the sucrose cultivation. In this study, we applied to determine the four metabolic contents in each medium using the parameters of the calibration curves [17, 19]. Figure 2 exhibits that the medium initially contained sucrose alone as the carbon source. Shortly after the start of the cultivation, the sucrose content immediately decreased while glucose and fructose successively increased. The glucose and fructose contents in the cultured TBY-2 cells reached peak values around 5 days and decreased afterwards (Fig. 2a), while the cultured rice cells peaked around 6 days (Fig. 2b). This indicated that sucrose in the medium is hydrolyzed to glucose and fructose, which are consumed by the plant cell. The dry cell weight increased with a decrease in the total sugar content and reached the maximum value when the sugars were almost completely consumed. In Fig. 2b, the ethanol content with the cultivation of the rice cells was negligible at the initial stage and became successively higher and indicated the highest value at 12 days just after the dry cell weight had reached a maximum value. Next, the ethanol content decreased rapidly with a slight decrease in the dry cell weight and was almost equal to zero at the final stage of cultivation. On the other hand, in Fig. 2a, the ethanol content with the cultivation of the TBY-2 cells was less than that with the cultivation of the rice cells. The difference in the two types of plant cells indicated the characteristics of each plant cell.

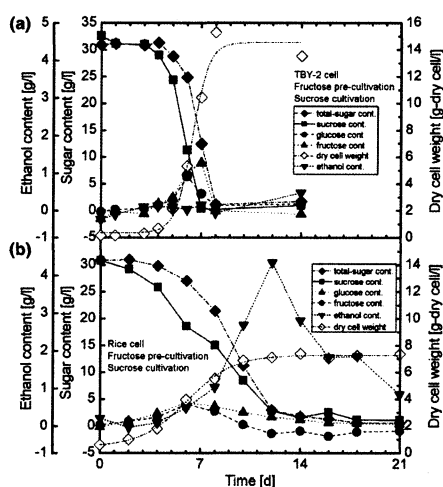


Fig. 2 Time courses of sugar content, ethanol content, and dry cell weight during sucrose cultivation a in TBY-2 and b rice cells

Sugar metabolic kinetics

Calculation of specific uptake rates

Next, we then studied the specific uptake rates of sugar, which is one of the most important indices characterizing the sugar metabolic kinetics of cells. We then determined the specific uptake rates after quantification of the sugar uptake rate and the cell density according to the method provided in our paper [18], as follows.

Sucrose is synthesized with glucose and fructose, which relates to the hydrolysis of sucrose in the medium by enzymes such as invertase [25, 26]. Consequently, if the suspension cells were cultivated in the sucrose media, we would need to calculate the uptake of the glucose and fructose from the medium to the cells, using the following equations.

$$W_{\text{sugar}} = C_{\text{sugar,ini}} + (C_{\text{suc,ini}} - C_{\text{suc}}) \frac{M_{\text{sugar}}}{M_{\text{suc}}} - C_{\text{sugar}} \quad (3)$$

Here, C (g l^{-1}) is the sugar content, M (g mol^{-1}) the molecular weight. W (g l^{-1}) is the uptake amount of sugar. The subscript sugar indicates glucose or fructose and the subscript suc indicates sucrose. Moreover, the subscript ini indicates the value at the initial stage. Eq. 3 is derived from the assumption that the suspension cells consume sucrose after hydrolysis.

We applied the logistic functions expressed by Eq. 4 in order to make W_{sugar} fit.

$$W_{\text{sugar}} = \frac{W_{\text{sugar,ini}} - W_{\text{sugar,fin}}}{1 + e^{(t - t_{0,\text{sugar}}/w_{w,\text{sugar}})}} + W_{\text{sugar,fin}} \quad (4)$$

In Eq. 4, t (d) is the cultivation time. The parameters t_0 and w_w , respectively, mean the inflection point of the time course and the time constant ticking its curve. The subscript fin indicates the value at the final stage. The calculated result lies beneath the linear plot. The glucose and fructose uptake rates were calculated by differentiating Eq. 4 with the cultivation time.

We quantitatively examined the above time course data and their rates. The logistic function expressed by Eq. 4 was applied to the plots of the dry cell weight against the cultivation time.

$$X = \frac{X_{\text{ini}} - X_{\text{fin}}}{1 + e^{(t - t_{0,x}/w_x)}} + X_{\text{fin}} \quad (5)$$

This equation is mathematically the same function as Eq. 4 and X (g-dry cell/l) is the dry cell weight. The specific uptake rates were calculated by dividing the uptake rates with the dry cell weight predicted by Eq. 5.

The comparison of TBY-2 cell and Rice cell on specific uptake rates in actual cultivation time

Figure 3 shows the time courses of specific uptake rates of sugar with the TBY-2 cells, and Fig. 4 exhibits that with the rice cells. The peak values of the specific uptake rates as shown in Figs. 3 and 4 differed from each other. The values of the TBY-2 cells were

higher than that of the rice cells. This was supposed to be the difference in sugar consumption ability for each plant cell.

Characteristic of TBY-2 cell In Fig. 3, the peak time of the specific uptake rate for the glucose pre-cultivation was earlier than that for the other sugars pre-cultivation (except for fructose cultivation) without being related to the types of sugar in the culture medium. In case glucose and fructose were both present in the medium, glucose was primarily utilized and followed by fructose. However, the peak time of the specific uptake rate for fructose cultivation was earlier than that for the glucose cultivation without being related to the types of sugar in the pre-culture medium.

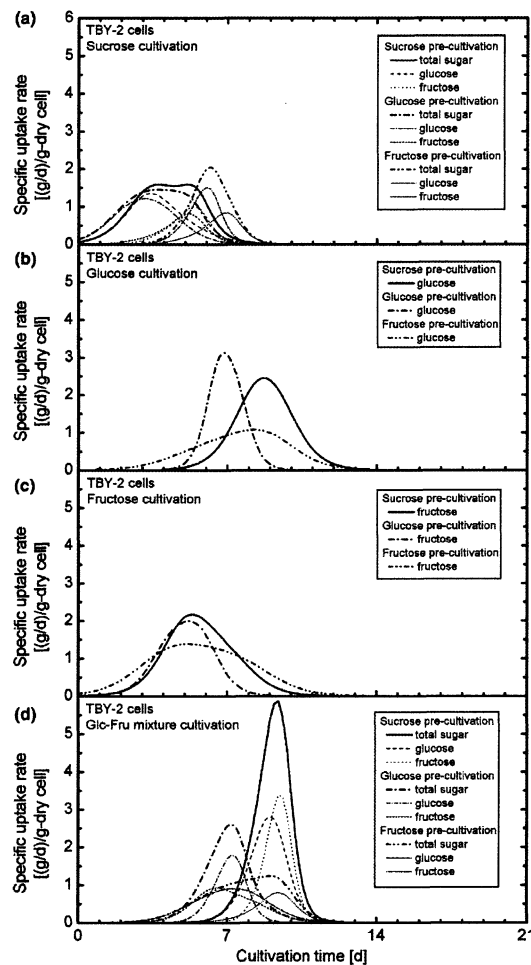


Fig. 3 Time courses of specific uptake rates of sugar a during sucrose cultivation, b glucose cultivation, c fructose cultivation, and d glucose fructose mixture cultivation in TBY-2 cells

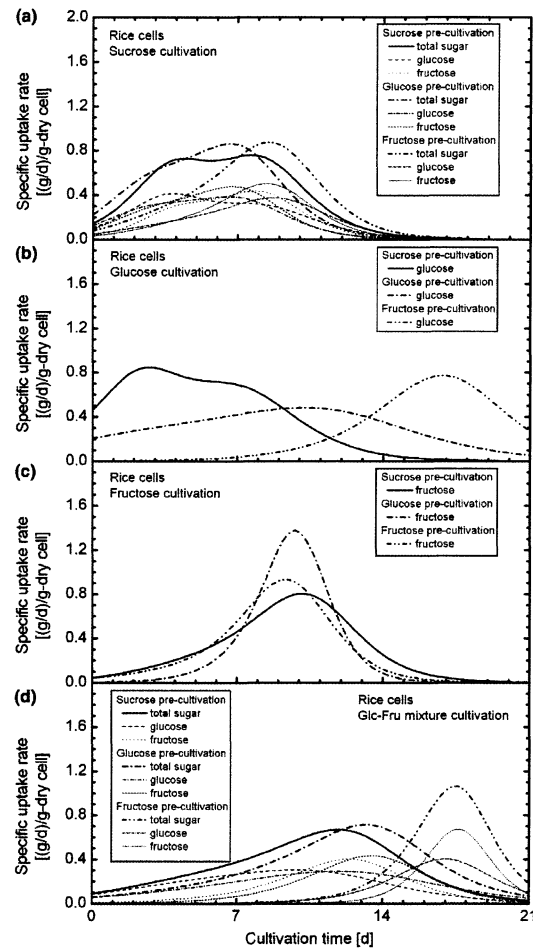


Fig. 4 Time courses for specific uptake rates of sugar a during sucrose cultivation, b glucose cultivation, c fructose cultivation and d glucose fructose mixture cultivation in rice cells

Characteristic of Rice cell The kinetic behavior of the sugar uptake in the culture is dependent on the type of sugar used. In particular, the significant differences in the time indicating maximum specific uptake rates among all pre-cultivation conditions were observed for glucose cultivation (Fig. 4b).

The comparison of TBY-2 cell and Rice cell on specific uptake rates in non-dimensional cultivation time

As shown in Figs. 3 and 4, the influences of sugar in the pre-cultivation medium, in particular, reflected the kinetic sugar uptake behavior of the test organisms. In addition, Fig. 2 also indicates that the cell growth rate was affected by the sugar in the pre-cultivation medium. Thus, Figs. 3 and 4 might be expressed as the

kinetic sugar uptake behavior denoting the variations in the cell growth process during cultivation. In order to discuss the kinetic sugar uptake phenomena and neglecting the cell growth behavior, we attempted to apply the non-dimensional cultivation time [15, 17] of $t_{\text{non},x}$, expressed by Eq. 4, to the data displayed in Figs. 3 and 4.

$$t_{\text{non},x} = \frac{t - t_0}{w_x} \quad (6)$$

The above non-dimensional time can be calculated using the parameters, t_0 and w_x in Eq. 3, which, respectively, denote the inflection point of the time course of the cell density and the time constant ticking its curve, so that the relationship between the specific sugar rate and the non-dimensional cultivation time could signify the kinetic sugar uptake characteristics of each plant cell based on the cell growth stage.

Figure 5 shows the influence of the specific uptake rate on the non-dimensional cultivation time in the TBY-2 cells and Fig. 6 shows that in the rice cells. The horizontal axis $(t - t_0)/w_x$ of Figs. 5 and 6 is the non-dimensional cultivation time standing for the cell growth behavior and was calculated with the parameters of the logistic function expressed by Eq. 3 fitting the time course of the cell density. We could compare the sugar metabolic kinetics with the TBY-2 cells and the rice cells, or with the different cultivation conditions using the non-dimensional the culture time.

Characteristics in common between Rice cell and TBY-2 cell Each peak time of the specific uptake rate as shown in Fig. 3 or 4 was varied in cultivation time, however, as shown in Fig. 5 or 6 this was almost uniform in the non-dimensional cultivation time. The time from the start of cultivation to the sugar uptake phenomena was changed by the influence of sugar spices in the pre-culture media. However, the sugar metabolic process of sugar uptake based on the cell growth stage was not changed. This was experimentally confirmed by the TBY-2 cells and by rice cells.

Characteristic of each plant cell Figure 5 shows the $(t - t_0)/w_x$ values of the peaks of the specific uptake rates with the TBY-2 cells below zero. On the contrary, Fig. 6 shows that the rice cells were above zero. The trend in Fig. 5 was found in all types of cultivation with the TBY-2 cells. Therefore, this characteristic was supposed to be that of the TBY-2 cells. Moreover, the trend in Fig. 6 was found in all types of cultivation with the rice cells. Therefore, this characteristic was supposed to be that of the rice cells. These results indicated that the TBY-2 cells consumed sugar before growth and that the rice cells consumed sugar after growth. Since we aim the specific uptake rates of sugars based on the non-dimensional cultivation time for cell growth behavior, we find that each plant cell has the original characteristic of the sugar metabolic kinetics.

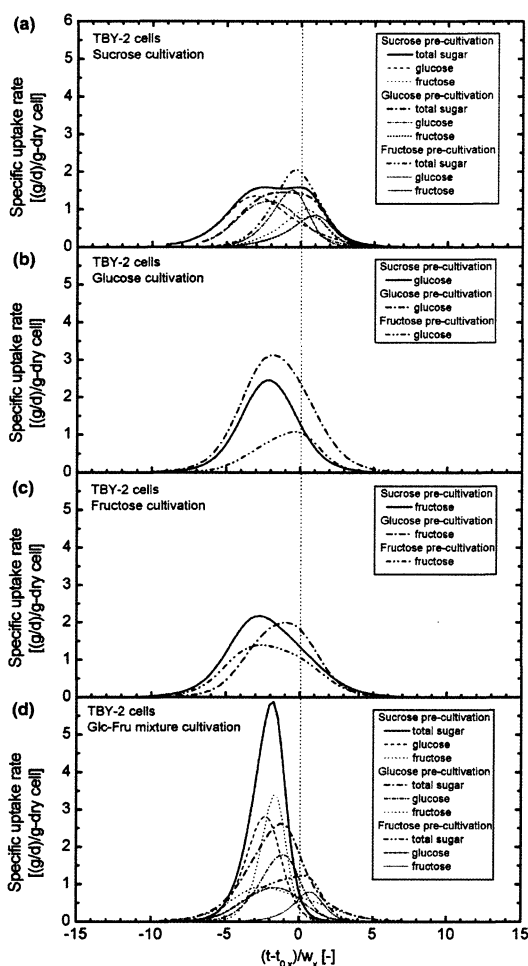


Fig. 5 Non-dimensional time courses for specific uptake rates of sugar a during sucrose cultivation, b glucose cultivation, c fructose cultivation and d glucose fructose mixture cultivation in TBY-2 cells

Ethanol content

The comparison of TBY-2 cell and rice cell on ethanol content in non-dimensional cultivation time

Figures 7 and 8 show the non-dimensional courses of ethanol content during cultivation in the TBY-2 cells and rice cells, respectively. Comparing the peak value of the ethanol content with the TBY-2 cells and the rice cells, the ethanol contents of rice cells were higher than that of the TBY-2 cells. These results indicated that the ethanol production kinetics of the TBY-2 cell was different from that of the rice cell. In Fig. 8, the peak

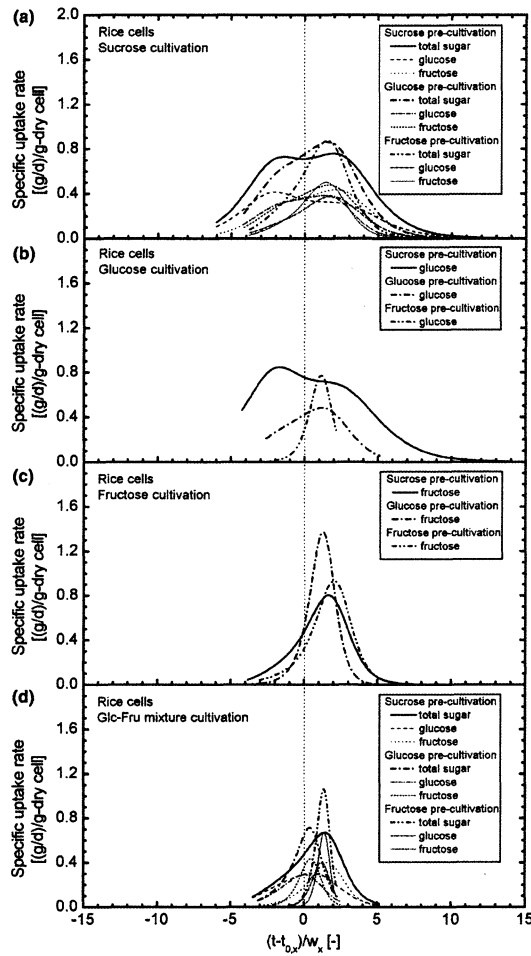


Fig. 6 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar a during sucrose cultivation, b glucose cultivation, c fructose cultivation and d glucose fructose mixture cultivation in rice cells

values of the ethanol content were various. However, the peaks had very similar shapes. Moreover, the $(t - t_0)/w_x$ values of the peaks of the ethanol content were generally above zero. These experimental results found that the rice cells had those trends; the ethanol content increased just after cell growth was activated without relation to sugar in the pre-culture or culture media. On the other hand, in Fig. 7, the peak values of the ethanol content were very small. As a result, we do not clearly find a trend in the TBY-2 cells. Since we aim the ethanol content for cell growth behavior based on the non-dimensional cultivation time, we find the original characteristics of the ethanol production kinetics of each plant cell.

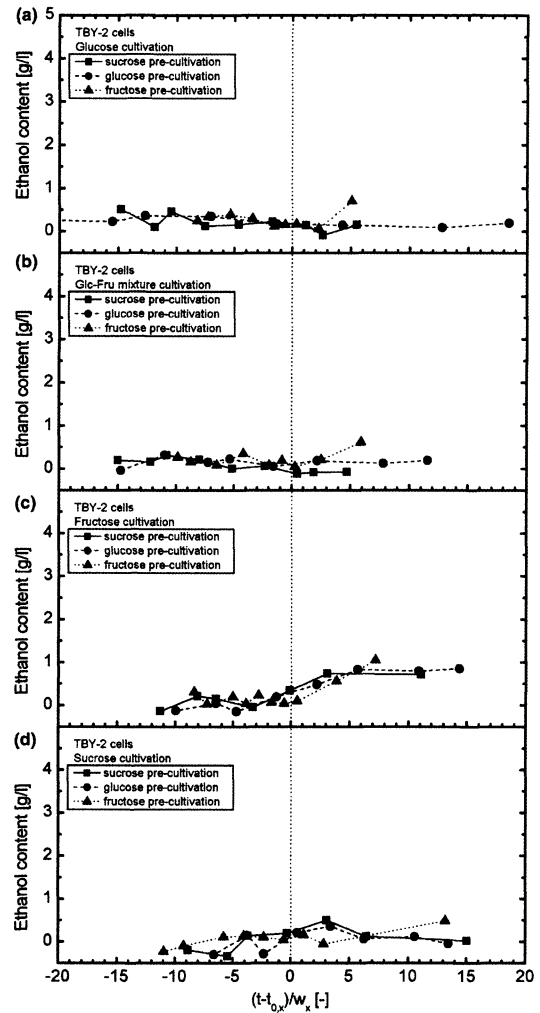


Fig. 7 Non-dimensional time courses of ethanol content a during sucrose cultivation, b glucose cultivation, c fructose cultivation and d glucose fructose mixture cultivation in TBY-2 cells

Conclusion

In conclusion, the consumption rate for each sugar and the behavior of the ethanol production could be measured simultaneously and accurately by the FT-IR/ATR method. In addition, by applying the logistic function to the predicted sugar contents and dry cell weight in the media during cultivation, the specific uptake rates of sugar by the suspension plant cells can be easily and continuously obtained. Accordingly, we suggested the importance of understanding the influence of the sugar in pre-cultivation and cultivation for

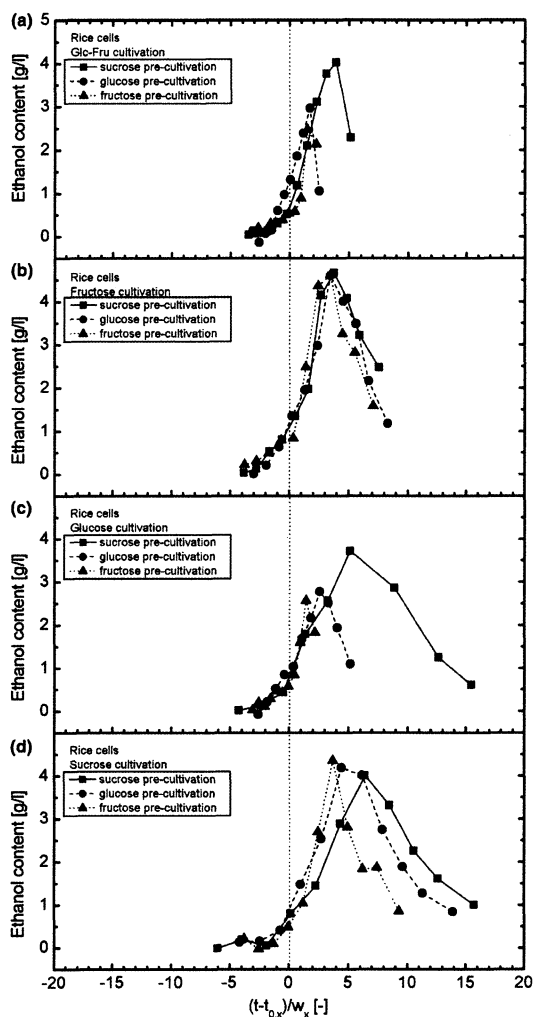


Fig. 8 Non-dimensional time courses of ethanol content a during sucrose cultivation, b glucose cultivation, c fructose cultivation and d glucose fructose mixture cultivation in rice cells

the sugar metabolic kinetics. Moreover, we were able to determine the common or overlapping characteristic for the two types of plant cells and the specific metabolic features exhibited by each plant cell. When the ethanol production behavior phenomena in each plant cell were compared, the ethanol contents during cultivation were significantly different. The amount of ethanol production with the TBY-2 cells was very small, so this phenomenon of the TBY-2 cell could not be to be measured. On the other hand, when the ethanol production behavior phenomena with the rice cells based on the non-dimensional cultivation time for

cell growth behavior was compared with every cultivation of prepared condition, the common characteristic in all types of cultivation was seen between the cell growth behavior and the ethanol production: the ethanol content increased just after cell growth activation. This indicated the influence of the type of sugar in the culture media on the kinetic sugar uptake phenomena, but was hardly the influence of that on the ethanol production phenomena.

References

- Mohr H, Schophfer P (1998) In: Amino S, Komamine A (eds) Plant physiology. Springer, Tokyo, pp 117-259
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signaling in plants. The Plant cell (Suppl):185-205
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999) The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. Plant Cell 11:707-26
- Harrick NJ (1967) Internal reflection spectroscopy. Review and supplement. Harrick Scientific Corporation, New York
- Mirabella FM, Harrick NJ (1985) Internal reflection spectroscopy. Review and supplement. Harrick Scientific Corporation, New York
- Bellon V, Vallat C, Goffinet D (1995) Quantitative analysis of individual sugars during starch hydrolysis by FT-IR/ATR spectroscopy. Part I: multivariate calibration study repeatability and reproducibility. Appl Spectrosc 49:556-562
- McQueen DH, Wilson R, Kinnunen A, Jensen EP (1995) Comparison of two infrared spectroscopic methods for Cheese analysis. Talanta 42:2007-2015
- Kemsley EK, Holland JK, Defernez M, Wilson RH (1996) Detection of adulteration of Raspberry Purees using infrared spectroscopy and chemometrics. J Agric Food Chem 44:3864-3870
- Wilson RH (1990) Fourier transform mid-infrared spectroscopy for food analysis. Trends Anal Chem 9(4):127-131
- Van de Voort FR (1992) Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. Food Res Int 25:397-403
- Kameoka T, Okuda T, Hashimoto A, Noro A, Shiinoki Y, Ito K (1998) FT-IR analysis of sugars in aqueous solutions using ATR method. J Jpn Soc Food Sci Technol 45:192-198
- Kameoka T, Okuda T, Hashimoto A, Noro A, Shiinoki Y, Ito K (1998) A rapid FT-IR/ATR method for sugar content determination in food. J Jpn Soc Food Sci Technol 45:199-204
- Kanou M, Nakanishi K, Hashimoto A, Kameoka T (2003) Infrared spectroscopic analysis of disaccharides in aqueous solutions. J Jpn Soc Food Sci Technol 50:57-62
- Hashimoto A, Kameoka T (2000) Mid-infrared spectroscopic determination of sugar contents in plant-cell culture media using an ATR method. Appl Spectrosc 54:1005-1011
- Hashimoto A, Yamanaka A, Kanou M, Nahar F, Kameoka T (2003) Effect of pre-cultivation on sugar metabolic kinetics of suspension plant cells measured by mid-infrared spectroscopy. J Food Agric Environ 1(2):168-175
- Wray V, Schiel O, Berlin J, Witte L (1985) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation of the in vivo regulation of intracellular pH in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*: the effects of oxygen supply, nitrogen, and external pH change. Arch Biochem Biophys 236:731-740
- Hashimoto A, Yamanaka A, Kanou M, Nakanishi K, Kameoka T Simple and rapid determination of metabolite content in plant cell culture medium using an FT-IR/ATR method. Bioprocess Biosyst Eng (in press)
- Hashimoto A, Nakanishi K, Motonaga Y, Kameoka T (2001) Sugar metabolic analysis of suspensions of plant cells using an FT-IR/ATR method. Biotechnol prog 17:560-564

学術論文 “MIR spectroscopic analysis on sugar metabolic and ethanol productive kinetics of suspension TBY-2 and rice cells pre-cultured in various media.”

133

19. Hashimoto A, Nakanishi K, Yamanaka A, Nahar F, Motonaga Y, Kameoka T (2001) Mid-infrared spectroscopic analysis of sugar metabolism by rice cells suspending in culture medium. IFAC computer applications in biotechnology 2001. Elsevier Science Ltd., pp 379-384
20. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
21. Ohara K, Ojima K, Fujiwara A (1973) Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol* 14:1113-1121
22. Ohara K, Ojima K, Saigusa M, Fujiwara A (1975) Studies on the nutrition of rice cell culture II. Microelement requirement and the effects of deficiency. *Plant Cell Physiol* 16:73-81
23. Kyoizuka J, Shimamoto K (1991) Transformation and regeneration of rice protoplasts. In: Lindsey K (ed) *Plant tissue culture manual*, B1. Kluwer, Dordrecht, pp 1-16
24. Cael J, Koenig J, Blackwell J (1974) Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates, Part IV. *Carbohydr Res* 32:79-91
25. Perata P, Matsukura C, Vernieri P, Yamaguchi J (1997) Sugar repression of a gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos. *Plant Cell* 9:2197-2208
26. Morita A, Umemura T, Kuroyanagi M, Futsuhara K, Perata P, Yamaguchi J (1998) Functional dissection of a sugar-repressed Amylase gene (RAmyl A) promoter in rice embryos. *FEBS Lett* 423:81-85

学術論文 “Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells using an FT-IRATR method.”

Bioprocess Biosyst Eng (2007) 30:457–468
DOI 10.1007/s00449-007-0142-z

ORIGINAL PAPER

Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells using an FT-IR/ATR method

Atsushi Yamanaka · Atsushi Hashimoto ·
Tomomi Matsuo · Mikihiro Kanou ·
Ken-Ichiro Suehara · Takaharu Kameoka

Received: 8 March 2007 / Accepted: 1 July 2007 / Published online: 22 July 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The influence of sugars in culture media on the kinetics of the mono- and disaccharide uptake and cell growth behavior was studied by mid-infrared spectroscopy using a Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) equipped with an attenuate total reflection accessory (ATR). We performed the plant cell cultivation with *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow No.2 (TBY-2) cells in the culture media, which contained glucose, fructose, mannose, galactose, sucrose, trehalose, maltose or lactose. Consequently, the differences of the kinetic sugar uptake and cell growth behavior among all the cultivations were confirmed. In particular, a very long lag time before the galactose uptake was observed, and the spectral-pattern of the maltose medium presented almost the same as the initial one during the cultivation. Furthermore, base on the non-dimensional cultivation time for cell growth behavior, it was suggested that the TBY-2 cells consumed sugar before cell growth and produced the ethanol just after cell growth.

Keywords Mid-infrared spectroscopy · Sugar metabolic kinetics · Plant cell · Maltose · Galactose

A. Yamanaka · A. Hashimoto (✉) · T. Matsuo ·
K.-I. Suehara · T. Kameoka
Division of Sustainable Resource Sciences,
Graduate School of Bioresources, Mie University,
1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan
e-mail: hasimoto@bio.mie-u.ac.jp


A. Yamanaka
e-mail: yamanaka@bife.bio.mie-u.ac.jp

M. Kanou
Management Office for Intellectual Property, Mie University,
1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan
e-mail: kanou@crc.mie-u.ac.jp

Introduction

Recently, plant-cell cultivation technology has been developed and plays a significant role in various fields, from plant physiology to bioprocess engineering. The precision control of the cultivation process is one of the most important subjects in both the scientific and engineering fields. Most of the biochemical reactions during glycolysis within plant cells are understood [1] and there are a number of studies on the sugar transport, sugar sensing and signaling in plants. For example, in disaccharides, Riesmeier et al. [2] discovered and successfully isolated a sucrose transporter (SUT) from spinach. Additionally, they suggested that the SUT had the ability to transport maltose. After this, the SUT was isolated from other plants. A maltose transporter had not been previously identified. Niittyla et al. [3] discovered a maltose transporter which was unrelated to other sugar transporters in *Arabidopsis* leaves. On the other hand, the monosaccharide transporter (MST) has been significantly reported from various plants. The monosaccharide transport activity was found in various areas such as the spice of plant, tissue in plants and the MST family. However, little is known about the kinetic transport phenomena of nutrimental sugars from a liquid medium to suspension plant cells.

Incidentally, the spectroscopic method using Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometers equipped with an attenuated total reflection accessory (FT-IR/ATR) provides significant potential as a quantitative analytical tool for liquids [4, 5]. Therefore, various FT-IR/ATR spectroscopic methods are under development for the analysis of bioproducts [6–9]. We also studied the quantitative analysis of sugars in aqueous solutions using the FT-IR/ATR method [10–12].

 Springer

The MIR spectrum using the FT-IR/ATR method has experimentally shown that the spectral additivity was applicable for sucrose, glucose and fructose in the MS media. In addition, we examined the potential of the sugar concentration determination in culture media containing suspended *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow No.2 (TBY-2) cells using the FT-IR/ATR method by a comparison with the high-performance liquid chromatography (HPLC) method in order to analyze the sugar uptake rate of the TBY-2 cell suspension [13]. We then discovered the importance of understanding the influence of sugar in the sub- and pre-culture media on the sugar uptake kinetic phenomena during cultivation [14].

Hashimoto et al. [15], moreover, made it possible to simultaneously measure the nutrient and product concentrations in a culture medium using the FT-IR/ATR method. Using the FT-IR/ATR method developed by Hashimoto et al. [15], we studied the influence of sugar species in the pre-culture and culture media on the kinetic sugar uptake phenomena and the ethanol production by comparing the characteristics of the TBY-2 cells with the rice cells [16].

Additionally, since water is a major constituent in the bioproducts, the interaction between the saccharide molecules and water is one of the most important factors for monosaccharide and disaccharides [17]. As a major translocatable product of photosynthesis, sucrose (glucose and fructose) is the main soluble component of the phloem sap [18]. Trehalose (a dimer of glucose linked in α 1–2) substitutes for water and maintains the life of organisms exposed to arid environments [17]. In leaves, maltose (a dimer of glucose linked in α 1–4) with glucose and isomaltose are principal products starch mobilization exported from chloroplasts at night [19, 20]. Mannose is known to be toxic for plant growth, supposedly due to a sequestration of inorganic phosphate as mannose-6-phosphate [21–23]. Similarly, galactose is highly toxic when supplied exogenously to plants in concentration of 1–10 mM [24, 25]. Moreover galactose which is one of the pectic polysaccharide components in the cell wall is related to intercellular contacts [26]. Kanou et al. [17] studied the infrared spectral characteristics of monosaccharides and disaccharides in aqueous solution.

In this study, we defined that glucose and sucrose as the typical carbon source of monosaccharide and disaccharide, respectively. We applied three monosaccharides (fructose, mannose and galactose) which corresponded to glucose epimers and three disaccharides (trehalose, maltose and lactose) which had various glucose linkages in addition to both typical carbon sources to this study. Additionally, those sugars are related to sugar metabolism as described the above paragraph.

The objective of the present work was to get a good grasp of the influence of sugar species, that is, the differ-

ence of molecular structure in monosaccharide and kinds of glucose links in disaccharide, in the culture media on the kinetic sugar uptake phenomena. Furthermore, we applied the FT-IR/ATR method developed by Hashimoto et al. to measure not only sugar concentrations but also ethanol concentration which plant cells produce in anaerobic environment, simultaneously.

Materials and methods

Plant cell

The experiments reported in this paper were carried out with *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow No.2 (TBY-2), which were sub-cultured in the Murashige–Skoog (MS) [27] medium for 7 days at 298 K on a rotary shaker (150 rpm) in the dark as described in the previous paper [13–16, 28].

Culture media

The MS media were used as the standard medium, and sucrose was used as the typical carbon source for the TBY-2 cell cultivation. Four types each of the monosaccharides (glucose, fructose, mannose and galactose) and disaccharides (sucrose, trehalose, maltose and lactose) were prepared as the carbon source in the culture media. The monosaccharide and disaccharide concentrations in the culture media were fixed at 31.58 and 30.00 g/l, respectively; adjusted to the sucrose carbon number. Trehalose, which was used in this study, was of special grade and obtained from Hayashibara Biochemical Laboratories (Okayama, Japan). All of the others chemicals were of special grade and were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). The sugar and the other components in the medium were prepared as separate solutions, and each sugar was dissolved in pure water. They were mixed after being sterilized. The sugar solution was sterilized by filtration using a 0.2- μ m membrane filter, and the medium without sugar was autoclaved for 15 min at 394 K.

Cultivation

During cultivation, 1.5 ml of the 7-day-old inoculums in the MS medium was washed by the MS medium without sugar and inoculated into 95 ml of each fresh medium in a 300 ml flask, and the cultivation was carried out at 298 K on a rotary shaker (150 rpm) in the dark. At specified time intervals, the metabolite concentrations and the dry cell weight in the culture medium were measured.

Enzyme assay

The enzymes, invertase and maltase in the sucrose and maltose culture media, were assayed under the conditions listed in Table 1, which showed that pH and temperature were optimum conditions of invertase (EC 3.2.1.26) [29] and maltase (EC 3.2.1.20) [30]. Each of culture medium at lag, logarithmic and stationary phases was filtrated through a 0.45 μm membrane filter in order to remove the cells from culture media. Furthermore, the sugar concentration, pH, and temperature of the culture media were adjusted to the conditions in Table 1. These culture media were incubated with a shaking. At specified time intervals, the sugar concentrations were measured. In additionally, as a control, each of the culture medium in 0.35 unit/ml invertase and maltase was incubated at the same conditions, respectively.

Analysis

The sugars and ethanol concentrations in culture medium were determined by FT-IR/ATR method as described previously [13–16, 28, 31]. For analysis by Mid-infrared spectroscopy, an FT-IR spectrometer (Nicolet, Magna 750) was equipped with a KBr beam splitter and a deuterated triglycine sulfate KBr detector was used to obtain the spectra. The ATR spectra were obtained with a horizontal zinc selenide ATR sampling accessory (GRASEBY SPECAC, SPECACLAMP ATR 11080). The dry cell weight after drying was compared to the turbidity of culture medium by at 600 nm as described previously [13–16, 28].

Analysis of the enzyme assay was performed using a Tosoh (Tokyo, Japan) HPLC system, consisting of a model DP-8020 pump and a model RI-8020 differential refracting detector. A Shim-Pack SCR-101 N (Shimadzu, Kyoto, Japan) HPLC analytical column (7.9 × 300 mm) with a guard column was used. The column temperature was maintained at 313 K with a column oven (CO-8020, Tosoh, Tokyo, Japan). The mobile phase was the pure water after filtration through a 0.2 μm membrane filter and degassing with an ERC-3310 degasser (Erma Optical Works, Tokyo, Japan). The refractive index of the elute was monitored as described previously [14].

Table 1 Enzyme assay setup conditions

	Sucrose culture medium	Maltose culture medium
Day	3, 6, 10	14, 19, 28
Sugar concentration	30.00 g/l	30.00 g/l
pH	5.0	6.9
Temperature	303 K	313 K

Results and discussion

ATR spectral analysis of culture medium

Figure 1 shows the ATR spectra of the monosaccharide (glucose, fructose, mannose and galactose), disaccharide (sucrose, trehalose, maltose and lactose) and ethanol from 1,300 to 900 cm⁻¹ (finger print region) in the MS medium. These spectra were obtained after the spectral subtraction of water. For the sugars, there were many peaks, such as the CO and C–OH stretching modes, which complicatedly overlapped each other [10, 11, 32], especially in the region from 1,200 to 950 cm⁻¹. These peaks depend on the sugar structure and on the interaction between the sugar molecules and their environments. In addition, ethanol had a significantly sharp peak around 1,045 cm⁻¹ (Fig. 1a), which did not overlap the sugar peaks. Thus, we can identify each sugar and ethanol in the medium with its spectral pattern in this region. The peaks around 1,036, 1,065, 1,070, 1,076, 1,055, 993, 1,149 and 1076 cm⁻¹ characterize the glucose, fructose, mannose, galactose (Fig. 1a), sucrose, trehalose, maltose and lactose (Fig. 1b) spectra, respectively.

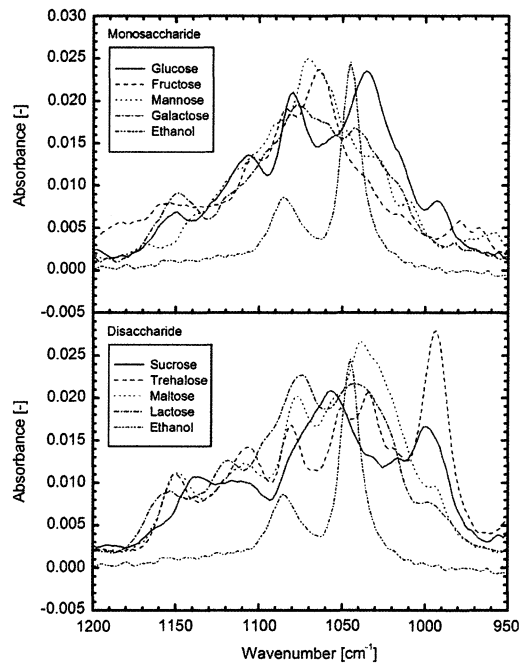


Fig. 1 ATR spectra of (a) monosaccharide (glucose, fructose, mannose and galactose), (b) disaccharide (sucrose, trehalose, maltose and lactose) and ethanol in MS medium

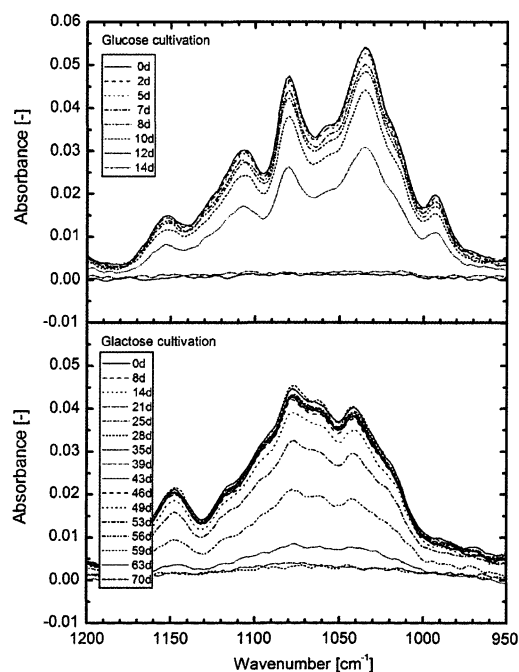


Fig. 2 Time behavior of the ATR spectra of the medium during (a) glucose and (b) galactose cultivation

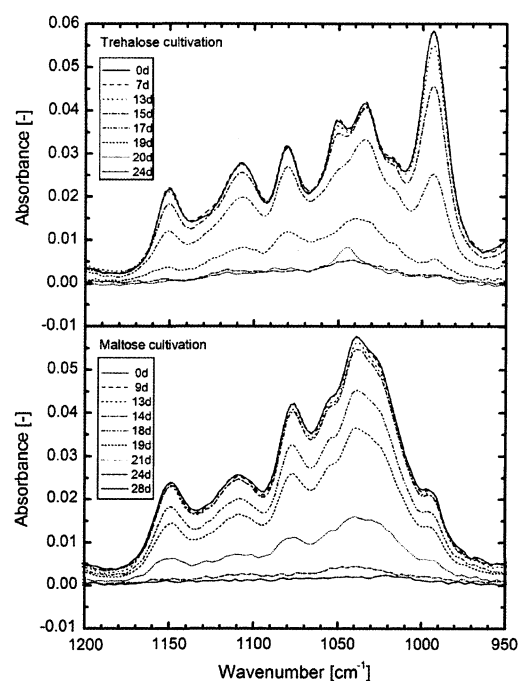


Fig. 3 Time behavior of the ATR spectra of the medium during (a) trehalose and (b) maltose cultivation

Figures 2a, b and 3a, b show the time behavior of the ATR spectra of the medium during the glucose, galactose, trehalose and maltose cultivation, respectively. At the beginning of the cultivation (0 day), the ATR spectra had the same characteristics as that of each disaccharide shown in Fig. 1. During the monosaccharide cultivation, the absorbance decreased almost over the finger print region without any change in the spectral patterns as shown in Fig. 2. Though the mannose and galactose cultivations are known to be toxic, the absorbance decreased with the cultivation time. On the other hand, during the disaccharide cultivation, the ATR spectra had the characteristics of two patterns. In one pattern, during the trehalose cultivations, the absorbance decreased with the changes in the spectral patterns. Especially, a sharp peak identifying the glycosidic linkage around 993 cm^{-1} decreased. These spectra qualitatively had the spectral characteristics as those of the trehalose and glucose mixture in the medium. The spectral patterns had gradually changed from trehalose to glucose (Fig. 3a). During the sucrose cultivation, the ATR spectral patterns had also gradually changed from a sucrose to a glucose and fructose mixture (data not shown). The other pattern, during the maltose cultivation, the absorbance decreased, however, there was little change in the spectral

pattern (Fig. 3b). Additionally, during the lactose cultivation, the ATR spectra hardly decreased within 180 days (data not shown).

Around $1,045\text{ cm}^{-1}$ appeared a sharp peak identifying ethanol, this sharp peak appeared after 20 days and was observed as shown in Fig. 3a. This phenomenon was observed with some sugar cultivations. Thus, the spectral change shown in Fig. 3a gives evidences for a biological process in which ethanol is produced after trehalose in the medium is hydrolyzed and consumed by the cells. However, the biological process was different from each carbon source. Finally, the ATR spectrum of the culture media was almost identical to that of the MS medium without sugar.

We applied the MIR spectroscopic method developed by Hashimoto et al. [13, 15] to the metabolite concentration determination. Focusing on the above wavenumbers, we made calibration curves between the absorbance and metabolite concentrations in the media. The fitting parameters and correlation coefficients of the calibration curves are displayed in Table 2. An excellent linearity was observed for each metabolite at each wavenumber [15].

Figure 4 shows the time courses for the sugar and ethanol concentrations evaluated by the above method and the dry cell weight in the culture media during the trehalose

學術論文 “Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells using an FT-IRATR method.”

Table 2 Fitting parameters and correlation coefficients of calibration curves

Metabolite	Wavenumber (cm ⁻¹)	Fitting parameter, <i>a</i> (M)	Fitting parameter, <i>b</i> (-)	Correlation coefficient, <i>r</i> (-)
Glucose	1,036 (Glc)	0.2938	0.0009	0.999
	1,065 (Fru)	0.1783	0.0016	0.999
	993 (Tre)	0.1032	0.0005	0.999
	1,055 (Suc)	0.1985	0.0014	0.999
	1,080 (Glc)	0.2433	0.0022	0.998
	1,149 (Mal)	0.0737	0.0017	0.999
	1,045 (EtOH)	0.2360	0.0014	0.999
Fructose	1,036 (Glc)	0.1247	0.0009	0.998
	1,065 (Fru)	0.2781	0.0016	0.999
	1,055 (Suc)	0.2134	0.0014	0.999
	1,045 (EtOH)	0.1439	0.0014	0.999
Mannose	1,070 (Man)	0.2836	0.0021	0.999
	1,045 (EtOH)	0.1800	0.0014	0.999
Galactose	1,076 (Gal)	0.2237	0.0027	0.999
	1,045 (EtOH)	0.2011	0.0014	0.999
	1,045 (EtOH)	0.2011	0.0014	0.999
Sucrose	1,036 (Glc)	0.3144	0.0009	0.999
	1,065 (Fru)	0.4276	0.0016	0.999
	1,055 (Suc)	0.4873	0.0014	0.999
	1,045 (EtOH)	0.3917	0.0014	0.999
Trehalose	1,036 (Glc)	0.4413	0.0009	0.999
	993 (Tre)	0.6235	0.0005	0.999
	1,045 (EtOH)	0.3663	0.0014	0.999
Maltose	1,080 (Glc)	0.4002	0.0022	0.999
	1,149 (Mal)	0.2298	0.0017	0.999
	1,045 (EtOH)	0.5226	0.0014	0.999
Lactose	1,076 (Lac)	0.4790	0.0027	0.999
	1,045 (EtOH)	0.4614	0.0014	0.998
Ethanol	1,036 (Glc)	0.0417	0.0009	0.994
	1,065 (Fru)	0.0118	0.0016	0.982
	1,070 (Man)	0.0131	0.0021	0.942
	1,076 (Gal)	0.0166	0.0027	0.968
	1,055 (Suc)	0.0327	0.0014	0.996
	993 (Tre)	–	0.0005	–
	1,080 (Glc)	0.0270	0.0022	0.997
	1,149 (Mal)	–	0.0017	–
	1,045 (EtOH)	0.1177	0.0014	0.999

cultivation. In this study, we determined the sugar and ethanol concentrations in the MS medium using the parameters of the calibration curves shown in Table 2. Figure 4 shows that the medium initially contained trehalose as the carbon source. The trehalose concentration decreased while the glucose successively increased. The glucose one reached peak values around 17 days and then decreased. This indicated that a part or most of the trehalose in the medium was hydrolyzed to glucose, which was consumed by the TBY-2 cell. Moreover, in the sucrose medium, the sucrose concentration decreased with an increase in the glucose and fructose concentrations, which

the sucrose in the medium was hydrolyzed similar to the previous studies [13–16, 32]. In contrast to these results, in the maltose medium, we rarely observed any sugar other than maltose by both the FT-IR/ATR and HPLC method (data not shown).

On the other hand, the dry cell weight increased with a decrease in the total sugar concentration and reached the maximum value when the sugars were almost completely consumed. The ethanol concentration, which was negligible during the initial stage, became successively higher and indicated the highest value at 19 days just after the dry cell weight had reached a maximum value. The ethanol con-

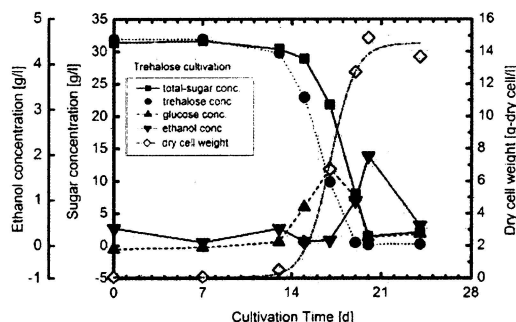


Fig. 4 Time courses of sugar concentration, ethanol concentration, and dry cell weight during trehalose cultivation

centration then rapidly decreased with a slight decrease in the dry cell weight and was almost equal to zero during the final stage of cultivation. These results suggested that the sugar metabolism and ethanol production during cultivation could be continuously observed on the base of the spectra in the culture medium using the FT-IR/ATR method.

Sugar metabolic kinetics

We studied the sugar metabolic kinetics in the mono- and disaccharides by comparing with all sugar metabolic kinetics. However, the sugar uptake phenomena on galactose and maltose presented very different behaviors when compared to the other sugars used in this study. We first understood both phenomena and then made a comparison of each sugar's metabolic kinetics.

Galactose

We observed that the TBY-2 cell growth on galactose medium required a longer lag time period from the start of the cultivation to the sugar uptake phenomenon than that on the other carbon source medium. The lag time was about five times longer than the second longest lag time (=maltose medium) in Fig. 10. Furthermore, Fig. 5a and b show the micrographs of cultured TBY-2 cells in sucrose medium for 0 day and for 7 days, respectively. These cultured cells were homogeneously proliferating. Figure 6a and b show the micrographs of those in the galactose medium for 0 day and for 25 days, respectively. The TBY-2 cells in Fig. 6a had a homogeneous distribution the same as those in Fig. 5a. However, those in Fig. 6b formed a number of small aggregates.

Galactose inhibits the growth of roots, coleoptiles and pollen, and promotes leaf abscission. It is a poor carbohydrate source for cultured plant cells [24]. It is toxic to

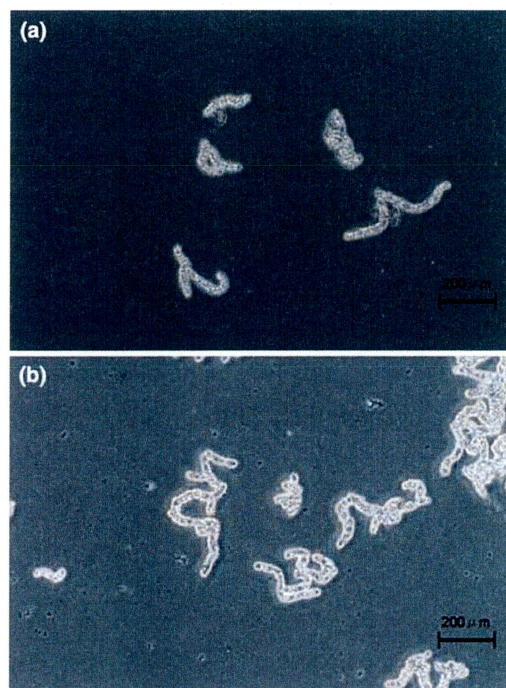


Fig. 5 Photograph of the TBY-2 cells in sucrose cultivation (a) for 0 day and (b) for 7 days

sugarcane cells, however, galactose-adapted cells that grow on 100 mM galactose have been propagated [25]. In sugarcane cultures, UDP-galactose 4-epimerase appears to be a key enzyme for the formation of glycolytic intermediates from galactose. The activity of UDP-galactose 4-epimerase in the cell walls of galactose-adapted cells is tenfold greater than that in the cell walls of the sucrose cultured cells. On the other hand, the strength of the intercellular contacts should depend on the cell wall structures, which include galactose in pectic polysaccharides [33]. The galactose content in the cell walls of the embryogenic callus of a carrot cell culture is lower than that in the cell walls of the non-embryogenic callus [26].

From these results, it was likely that the TBY-2 cells cultured on galactose medium for a long time period were roughly under similar conditions to the galactose-adapted sugarcane cells, and that UDP-galactose in the cell walls of the TBY-2 cells was transformed to glycolysis as the nutrition resource after it was transformed into UDP-glucose. The galactose content in the cell walls of the TBY-2 cells cultured on galactose medium would have decreased with cultivation. Therefore, it seems that a low galactose content causes strong intercellular contacts as shown in Fig. 6b.

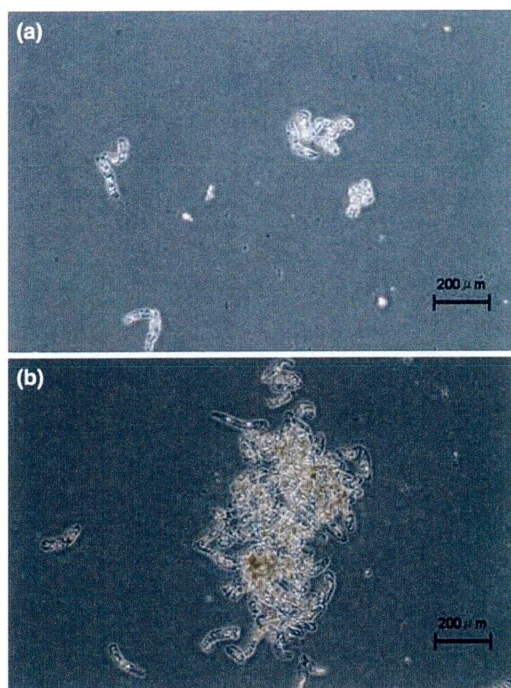


Fig. 6 Photograph of the TBY-2 cells in galactose cultivation (a) for 0 day and (b) for 25 days

We then examined the sugar uptake phenomena of the cultured cells in galactose medium that formed some aggregates. Furthermore, we studied the specific uptake rates of sugar, which is one of the most important indices characterizing the sugar metabolic kinetics of cells. We then determined the specific uptake rates after quantification of the sugar uptake rate and the cell density according to the method provided in our paper [14, 16, 28] as follows.

Experimentally and spectroscopically, a decrease in absorbance of the culture medium suggests that the suspension cells consumed sugar. In order to determine the sugar and ethanol concentrations in the MS medium using the parameters of the calibration curves shown in Table 2 [15], we showed the time courses for the sugar and ethanol concentrations and the dry cell weight in the culture media during cultivation as shown in Fig. 4. We applied the logistic functions expressed by Eq. (1), which could experimentally represent the time course of W_{sugar} very well [14, 16, 28, 31], to the fitting in order to compare the sugar metabolic kinetics in all the cultivations (Figs. 10, 11).

$$W_{\text{sugar}} = \frac{W_{\text{sugar,ini}} - W_{\text{sugar,fin}}}{1 - e^{-(t-t_0)/w_x}} + W_{\text{sugar,fin}} \quad (1)$$

Where, W (g/l) is the uptake amount of the sugar. The subscript sugar indicates the monosaccharide. t (d) is the cultivation time. The parameters t_0 and w_x , respectively, denote the inflection point of the time course and the time constant ticking its curve. Moreover the subscript ini and fin indicates the value at the initial and final stage, respectively. The calculated result lies below the linear plot. The sugar uptake rates were calculated by differentiating Eq. (1) with the cultivation time t .

We quantitatively examined the above time course data and their rates. The logistic function expressed by Eq. (1) was applied to the plots of the dry cell weight versus the cultivation time for the same purpose as the above-mentioned.

$$X = \frac{X_{\text{ini}} - X_{\text{fin}}}{1 - e^{-(t-t_0)/w_x}} + X_{\text{fin}} \quad (2)$$

This equation is mathematically the same function as Eq. (1) and X (g-dry cell/l) is the dry cell weight. The specific uptake rates were calculated by dividing the uptake rates by the dry cell weight predicted by Eq. (2).

Figure 7a shows the time courses of the specific uptake rates of sugar during the galactose cultivation. We performed the cultivation with galactose tentimes. The peak values of the specific uptake rates widely differed from one another. Every sample required a long lag period from the start of the cultivation to consuming sugar. These lag periods were abnormally long times. The longest lag period in this study was about 80 days.

Next, Fig. 7b might be expressed as the kinetic sugar uptake behavior denoting the variations in the cell growth process during cultivation. In order to discuss the kinetic sugar uptake phenomena while neglecting the cell growth behavior, we attempted to apply the non-dimensional cultivation time [14–16] expressed by $t_{\text{non},x} = (t - t_0)/w_x$ to the data displayed in Fig. 7a. The non-dimensional cultivation time can be calculated using the parameters t_0 and w_x , which respectively denote the inflection point of the time course of the cell density and the time constant ticking its curve, so that the relationship between the specific uptake rate and the non-dimensional cultivation time could signify the kinetic sugar uptake characteristics of each sugar cultivation based on the cell growth stage.

Figure 7b shows the influence of the specific uptake rate on the non-dimensional cultivation time. The horizontal axis $(t - t_0)/w_x$ is the non-dimensional cultivation time denoting for the cell growth behavior and was calculated using the parameters of the logistic function expressed by Eq. (2) fitting the time course of the cell density. We could compare the sugar metabolic kinetics with each of the galactose cultivation samples using the non-dimensional cultivation time.

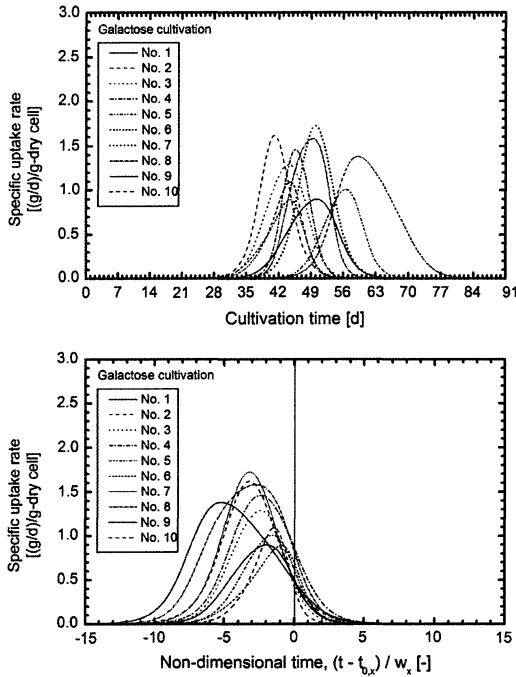


Fig. 7 Specific uptake rates. a Time courses of specific uptake rates of sugar during galactose cultivation; b non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during galactose cultivation

As shown in Fig. 7b, each peak value was almost uniform regarding the non-dimensional cultivation time, nevertheless, each peak in Fig. 7a varied in cultivation time. Additionally, in Fig. 7b, almost the $(t - t_0)/w_x$ values of the peaks of the specific uptake rate are below zero.

These results indicated the following. Although the time from the start of cultivation to the sugar uptake phenomena was very long and uneven, almost all of the sugar metabolic processes of the sugar uptake based on the cell growth stage did not change. Moreover, the cultured cells consumed sugar before their growth.

Maltose

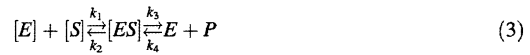
No maltose transporter has been identified and the importance of maltose export in vivo is poorly understood [3]. Though the absorbance decreased with little or no change in the spectral pattern during the maltose cultivation, the glucose concentration did not increase at all (Fig. 2b).

Cased on these results, several possibilities were considered for the sugar uptake phenomenon. For example, one possibility is to assume that the glucose uptake rate is significantly faster than the hydrolysis rate of maltose,

therefore, the glucose in the medium is not able to be observed. Another possibility is that since the maltose transporter exists in the apoplast, the maltose in the medium is imported from the extracellular to intracellular without hydrolysis.

In contrast, it has been previously reported that sucrose in the medium was hydrolyzed with glucose and fructose by enzymes such as invertase for the plant cells [13–16, 28, 31]. In this study, in order to understand the maltose uptake phenomenon, the enzymes in the maltose culture medium were assayed as compared with the ones in the sucrose culture medium.

The disaccharide like sucrose and trehalose is hydrolyzed into two monosaccharides in the medium by enzymes such as invertase. This enzyme reaction is expressed by the Michaelis–Menten equation as follows:



Here, $[E]$, $[S]$, $[ES]$ and $[P]$ are the concentrations of the enzyme, substrate, enzyme-substrate complex and product, respectively. k_1 , k_2 , k_3 and k_4 are the reaction rates.

$$v = \frac{v_{\max}[S]_0}{[S]_0 + K_m} \text{ where, } v_{\max} = k_3[E]_0 \quad (4)$$

Where, v is the reaction rate, and v_{\max} is the maximum reaction rate. K_m is the Michaelis constant. $[E]_0$ and $[S]_0$ are the initial enzyme and substrate concentrations, respectively. The rate equation of $[P]$ is given as follows:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] - k_4[E][P] \quad (5)$$

where, t is the reaction time. The product is hydrolyzed to a substrate by the enzyme. The relationship between $[P]$ and $[S]$ is expressed by $[P] = [S]_0 - [S]$.

When the reaction is under steady state conditions, the following equation is expressed by Eq. (6).

Where,

$$\begin{aligned} X &= \frac{k_1 - k_4}{(k_1k_3 + k_2k_4)[E]_0}, \\ Y &= \frac{(k_2 + k_3)(k_1k_4[S]_0 + k_1k_3 + k_2k_4)}{(k_1k_3 + k_2k_4)^2}, \\ Z &= \frac{k_2k_4}{k_1k_3 + k_2k_4}[S]_0 \\ t &= X([S]_0 - [S]) - Y \ln \frac{[S] - Z}{[S]_0 - Z} \quad (6) \end{aligned}$$

Rearranging Eq. (6), we get the following equation.

$$t = X([S]_0 - [S]) - Y \ln \{1 - Z'([S]_0 - [S])\} \quad (7)$$

where

$$Z' = \frac{1}{[S]_0 - Z}, \quad \text{at } t \rightarrow \infty : Z' < \frac{1}{[S]_0}$$

The initial velocity of the reaction, v_0 is defined by Eq. (7) as follows;

$$v_0 = \left(\frac{d[S]}{dt} \right)_{t=0} = \frac{1}{X + YZ'} \quad (8)$$

Fig. 8a shows the time courses for the sucrose uptake rate, sucrose concentration and dry cell weight during the sucrose cultivation. Moreover, for the enzyme assay, Fig. 8b displays the time courses of the substrate consumption in the sucrose culture media filtered at 3, 6 and 10 days during incubation. The substrate consumption increased during the incubation in all the three of the filtered culture media. As shown in Fig. 8a, since the sucrose hardly remained in the culture medium at 10 days, the sucrose uptake rate was almost zero. However, this medium had the greatest potential for the hydrolysis of sucrose among of the three culture media in Fig. 8b. These experimental results reconfirmed that the enzyme by which sucrose in the culture medium was hydrolyzed to glucose and fructose was released into the culture medium by the TBY-2 cells.

On the other hand, Fig. 9a shows the time courses for the maltose uptake rate, maltose concentration and dry cell weight. Moreover, in the enzyme assay, Fig. 9b displays the time courses of the substrate consumption in the maltose culture media filtered at 14, 19 and 28 days during incubation. These enzymatic activities were very low. We

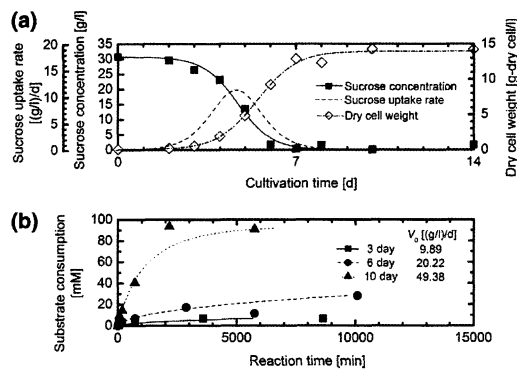


Fig. 8 Enzyme assay (sucrose). **a** Time courses of sucrose uptake rate, sucrose concentration and dry cell weight during sucrose cultivation; **b** time courses of substrate consumption in the sucrose culture medium filtered during incubation

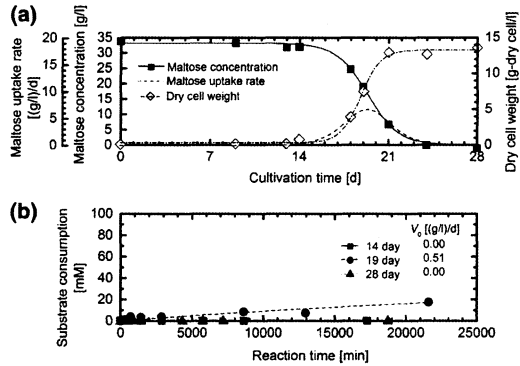


Fig. 9 Enzyme assay (maltose). **a** Time courses of maltose uptake rate, maltose concentration and dry cell weight during maltose cultivation; **b** time courses of substrate consumption in the maltose culture medium filtered during incubation

had confirmed that invertase (EC 3.2.1.26) and maltase (EC 3.2.1.20) hydrolyzed disaccharide in the culture media to a monosaccharide under the conditions listed in Table 1 (data not shown).

Table 3 shows the initial velocity v_0 of the enzyme assays and the disaccharide uptake rate during cultivation using the sucrose and maltose culture media. In the sucrose culture media, the values of v_0 were higher than the sucrose uptake rate. In particular, although the sucrose uptake rate at 10 days was about zero, the value of v_0 was the highest at that time. In the maltose culture media, the values of v_0 were lower than the maltose uptake rate. Furthermore, these values of v_0 were about zero. This result suggested that almost all of the maltose in the culture medium was not hydrolyzed to glucose, but probably imported to the intracellular by the maltose transporter, directly. Therefore, based on the assumption that the suspension cells consume

Table 3 Initial velocity (v_0) of the enzyme assays and disaccharide uptake rate during cultivation using the sucrose and maltose culture media

Kind of cultivation	Cultivation period (days)	Initial velocity v_0 [(g/l)/day]	Disaccharide uptake rate (during cultivation) [(g/l)/day]
Sucrose cultivation	3	9.89	3.10
	6	20.22	5.06
	10	49.38	0.02
Maltose cultivation	14	0.00	0.50
	19	0.51	5.12
	28	0.00	0.06

maltose without hydrolysis, we calculated the specific uptake rates of maltose in this study.

Comparison of each sugar metabolic kinetics

Figure 10 shows the time courses of the specific uptake rate of sugar during the cultivation. The kinetic behavior of the sugar uptake in the culture is dependent on the type of sugar used. Each peak time of the specific uptake rates as shown in Fig. 10 differed from each carbon source. However, these cultivation conditions in this study could be classified into the early and later groups. The early peak time group with the specific uptake rate consisted of the sucrose (5 days), fructose (6 days) and glucose (9 days) cultivation. These sugars are usually used as the carbon source by plant cells. The later group consisted of mannose (13 days), trehalose (15 days), maltose (16 days) and galactose (50 days, Fig. 7a, sample No. 7) cultivation. In particular, the peak time of the specific uptake rate for the galactose cultivation was about three times later than that for the maltose cultivation.

Sucrose and trehalose as disaccharides were consumed by the TBY-2 cells after hydrolysis of the monosaccharide. On the one hand, the peak time of the specific uptake rate for the sucrose cultivation was earlier than that for both the glucose and fructose cultivations. On the other hand, the peak time of the specific uptake rate for the trehalose cultivation was later than that for the glucose cultivation. Additionally, in the case when glucose and fructose were both present in the culture medium, namely, the sucrose cultivation, glucose was primarily utilized then followed by fructose. However, the peak time of the specific uptake rate for the fructose cultivation was earlier than that for the glucose cultivation.

Figure 11 shows the influence of the specific uptake rate on the non-dimensional cultivation time. The horizontal axis $(t - t_0)/w_x$ in Fig. 11 is the non-dimensional cultivation time as well as that in Fig. 7b. We compared the sugar metabolic kinetics with each of the sugar cultivation conditions using the non-dimensional cultivation time. Each $(t - t_0)/w_x$ value for the peak was below zero. This indicated the cultured cells consumed sugar before their growth without being related to the types of sugars in the medium. We reported that this characteristic in the sucrose, glucose and fructose cultivation was supposed to be that of the TBY-2 cells [15]. In particular, these values for the maltose and galactose cultivation were more negative than that of the other sugar cultivations. These results indicated that the time from the start of sugar uptake phenomenon to cell growth on the maltose and galactose cultivation was longer than that on the other sugar cultivations.

Conclusions

The influences of the difference in the molecular structures of the monosaccharides and kinds of glucose links in the disaccharides on the kinetic sugar uptake phenomenon were studied by the FT-IR/ATR method and enzyme assay.

In the monosaccharide, mannose [21–23] and galactose [24, 25] which are known to be toxic to plant growth, were consumed by the TBY-2 cells in this study. In general, TBY-2 cells are known to homogeneously proliferate. However, for only the galactose cultivation, each cell formed a number of small aggregates with proliferation. Furthermore, we observed that the cell growth on the galactose medium required a longer lag time period from the start of the cultivation to the sugar uptake phenomenon than that on the other carbon source media.

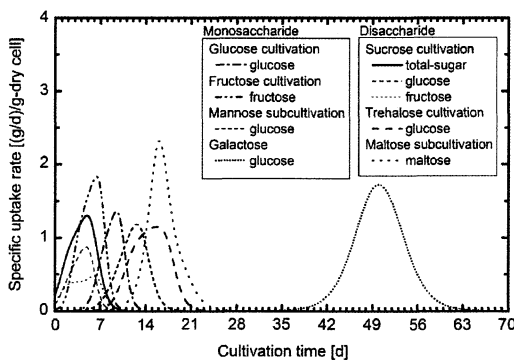


Fig. 10 Time courses of specific uptake rates of sugar during monosaccharide and disaccharide cultivation

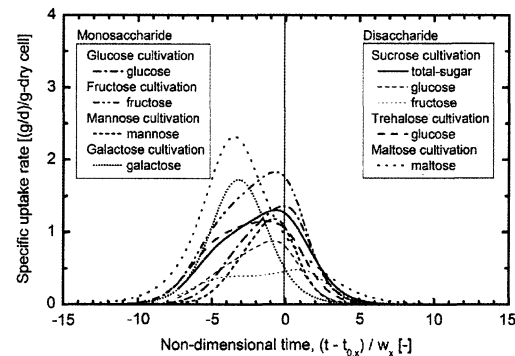


Fig. 11 Non-dimensional time courses of specific uptake rates of sugar during monosaccharide and disaccharide cultivation

In the disaccharide, sucrose and trehalose were consumed with hydrolysis of the monosaccharide, such as glucose and fructose, by TBY-2 cells. However, maltose would be consumed without the hydrolysis of glucose, but imported to the intracellular by a maltose transporter. Therefore, we calculated the specific uptake rates based on the assumption that the suspended cells consume maltose without hydrolysis. Additionally, the TBY-2 cells cannot consume lactose.

Based on these results, the specific uptake rates of sugar by the suspended plant cells can easily and continuously be obtained by applying the logistic function to the predicted sugar concentrations and dry cell weight in the media during cultivation. Accordingly, we suggested the importance of understanding the influence of the monosaccharide and disaccharide species in the culture media on the kinetic sugar uptake phenomena. The order of the peak time of the specific uptake rate was sucrose (5 days), fructose (6 days), glucose (9 days), mannose (13 days), trehalose (15 days), maltose (16 days) and galactose (50 days) cultivation. As a result, the lag time from the start of the cultivation to consuming sugar was different from that for one other cultivation. In particular, the peak time for the galactose cultivation was about three times longer than that for the maltose cultivation. However, based on the non-dimensional cultivation time for the cell growth behavior, we found common characteristics in all the sugar types of cultivation; the TBY-2 cells consumed sugar before cell growth and then the ethanol concentration in the culture media increased just after cell growth. Additionally, for the maltose and galactose cultivation, it was suggested that the time from the start of the sugar uptake phenomena to cell growth was longer than that for the other sugar cultivation.

Acknowledgments The authors would like to thank Prof. Junji Yamaguchi, Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Japan, for the valuable discussion.

References

- Mohr H, Schophfer P (1998) Plant physiology. In: Amino S, Komamine A (eds) Springer, Tokyo, pp 117–259 (in Japanese)
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J* 11(13):4705–4713
- Niittyla T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303(2):87–89
- Harrick NJ (1967) Internal reflection spectroscopy. Review and supplement. Harrick Scientific Corporation, New York
- Mirabella FM, Harrick NJ (1985) Internal reflection spectroscopy. Review and supplement. Harrick Scientific Corporation, New York
- Bellon V, Vallat C, Goffinet D (1995) Quantitative analysis of individual sugars during starch hydrolysis by FT-IR/ATR spectroscopy. Part I: multivariate calibration study repeatability and reproducibility. *Appl Spectrosc* 49:556–562
- McQueen DH, Wilson R, Kinnunen A, Jensen EP (1995) Comparison of two infrared spectroscopic methods for cheese analysis. *Talanta* 42:2007–2015
- Kemsley EK, Holland JK, Defemez M, Wilson RH (1996) Detection of adulteration of raspberry purees using infrared spectroscopy and chemometrics. *J Agric Food Chem* 44:3864–3870
- Van de Voort FR (1992) Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res Int* 25:397–403
- Kameoka T, Okuda T, Hashimoto A, Noro A, Shiinoki Y, Ito K (1998) FT-IR analysis of sugars in aqueous solutions using ATR method. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 45:192–198
- Kameoka T, Okuda T, Hashimoto A, Noro A, Shiinoki Y, Ito K (1998) A rapid FT-IR/ATR method for sugar content determination in food. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 45:199–204
- Kanou M, Nakanishi K, Hashimoto A, Kameoka T (2003) Infrared spectroscopic analysis of disaccharides in aqueous solutions. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 50:57–62
- Hashimoto A, Kameoka T (2000) Mid-infrared spectroscopic determination of sugar contents in plant-cell culture media using an ATR method. *Appl Spectrosc* 54:1005–1011
- Hashimoto A, Yamanaka A, Kanou M, Nahar F, Kameoka T (2003) Effect of pre-cultivation on sugar metabolic kinetics of suspension plant cells measured by Mid-infrared spectroscopy. *J Food Agric Environ* 1(2):168–175
- Hashimoto A, Yamanaka A, Kanou M, Nakanishi K, Kameoka T (2005) Simple and rapid determination of metabolite content in plant cell culture medium using an FT-IR/ATR method. *Bioprocess Biosyst Eng* 27(2):115–123
- Yamanaka A, Hashimoto A, Kanou M, Kameoka T (2005) MIR spectroscopic analysis on sugar metabolic and ethanol productive kinetics of suspension TBY-2 and rice cells pre-cultured in various media. *Bioprocess Biosyst Eng* 27(2):125–133
- Kanou M, Nakanishi K, Hashimoto A, Kameoka T (2005) Influences of monosaccharides and its glycosidic linkage on infrared spectral characteristics of disaccharides in aqueous solutions. *Appl Spectrosc* 59:885–892
- Ziegler H (1975) Zimmermann MH, Milburn JA (eds) In encyclopedia of plant physiology, new series vol. 1. Springer, Berlin, pp 59
- Lu Y, Sharkey TD (2004) The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* 218:466–473
- Servaites JC, Geiger DR (2002) Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport. *J Experimen Bot* 53:1581–1591
- Herold A, Lewis DH, Walker DA (1976) Sequestration of cytoplasmic orthophosphate by mannose and its differential effect on photosynthetic starch synthesis in C3 and C4 species. *New Phytol* 76:397–407
- SheuHwa CS, Lewis DH, Walker DA (1975) Stimulation of photosynthetic starch formation by sequestration of cytoplasmic orthophosphate. *New Phytol* 74:383–392
- Dormann P, Benning C (1998) The role of UDPglucose epimerase in carbohydrate metabolism of *Arabidopsis*. *Plant J* 13(5):641–652
- Loughman BC, Ratcliffe RG, Schwabe JWR (1989) Galactose metabolism in zea mays root tissues observed by ³¹P NMR spectroscopy. *Plant Sci* 59:11–23
- Maretzki A, Thom M (1978) Characteristics of a galactose adapted sugarcane cell line grown in suspension culture. *Plant Physiol* 61:544–548
- Kikuchi A, Satoh S, Nakamura N, Fujii T (1995) Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. *Plant cell Rep* 14:279–284
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497

学術論文 “Analysis of kinetic uptake phenomena of monosaccharide and disaccharide by suspension TBY-2 cells using an FT-IRATR method.”

28. Hashimoto A, Nakanishi K, Motonaga Y, Kameoka T (2001) Sugar metabolic analysis of suspensions of plant cells using an FT-IR/ATR method. *Biotechnol Prog* 17:560–564
29. Masuda H, Takahashi T, Sugawara S (1988) Acid and alkaline invertases in suspension cultures of sugar beet cells. *Plant Physiol* 86:312–317
30. Matsusaka K, Chiba S, Shimomura T (1977) Purification and substrate specificity of brewer's yeast α -glucosidase. *Agric Biol Chem* 41(10):1917–1923
31. Hashimoto A, Nakanishi K, Yamanaka A, Nahar F, Motonaga Y, Kameoka T (2002) Mid-infrared spectroscopic analysis of sugar metabolism by rice cells suspending in culture medium. *IFAC computer applications in biotechnology 2001*. Elsevier, Oxford, pp 379–384
32. Cael J, Koenig J, Blackwell J (1974) Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates Part IV. *Carbohydr Res* 32:79–91
33. Goldberg R, Morvan C, Hervé du Penhoat C, Michon V (1989) Structure and properties of acidic polysaccharides from mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol* 30(2):163–173

謝辞

本研究は、三重大学大学院生物資源学研究科生物資源開発科学専攻資源生物育成学講座生物情報工学研究室において、亀岡孝治教授（現・循環生物学専攻食・環境・文化情報学研究室）、橋本篤教授の多大なるご指導の下に遂行されたものである。両先生方には、本研究における様々な問題点の指摘や解析方法、考察に至るまで貴重なご指導を賜り、本研究の方向性と軌道修正をして頂くとともに、最終的な論文構成にもご助言を受け賜った。亀岡教授には卒業論文、修士論文のご指導に始まり、筆者が就職後、不況に伴い進路に暗雲が立ち込めた際にも、三重大学大学院博士後期課程への進学を後押しして下さいました。後期課程2年からは、同大学理事・副学長職、さらに現職と移られたが、変わらぬご支援を賜り、また、本論文審査にも副査としてもご協力していただいた。橋本教授にも、卒業論文から博士論文まで全般にわたって、研究者の有るべき姿、研究の進め方などの様々な面でご助言、ご指導頂いた。筆者は、博士課程前期課程修了後、一旦就職したが、不況により退職後、後期課程への進学した。その後、再就職に伴って2年の休学を挟み、復学後に本論文を執筆した。とくに、再就職後は連絡がとりづらい環境になったが、橋本教授の変わらぬご支援を賜ることで、本論文を最後まで執筆することができた。本研究のテーマも橋本教授から頂いたものであり、このテーマに取り組めたことは筆者にとって非常に幸いであった。

三重大学知的財産統括室の狩野幹人助教は、生物情報工学研究室の良き先輩であり、研究室配属から今日に至るまで、公私ともお付き合い頂いた。また、数多くの貴重なご助言も頂いた。

筆者が再就職後、本研究室に赴任された末原憲一郎准教授にも様々なご配慮を賜るとともに、貴重なご助言も頂いた。また、本論文の審査にも副査としてご協力していただいた。

三重大学大学院生物資源学研究科資源循環学専攻森林生物循環学研究室の中西健一准教授には、修士論文をまとめるにあたり貴重なご意見、ご助言を頂い

たが、とくに本論文の2章の解析面で大きく寄与した。

自然科学研究機構基礎生物学研究所高次細胞機構研究部門の西村幹夫教授にはタバコ BY-2 細胞をご提供頂いた。

北海道大学大学院先端生命科学研究院の山口淳二教授には、前職の名古屋大学生物分子応答研究センター時代にイネ細胞をご提供いただき、また、本論文の研究遂行に当たっても、さまざまなご助言を頂いた。さらに、本論文の審査にも副査として加わって頂いた。

本論文の2～4章で、松尾知美氏の卒業・修士論文の研究として、2, 3章で田邊敬子氏、3章で梅田優子氏の卒業論文の研究として実験にご協力頂いた。その他、生物情報工学研究室に在籍していた卒業生および在学生諸君にも、様々な協力をして頂き、また、多くのイベントにも招待を受け、一時の安らぎの場を提供して頂いた。

本論文の公開発表会に当たって、三重大学大学院生物資源学研究科佐藤邦夫教授（生物資源開発科学専攻主任）にお世話になった。また、久松眞教授には、本論文の閲読をお願いし、審査員の副査として貴重なご批評を受け賜った。

このように、本論文に関する研究および審査に当たって諸先生方をはじめ、さまざまな方のお世話になったが、研究活動を遂行していく上で、生活面においても多数の方からご支援を頂いた。以下に記して感謝の意を表したい。

三重大学医学部第二内科（現・同大学大学院医学系研究科腫瘍・免疫内科）の珠玖洋教授（当時）には、博士後期課程在学中に同学部の技術補佐員として採用していただき、経済的に扶助した頂いたことはもちろん、免疫学の基礎、動物細胞や実験動物の扱いなどの手技等を教えていただいた。さらに、同科の先生・学生方には、他学部出身で、かつ免疫学の素人である筆者に常日頃温かく接していただいた。本研究とは直接的な関わりはなかったが、それゆえ、自らの研究を客観的に見つめなおす貴重な機会になったと感謝している。さらに、同学部での経験がきっかけで、現職のピアス株式会社にて在学中にもかかわらず中途入社することができた。同社では、半ば諦めかけていた在学の継続を認めていただき、研究活動を完遂することができた。本論文の執筆に当たって濱田和彦中央研究所長をはじめ、古賀勉研究二部長、石塚一広主査、ならびに研究員の

皆様には、さまざまなご配慮を賜った。多くのご心配、ご迷惑をおかけしたが、この経験を生かして、これからはより一層、同社の発展に尽力していきたい。

博士後期課程1年より約2年間、日本学生支援機構から奨学金の貸与を受けた。さらに、後期課程2年より再就職するまでの1年半の間、財団法人中董奨学会より奨学生として採用して頂き、奨学給付金を賜った。これら奨学金による経済的支援は、医学部での給与とともに金銭的な不安を取り除くことに役立つ、非常に有難かった。これらの関係者の皆様には深く謝したい。

印刷業界に勤める筆者の叔父には、本論文の印刷および製本の依頼を快く引き受けていただき、大いに助かった。

また、来月より夫婦となる婚約者・加奈江と神谷家のご家族には、本論文の本格的な執筆作業および審査日程が、結納、結婚式の準備期間に重複してしまったため、日程の大幅な変更を招くことになり、その準備にも多大なご負担、ご迷惑をおかけしてしまった。ここに深くお詫びするとともに、本論文の執筆作業が完遂されるまで応援して頂き、絶大なるご支援を賜ったことを深謝したい。

最後に、末筆ながら本論文の執筆作業に影ながら常に応援して頂き、また、ご心配、ご迷惑をおかけしたが、長期にわたる学生生活を継続していく上で、全般にわたって支え続けていただいた両親はじめ家族の皆様にも深謝したい。

以上のように、本論文は非常に多くの方々のご支援によって遂行されたものである。関係者の皆様には、ここに記して、謝意を表し、深く感謝申し上げる次第である。

平成21年9月 記