

論文の内容の要旨

生物・環境工学専攻
平成 24 年度博士課程進学
藤内直道
指導教員 富士原和宏

一過性遺伝子発現法を用いた植物利用型有用タンパク質生産における 環境調節のための基礎的研究

1. 緒言

遺伝子組換えアグロバクテリウムを植物体地上部に後天的に感染させて有用タンパク質を生産させる一過性遺伝子発現法の 1 つである **magnifection** 法は、迅速、大量、かつ安価に生産されることが求められる種々の有用タンパク質生産に適するとされる。**magnifection** 法により大量かつ安価に有用タンパク質を生産するには、面積あたりの植物収穫物生体重と収穫物生体重あたりの有用タンパク質量を両立するように環境を好適に調節することが必要であると考えられる。そこで本論文では、環境要素が **magnifection** 法における有用タンパク質生産量に及ぼす影響を調べることを目的とした。

他方、一般に **magnifection** 法では植物体地上部にアグロバクテリウム導入を行う（植物体法）が、一過性遺伝子発現法において、植物体から一部の葉を切離して、その切離葉に遺伝子組換えアグロバクテリウム導入を行い、切離葉内で有用タンパク質生産を行う方法（切離葉法）が提案されている。切離葉法は様々な利点を有しており、有用タンパク質生産の大規模化に適しているといえる。切離葉法では、植物体法とは異なる工程が必要とされる。切離葉法に特有の工程における切離葉の生理状態および成長または環境要素の詳細は明らかではなく、またそれらが切離葉内に蓄積される有用タンパク質量に及ぼす影響も明らかではない。そこで次に、切離葉法における工程の改良を試み、さらに環境要素が切離葉法の有用タンパク質生産量に及ぼす影響を調べた。

2. 植物体法におけるヘマグルチニン生産に液肥中硝酸濃度が及ぼす影響

遺伝子組換え植物細胞培養培地中の硝酸濃度を高めることで、有用タンパク質量を大幅に高められることが報告されている。このような有用タンパク質量増大効果は、**magnifection** 法においても、高硝酸濃度の液肥を植物根圏に施用することで得られると考えた。そこで、高硝酸濃度液肥施用によって有用タンパク質量をたかめることができるかを調べた。硝酸濃度を 12 (N12)、36 (N36)、または 60 (N60) mmol L⁻¹ とした液肥を施用して栽培したベンサミアナタバコにアグロバクテリウム導入を行った。それらをその後 1 週間培養した。

N60 の生体重あたりの HA 量は、他の試験区のそれらと比較して有意に大きかった。ま

た、N60の生体重あたりの可溶性還元態窒素量は、他の試験区のそれと比較して有意に大きかった。N60の生体重あたりの可溶性タンパク質体窒素量は他の試験区のそれと比較して大きい傾向にあった。これらの結果から、高硝酸濃度液肥施用によって生体重あたりの可溶性還元態窒素量が増大し、それに伴って生体重あたりの可溶性タンパク質態窒素量および生体重あたりのHA量が増大したことが示唆された。

N60のアグロバクテリウム導入前および培養終了時の植物体あたりの葉生体重は、N12のそれらと比較して有意に小さかった。N60で施用した液肥の溶質濃度はN12で施用した液肥のそれと比較して約3倍であったことから、N60では浸透圧ストレスによって葉成長が抑制された可能性があるかと推察する。

植物体あたりのHA量では試験区間に有意な差が認められなかった。このことからN60では、植物体あたりのHA量の点ではN12およびN36と同程度であるが、生体重あたりのHA量の点では大きかったことになる。N60液肥施用によって、生体重あたりのHA量が大きくなることで、HAの抽出・精製工程に要するコストが減少することが期待される。

3. 植物体法におけるヘマグルチニン生産に栽植密度が及ぼす影響

一般に、栽植密度が高いほど面積あたりの植物体地上部生体重は大きくなることが知られている。magnifaction法において植物体地上部生体重あたりの有用タンパク質量が栽植密度によらず同程度であるならば、高栽植密度で栽培した方が、低栽植密度で栽培した場合と比較して、面積あたりの有用タンパク質量は大きくなると考えられる。そこで、面積あたりの有用タンパク質量および植物収穫物生体重あたりの有用タンパク質量に栽植密度が及ぼす影響を調べた。ベンサミアナタバコをアグロバクテリウム導入前後に100または400 plants m⁻²の栽植密度で栽培した。

地上部全体を収穫する場合には、400 plants m⁻²での面積あたりの収穫物量は、100 plants m⁻²でのそれと比較して有意に大きかった。他方、400 plants m⁻²での収穫物生体重あたりのHA量は、100 plants m⁻²でのそれと比較して有意に小さかった。このことは、400 plants m⁻²では、HAがほとんど蓄積しない茎の生体重が収穫物生体重に占める割合が大きかったこと、生体重あたりのHA量が比較的大きい上位葉が収穫物に占める割合が小さかったこと、および最上位葉に近い葉位では葉生体重あたりのHA量が小さかったことに起因していた。地上部のうち葉のみ、または葉の中でも上位葉のみを収穫する場合にも、収穫物生体重あたりのHA量、および面積あたりのHA量のそれぞれについての栽植密度間での差の傾向は、地上部全体を収穫する場合と同様であった。

以上のように、面積あたりの収穫物生体重が大きいような高栽植密度であっても、面積あたりのHA量が低栽植密度と比較して大きくなるとは限らないことを示した。さらに、高栽植密度では、収穫物生体重あたりのHA量が小さいことで、HAの抽出・精製に要するコストの点で不利となる可能性があることが示された。

4. 切離葉法におけるヘマグルチニン生産にアグロバクテリウム懸濁液水除去処理が及ぼす影響

切離葉法では、アグロバクテリウム導入直後に葉内に浸潤した懸濁液中の水を蒸散によって除去する処理(水除去処理)後に、高湿度下で培養するという2つのステップの工程

が必要とされる。水除去処理において、水を十分に蒸散させることが切離葉法での有用タンパク質生産にとって重要であるとされているが、その効果は明らかではない。そこで、水除去処理の終了時における、切離葉内に残存するアグロバクテリウム懸濁液量（残存液量）が切離葉培養後の有用タンパク質量に及ぼす影響を調べた。残存液量の指標として、アグロバクテリウム導入前の切離葉生体重に対する水除去処理終了時の切離葉生体重の比（以後、処理後相対生体重）を用いた。処理後相対生体重を異なるものとした複数の切離葉の、培養終了時の有用タンパク質量を調べた。

切離葉の生体重あたりの HA 量は、処理後相対生体重が大きいほど小さかった。切離葉の生体重増大率は処理後相対生体重に依存しておらず、すべての切離葉で同程度であった。そのため、切離葉の葉あたりの HA 量は、生体重あたりの HA 量と同様に、処理後相対生体重が大きいほど小さかった。これらの結果から、水除去処理後に切離葉内に残存する懸濁液中の水が切離葉での HA 蓄積を抑制し、また、その抑制の程度は残存液量が大きいほど大きいことが明らかとなった。HA 量と異なり、生体重増大率および TSP 量は処理後相対生体重にかかわらずすべての切離葉で同程度であった。このことは、切離葉内に残存するアグロバクテリウム懸濁液中の水は HA 量にのみ影響を及ぼし、葉細胞の生理活性には影響を及ぼさないことを示唆している。

以上のように、切離葉法において生体重あたりおよび葉あたりで大きな HA 量を得るためには、アグロバクテリウム懸濁液中の水を切離葉から十分に蒸散させる必要があることを示した。

5. 切離葉法におけるヘマグルチニン生産に培養中の光合成有効光量子束密度が及ぼす影響

一般に光合成有効光量子束密度 (PPFD) が高いほど、葉の純光合成速度は大きくなる。同様に、切離葉法において、アグロバクテリウム導入および水除去処理後の培養中の PPFD を適切なレベルまで高めることで、切離葉の純光合成速度を大きくできれば、結果的に葉の成長が促進される可能性がある。そこで、切離葉の生体重あたりの有用タンパク質量および葉あたりの有用タンパク質量に培養中の PPFD が及ぼす影響を調べた。培養中の切離葉面における PPFD が 0 (P0)、50 (P50)、100 (P100)、または 500 (P500) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ である 4 試験区を設定した。

光照射区 (P50, P100, P500) では、生体重あたりの HA 量は同程度であった。光照射区の生体重あたりの HA 量は、暗黒区 (P0) と比較して大きい傾向にあり、P500 の生体重あたりの HA 量は、P0 のそれと比較して有意に大きかった。P50 の生体重増大率は、P0 のそれと比較して有意に大きかったものの、その他の試験区間では有意な差は認められなかった。そのため、生体重あたりの HA 量と同様に、光照射区では、葉あたりの HA 量は同程度であり、また、暗黒区のそれと比較して大きい傾向にあった。

光照射区では、PPFD が高いほど生体重増大率は小さい傾向にあった。一方、PPFD が高いほど積算 CO_2 同化量は大きく、乾物重増大率および乾物率も大きい傾向にあった。P500 では切離葉全体に斑点状の壊死が発生していることが目視で認められたことから、このような壊死が乾物率増大の要因の 1 つであると推察した。P100 では壊死は目視では確認できなかったことから、壊死以外にも乾物率増大の要因候補があると考えられる。

以上より、切離葉法において生体重あたりおよび葉あたりで大きな有用タンパク質量を得るためには、培養中の切離葉表面における PPF_D が $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上となるように切離葉に光照射を行う必要があるといえる。

6. 結語

液肥中硝酸濃度または栽植密度が magniffection 法における有用タンパク質生産量に影響を及ぼすことを示し、植物体あたりまたは栽培面積あたりの植物生体重を増大するような環境調節が必ずしも有用タンパク質生産量の増大に有効であるとは限らないことを示した。また切離葉法の水除去処理における適切な処理および培養中の PPF_D を示し、安定的に大きな有用タンパク質量を得るための切離葉法の確立に寄与する有用な知見を提供した。

以上のように、本研究により、magniffection 法における環境調節による有用タンパク質生産量増大に資する基礎的知見が得られた。