

博士論文

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

平成 27 年 9 月

東京大学 大学院農学生命科学研究科 生物・環境工学専攻

藤内 直道

目次

第1章 緒言.....	1
1. 本論文の背景および目的.....	2
2. 本論文の構成.....	7
3. 本論文で着目する要素.....	7
4. magniflection 法での有用タンパク質蓄積機構.....	9
第2章 植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現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.....	16
1. 序論.....	17
2. 材料および方法.....	18
2.1 供試植物および生育条件.....	18
2.2 遺伝子組換えアグロバクテリウム.....	19
2.3 遺伝子導入.....	20
2.4 遺伝子導入後の培養.....	20
2.5 ヘマグルチニンおよび各種窒素化合物の定量.....	21
2.6 植物体あたりのヘマグルチニン含量および葉乾物率の算出方法.....	22
2.7 統計処理.....	23
3. 結果および考察.....	23
4. 結論.....	26
第3章 植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現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.....	31
1. 序論.....	32
2. 材料および方法.....	33
2.1 供試植物および生育条件.....	33
2.2 遺伝子組換えアグロバクテリウム.....	34
2.3 遺伝子導入.....	34
2.4 遺伝子導入後の培養.....	35
2.5 葉位別の葉生体重および茎生体重測定.....	35
2.6 ヘマグルチニンの定量.....	36
2.7 単位栽培面積あたりの収穫物生体重、単位栽培面積あたりのヘマグルチニン量、 および収穫物の単位生体重あたりのヘマグルチニン含量の算出.....	36
2.8 統計処理.....	37
3. 結果および考察.....	37
3.1 単位栽培面積あたりのベンサミアナタバコ地上部乾物重に栽植密度が及ぼす影響.....	37
3.2 茎の単位生体重あたりのヘマグルチニン含量.....	38
3.3 葉生体重、茎生体重、および単位葉生体重あたりのヘマグルチニン含量の 葉位別分布に栽植密度が及ぼす影響.....	39
3.4 単位栽培面積あたりのヘマグルチニン量および収穫物の単位生体重あたりの ヘマグルチニン含量に栽植密度が及ぼす影響.....	40
4. 結論.....	43
第4章 切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現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.....	51
1. 序論.....	52

2. 材料および方法.....	54
2.1 供試植物および育成条件.....	54
2.2 遺伝子組換えアグロバクテリウム	54
2.3 切離葉の取得および遺伝子導入.....	54
2.4 水除去処理.....	55
2.5 水除去処理後の培養	55
2.6 ヘマグルチニン量および可溶性タンパク質量の定量.....	56
2.7 処理後相対生体重および葉あたりのヘマグルチニン含量算出	57
2.8 統計処理	57
3. 結果および考察.....	57
4. 結論	59
第5章 切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現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.....	63
1. 序論	64
2. 材料および方法.....	65
2.1 供試植物および育成条件.....	65
2.2 遺伝子組換えアグロバクテリウム	65
2.3 切離葉の取得および遺伝子導入.....	66
2.4 水除去処理.....	66
2.5 水除去処理後の培養	66
2.6 ヘマグルチニン量の定量.....	68
2.7 葉あたりのヘマグルチニン含量、培養後相対生体重、培養後相対乾物重、 および乾物率算出	68
2.8 統計処理	69
3. 結果および考察.....	69
4. 結論	70
第6章 結語.....	79
1. 本論文の総括.....	80
2. 今後の展開	82
要約.....	85
引用文献	91
参考ウェブサイト	101
謝辞.....	102

第1章

緒言

1. 本論文の背景および目的

植物細胞または植物体を利用してワクチン・抗体・酵素などの医療あるいは研究に有用なタンパク質を生産する植物利用型有用タンパク質生産法は、ヒト感染性病原体の混入リスクが小さく (Fischer and Emans, 2000; Mett et al., 2008)、また、動物細胞内で生産されるタンパク質に付加されるものに類似の糖鎖が有用タンパク質に付加される (Cabanes-Macheteau et al., 1999) という特長を有する。植物利用型有用タンパク質生産法は、遺伝子組換え植物細胞を培養する方法と、植物体を利用する方法の2つに大別できる。植物体を利用する方法は、遺伝子組換え *Nicotiana tabacum* を用いたヒト成長因子生産 (Barta et al., 1986) によって初めて示された。この方法は、植物利用型有用タンパク質生産法が有する前述の特長にくわえて、栽培面積を増大することで容易に生産量を増大でき (Paul and Ma 2011)、運転および維持費用の高い細胞培養装置を使用しないため安価に有用タンパク質を生産可能である (Desai et al., 2010) という特長を有する。このことから植物体を利用する植物利用型有用タンパク質生産法は、これまで有用タンパク質生産におもに用いられてきた鶏卵法や動物細胞培養法などに代わりうる方法として注目を集めている。

植物体を利用する植物利用型有用タンパク質生産法には、有用タンパク質の遺伝子を核や葉緑体のゲノムに有する安定形質転換体の作出を必要とする方法 (以後、遺伝子組換え植物法) および植物に後天的に有用タンパク質の遺伝子を導入する方法 (以後、一過性遺伝子発現法) がある。遺伝子組換え植物法は、一度安定形質転換体が作出されると遺伝子導入操作を必要としないため生産費用が小さいという特長を有する (Stoger et al., 2002) ものの、安定形質転換体の作出に数ヶ月から数年を要し (Hood et al., 2002)、単位葉生体重あたりの有用タンパク質含量は $100 \mu\text{g gFW}^{-1}$ 未満程度である (Fischer et al., 2003; Floss et al., 2007; Gaertner et al., 2008; Ma et al., 2003; Paul and Ma, 2011; Valdés et al., 2003)。これに対して一過性遺伝子発現法は、安定形質転換体の作出を必要としないため、有用タンパク質の遺伝子同定から生産までを数週間以内に完了可能である (D'Aoust et al., 2010) という特長を有する。それにくわえて近年では、導入遺伝子の改良 (Lindbo, 2007; Marillonnet et al., 2004; Marillonnet et al.,

2005; Musiychuk et al., 2007; Sudarshana et al., 2006) によって、数百から数千 $\mu\text{g gFW}^{-1}$ 程度の葉の単位生体重あたりで比較的大きな有用タンパク質含量を得ることが可能である。これらの特長から一過性遺伝子発現法は、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、例えば塩基配列が頻繁に変異する病原体による感染症用のワクチンや抗体などの生産に適する (Fischer et al., 2012; Wilken and Nikolov, 2012)。

一過性遺伝子発現法の中でも、有用タンパク質の遺伝子を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムを減圧浸潤法によって植物細胞間隙に導入する方法は、簡便、安価、かつ大規模に有用タンパク質の遺伝子を植物に導入できる方法である (Gleba et al., 2014)。この方法を用いた有用タンパク質の生産工程の概要は以下の通りである (Fig. 1)。4-6 週間栽培した植物体を上下反転させ、植物体地上部を遺伝子組換えアグロバクテリウムの懸濁液に浸す。これらを密閉容器内に入れて減圧した後に復圧することで、アグロバクテリウム懸濁液を植物細胞間隙内に浸潤させる (以後、遺伝子導入)。植物体を懸濁液から取り出し、約 1 週間栽培する。本論文では、遺伝子導入後の栽培のことを単に培養と呼ぶ。培養中に有用タンパク質の遺伝子が植物細胞内で発現し、有用タンパク質が細胞中に蓄積または細胞外に分泌される。有用タンパク質が蓄積した部分を収穫し、緩衝液と混合した後に破碎する。破碎液から有用タンパク質を抽出し精製する。この方法を用いて試験的に生産された鳥インフルエンザワクチン (D'Aoust et al., 2008; Shoji et al., 2013)、エボラウイルス抗体 (Qiu et al., 2014; Zeitlin et al., 2011) などが、現在では臨床試験に供されている (Gleba et al., 2014)。一過性遺伝子発現法の実用化への期待は大きく、いくつかの有用タンパク質の試験生産が米国国防高等研究計画局など政府機関の支援のもとで行われている (Preis, 2012; Wechsler, 2014)。

このようなアグロバクテリウムを利用する一過性遺伝子発現法の遺伝子導入前後における植物栽培および培養は、温室や人工光型植物栽培施設のような閉鎖型または半閉鎖型施設内で行われる。閉鎖型または半閉鎖型施設内で植物栽培および培養を行うことで、組換え遺伝子を封じ込めると同時に昆虫などの異物混入を防止することができる (Davies, 2010; Fischer et al., 2012) ばかりでなく、環境制御によって周年的かつ安定的に有用タンパク質を生産できる

(Davies, 2010; Fischer et al., 2012; Paul and Ma, 2011)。ここでの環境は、有用タンパク質生産に好適となるように調節されるべきである。植物体を利用する植物利用型有用タンパク質生産では、単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量にくわえて収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量が大きければ大きいほど好ましい。単位生体重あたりの有用タンパク質含量が大きいくほど、収穫した植物から有用タンパク質を抽出し精製する際に必要となる資材量などが小さくなり、有用タンパク質生産全体に要する費用の 50-80%を占める有用タンパク質の抽出・精製費用 (Buonaguro and Butler-Ransohoff, 2010; Roque et al., 2004) が小さくなる (Buyel and Fischer, 2012; Fischer et al., 2013; Tusé et al., 2014)。つまり、閉鎖型または半閉鎖型施設内で行われる一過性遺伝子発現法での植物栽培・培養環境は、単位生体重あたりの有用タンパク質含量と単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の両方、またはいずれか一方でも大きくなるように調節されることが望ましい。

有用タンパク質生産に好適な環境は、植物生産に好適な環境、例えば単位時間・単位栽培面積あたりの収穫物生体重が大きくなるような環境、とは異なる可能性が高い。ところが、有用タンパク質生産に好適な環境に調節する上で重要であると考えられる、個々の環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響に関する研究はほとんど見あたらない。遺伝子導入後の培養における気温または光合成有効光量子束密度 (以後、PPFD) に着目した数例の研究 (Buyel and Fischer, 2012; Matsuda et al., 2012) しかない。このため、有用タンパク質生産において環境調節を行うためには、まず、栽培中または培養中における個々の環境要素が単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量に及ぼす影響を調べ、有用タンパク質生産に好適な環境要素のレベルは植物生産に好適なそれとは異なるのかなどについての基礎的な知見を得ることが必要であると考えられる。

ところで、ここまで述べてきた従来の一過性遺伝子発現法は、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法である。これに対して近年では、実験室レベルではあるものの、植物体から一部の葉を切離して、その切離葉に減圧浸潤法によって遺伝子導入を行い、切離葉を高相対湿度条件で培養しながら切離葉内で遺伝子を発現させて有用タンパク質を蓄積させる方法 (Arzola et al., 2011; Joh et al.,

2005; Jung et al., 2014; Kingsbury and McDonald, 2014; McDonald et al., 2014; Plesha et al., 2007; Plesha, 2008; Plesha et al., 2009; Simmons et al., 2009) が試みられている。この方法を用いた実用レベルの有用タンパク質生産が可能となれば、いくつかの利点が生じる。この方法では、遺伝子導入時に植物体を支える培地がないことから上下反転操作は必要なく、また、収穫後の培地を滅菌し廃棄する必要もない。そればかりでなく、上位葉などの一部の葉を切離した後の植物を継続して栽培して脇芽を成長させることにより、次の有用タンパク質生産に用いる葉を生産するための母株として有効利用できる。植物体地上部に遺伝子導入を行う方法では、植物体を遺伝子導入に供するごとに新たに播種から栽培を行う必要があるため、期間あたりに有用タンパク質生産に利用できる葉は少なくなる。したがって、切離葉に遺伝子導入を行う方法では、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法と比較して単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量を大きくできる可能性がある。

切離葉に遺伝子導入を行う方法における遺伝子導入後の生産工程は、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法におけるそれとは異なる (Fig. 1)。減圧浸潤法による遺伝子導入操作直後に低相対湿度下に切離葉を数時間置くことで、葉細胞間隙に浸潤したアグロバクテリウム懸濁液の水を蒸散によって除去する処理 (以後、水除去処理) が必要との報告 (Plesha, 2008) がある。また水除去処理後の切離葉の培養は、多くの報告において内部気温を 20–21°C に保った上で遮光した加湿チャンバ内で行われている (Arzola et al., 2011; Jung et al., 2014; Kingsbury and McDonald, 2014; Plesha et al., 2007; Plesha, 2008; Plesha et al., 2009)。ところが、このような水除去処理および培養を行った場合でも、切離葉内の単位生体重あたりの有用タンパク質含量は植物体地上部に遺伝子導入を行う方法でのそれと比較して約半分であったとの報告 (Plesha et al., 2007) がある。このような、切離葉での単位生体重あたりで小さい有用タンパク質含量は、水除去処理のレベルまたは培養中の環境要素のレベルを有用タンパク質生産に好適であるように調節することで大きくなると考えられるものの、有用タンパク質生産に好適な水除去処理のレベルまたは培養環境要素のレベルは明らかではない。このため、水除去処理および培養中の個々の環境要素が単位生体重あたりの有用タンパク質含量に及ぼす影響を定量的に明らかにすることは、

切離葉に遺伝子導入を行う方法において有用タンパク質生産に好適な環境調節を行い、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法と比較して同程度の有用タンパク質含量を得るために、ひいては実用レベルの有用タンパク質生産技術の確立に必要であると考える。

以上のような背景から本論文では、植物利用型有用タンパク質生産法の1つである一過性遺伝子発現法において、有用タンパク質生産に好適な環境調節を行う上で重要な知見を得ることを目的とした4つの研究を行った。そのうち2つの研究は、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法において、個々の環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響を調べ、有用タンパク質生産に好適な環境要素のレベルは植物生産に好適なそれと異なるのかなどについて明らかにすることを目的としたものである。環境要素の中でも、遺伝子導入前の栽培における液肥中硝酸濃度および遺伝子導入前後の栽植密度に着目した。残りの2つの研究は、切離葉に遺伝子導入を行う方法において、水除去処理または培養中の環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響を調べ、有用タンパク質生産に好適な水除去処理のレベルおよび環境要素のレベルを明らかにすることを目的としたものである。水除去処理のレベルに関して、減圧浸潤法による遺伝子導入操作前の切離葉の生体重に対する遺伝子導入操作直後の水除去処理終了時のその比に着目し、これを指標として用いた。また、培養中の環境要素の中でも、明期中の光合成有効光量子束密度に着目した。これらの要素に着目した理由を本章第3節で簡単に述べる。

なお、本論文では一過性遺伝子発現法として *magniflection* 法 (Gleba et al., 2005) を用いた。*magniflection* 法は遺伝子組換えアグロバクテリウムを利用する方法の1つであり、アグロバクテリウムから植物細胞に導入される遺伝子を T-DNA 領域に有するプラスミドとして *magnICON*[®] (Icon Genetics, Halle (Saale), Germany; Gleba et al., 2005; Marillonnet et al., 2005) を用いる方法である。*magnICON* を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムを減圧浸潤によってタバコ属の一種である *Nicotiana benthamiana* (以後、ベンサミアナタバコ) に導入して培養することで、葉の単位生体重あたりで数百から数千 $\mu\text{g gFW}^{-1}$ 程度の比較的大きな有用タンパク質含量が得られる (Gils et al., 2005; Gleba et al., 2005; Huang et al., 2006; Huang et al., 2008; Marillonnet et al., 2005; Santi et al.,

2006)。この特長により、magnICON を用いた有用タンパク質生産は研究室規模から商業規模まで幅広く行われている (Gleba et al., 2014)。また、本論文ではモデルタンパク質として、H5N1 亜型インフルエンザに対するワクチンタンパク質であるヘマグルチニン (以後、HA) を生産した。magniffection 法での有用タンパク質蓄積機構を本章第 4 節で述べる。

2. 本論文の構成

本論文は 6 章から成り、第 1 章は緒言、第 2 章から第 5 章までは独立した 4 章であり、最後の第 6 章は結語である。第 2 章から第 5 章の各章でそれぞれ特定の要素に着目した理由については第 1 章では簡単に述べるに留め、詳しくはそれぞれの章の序論において述べる。

3. 本論文で着目する要素

第 2 章および第 3 章ではそれぞれ、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法の遺伝子導入前の栽培において根圏に施用する液肥の硝酸濃度、および遺伝子導入前後の栽培・培養における栽植密度に着目した。植物細胞培養法において液体培地中の硝酸濃度を高めることで有用タンパク質含量が大きくなったとの報告 (Häkkinen et al., 2013; Holland et al., 2010) があることから、一過性遺伝子発現法においても液肥中の硝酸濃度が収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量に影響を及ぼす可能性は高いと予想した。また、一過性遺伝子発現法において上位葉の単位生体重あたりまたは可溶性タンパク質量あたりの有用タンパク質含量は下位葉のそれと比較して大きい傾向があったとの報告 (Buyel and Fischer, 2012; Sheludko et al., 2007) があることから、葉位別葉生体重分布などの植物体の形態に影響を及ぼす栽植密度が収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量に影響を及ぼす可能性は高いと予想した。もし、これらの環境要素が単位生体重あたりの有用タンパク質含量に影響を及ぼすのであれば、単位生体重あたりの有用タンパク質含量と単位時間・単位栽培面積あたりの収穫物生体重の積である単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量

にも影響を及ぼす可能性が高い。以上のように、有用タンパク質生産において重要な量である単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の両方に影響を及ぼす可能性が高く重要性が高いと予想されたため、他の環境要素に優先してこれらの環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響を明らかにすることとした。

第2章では収穫物として葉を想定し、また、葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量に関する試験区間での差の傾向はどの葉位においても同様であると考えた。そこで、単位生体重あたりの有用タンパク質含量が比較的大きいと考えられる第7-9葉をまとめて磨砕した場合の単位生体重あたりの有用タンパク質含量を、植物体から収穫される葉全体の単位生体重あたりの有用タンパク質含量の代表値として評価した。また、栽植密度および生産周期が一定の条件下では単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量は植物体あたりの有用タンパク質含量に比例するため、そのような条件を仮定して単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の代わりに植物体あたりの有用タンパク質含量を推定して評価した。第3章では収穫物として葉または植物体地上部全体を想定し、それらの単位生体重あたりの有用タンパク質含量を算出して評価した。また、生産周期が一定の条件下では単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量は単位栽培面積あたりの有用タンパク質量に比例するため、単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の代わりに単位栽培面積あたりの有用タンパク質量を算出して評価した。

第4章および第5章ではそれぞれ、切離葉に遺伝子導入を行う方法における、減圧浸潤法による遺伝子導入前の切離葉の生体重に対する遺伝子導入操作直後の水除去処理終了時のその比（以後、処理後相対生体重）、および培養中の光合成有効光量子束密度に着目した。水除去処理では葉内に浸潤したアグロバクテリウム懸濁液の水が蒸散によって除去されるため、葉内に残存する懸濁液の水の量と高い相関を持つと考えられる処理後相対生体重は水除去処理のレベルの指標として適当であると考えた。他方、切離葉に遺伝子導入を行う方法に関する既往の研究のほとんど (Arzola et al., 2011; Jung et al., 2014; Kingsbury and McDonald, 2014; Plesha et al., 2007; Plesha, 2008; Plesha et al., 2009) では暗黒下で培養が行われているものの、切離葉の培養中の光環境が有用タンパク質

生産に及ぼす影響は不明である。もし、光照射が有用タンパク質生産に正の影響を及ぼすのであればその重要性は高いと考え、他の環境要素に優先して明期中の光合成有効光量子束密度が有用タンパク質生産に及ぼす影響を明らかにすることとした。

第4章および第5章では収穫物は切離葉であるため、切離葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量を評価した。また、遺伝子導入前の栽培から単位時間・単位栽培面積あたりで収穫される切離葉の生体重は一定であると想定し、単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の代わりに葉あたりの有用タンパク質含量を評価した。

4. magniffection法での有用タンパク質蓄積機構

本論文では一過性遺伝子発現法として magniffection 法を用いる。magniffection 法で用いるプラスミド magnICON は、植物ウイルス由来の遺伝子複製・細胞間移行タンパク質および有用タンパク質の遺伝子を T-DNA 領域に有する。本研究で用いる magnICON は、HA の遺伝子を有する。HA の遺伝子の 5'末端および 3'末端に、分泌シグナルペプチドの遺伝子および小胞体への返送シグナルペプチドの遺伝子がそれぞれ付加されていることで、細胞内で合成された HA は小胞体内に蓄積される。本論文で用いた magnICON のうち、アグロバクテリウムの機能によって植物核内に導入される T-DNA 領域の概略を Fig. 2 に示す。

上記のような HA の遺伝子を有する magnICON を用いて magniffection 法を行う場合の、葉内における HA 蓄積機構を以下に述べ、Fig. 3 に示す。まず、減圧浸潤法によって遺伝子組換えアグロバクテリウムが植物葉細胞間隙へ導入される。その後、アグロバクテリウムによる植物核内への T-DNA 導入、核内での T-DNA を鋳型とする mRNA 合成、およびリボソームなどによる RNA 依存性 RNA 複製酵素・細胞間移行タンパク質・HA 合成が連続して生じる。合成された HA 以外のタンパク質は細胞質に、HA は小胞体に入る。その後、細胞質内で RNA 依存性 RNA 複製酵素などによる mRNA 複製、細胞間移行タンパク質などによる mRNA 細胞間移行、HA の小胞体-シスゴルジ網間輸送および

シスゴルジ網-小胞体間返送などによって、小胞体に HA が蓄積されると同時に、mRNA が隣接細胞に移行し、隣接細胞内でも HA が蓄積させる。

また、植物利用型有用タンパク質生産法における magniffection 法の位置づけを Fig. 4 に示す。植物利用型有用タンパク質生産法は、以下の 3 つの方法に大別できる。有用タンパク質の遺伝子を核や葉緑体のゲノムに有する遺伝子組換え植物細胞を細胞培養装置で培養する方法、遺伝子組換え植物を種子から栽培する方法、および一過性遺伝子発現法である。一過性遺伝子発現法は、以下の 2 つの方法に大別できる。有用タンパク質の遺伝子を有する植物ウイルスそのものを植物に感染させる方法と、有用タンパク質の遺伝子を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムを利用して遺伝子を植物に導入する方法である。遺伝子組換えアグロバクテリウムを利用する方法は、以下の 2 つに大別できる。植物ウイルス由来のタンパク質の遺伝子を有さない遺伝子組換えアグロバクテリウムを利用する方法と、植物ウイルス由来のタンパク質の遺伝子を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムを利用することで植物ウイルス由来のタンパク質の機能によって細胞内で mRNA 複製が生じる方法である。magniffection 法は、植物ウイルスのタンパク質の遺伝子を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムを利用する方法に含まれる。

なお、一過性遺伝子発現法に関する多くの研究では、後天的に遺伝子を導入される植物としてタバコ属の植物、例えばベンサミアナタバコや *Nicotiana tabacum* が用いられることが多い。magniffection 法ではベンサミアナタバコが用いられる。ベンサミアナタバコは、植物病理学に関する研究で病原体の宿主植物として頻繁に用いられてきた (Goodin et al., 2008) ことで外来タンパク質生産に関する知見が他の植物と比較して比較的多い、植物ウイルス由来の遺伝子複製タンパク質の遺伝子の機能を阻害する遺伝子サイレンシングの発生頻度が低い (Yang et al., 2004) などの特長を有する。

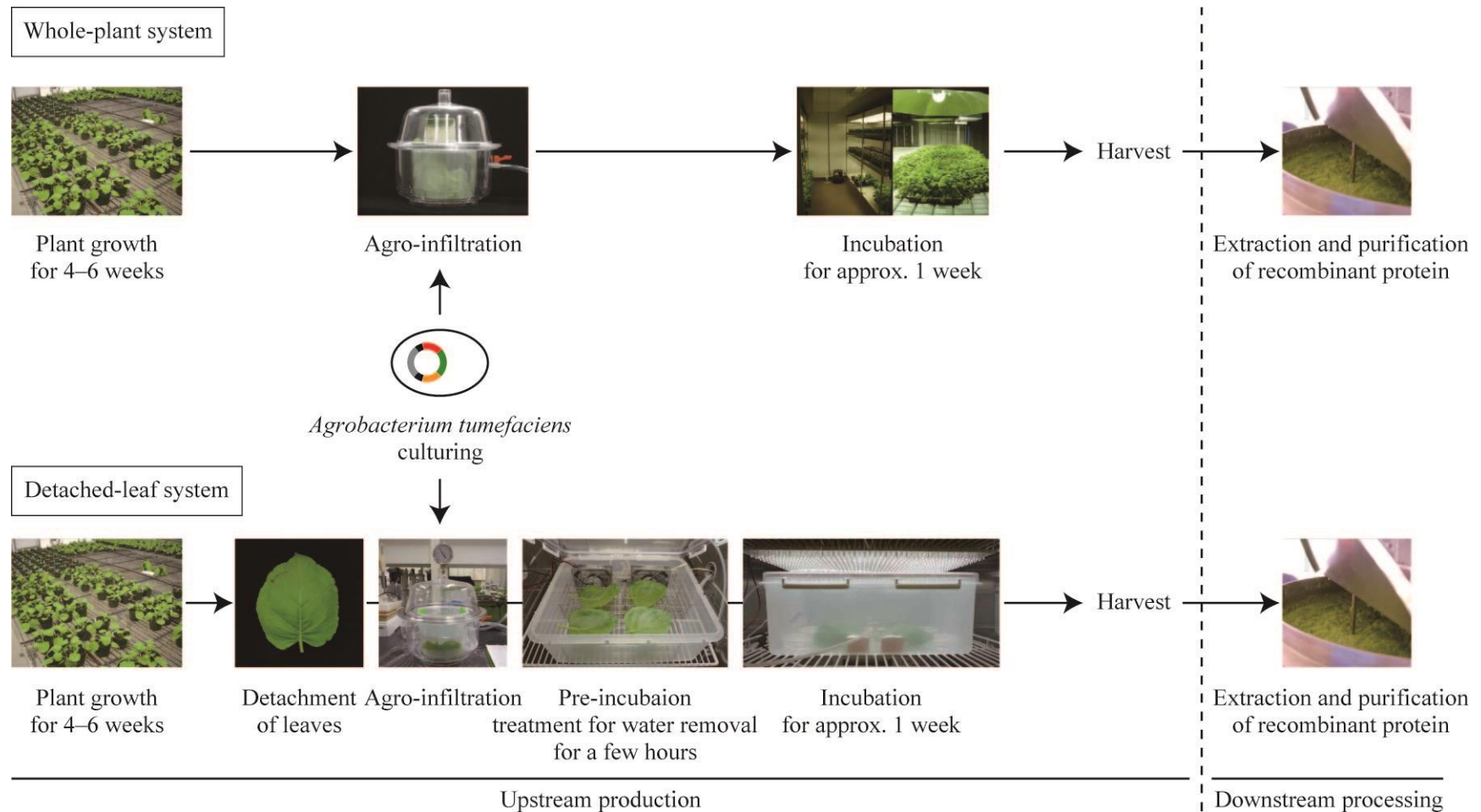


Fig. 1 Flow diagrams of processes for upstream production and downstream processing of recombinant protein in *Agrobacterium*-mediated transient expression system using whole plants or detached leaves at a laboratory scale.



Fig. 2 Construct map of magnICON: RB, right border; Act2, *Arabidopsis thaliana* actin2 promoter; RdRp, RNA-dependent RNA polymerase; MP, movement protein; ABP1-HA-HDEL, hemagglutinin with *Arabidopsis thaliana* auxin binding protein 1 and endoplasmic reticulum retention signal peptide; T, Nos terminator; LB, left border.

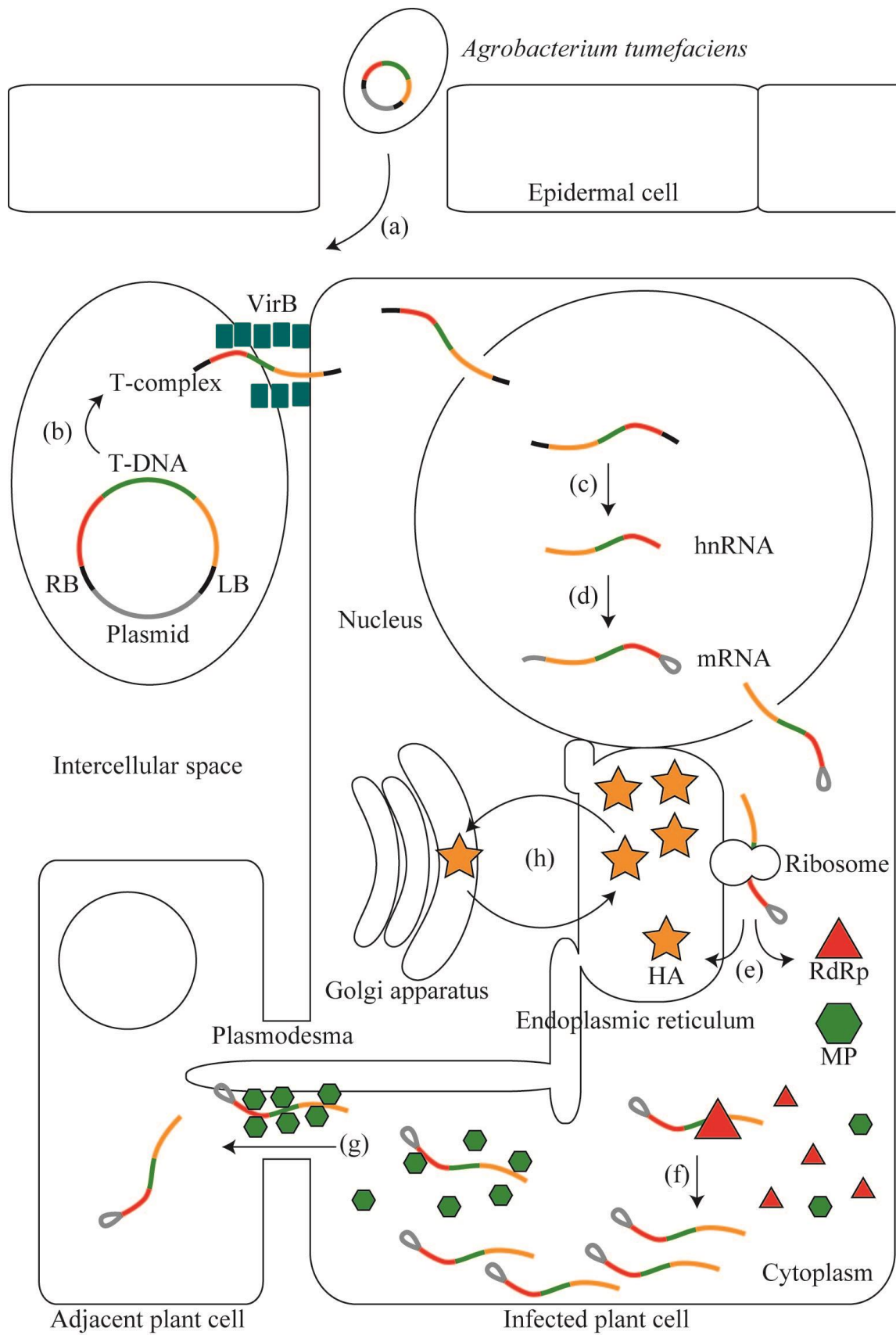


Fig. 3 Schematic diagram of a series of events in plant leaf after agro-infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* holding magnICON with endoplasmic reticulum retention signal peptides for the expression of hemagglutinin (HA). (a) Plant leaves are infiltrated with *A. tumefaciens* suspension. *A. tumefaciens* intrude into the intercellular space. (b) T-strand is generated at a T-DNA region of bacterial plasmid (magnICON). T-strand and bacterial proteins form T-complex that is supported to be transported into the host plant nucleus through a bridge of VirB protein (Tzfira and Citovsky, 2002). (c) T-DNA of T-complex is transcribed into heterogenous nucleus RNA (hnRNA). (d) hnRNA undergoes post-transcriptional modification to form mRNA. (e) mRNA is translated into RNA dependent RNA polymerase (RdRp), movement protein (MP) and HA. RdRp and MP, which have no binding protein, are secreted into cytoplasm, whereas HA, which has a binding protein and an endoplasmic reticulum (ER) retention signal peptide, is secreted into ER and is glycosylated. (f) RdRp amplifies mRNA. (g) MP and mRNA form MP-RNA complex, which is transported to the adjacent plant cell through a plasmodesma (Liu and Nelson, 2013; Lucas et al., 2009). (h) HA is transported temporarily from ER to the cis Golgi network (CGN). Because signal peptide on HA allows for retrieval from CGN, HA accumulates inside ER.

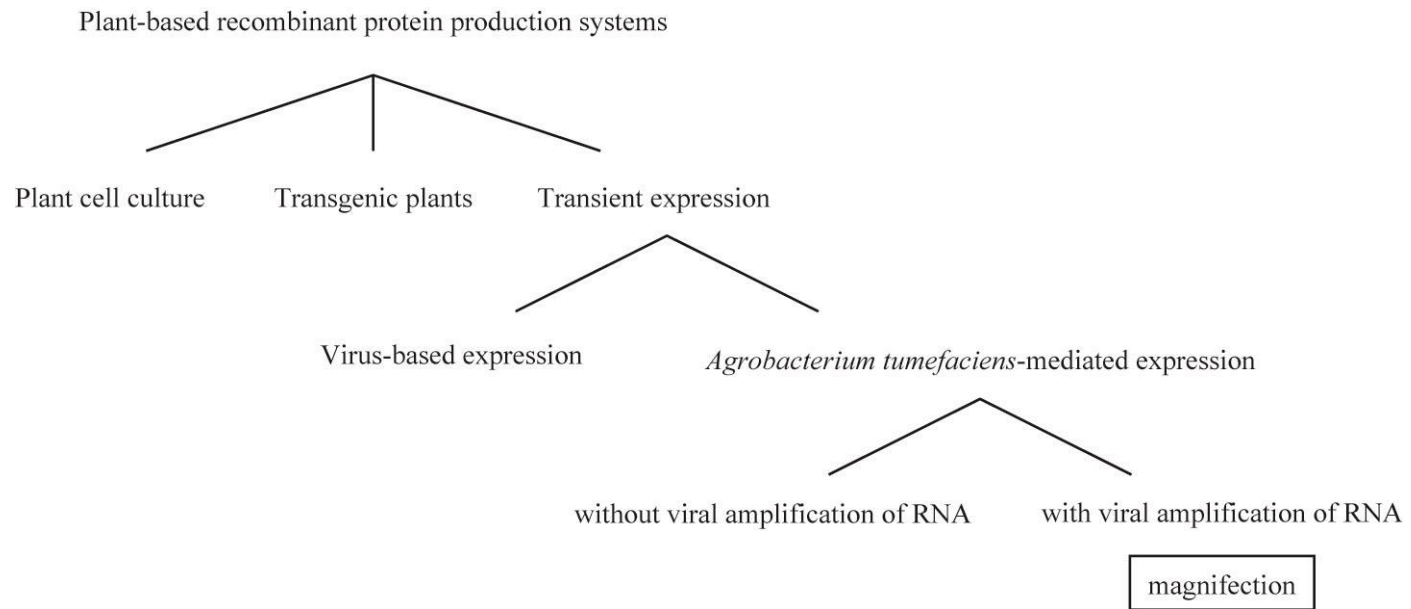


Fig. 4 Classification map of plant-based recombinant protein expression systems.

第2章

植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法における
ヘマグルチニン生産に液肥中硝酸濃度が及ぼす影響

1. 序論

一過性遺伝子発現法では、遺伝子導入後に植物細胞内で有用タンパク質が大量に合成される。有用タンパク質合成には窒素化合物を要するため、遺伝子導入を行う植物体の窒素化合物含量が大きければ、単位生体重あたりの有用タンパク質含量がより大きくなる可能性がある。そのような植物体は、根圏に施用する液肥の窒素濃度を調節することで作出可能であるかもしれない。一過性遺伝子発現法ではないものの、植物利用型有用タンパク質生産の1つである植物細胞培養法においては、液体培地中の窒素濃度が有用タンパク質蓄積に重要であることを示す報告がいくつかある。例えば Holland et al. (2010) は、抗ヒト免疫不全ウイルス広域中和抗体 2G12 の遺伝子を有する遺伝子組換え *N. tabacum* BY-2 細胞のフラスコ培養およびバイオリクター培養において、液体培地中の硝酸濃度を 40 mmol L^{-1} からそれぞれ 99 または 139 mmol L^{-1} に高めることで細胞懸濁液中の 2G12 含量が増大したと報告した。また、Häkkinen et al. (2013) は、ビトロネクチンに結合する M12 抗体の遺伝子を有する遺伝子組換え *N. tabacum* 毛状根培養において、液体培地中の硝酸濃度を 25 mmol L^{-1} から 119 mmol L^{-1} に高めることで細胞内および細胞外の M12 含量が増大したと報告した。このような高硝酸濃度による有用タンパク質含量増大効果は、ベンサミアナタバコを用いた一過性遺伝子発現法においても、硝酸濃度が高い液肥を根圏に施用することで得られると考えた。

一般に、一過性遺伝子発現法は温室や人工光型植物栽培施設内のような閉鎖または半閉鎖型施設内で行われる。ここでの植物栽培・培養環境は、収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量と単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の両方が大きくなるように、またはいずれか一方でも大きくなるように調節されることが望ましい。栽植密度および生産周期が一定の条件下では、単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量は植物体あたりの有用タンパク質含量に比例する。もし、高硝酸濃度液肥施用によって葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量が大きくなる一方で、植物体あたりの葉生体重は小さくならないのであれば、植物体あたりの有用タンパク質含量および単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量は大きくなる。

また、植物体あたりの有用タンパク質含量および単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量が大きくならずとも、葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量が大きくなったならば、それは有用タンパク質を抽出し精製する際に必要となる資材量などが小さくなり、有用タンパク質生産全体に要する費用の 50-80%を占める有用タンパク質の抽出・精製費用 (Buonaguro and Butler-Ransohoff, 2010; Roque et al., 2004) が小さくなる (Buyel and Fischer, 2012; Fischer et al., 2013; Tusé et al., 2014) ことを意味する。このため、有用タンパク質生産では有利であるといえる。

そこで、植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において、遺伝子導入前の栽培において植物体根圏に施用する硝酸濃度を高めることで、葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量と植物体あたりの有用タンパク質含量の両方またはいずれか一方でも増大するかについて調べることを目的とした。一過性遺伝子発現法として、プラスミド magnICON を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムをベンサミアナタバコに導入する magnifection 法 (Gleba et al., 2005) を用いた。また、モデルタンパク質として HA を用いた。magnifection 法を用いた一過性遺伝子発現法において、HA 蓄積量が遺伝子導入後 6 日目に最大値となったとの報告 (Matsuda et al., 2012) があり、このときの 6 日目の HA 蓄積量は 7 日目のそれと同程度であった (Matsuda, 私信) ことから、本研究では遺伝子導入後 7 日目における単位生体重あたりの HA 含量および植物体あたりの HA 含量を評価することとした。

2. 材料および方法

2.1 供試植物および成育条件

ベンサミアナタバコ種子 96 粒を、ロックウールおよびピートモス混合培養土 (Bestmix No. 3; Nippon Rockwool, Tokyo, Japan) を充填したポリスチレン製プラグトレイ (P-128; Takii, Kyoto, Japan; cut to the size of 170 mm wide × 170 mm long × 35 mm high) に播種し、ツイン形昼白色蛍光灯 (FPL55EX-N; Iwasaki electric, Tokyo, Japan) を備えた人工光型植物栽培施設内で栽培した。

培地上面における PPF_D は約 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期は 16/ 8 h、気温は約 25/ 21°C (明期/ 暗期) であった。播種後 1 週間、水道水をトレイに底面灌水し、その後 1 週間、4.0 mmol L^{-1} KNO_3 、8.0 mmol L^{-1} NaNO_3 、1.0 mmol L^{-1} KH_2PO_4 、2.4 mmol L^{-1} MgSO_4 および 4.0 mmol L^{-1} CaCl_2 の多量要素組成の液肥 (Matt et al., 2001) をトレイに底面灌水した。播種後 2 週目に、成育の揃った 36 植物体を選抜し、上記の混合培養土を充填したプラスチック製スリット鉢 (容積: 0.65 L) に移植した。その後 2 週間、上記植物栽培施設内で直管形昼白色蛍光灯 (FLR110H・N/A/100; TOSHIBA Lighting & Technology) 下で、上記の液肥を毎日 50 mL ずつ鉢に与えて栽培した。

播種後 4 週目に成育の揃った 24 植物体を選抜し、8 植物体ずつ 3 試験区に供した。3 試験区は、その後 2 週間、上記の液肥 (以後、N12 液肥) を与える区 (以後、N12 区)、上記の液肥に 24 mmol L^{-1} NaNO_3 を加えて硝酸濃度を 36 mmol L^{-1} とした液肥 (以後、N36 液肥) を与える区 (N36 区)、および上記の液肥に 48 mmol L^{-1} NaNO_3 を加えて硝酸濃度を 60 mmol L^{-1} とした液肥 (以後、N60 液肥) を与える区 (N60 区) とした。N12、N36、または N60 で用いた液肥のモル濃度は、それぞれ 19、43、または 67 mmol L^{-1} であった。

播種後 6 週目に、各試験区 4 植物体ずつを破壊測定に供した。破壊測定では、遺伝子導入前の植物体あたりの葉生体重を測定した。

2.2 遺伝子組換えアグロバクテリウム

遺伝子発現ベクターとして、アグロバクテリウム (GV3101::pMP90 (Koncz and Schell, 1986)) を pICH26212 (magnICON[®]; Icon Genetics, Halle/Saale, Germany) の派生プラスミドである pNM216 で形質転換した遺伝子組換えアグロバクテリウムを用いた。pNM216 の T-DNA 領域には、プロモーターとしてシロイヌナズナアクチン 2 プロモーターが、発現タンパク質としてトバモウイウイルス由来の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼおよび細胞間移行タンパク質およびインフルエンザ A ウイルス (A/California/07/2009) のヘマグルチニンエクトドメイン (以後、HA) の cDNA が含まれている。ヘマグルチニンエクトドメインの N 末端には分泌シグナルペプチドが、C 末端には小胞体蓄積シグナル

ペプチドが含まれている。

2.3 遺伝子導入

Matoba et al. (2010) の方法に従い、上述の遺伝子組換えアグロバクテリウムを YenB 培地を用いて培養した。遺伝子組換えアグロバクテリウム培養 YenB 培地の 600 nm 吸光度が 0.6–1.2 の範囲に入る濃度となるまで 25–28°C で振盪培養した後に、遠心分離によって沈殿を得た。その沈殿を、pH が 5.5 となるように調製した 2-メルホリノエタンスルホン酸 (MES) バッファに、600 nm 吸光度が 0.03 となるように懸濁することで、減圧浸潤に用いる遺伝子組換えアグロバクテリウム懸濁液を得た。ポリカーボネート製真空デシケーター (Inner volume of 19 L) 内に置いたポリプロピレン製容器 (B-315; Iwasaki Industry, Nara, Japan; Φ 182 mm \times 141 mm high) 内にアグロバクテリウム懸濁液を満たした。播種後 6 週目の各試験区のベンサミアナタバコ植物体 (Fig. 5) を 1 つずつ、上下反転後に地上部のみをアグロバクテリウム懸濁液に浸漬した後に、Matsuda et al. (2012) の方法に従い、真空ポンプ (DA-20D; Ulvac, Kanagawa, Japan) を用いて減圧浸潤法によって植物体地上部にアグロバクテリウムを導入した。減圧浸潤の手順は以下の通りである。1) 約 15 kPa まで容器内を減圧する、2) その状態を約 1 分間保持する、3) 容器内を大気圧まで復圧する、4) 1) ~3) をもう一度繰り返す。

2.4 遺伝子導入後の培養

遺伝子導入後の 1 週間の培養は、ツイン形昼白色蛍光灯 (FPL55EX-N; Iwasaki electric, Tokyo, Japan) を備えたグローブチャンバ (MIR-554; Panasonic, Osaka, Japan) 内で行った。Matsuda et al. (2012) は、遺伝子導入後の培養での PPFd に関して 2 水準 (100 または 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、および気温に関して 2 水準 (20°C または 25°C) を設定し、計 4 試験区で一過性遺伝子発現による HA 生産を行い、試験区間で単位乾物重あたりの HA 含量を比較したところ、PPFD 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では有意な差は認められず、気温

20°C と 25°C では 20°C の方が大きかったと報告した。そこで、PPFD 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ および気温 20°C の条件で培養を行うこととした。培養中の鉢上面における PPFD は 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期は 16/ 8 h、気温は明期、暗期とも 20°C であった。また、一過性遺伝子発現法における遺伝子導入後の 1 週間の培養中に根圏に施用する液体の化合物組成が単位生体重あたりの HA 含量に及ぼす影響を調べた予備実験において、水道水施用区、N12 液肥施用区、および N36 液肥施用区間では単位生体重あたりの HA 含量および植物体あたりの葉生体重に差が認められなかった。この結果から、遺伝子導入後に液肥を施用することに利点はないと判断し、本研究では毎日 50–100 mL の水道水を植物体根圏に与えた。

2.5 ヘマグルチニンおよび各種窒素化合物の定量

遺伝子導入後に 1 週間培養したベンサミアナタバコ植物体 (Fig. 5) の、培養終了時の植物体あたりの葉生体重および植物体あたりの葉乾物重を測定した後、植物体の第 7–9 葉の一部を切り取り HA 量および各種窒素画分量を定量した。酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; 以後、ELISA 法) によって HA 量を定量した。葉の一部を、2 mmol L⁻¹ ナトリウムヨード酢酸、1% (v/v) ポリビニルピロリドン、および 0.8% (v/v) 2-メルカプトエタノールを含む、生体重の 9 倍量の 50 mmol L⁻¹ リン酸ナトリウムバッファ (pH 7.0) で磨砕し、磨砕液を得た。磨砕液に 1 g L⁻¹ となるように Triton X-100 を加え、15,000 × g、4°C で 15 分間遠心して得た上清を ELISA 法に供した。ELISA 法は、HA に結合するウサギポリクローナル抗体 (IT-003-SW; Immune Technology, NY, USA) を用いて、Matsuda et al. (2012) の方法に従って行った。

全還元態窒素量、可溶性還元態窒素量、および可溶性タンパク質 (以後、TSP) 態窒素量を、ケルダール分解後にネスラー試薬を用いて比色定量する方法によって定量した。磨砕液、磨砕液を 15,000 × g、4°C で 15 分間遠心して得た上清、およびその上清に 15% (w/v) トリクロロ酢酸水溶液を加えて氷上に 30 min 静置後に形成される沈殿を 80% (v/v) エタノールで複数回洗浄した。その沈殿をケルダール分解に供した。スピッツ管に移したそれらに 60% (v/v)

硫酸 100 μL を加え、ヒートブロック恒温槽を用いてケルダール分解 (140–260°C まで段階的に温度を上げ、温度を上げる前には一旦室温まで放冷し、分解促進剤である過酸化水素水を 2 滴添加した) を行った。分解後、蒸留水で 5 mL とし、1,800 $\times g$ 、25°C、15 分間遠心して得た上清 0.5 mL に、2.5 mol L⁻¹ 水酸化ナトリウム水溶液 50 μL 、10% (w/v) (+)-酒石酸ナトリウムカリウム四水和物水溶液 100 μL 、蒸留水 4.25 mL を加え攪拌した後、ネスラー試薬 100 μL を加えよく攪拌した。20 分間静置した後に 420 nm 吸光度を測定し、これらと同様に処理した塩化アンモニウム水溶液の吸光度から作成した標準曲線から、磨砕液中の各種還元態窒素濃度を定量した。

また、硝酸態窒素量を、Cataldo et al. (1975) の方法に従って定量した。磨砕液を 5 mL ガラスピペットに 500 μL 分取し、80% (v/v) エタノールを 2.5 mL 加えて 80°C で 12 分間加熱後、1,600 $\times g$ 、25°C、5 分間遠心後、上清をリム付き濃縮試験管に移した。試験管濃縮機 (TC-8F; Taitec, Saitama, Japan) を用いて、残存エタノールを蒸発させた。残渣に 80% (v/v) エタノールを再び加え、蒸発させる操作を 3 回繰り返した。残渣に蒸留水を加え 500 μL とし、18,000 $\times g$ 、4°C、15 分間遠心後、得られた上清を低分子画分抽出液とした。蒸留水で希釈したイオンクロマトグラフィー用硝酸標準水溶液および低分子画分抽出液 200 μL に 5% (w/v) サリチル酸-濃硫酸溶液 100 μL を加え、室温で 20 分間静置した後に、2 mmol L⁻¹ 水酸化ナトリウム水溶液を加え攪拌した。その後、室温で 20 分間静置した後に、410 nm 吸光度を測定し、硝酸標準水溶液の吸光度から作成した標準曲線から、磨砕液中の硝酸態窒素濃度を定量した。

2.6 植物体あたりのヘマグルチニン含量および葉乾物率の算出方法

磨砕液中の HA 濃度、各種還元態窒素濃度、および硝酸態窒素濃度を、葉の単位生体重あたりの HA 含量、葉の単位生体重あたりの全還元態窒素含量、葉の単位生体重あたりの可溶性還元態窒素含量、葉の単位生体重あたりの可溶性タンパク質 (TSP) 態窒素含量、および葉の単位生体重あたりの硝酸態窒素含量に換算した。ここでの単位生体重あたりの HA 含量は、第 7–9 葉をまとめて磨砕した場合の値である。葉の単位生体重あたりの HA 含量に関する試験区間

での差の傾向はどの葉位においても同様であると考え、単位生体重あたりの HA 含量が比較的大きいと考えられる第 7-9 葉をまとめて磨砕した場合の単位生体重あたりの HA 含量を、植物体から収穫される葉全体の単位生体重あたりの HA 含量の代表値として用いた。第 7-9 葉で単位生体重あたりの HA 含量が比較的大きいと考えられたのは、一過性遺伝子発現法において上位葉の単位生体重あたりまたは可溶性タンパク質量あたりの有用タンパク質含量は下位葉のそれと比較して大きい傾向があったとの報告 (Buyel and Fischer, 2012; Sheludko et al., 2007) による。また、7-9 葉をまとめて磨砕した場合の単位生体重あたりの HA 含量に培養終了時の植物体あたりの葉生体重を乗じることで算出した値を、植物体あたりの HA 含量推定値とした。また、培養終了時の植物体あたりの葉乾物重を培養終了時の植物体あたりの葉生体重で除することで、植物体の葉乾物率を算出した。

2.7 統計処理

異なる硝酸濃度の液肥を施用した試験区間での測定項目の平均値の差を、Tukey の HSD 検定により有意水準 5% で検定した。統計処理には、統計処理ソフトウェア R のパッケージである agricolae (De Mendiburu, 2009) 内の関数 HSD.test() を用いた。

3. 結果および考察

液肥中硝酸濃度が高い区ほど、葉の単位生体重あたりの HA 含量は大きくなる傾向があった。N60 の単位生体重あたりの HA 含量は、他の試験区のそれらと比較して有意に大きく、N12 のそれと比較して約 40% 大きかった (Fig. 6A)。N60 の単位生体重あたりの可溶性還元態窒素含量は、他の試験区のそれと比較して有意に大きかった (Fig. 7B)。葉の単位生体重あたりの全還元態窒素含量、単位生体重あたりの TSP 窒素含量、および単位生体重あたりの硝酸態窒素含量では、試験区間に有意な差は認められなかったものの、N60 の単位生体重あたりの TSP 窒素含量は他の試験区のそれと比較して大きい傾向にあった (Fig.

7A, C, D)。また、単位生体重あたりの TSP 窒素含量が大きいほど単位生体重あたりの HA 含量は大きかった (Fig. 6A, Fig. 7C)。この結果は、遺伝子導入後に異なる気温で培養した場合に、単位生体重あたりの TSP 含量に対する単位生体重あたりの HA 含量の比は試験区間で大きく異ならなかったとの報告 (Matsuda et al., 2012) と同様である。また、単位生体重あたりの可溶性還元態窒素含量が大きいほど単位生体重あたりの HA 含量は大きかった (Fig. 6A, Fig. 7B)。これらの結果から、高硝酸濃度液肥施用によって単位生体重あたりの可溶性還元態窒素含量が増大したことに伴って、単位生体重あたりの可溶性タンパク質態窒素含量および単位生体重あたりの HA 含量も増大したと推察する。なお、単位生体重あたりの可溶性還元態窒素含量および単位生体重あたりの TSP 窒素含量は液肥中硝酸濃度が大きいほど大きい傾向にあったのに対して、単位生体重あたりの全還元態窒素含量は N36 で最も大きかった。このような傾向の不一致の理由は不明である。

N60 の遺伝子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 (Fig. 8A)。N60 で施用した液肥の溶質濃度 (約 67 mmol L^{-1}) は、N12 で施用した液肥のそれ (約 19 mmol L^{-1}) と比較して 3 倍以上であったことから、N60 では植物の水分吸収、細胞伸長、および葉展開を抑制する浸透圧ストレス (Horie et al., 2012) 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。N60 の葉乾物率が、N12 のそれと比較して有意に小さいことはなかったものの、N12 のそれと比較してわずかに大きい傾向にあった (Fig. 8B) ことも、浸透圧ストレスが存在した可能性があることを示している。N60 において浸透圧ストレスがあったとしても、N60 の単位生体重あたりの HA 含量は、他の試験区のそれらと比較して有意に大きかった (Fig. 6A) ことから、少なくとも N60 におけるストレスレベルでは HA 蓄積を抑制しないといえる。

遺伝子組換え細胞培養法による有用タンパク質生産では、マンニトールを添加して水ポテンシャルを高めた培養培地を用いたところ、細胞外に分泌された有用タンパク質の分解が抑制されたことで培養培地中の有用タンパク質濃度が増大したとの報告 (Soderquist and Lee, 2005) がある。しかしながら予備実験として、N12 液肥に NaNO_3 ではなく $12\text{--}36 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$ を添加した液肥 (溶

質濃度: 31–55 mmol L⁻¹) をベンサミアナタバコ植物体に施用したところ、単位生体重あたりの HA 含量の増大は認められなかった。この結果は、単に溶質濃度が高い液肥を施用するだけでは単位生体重あたりの有用タンパク質含量は増大しないことを示す 1 つの例である。このことから、予備実験で用いた NaCl および本研究で用いた NaNO₃ などの硝酸体窒素を含む化合物以外の化合物を液肥に添加して溶質濃度を高めたとしても、単位生体重あたりの HA 含量は増大しない可能性が高いと考える。つまり、本研究での単位生体重あたりの有用タンパク質含量増大効果は、液肥中の硝酸濃度を高めることに特有の効果であると考えられる。

植物体あたりの HA 含量では試験区間に有意な差が認められなかった (Fig. 6B)。このことから N60 では、植物体あたりの HA 含量の点では N12 および N36 と大きな差はなく、単位生体重あたりの HA 含量の点では大きかったことになる。栽植密度および生産周期が一定の条件下では葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量と植物体あたりの有用タンパク質含量の両方またはいずれか一方でも大きいことが望ましい。例えば、有用タンパク質の抽出に必要な抽出バッファ量は、抽出に供される葉生体重に比例する (Matoba et al., 2011)。このため、葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量が大きいことは、有用タンパク質の抽出および精製の点で有利であるといえる。本実験での N60 の単位生体重あたりの HA 含量は N12 のその約 1.4 倍であったことから、N60 の植物を収穫して単位量の精製 HA を得る場合に必要な収穫物量は、N12 の植物を収穫する場合に必要なそれと比較して約 70%に減少すると考えられる。このように、高硝酸濃度液肥施用によって植物体あたりの有用タンパク質含量を大きく減少させることなく単位生体重あたりの有用タンパク質含量を大きくできることから、液肥中硝酸濃度を標準的な 12 mmol L⁻¹ から 60 mmol L⁻¹ に高めることは一過性発現法を用いた有用タンパク質生産に有用であるといえる。つまり、有用タンパク質生産に好適な液肥中硝酸濃度のレベルは、植物生産に好適なそれとは異なることが明らかとなった。

N60 の植物体生体重は、他の試験区と比較して小さかった (Fig. 8A)。液肥中硝酸濃度が 10 mmol L⁻¹ で *N. tabacum* の相対成長率は最も大きく、それ以上でも以下でも相対成長率は減少したという報告 (Stöhr, 1999) がある。本実験

でも、N60 ではそのような高硝酸液肥施用による成長抑制が発生したと推察される。このような成長抑制を防ぐ方法として、CO₂ 施用は有効であるかもしれない。Geiger et al. (1999) は、CO₂ 施用によって、*N. tabacum* の単位生体重あたりのタンパク質含量を減少させることなく成長を増大させることが可能であったと報告している。一過性遺伝子発現法においても、CO₂ 施用の効果は期待できると考えられることから、高濃度硝酸液肥施用と組み合わせることにより、単位生体重あたり HA 含量をより一層増大できる可能生がある。

4. 結論

アグロバクテリウムを利用した一過性遺伝子発現法による HA 生産において、遺伝子導入前のベンサミアナタバコ栽培における根圏への高濃度硝酸 (60 mmol L⁻¹) 液肥施用は、植物生産に用いられる標準的な硝酸濃度 (12 mmol L⁻¹) の液肥施用と比較して、植物体あたりの HA 含量を大きく減少させることなく、単位生体重あたりでより高い HA 含量をもたらした。このことから液肥中の硝酸濃度を高めることは、単体量の有用タンパク質を得るために必要な葉収穫量の低減に寄与し、結果的に有用タンパク質の抽出および精製に要する費用を減少しうるため、有用タンパク質生産に好適な環境調節であるといえる。このように本章では、遺伝子導入前の栽培における有用タンパク質生産に好適な液肥中硝酸濃度のレベルは、植物生産に好適なそれと比較して高いことを示した。

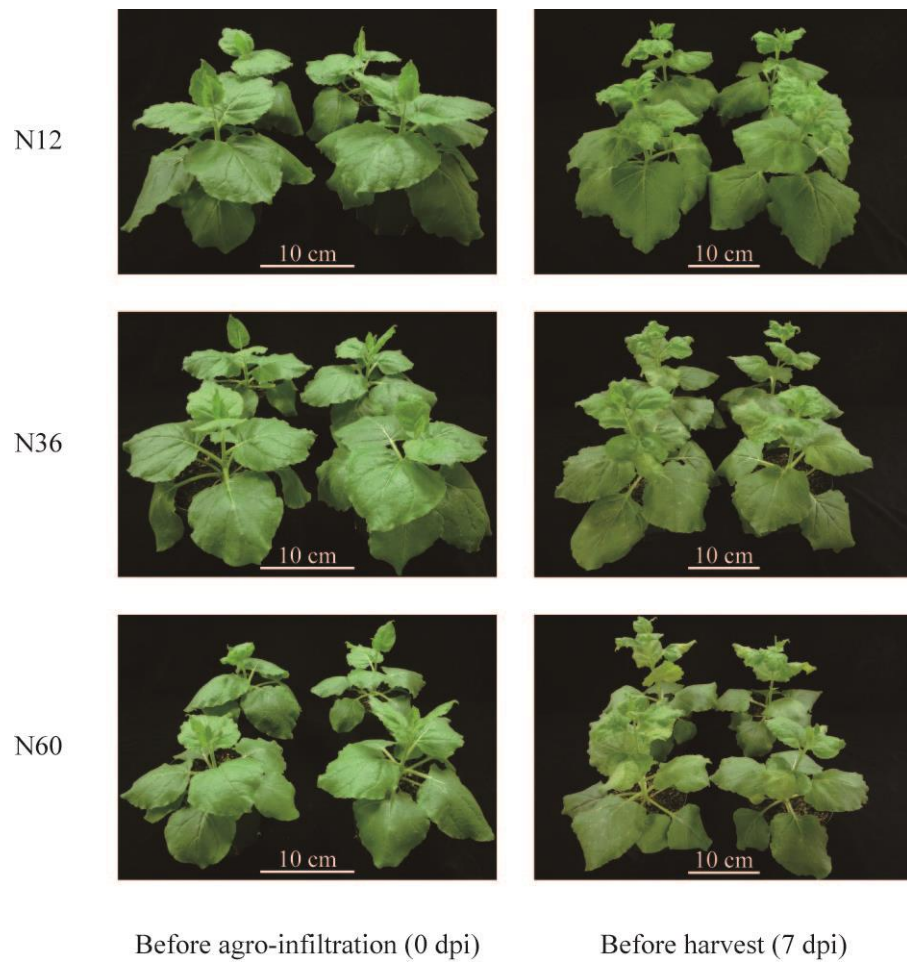


Fig. 5 *N. benthamiana* plants before agro-infiltration (0 days post infiltration (dpi)) and before harvest (7 dpi). Plants were grown with a nutrient solution containing 12 (N12), 36 (N36) or 60 (N60) mmol L^{-1} nitrate for 2 weeks before agro-infiltration.

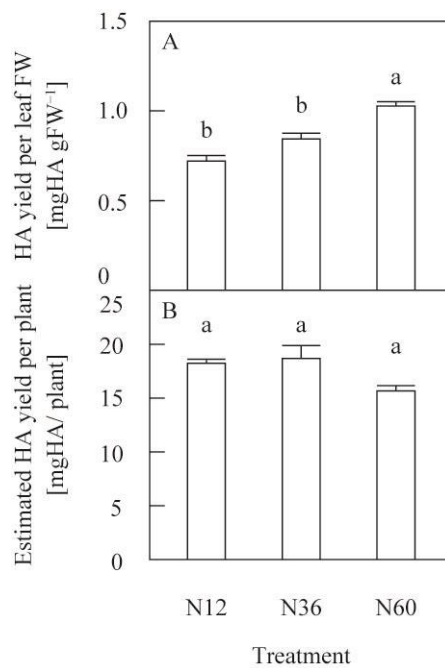


Fig. 6 Hemagglutinin (HA) yield per unit leaf fresh weight (FW) (A) and estimated HA yield per plant (B) of *N. benthamiana* plants grown with a nutrient solution containing 12 (N12), 36 (N36), or 60 (N60) mmol L⁻¹ nitrate for 2 weeks before agro-infiltration. Vertical bars show standard errors of the mean ($n = 4$). Means labeled with different small letters in each panel mutually differ significantly at the 5% level, as determined using Tukey's HSD test.

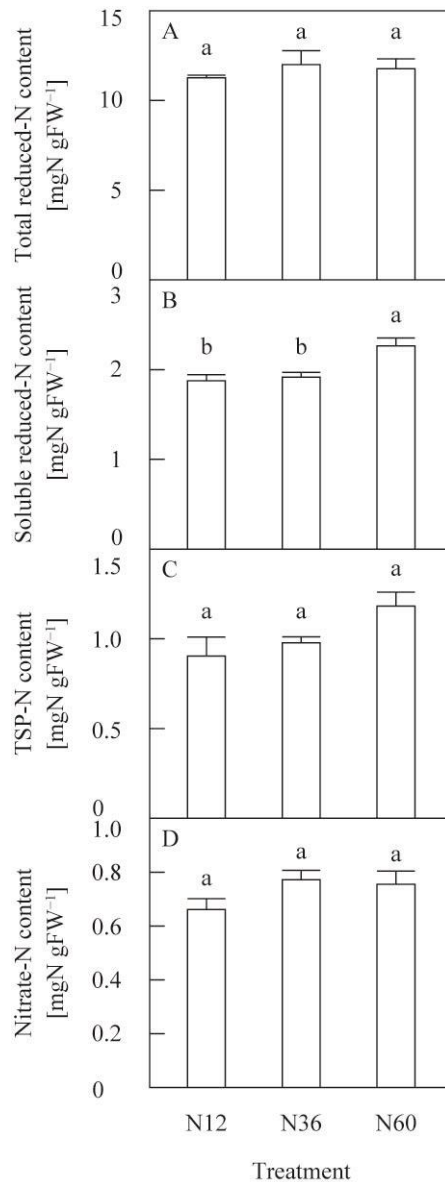


Fig. 7 Total reduced-nitrogen (N) content (A), soluble reduced-N content (B), total soluble protein (TSP) content (C) and nitrate-N content (D) per unit of leaf fresh weight at 7 days post infiltration of *N. benthamiana* plants grown with a nutrient solution containing 12 (N12), 36 (N36), or 60 (N60) mmol L⁻¹ nitrate for 2 weeks before agro-infiltration. Vertical bars show standard errors of the mean ($n = 4$). Means labeled with different small letters in each panel mutually differ significantly at the 5% level, as determined by Tukey's HSD test.

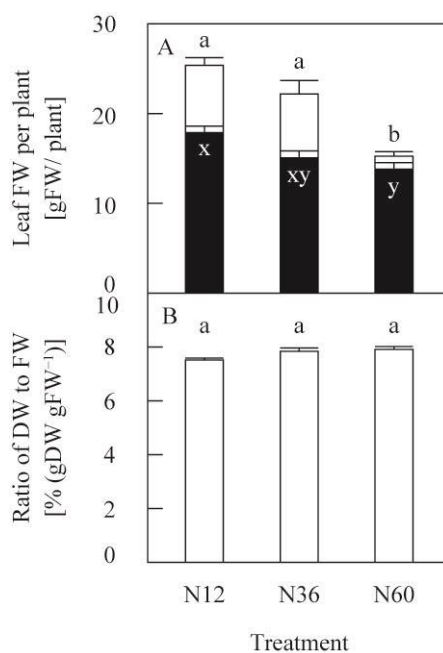


Fig. 8 Leaf fresh weight per plant at 0 dpi (black column) and at 7 dpi (white column) (A) and the ratio of leaf dry weight (DW) to leaf fresh weight (FW) (B) at 7 days post infiltration of *N. benthamiana* plants grown with a nutrient solution containing 12 (N12), 36 (N36), or 60 (N60) mmol L⁻¹ nitrate for 2 weeks prior to agro-infiltration. Vertical bars show standard errors of the mean ($n = 4$). Means labeled with different small letters in each panel and dpi mutually differ significantly at the 5% level, as determined using Tukey's HSD test.

第3章

植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法における
ハマグルチニン生産に栽植密度が及ぼす影響

1. 序論

栽植密度は、単位時間・単位栽培面積あたりの植物体地上部生体重に影響を及ぼす広義の環境要素の1つである。一般に、栽植密度が高いほど単位時間・単位栽培面積あたりの植物体地上部乾物重は大きく、植物体間で相互遮蔽が生じるようなある値以上の栽植密度では、単位時間・単位栽培面積あたりの植物体地上部乾物重はほぼ一定となる (Scaife et al., 1987; Scaife and Jones, 1976; Shinozaki and Kira, 1956)。単位時間・単位栽培面積あたりの植物体地上部生体重も、単位時間・単位栽培面積あたりの植物体地上部乾物重と同様の傾向を栽植密度に対して示すと考えられる。つまり、植物生産において植物体の地上部乾物重や地上部生体重が大きいことが望ましい場合には、栽植密度が高いほど好適な環境であるといえる。

他方、一過性遺伝子発現法を用いた有用タンパク質生産に好適な栽植密度は不明である。一過性遺伝子発現法のような閉鎖型施設内で行われる植物利用型有用タンパク質生産では、収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量と単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の両方が大きくなるように、またはいずれか一方でも大きくなるように調節されることが望ましい。生産周期が一定の条件下では、単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量は単位栽培面積あたりの有用タンパク質量に比例する。植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において植物体地上部全体を収穫する場合には、単位栽培面積あたりの有用タンパク質量は単位栽培面積あたりの地上部生体重と、地上部の単位生体重あたりの有用タンパク質含量の積である。一過性遺伝子発現法において上位葉の単位生体重あたりまたは可溶性タンパク質量あたりの有用タンパク質含量は下位葉のそれと比較して大きい傾向があったとの報告 (Buyel and Fischer, 2012; Sheludko et al., 2007) を考慮すると、葉位別葉生体重分布などの植物体の形態に影響を及ぼす栽植密度が単位生体重あたりの有用タンパク質含量に影響を及ぼす可能性は高い。もし、栽植密度が高くなるほど単位生体重あたりの有用タンパク質が小さくなるのであれば、栽植密度が高いほど望ましい植物生産の場合とは異なり、有用タンパク質生産の場合には比較的低い栽植密度が好適である可能性がある。このため、栽植密度が

生体重および単位生体重あたりの有用タンパク質含量の葉位別分布に及ぼす影響を考慮し、収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位栽培面積あたりの有用タンパク質量に及ぼす影響を調べることは、有用タンパク質生産に好適な栽植密度を検討する上で重要であると考えられる。

そこで、植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において、栽植密度が葉生体重の葉位別分布および単位生体重あたりの有用タンパク質含量の葉位別分布に及ぼす影響を調べ、収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位栽培面積あたりの有用タンパク質量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。一過性遺伝子発現法では、地上部全体を収穫するのではなく、葉のみ、または葉の中でも上位葉のみを収穫する場合がある (Buyel and Fischer, 2012; Medicago Inc. (website)) ため、植物体地上部全体を収穫する場合、葉のみを収穫する場合、または葉の中でも上位葉のみを収穫する場合それぞれについて、低栽植密度と高栽植密度間で収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位栽培面積あたりの有用タンパク質量を比較した。一過性遺伝子発現法として、プラスミド magnICON を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムをベンサミアナタバコに導入する magniffection 法 (Gleba et al., 2005) を用いた。また、モデルタンパク質として HA を用いた。magniffection 法を用いた一過性遺伝子発現法において、HA 蓄積量が遺伝子導入後 6 日目に最大値となったとの報告 (Matsuda et al., 2012) があることから、本研究では遺伝子導入後 6 日目における単位生体重あたりの HA 含量および単位栽培面積あたりの HA 量を評価することとした。

2. 材料および方法

2.1 供試植物および成育条件

ベンサミアナタバコ種子をブロック状ロックウール培地 (AO36/40; Rockwool International, Hedehusene, Denmark) に 1 ブロックにつき 2 粒ずつ、140 ブロックに播種した。播種後 1 週間は、上面を透明なラップフィルムで覆い、水道水を少量ずつ、つねに底面灌水することで内部の相対湿度を高く維持

したプラスチックトレイ内にロックウール培地を置き、発芽を促した。播種後 1 週目に同穴の 2 植物体のうち、目視で植物体生体重が小さいと判断した植物体を間引きし、その後 1 週間、自動給液ベッド上で栽培した。毎日朝 5 時から 20 分間、電気伝導度を 180 mS m^{-1} に調製した大塚 A 処方養液 (OAT Agrio, Tokyo, Japan) を底面給液した。播種後 2 週目に、目視で植物体生体重が大きいと判断した 80 植物体を選抜し、異なるロックウール培地に移植した。栽植密度が $100 \text{ plants m}^{-2}$ (以後、低栽植密度) または $400 \text{ plants m}^{-2}$ (以後、高栽植密度) となるように、それぞれ表面に均等な間隔で穴を開けたロックウール培地 (2075 B2W; Rockwool International, Hedehusene, Denmark) を用いた。W200 × D400 mm となるように切断したロックウール培地を 2 片隣接させて W400 × D400 mm となるように配置することで、それぞれの栽植密度で 16 植物体または 64 植物体を栽培可能とした。このロックウール培地の穴に選抜植物体のブロック状ロックウール培地を挿入した後に、19 日間自動給液ベッド上で栽培した。ここまでの 5 週間の栽培は、直管形白色蛍光灯 (FLR110H・N/A/100; TOSHIBA Lighting & Technology) を備えた人工光型植物栽培施設内で行った。培地上面における PPF_D は約 $220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、明暗周期は 16/ 8 h、気温は約 25/ 23°C (明期/ 暗期)、相対湿度は約 60/ 68% (明期/ 暗期) であった。

2.2 遺伝子組換えアグロバクテリウム

第 2 章 2.2 と同様とした。

2.3 遺伝子導入

播種後 33 日目に、低栽植密度で栽培したベンサミアナタバコ植物体群 (以後、低栽植密度区) または高栽植密度で栽培したベンサミアナタバコ植物体群 (以後、高栽植密度区) (Fig. 11) の地上部に減圧浸潤法によって遺伝子組換えアグロバクテリウムを導入した。アクリル製真空デシケーター (AA30A01A; Shin-ei Sangyou, Osaka, Japan; 500 mm wide × 500 mm long × 300 mm high) の内壁をビニールで覆い、そこに第 2 章 2.3 と同様にして得た遺伝子組換えアグ

ロバクテリウム懸濁液 19.9 L を満たした。鋼材枠 (400 mm wide × 400 mm long × 275 mm high) の下部にベンサミアナタバコ植物体群のロックウール培地を固定し、上下反転してベンサミアナタバコ地上部のみを懸濁液に浸した。その後 Matsuda et al. (2012) の方法に従って、真空ポンプ (DA-20D; Ulvac, Kanagawa, Japan) を用いて減圧浸潤によってベンサミアナタバコ植物体群地上部にアグロバクテリウムを導入した。減圧浸潤後にベンサミアナタバコ植物体群を取り出し、懸濁液が浸潤していない部分が目視で確認できた葉にシリンジ浸潤法によってアグロバクテリウムを導入した。その後、葉表面に付着したアグロバクテリウム懸濁液に含まれる水を蒸発させて培養中の葉の腐敗を防ぐ目的で、室内 (気温 26°C, RH30%) に 4 h 静置した。葉表面に水分が残存していないことを目視で確認した後に、ベンサミアナタバコ植物体群をインキュベータ内での遺伝子導入後の培養に供した。

2.4 遺伝子導入後の培養

遺伝子導入後の培養は、ツイン形白色蛍光灯 (FPL55EX-N; Iwasaki electric, Tokyo, Japan) を備えたインキュベータ (MIR-553; Sanyo Electric, Osaka, Japan) 内で 6 日間行った。低栽植密度区または高栽植密度区を、それぞれ別のインキュベータ内に置いた。第 2 章 2.4 と同様の理由により、PPFD $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ および気温 20°C の条件で培養を行うこととした。ベンサミアナタバコ植物体群上面における PPFD は約 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期は 16/ 8 h、気温は両栽植密度区ともに約 20/ 20°C (明期/ 暗期)、相対湿度は、低栽植密度区では約 64/ 87% (明期/ 暗期)、高栽植密度区では約 72/ 91% (明期/ 暗期) であった。1 日 1 回、植物体群あたり 800 mL の水道水を培地上面から与えた。また、インキュベータ間で異なる環境による影響を排除するために、インキュベータ間でベンサミアナタバコ植物体群を 1 日 1 回入れ替えた。

2.5 葉位別の葉生体重および茎生体重測定

遺伝子導入後の 6 日間の培養の後、低栽植密度区または高栽植密度区のベン

サミアナタバコ植物体の葉位別の葉生体重および茎生体重を測定した。低栽植密度区ではロックウール培地に格子状に配置された 16 植物体のうち中心に近い 4 植物体の 1 植物体ずつを、高栽植密度区ではロックウール培地に格子状に配置された 64 植物体のうち中心に近い 16 植物体の 4 植物体ずつをひとまとまりとした (各試験区で $n = 4$)。葉および茎を、第 1-2、3-4、5-6、7-8、9-10 葉位、および第 11 葉位以上の 6 グループに切り分けて生体重を測定した。ただし高栽植密度区では、測定した葉位別の葉および茎の生体重は 4 植物体分であるので、それを 4 で除すことで 1 植物体分の葉位別の葉および茎の生体重を算出した。葉位別の葉生体重あたりの HA 量を算出するために、葉を生体重測定後に主葉脈に沿って 2 分割し、片方を HA 量の定量に供した。

2.6 ヘマグルチニンの定量

HA の定量を、ELISA 法に従って行った。上述のように 2 分割した葉の片方を、 2 mmol L^{-1} ナトリウムヨード酢酸、1% (v/v) ポリビニルポリピロリドン、および 0.8% (v/v) 2-メルカプトエタノールを含む、葉生体重の 5 倍量の体積の 50 mmol L^{-1} リン酸ナトリウムバッファ (pH 7.0) で磨砕し、磨砕液を得た。磨砕液に終濃度 1 g L^{-1} となるように Triton X-100 を加え、 $15,000 \times g$ 、 4°C で 15 分間遠心して得た上清を ELISA 法に供した。ELISA 法は、ELISA アッセイキット (SEK001; Sino Biological, Beijing, China) を用いた。磨砕液中の HA 濃度を定量後、それを葉の単位生体重あたりの HA 含量に換算した。なお、第 1-2 葉の単位生体重あたりの HA 含量は測定しなかった。これは、一過性遺伝子発現において最下位葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量は上位葉のその 10 分の 1 以下であったという報告 (Buyel and Fischer, 2012) があることから、第 1-2 葉の単位生体重あたりの HA 含量は上位葉のそれと比較して無視できるほど小さいと判断したためである。

2.7 単位栽培面積あたりの収穫物生体重、単位栽培面積あたりのヘマグルチニン量、および収穫物の単位生体重あたりのヘマグルチニン含量の算出

第3葉以上の葉および茎の生体重を積算することで植物体あたりの収穫物生体重を算出し、それに栽植密度を乗じることで、地上部全体を収穫する場合の単位栽培面積あたりの収穫物生体重を算出した。同様にして、葉のみを収穫する場合の単位栽培面積あたりの収穫物生体重を算出した。また、第5、7、9葉、または第11葉以上の葉の生体重を積算することで算出した植物体あたりの収穫物生体重に栽植密度を乗じることで、上位葉のみを収穫する場合の単位栽培面積あたりの収穫物生体重を算出した。

葉位別の葉生体重に葉位別の葉の単位生体重あたりのHA含量を乗じることで、葉位別の葉あたりのHA含量を算出した。単位栽培面積あたりの収穫物生体重の算出と同様に、ある葉位以上の葉あたりのHA含量を積算した値に栽植密度を乗じることで、単位栽培面積あたりのHA量を算出した。

単位栽培面積あたりのHA量を単位栽培面積あたりの収穫物生体重で除することで、収穫物の単位生体重あたりのHA含量を算出した。

2.8 統計処理

異なる栽植密度間での単位栽培面積あたりの地上部乾物重の平均値の差を、TukeyのHSD検定により有意水準5%で検定した。統計処理には、統計処理ソフトウェアRのパッケージであるagricolae(De Mendiburu, 2009)内の関数HSD.test()を用いた。茎と葉の単位生体重あたりのHA含量の平均値の差、または異なる栽植密度間でのそれらの平均値の差を、Welch検定により有意水準5%で検定した。統計処理には、統計処理ソフトウェアRのパッケージであるstats内の関数oneway.test()を用いた。

3. 結果および考察

3.1 単位栽培面積あたりのベンサミアナタバコ地上部乾物重に栽植密度が及ぼす影響

栽植密度が面積あたりのベンサミアナタバコ地上部乾物重に及ぼす影響を調

べる予備実験を行った。播種後 35 日間、100、200、300、または 400 plants m^{-2} で栽培した試験区間で、単位栽培面積あたりの地上部乾物重を比較したところ、400 plants m^{-2} の面積あたり地上部乾物重は、100 plants m^{-2} のそれと比較して有意に大きく、約 1.8 倍であった (Fig. 9)。単位栽培面積あたりの地上部生体重も同様の傾向であると判断し、単位栽培面積あたりの地上部生体重が大きく異なる 2 つの栽植密度間で収穫物の単位生体重あたりの HA 含量および単位栽培面積あたりの HA 量を比較することを目的として、低栽植密度条件として 100 plants m^{-2} 、高栽植密度条件として 400 plants m^{-2} で 35 日間栽培したベンサミアナタバコを遺伝子導入に供し、その後 6 日間培養する実験を行った (第 3 章 3.3, 3.4)。

3.2 茎の単位生体重あたりのヘマグルチニン含量

一過性遺伝子発現法では、茎には有用タンパク質の遺伝子が導入されないとされている (Gleba et al., 2014)。このため、単位生体重あたりの HA 含量と単位栽培面積あたりの HA 量のどちらの点においても茎由来の HA 量は無視できるほど小さいものであると考えられる。このことを確認するため、予備実験として、葉および茎の単位生体重あたりの HA 含量を比較した。播種後 35 日目に遺伝子導入を行い、その後 10 日間培養したベンサミアナタバコの第 7-9 葉の単位生体重あたりの HA 含量は、茎の単位生体重あたりの HA 含量と比較して有意に大きく、約 12 倍であった (Fig. 10)。茎生体重は葉生体重と比較して同程度またはそれ以下であった (Fig. 13A, B)。これらの結果から、ベンサミアナタバコ地上部全体を収穫する場合には茎由来の HA 量は無視できるほど小さいといえる。このため、低栽植密度条件として 100 plants m^{-2} 、高栽植密度条件として 400 plants m^{-2} で 35 日間栽培したベンサミアナタバコを遺伝子導入に供し、その後 6 日間培養する実験を行った (第 3 章 3.3, 3.4) では、茎由来の HA 量は無視することとした。

3.3 葉生体重、茎生体重、および単位葉生体重あたりのヘマグルチニン含量の葉位別分布に栽植密度が及ぼす影響

400 plants m⁻²での第 5-6 葉、第 7-8 葉、第 9-10 葉、および第 11-葉の葉生体重は、100 plants m⁻²のそれと比較して有意に小さかった。葉生体重の平均値が最大である葉位は、100 plants m⁻²では第 9-10 葉であったのに対して、400 plants m⁻²では第 5-6 葉であり、栽植密度条件間で異なった (Fig. 13A)。400 plants m⁻²での第 1-2 葉、第 9-10 葉、および第 11-葉の茎生体重は、100 plants m⁻²でのそれと比較して有意に小さかったものの、400 plants m⁻²の第 5-6 葉の茎生体重は、100 plants m⁻²でのそれと比較して有意に大きかった。茎生体重の平均値が最大となった葉位は、100 plants m⁻²では第 7-8 葉であったのに対して、400 plants m⁻²では第 5-6 葉であり、栽植密度条件間で異なった (Fig. 13B)。

葉生体重が最大である葉位が栽植密度間で異なったことには、400 plants m⁻²では 100 plants m⁻²と比較して相互遮蔽が生じ始めるまでの日数が短かったことが関連していると考えられる。植物体間で相互遮蔽が生じ始める播種後日数は、100 plants m⁻²では約 27 日目であり、400 plants m⁻²では約 21 日目であった (Fig. 12)。播種後約 21 日目には第 5 本葉まで展開していることが目視で確認できる (Fig. 12)。相互遮蔽が生じると光受容体によるエチレン、オーキシン、ブラシノステロイド、およびジベレリン生合成抑制効果が減少し、茎および葉柄の伸長が促進される (Vandenbussche et al., 2005)。このため 400 plants m⁻²では、播種後約 21 日目以降に茎および葉柄の伸長が促進されたと考えられる。葉柄の伸長および隣接植物体への接触によって、400 plants m⁻²では第 5 本葉が立ち上がり、他の葉位の葉に先駆けて群落上面を覆うように成長したと考えられる。これにより、それより上位の葉の成長が抑制されたと考えられる。一方で 100 plants m⁻²では、相互遮蔽が生じ始めた播種後約 27 日目には第 7 本葉まで展開していたことにくわえて隣接植物体との距離が大きかったことで、下位葉による上位葉の成長抑制は生じなかったと考えられる。以上のことから 400 plants m⁻²での葉生体重が最大である葉位は、100 plants m⁻²のそれと比較して低く、第 5-6 葉位であったと考えられる。

400 plants m⁻²での第 9-10 葉および第 11-葉の単位生体重あたりの HA 含量は、100 plants m⁻²でのそれと比較して有意に小さかった。葉の単位生体重あたりの HA 含量の平均値が最大となった葉位は、100 plants m⁻²では第 11-葉であったのに対して、400 plants m⁻²では第 9-10 葉であり、栽植密度条件間で異なった。両栽植密度条件ともに上位葉（第 7-8 葉、第 9-10 葉、および第 11-葉）の単位生体重あたりの HA 含量は、下位葉（第 3-4 葉および第 5-6 葉）のそれと比較して大きい傾向にあった (Fig. 13C)。

上位葉の単位生体重あたりの HA 含量が下位葉のそれと比較して大きい傾向は、一過性遺伝子発現法による有用タンパク質生産で葉の単位生体重あたりのまたは可溶性タンパク質あたりの有用タンパク質含量の葉位別分布を調べた既往の報告 (Buyel and Fischer, 2012; Sheludko et al., 2007) と同様である。この傾向には、葉齢が小さい葉では葉齢が大きく成熟した葉と比較してタンパク質合成能力が大きいと考えられる細胞周期の細胞数が多い (Galbraith et al., 1983) ことが関係しているかもしれないという指摘 (Buyel and Fischer, 2012) がある。他方、興味深いことに、上位葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量でも、100 plants m⁻²でのそれは 400 plants m⁻²でのそれと比較して有意に大きいことが示された (Fig. 13C)。このことには、100 plants m⁻²での上位葉の葉生体重が 400 plants m⁻²でのそれと比較して有意に大きいこと (Fig. 13A) が関係しているかもしれない。

以上のように栽植密度によって、葉位別の葉生体重、茎生体重、または葉の単位生体重あたりの HA 含量が異なったのみならず、それらが最大となる葉位も異なることが明らかとなった。

3.4 単位栽培面積あたりのヘマグルチニン量および収穫物の単位生体重あたりのヘマグルチニン含量に栽植密度が及ぼす影響

地上部全体（第 3 葉以上の葉および茎）を収穫する場合の、単位栽培面積あたりの収穫物量、収穫物の単位生体重あたりの HA 含量、および単位栽培面積あたりの HA 量を算出した。400 plants m⁻²での単位栽培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く、約 2.1 倍であった

(Fig. 14A)。他方、400 plants m⁻²での収穫物の単位生体重あたりの HA 含量は、100 plants m⁻²でのそれと比較して有意に小さく、約 0.51 倍であった (Fig. 14B)。このため、それらの積である単位栽培面積あたりの HA 量には、400 plants m⁻²と 100 plants m⁻²の間には有意な差は認められず、同程度であった (Fig. 14C)。400 plants m⁻²での収穫物の単位生体重あたりの HA 含量が 100 plants m⁻²でのそれと比較して小さかったことは、以下の 3 点に起因する。第一に、有用タンパク質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である。400 plants m⁻²での茎生体重が収穫物生体重に占める割合は約 43%であり、100 plants m⁻²での約 26%より大きかった (Fig. 14A)。第二に、葉の単位生体重あたりの HA 含量が比較的大きい上位葉 (7-8 葉、9-10 葉、および 11-葉) が収穫物に占める割合が小さかったことである。400 plants m⁻²での上位葉生体重が収穫物生体重に占める割合は約 27%であり、100 plants m⁻²での約 49%より低かった (Fig. 14A)。これは、400 plants m⁻²での葉生体重が最大となる葉位は第 5-6 葉であったのに対して、100 plants m⁻²でのそれは第 9-10 葉であった (Fig. 13A) ことに起因する。第三に、上位葉の中でも、400 plants m⁻²での第 9-10 葉および第 11-葉の単位生体重あたりの HA 含量は、100 plants m⁻²でのそれと比較して有意に小さかった (Fig. 13C) ことである。これらのことから、一過性遺伝子発現法では、単位栽培面積あたりの収穫物生体重が大きような高栽植密度条件であっても、収穫物の単位生体重あたりの HA 含量は小さくなる可能性があり、結果として単位栽培面積あたりの HA 量が低栽植密度条件と比較して必ずしも大きくなるわけではないといえる。むしろ高栽植密度条件では、収穫物の単位生体重あたりの HA 含量が小さいことで HA の抽出および精製に要する費用の点で不利となる可能性がある。

次に、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の単位栽培面積あたりの収穫物量、収穫物の単位生体重あたりの HA 含量、および単位栽培面積あたりの HA 量を算出した。なお、葉のみを収穫することは、第 3 葉以上の葉をすべて収穫することに相当する。第 3 葉以上または第 5 葉以上を収穫する場合の 400 plants m⁻²での単位栽培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ものの、その他の場合では栽

植密度間に有意な差は認められなかった (Fig. 15A)。第 7 葉以上を収穫する場合を除いて、400 plants m⁻²での収穫物の単位生体重あたりの HA 含量は、100 plants m⁻²のそれと比較して有意に小さかった (Fig. 15B)。単位栽培面積あたりの HA 量は、いずれの場合も、栽植密度間に有意な差は認められなかった (Fig. 15C)。400 plants m⁻²での収穫物の単位生体重あたりの HA 含量が 100 plants m⁻²でのそれと比較して小さかったことは、おもに以下の 2 点に起因する。葉の単位生体重あたりの HA 含量が比較的高い上位葉 (7-8 葉、9-10 葉、および 11-葉) が収穫物に占める割合が 100 plants m⁻²では約 67%であったのに対して 400 plants m⁻²では約 48%であり低かったこと、および 400 plants m⁻²での第 9-10 葉および第 11-葉の単位生体重あたりの HA 含量が 100 plants m⁻²でのそれと比較して有意に小さかった (Fig. 13C) ことである。このように、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、収穫物の単位生体重あたりの HA 含量、および単位栽培面積あたりの HA 量のそれぞれについての栽植密度間での差の傾向は、茎を含めた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、本研究の条件では 100 plants m⁻²は 400 plants m⁻²と比較して一過性遺伝子発現法を用いた HA 生産に好適な栽植密度であることが示された。つまり、栽植密度が高いほど望ましい植物生産の場合とは異なり、HA 生産の場合には低栽植密度が望ましい場合があることが示された。しかしながら、栽植密度が低いほど HA 生産に好適であるとは限らず、また、必ずしも 100 plants m⁻²が最適な栽植密度であるとは限らない。本研究において 400 plants m⁻²での収穫物の単位生体重あたりの HA 含量が小さかった要因が植物体間での相互遮蔽に帰結されるならば、単位栽培面積あたりの収穫物生体重も考慮して、栽培および培養期間に植物体間で相互遮蔽が生じない範囲で最大の栽植密度が有用タンパク質生産に最適であるかもしれない。そのような栽植密度は、群落上面における光合成有効光量子束密度などの光環境要素や生産周期によって異なると考えられる。このため、任意の環境下での最適栽植密度を明らかにするためには、光環境要素と栽植密度が有用タンパク質生産に及ぼす影響を、交互作用を含めて調べる必要があると考える。

4. 結論

本章では、地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において、地上部全体を収穫する場合、葉のみを収穫する場合、または葉の中でも上位葉のみを収穫する場合に、収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位栽培面積あたりの有用タンパク質量に栽植密度が及ぼす影響を明らかにすることを目的として、100 plants m⁻²の低栽植密度条件、または400 plants m⁻²の高栽植密度条件で栽培・培養したベンサミアナタバコの、葉位別の葉生体重、茎生体重、および葉の単位生体重あたりのHA含量を調べた。

単位栽培面積あたりの収穫物生体重が大きいような高栽植密度条件であっても、単位栽培面積あたりのHA量が低栽植密度条件と比較して大きくなるとは限らないことが示された。むしろ高栽植密度条件では、収穫物の単位生体重あたりのHA含量が小さいことで、HAの抽出および精製に要する費用の点で不利となる可能性があることが示された。

このように本章では、栽植密度が高いほど望ましい植物生産の場合とは異なり、有用タンパク質生産の場合には低栽植密度が望ましい場合があることを示した。一過性遺伝子発現法を用いた有用タンパク質生産における栽植密度を決定する際には、葉または茎の生体重の葉位別分布および単位生体重あたりの有用タンパク質含量の葉位別分布に栽植密度が及ぼす影響を考慮する必要がある。

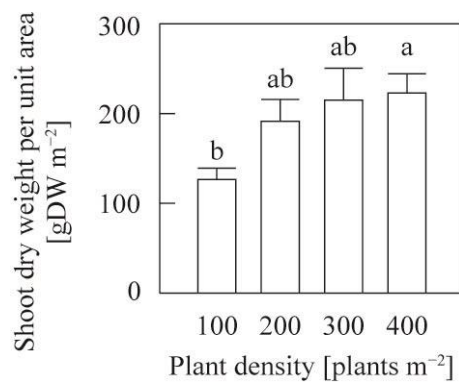


Fig. 9 Shoot dry weight per unit area of *N. benthamiana* plants grown for 35 days at a plant density of 100, 200, 300, or 400 plants m⁻². Vertical bars show standard errors of the mean ($n = 8$). Means labeled with different small letters mutually differ significantly at the 5% level, as determined using the Tukey's HSD test.

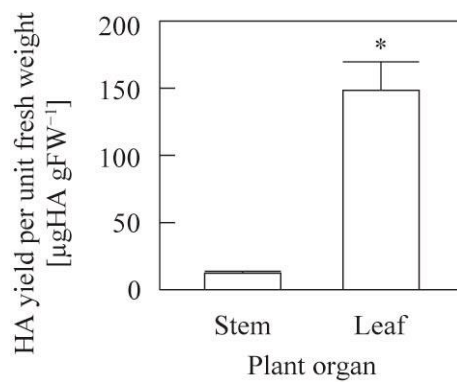


Fig. 10 Hemagglutinin (HA) yield per unit fresh weight of stem and leaf of *N. benthamiana* plants grown for 35 days, agro-infiltrated and incubated for 10 days. Leaves at leaf positions of 7–9 were harvested and homogenized. Vertical bars show standard errors of the mean ($n = 3$). Mean labeled with an asterisk (*) differs significantly from the other at the 5% level, as determined using Welch's test.

100 plants m⁻²



400 plants m⁻²



Fig. 11 *N. benthamiana* plants grown for 33 days at a plant density of 100 or 400 plants m⁻².

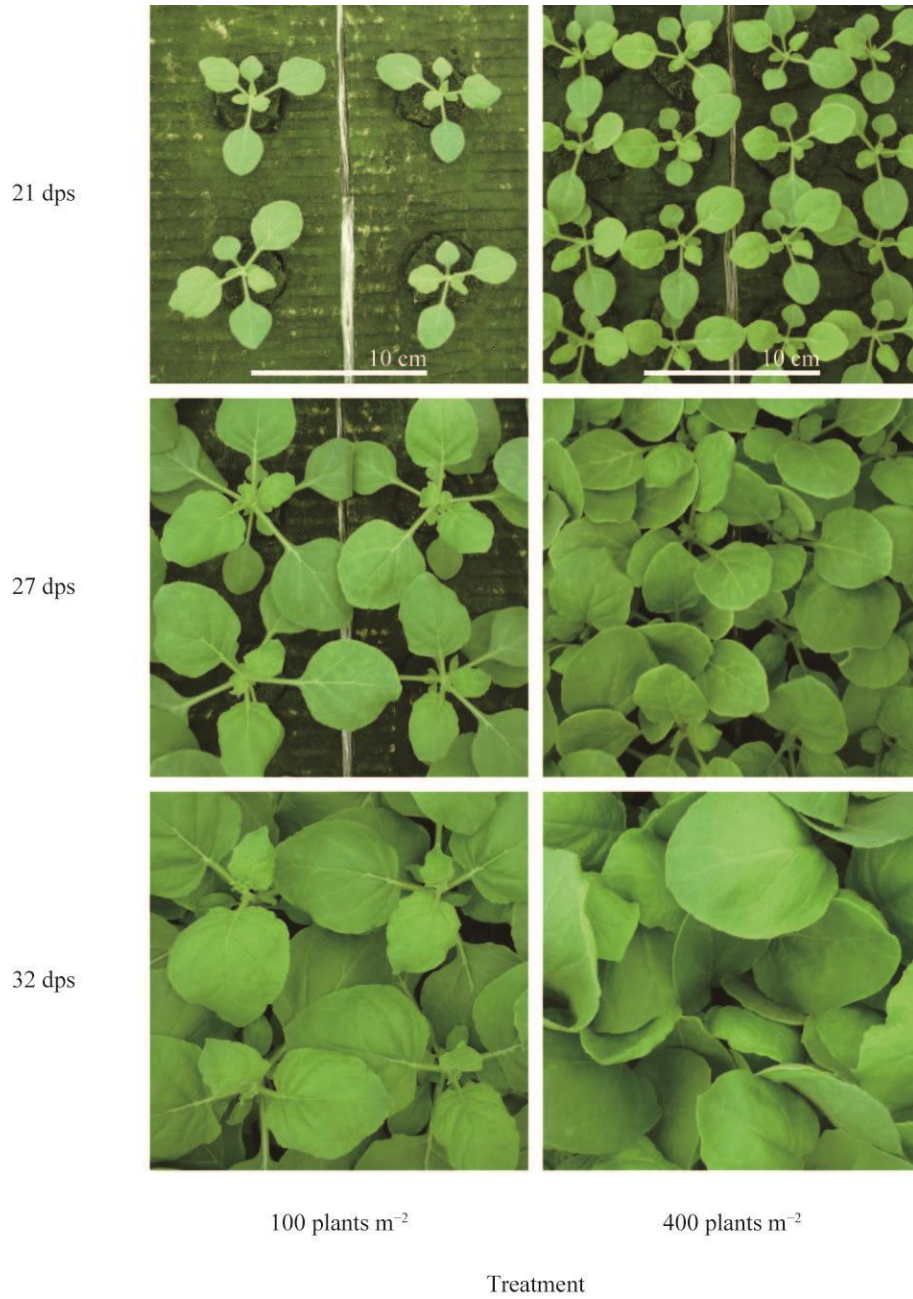


Fig. 12 *N. benthamiana* plants grown for 21, 27, or 32 days post seeding (dps) at different a plant density of 100 or 400 plants m⁻².

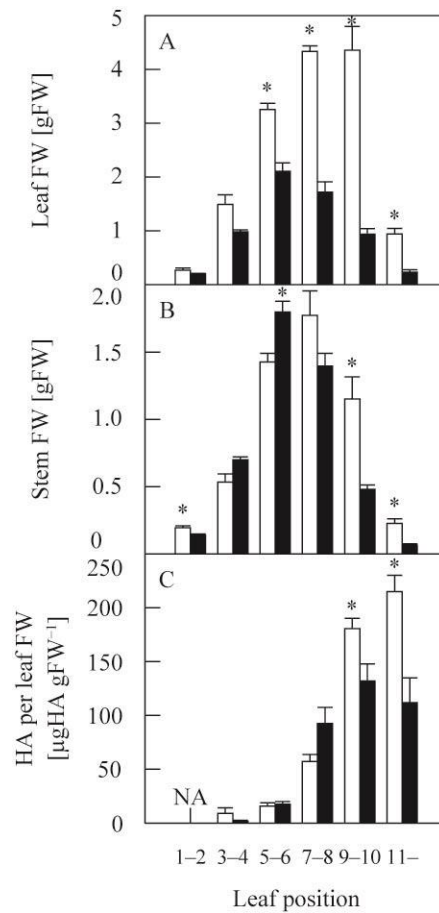


Fig. 13 Leaf fresh weight (FW) (A), stem FW (B) and hemagglutinin (HA) yield per leaf FW (C) at different leaf positions of *N. benthamiana* in plants grown for 33 days and incubated for 6 days at a plant density of 100 (white column) or 400 (black column) plants m^{-2} . Vertical bars show standard errors of the mean ($n = 4$). Means labeled with an asterisk (*) differ significantly from the other at the 5% level, as determined using Welch's test. NA means that no data are available.

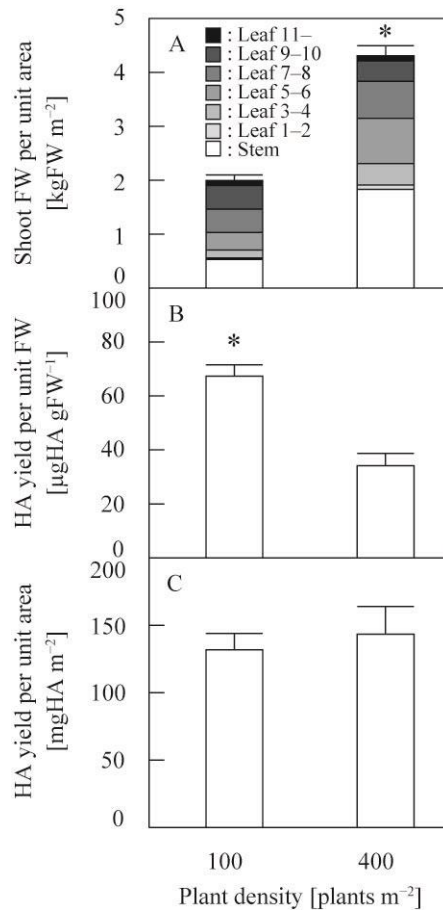


Fig. 14 Fresh weight (FW) of harvested portion per unit area (A), hemagglutinin (HA) yield per unit FW (B) and HA yield per unit area (C) in harvesting the aerial portion of shoot above the leaf position of 3 on *N. benthamiana* plants grown at a plant density of 100 or 400 plants m⁻². In FW of the harvested portion per unit area, columns of different colors mean FW of stem and FWs of leaves at different leaf positions. Vertical bars show standard errors of the mean ($n = 4$). Means labeled with an asterisk (*) differ significantly from the other at the 5% level, as determined using Welch's test.

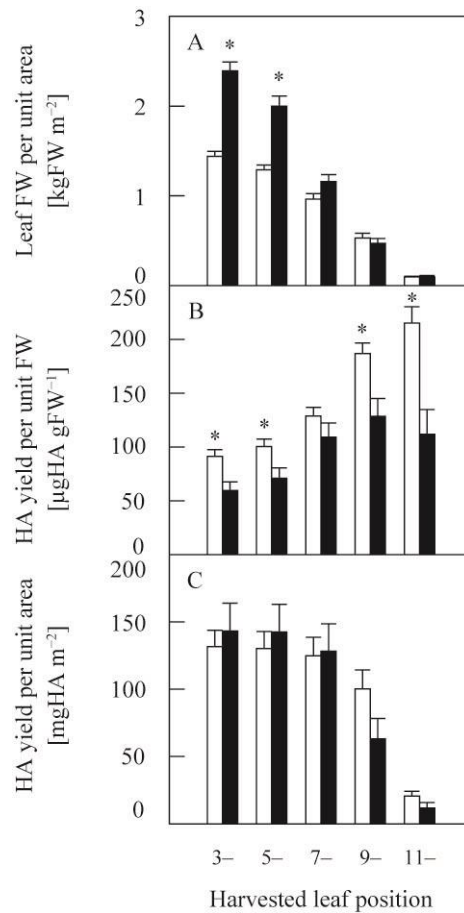


Fig. 15 Fresh weight (FW) of harvested portion per unit area (A), hemagglutinin (HA) yield per unit FW (B) and HA yield per unit area (C) in harvesting leaves above the leaf position of 3, 5, 7, 9, or 11 on *N. benthamiana* plants grown at plant density of 100 (white column) or 400 (black column) plants m⁻². Vertical bars represent standard errors of the mean ($n = 4$). Means labeled with an asterisk (*) differ significantly from the other at the 5% level, as determined using Welch's test.

第4章

切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法における
ハ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

1. 序論

遺伝子組換えアグロバクテリウムを利用した一過性遺伝子発現法による大規模有用タンパク質生産では一般に、植物体地上部全体に遺伝子導入を行い、約1週間の培養後にその植物体地上部全体あるいは多くの部分を収穫する。具体的には、特殊な大型機械を用いて複数の植物体を培地ごと上下反転させ、植物体地上部のみをアグロバクテリウム懸濁液に浸した後に減圧浸潤法によって植物体地上部に遺伝子組換えアグロバクテリウム懸濁液を浸潤（以後、遺伝子導入）させる。その後、植物体を培地ごと適切な環境下で培養し、有用タンパク質を葉内に蓄積させてから収穫する。この遺伝子導入の対象を、植物から切離した葉（以後、切離葉）とすることができれば、いくつかの利点が生じる。減圧浸潤法によって切離葉に遺伝子組換えアグロバクテリウムを導入して切離葉内に有用タンパク質を蓄積させる方法（Arzola et al., 2011; Joh et al., 2005; Jung et al., 2014; Kingsbury and McDonald, 2014; McDonald et al., 2014; Plesha et al., 2007; Plesha, 2008; Plesha et al., 2009; Simmons et al., 2009）では、植物体を支える培地がないことから、特殊な大型機械による上下反転操作は必要なく、また、収穫後の培地を滅菌し廃棄する必要もない。そればかりでなく、この方法では上位葉などの一部の葉を切離した後の植物を継続して栽培して脇芽を成長させることにより、次の有用タンパク質生産に用いる葉を生産するための母株として有効利用できる。植物体地上部に遺伝子導入を行う方法では、遺伝子導入ごとに新たに播種から栽培を行う必要があるため、期間あたりに有用タンパク質生産に利用できる葉は少なくなる。したがって、切離葉に遺伝子導入を行う方法では、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法と比較して単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量を大きくできる可能性がある。このように、切離葉を用いる方法は有用タンパク質生産の大規模化に適しているといえる。

切離葉を用いる方法では遺伝子導入後の培養において、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法とは異なる環境調節を行う工程が必要との報告（Plesha, 2008）がある。この報告では、遺伝子導入後の約1週間の培養では、しおれを防ぐために切離葉の周囲を高湿度に保つ必要があるとしている。またこの報告

では、培養中に葉内が嫌気状態となることを防ぐために、減圧浸潤法による遺伝子導入直後に切離葉を低湿度下に置いて、葉内に浸潤したアグロバクテリウム懸濁液中の水を蒸散させる必要があるとしている。具体的には、15秒間の減圧浸潤に対しては20分間程度の蒸散が、また1分間の減圧浸潤に対しては1時間程度の蒸散が行われなければ、有用タンパク質が切離葉にほとんど蓄積されないと報告されている。蒸散時間が短く切離葉内に残存するアグロバクテリウム懸濁液の水量（以後、残存懸濁液水量）が大きい場合には、培養中の切離葉の生理状態の悪化が有用タンパク質の蓄積に負の影響を及ぼすことが示唆されている（Plesha, 2008）。ところが、このようにアグロバクテリウム懸濁液の水を蒸散させる処理（以後、水除去処理）の持続時間が示されているものの、持続時間が単位生体重あたりの有用タンパク質含量に及ぼす影響は調べられていない。このため、単位生体重あたりで大きな有用タンパク質含量を得るための水除去処理の指標として処理の持続時間を用いることが妥当であるのかについてさえ不明である。そもそも、水除去処理の目的はアグロバクテリウム懸濁液の水を蒸散によって除去することである。これを考慮すると、切離葉に浸潤した懸濁液の水を水除去処理においてほぼ完全に除去することで、単位生体重あたりで大きな有用タンパク質含量を得られると考える。そのような水除去処理を行うためには、残存懸濁液水量の指標を水除去処理の指標として用いることが妥当であると考えられる。

そこで本研究では、切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法における遺伝子導入直後の水除去処理の指標を新たに設定し、それが単位生体重あたりの有用タンパク質含量に及ぼす影響を明らかにすることで、有用タンパク質生産に好適な水除去処理方法を提案することを目的とした。水除去処理の指標として、遺伝子導入前の切離葉の生体重に対する水除去処理終了時の生体重の比（以後、処理後相対生体重）を用いた。これは、処理終了時の残存懸濁液水量と正の相関があると考えられる値である。一過性遺伝子発現法として、プラスミド magnICON を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムをベンサミアナタバコに導入する magnifection 法（Gleba et al., 2005）を用いた。また、モデルタンパク質として HA を用いた。また、切離葉に遺伝子導入を行う方法で植物体地上部に遺伝子導入を行う方法と同程度の単位生体重あたりの HA 含量を得ら

れるかについて検証するために、植物体から切離されていない葉（以後、非切離葉）の単位生体重あたりの有用タンパク質含量と切離葉のそれを比較した。**magniflection** 法を用いた一過性遺伝子発現法において、HA 蓄積量が遺伝子導入後 6 日目に最大値となったとの報告 (Matsuda et al., 2012) があることから、本研究では遺伝子導入後 6 日目における単位生体重あたりの HA 含量を評価することとした。

2. 材料および方法

2.1 供試植物および生育条件

播種後 2 週目からは、約 74 plants m⁻² の栽植密度でベンサミアタバコを栽培した。その他の条件は、第 3 章 2.1 と同様とした。

2.2 遺伝子組換えアグロバクテリウム

第 2 章 2.2 と同様とした。

2.3 切離葉の取得および遺伝子導入

播種後 5 週目のベンサミアタバコから、第 9 葉または第 10 葉を切離し、6 枚の第 9 葉位切離葉および 10 枚の第 10 葉位切離葉を得た。切離直後に、遺伝子導入前の生体重 (FW_{pre}) を測定した。ポリカーボネート製真空デシケーター (300G; As One, Osaka, Japan) 内に置いたポリプロピレン製容器 (B-315; Iwasaki Industry, Nara, Japan; $\Phi 182$ mm \times 141 mm high) 内に、第 2 章 2.3 と同様にして得た遺伝子組換えアグロバクテリウム懸濁液 2.3 L を満たした。切離葉をアグロバクテリウム懸濁液に浸した後に、Matsuda et al. (2012) の方法に従って、真空ポンプ (DA-20D; Ulvac, Kanagawa, Japan) を用いて減圧浸潤法によって切離葉にアグロバクテリウム懸濁液を浸潤させた。

一方、播種後 5 週目のベンサミアタバコのうち 4 植物体の第 10 葉 4 枚を、

植物体から切り離さない非切離葉として実験に用いた。これら 4 植物体の地上部にも、減圧浸潤法によってアグロバクテリウム懸濁液を浸潤させた。4 枚の第 10 葉位非切離葉の FW_{pre} はいずれも、10 枚の第 10 葉位切離葉の FW_{pre} の平均値と同値とした。

2.4 水除去処理

遺伝子導入直後に水除去処理を行った。水除去処理は、除湿空気を通気した透明アクリル製チャンバ (321 mm wide × 232 mm long × 223 mm high; Fig. 17A) 内に静置したステンレス製網棚上に複数の切離葉を置き、最大 4.4 h 静置することで行った。エアーポンプ (APN-110R; Iwaki, Tokyo, Japan) から排出された空気を乾燥シリカゲルを通過させることで得た除湿空気 (相対湿度: 約 10%) を、チャンバ内に連続通気した。通気により、チャンバ内相対湿度は 10–40% であった。水除去処理中は、チャンバ外側上方に設置したツイン型白色蛍光灯 (FPL55EX-N; Iwasaki electric, Tokyo, Japan) を用いて、切離葉に光を照射した。切離葉面における PPF_D は $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。水除去処理中のチャンバ内気温は 26°C であった。

切離葉ごとに水除去処理の時間を 0.7–4.4 h の範囲で変えることで、処理後相対生体重が $0.94\text{--}1.28 \text{ gFW gFW}^{-1}$ で異なる複数の切離葉を得た。処理後相対生体重 (RFW) は、 FW_{pre} に対する水除去処理終了時の切離葉生体重 (FW_{post}) の比である。

一方で、葉を切離せずに遺伝子導入を行った 4 植物体を、4 h ほど室内に静置することで非切離葉の水除去処理とした。4 枚の非切離葉の FW_{post} は、それぞれの FW_{pre} と同値とした。すなわち、非切離葉の RFW は 1 とした。

2.5 水除去処理後の培養

水除去処理終了直後の切離葉の葉柄端を切除した後に、切離葉生体重 (FW_{cut}) を測定し、6 日間の培養に供した。切離葉の培養を、内部に加湿空気を連続導入した透明アクリル製チャンバ (200 mm wide × 200 mm long × 250

mm high; Fig. 17B) 内で行った。切離葉の葉柄端をウレタンフォームで巻き、チャンバ内底面に入れた 30 mg L⁻¹ リファンピシン水溶液 1 L に沈めたポリスチレン製プラグトレイ (P-128; Takii, Kyoto, Japan; cut to the size of 170 mm wide × 170 mm long × 35 mm high) のセル内に、ウレタンフォームを挿した。エアープンプ (APN-110R, Iwaki, Tokyo, Japan) から排出された空気を加湿瓶に通すことで得た加湿空気を、チャンバ内に連続導入した。加湿空気を導入することによるチャンバの換気回数は 15 h⁻¹ であり、チャンバ内相対湿度は 90% 以上であった。培養中は、チャンバ上方に設置したツイン型白色蛍光灯 (FPL55EX-N; Iwasaki electric, Tokyo, Japan) を用いて、切離葉に光照射を行った。第 2 章 2.4 と同様の理由により、PPFD 100 μmol m⁻² s⁻¹ および気温 20°C の条件で培養を行うこととした。明暗周期は 16/ 8 h とし、明期時の切離葉面における PPFD は 100 μmol m⁻² s⁻¹ であった。培養中のチャンバ内気温は 20–21°C であった。

一方、葉を切離せずに遺伝子導入を行った 4 植物体を、加湿空気を導入しないグロースチャンバ (MIR-553; Sanyo Electric, Osaka, Japan) 内に静置することで、非切離葉の 6 日間の培養を行った。非切離葉の培養中における気温、明暗周期、および葉面 PPFD は、切離葉の培養中のそれらと同様とした。明期の相対湿度は約 62%、暗期の相対湿度は約 83% であった。これらの 4 植物体をトレイに載せ、水道水を常時底面灌水した。4 枚の非切離葉の FW_{cut} は、それぞれの FW_{pre} または FW_{post} と同値とした。

6 日間の培養後、切離葉と切離後の非切離葉の生体重 (FW_6) を測定し、HA 量および可溶性タンパク質 (TSP) 量定量に供した。

2.6 ヘマグルチニン量および可溶性タンパク質量の定量

切離葉および非切離葉から生体重にして約 0.5 g を切り出した部分の HA 量および TSP 量を、それぞれ ELISA 法またはブラッドフォード法によって定量した。磨砕および ELISA 法は、使用した 50 mmol L⁻¹ リン酸ナトリウムバッファ (pH 7.0) の体積が、切り出した部分の生体重の 9 倍量であった以外は、第 3 章 2.6 と同様とした。磨砕液に Triton X-100 を加えずに 15,000×g、4°C で 15

分間遠心して得た上清をブラッドフォード法に供した。ブラッドフォード法は、プロテインアッセイ染色試薬 (500-0006; Bio Rad Laboratories, CA, USA) およびウシ血清アルブミン (A7638; Sigma Aldrich, MO, USA) を用いて行った。磨砕液中の HA 濃度を定量後、それを葉の単位生体重あたりの HA 含量および葉の単位生体重あたりの TSP 含量に換算した。

2.7 処理後相対生体重および葉あたりのヘマグルチニン含量算出

水除去処理終了後の葉柄端切除後の生体重 (FW_{cut}) には RFW の影響が含まれているため、 FW_{cut} を RFW で除することで遺伝子導入前の生体重に換算した生体重 (FW_0) を求めた。非切離葉の場合、 $RFW = 1$ としたため、 $FW_0 = FW_{\text{pre}} = FW_{\text{post}} = FW_{\text{cut}}$ である。 FW_6 を FW_0 で除することで、葉成長の指標である培養後相対生体重を算出した。

葉の単位生体重あたりの HA 含量または葉の単位生体重あたりの TSP 含量に、培養後相対生体重および切離葉 16 枚の平均 $FW_0 = 2.8$ を乗じることで、葉あたりの HA 含量および葉あたりの TSP 含量を算出した。

2.8 統計処理

単位生体重あたりの HA 含量および葉あたりの HA 含量を、処理後相対生体重に対して最小二乗法によって単回帰し、回帰直線の作成、調整済み決定係数 (r^2) の算出、および P 値の算出を行った。統計処理には、統計処理ソフトウェア R のパッケージである stats 内の関数 `lm()` を用いた。

3. 結果および考察

切離葉の単位生体重あたりの HA 含量は、水除去処理後に切離葉内に残存するアグロバクテリウム懸濁液水量の指標である処理後相対生体重 (RFW) が大きいほど小さかった (Fig. 18A)。培養中の葉成長の指標である培養後相対生体重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

(Fig. 18B)。このため切離葉の葉あたりの HA 含量は、単位生体重あたりの HA 含量と同様に処理後相対生体重が大きいほど小さかった (Fig. 18C)。一方で、切離葉の単位生体重あたりの TSP 含量および葉あたりの TSP 含量のどちらにも、処理後相対生体重による影響は認められなかった (Fig. 18D, E)。処理後相対生体重が 1.0 であることは、水除去処理後に切離葉内にアグロバクテリウム懸濁液の水がほとんど残存していないことを意味する。このことは、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、その抑制の程度は残存懸濁液水量が大きいほど大きいことを示唆している。処理後相対生体重を指標としてそれが 1.0 近傍となるまで水除去処理を行うことで、単位生体重あたりまたは葉あたりで大きな HA 含量を得られることが明らかとなった。培養後相対生体重および TSP 量が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とは、水除去処理後に切離葉内に残存する懸濁液水は HA 蓄積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。

他方、切離葉に遺伝子導入を行う方法で植物体地上部に遺伝子導入を行う方法と比較して同程度の単位生体重あたりの HA 含量を得られるかについて調べるために、それぞれの方法で得られた切離葉または非切離葉の単位生体重あたりの HA 含量および葉あたりの HA 含量を比較した。処理後相対生体重が約 1.0 の切離葉の単位生体重あたりの HA 含量の最大値は、非切離葉の単位生体重あたりの HA 含量の平均値の約 95%であり同程度であった (Fig. 18A)。しかしながら、葉あたりの HA 含量では、切離葉のそれと非切離葉のそれとの間の差は大となり、切離葉の葉あたりの HA 含量の最大値でも非切離葉のその平均値の約 84%であった (Fig. 18C)。このことは、培養中の葉成長の指標である培養後相対生体重に関して、切離葉のそれは非切離葉のそれと比較して小さい傾向にあった (Fig. 18B) ことに示されるように、切離葉では葉の切離によって葉成長が抑制されたことに起因する。以上のように、本研究の条件では、水除去処理においてアグロバクテリウム懸濁液の水をほぼすべて蒸散させたとしても、切離葉に遺伝子導入を行う方法での葉あたりの HA 含量は、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法のそれと比較して小さい傾向にあった。

培養中の切離葉の葉成長は、葉成長に好適なように培養環境を調節すること

で増大する可能性がある。本実験では相対湿度以外の環境要素を、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法と同様、すなわち PPF D を第 2 章 2.4 に述べた理由により $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とし、培養容器内 CO_2 濃度を外気 CO_2 濃度とした。これらの環境要素の値を高めることで切離葉の葉成長を促進でき、切離葉の葉あたりの HA 含量を増大できるかもしれない。

本研究によって水除去処理後に葉内に残存する懸濁液水が有用タンパク質量の蓄積を抑制することが示唆されたものの、そのメカニズムは不明である。遺伝子組換えアグロバクテリウムを利用した一過性遺伝子発現法は、アグロバクテリウムによる植物細胞への遺伝子導入、導入された遺伝子の転写、翻訳、細胞間移行、および有用タンパク質の代謝などの一連の反応を含む。残存懸濁液水がこれらの反応に及ぼす影響を解析することで、切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において安定的に大きな単位生体重あたりの有用タンパク質含量を得るためのより詳細な条件を見出すことが可能となると考える。

4. 結論

本章では、切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法における遺伝子導入直後に切離葉内に浸潤したアグロバクテリウム懸濁液の水を蒸散によって除去する水除去処理の指標を新たに設定し、それが単位生体重あたりの有用タンパク質含量に及ぼす影響を明らかにすることで、有用タンパク質生産に好適な水除去処理方法を提案することを目的とした。水除去処理の指標として、遺伝子導入前の切離葉の生体重に対する水除去処理終了時の生体重の比（以後、処理後相対生体重）を用いた結果、処理後相対生体重が 1.0 近傍となるまで水除去処理を行うことで、単位生体重あたりまたは葉あたりで大きな HA 含量を得られることが明らかとなった。また、そのような適切な水除去処理を行った場合には、切離葉の単位生体重あたりの HA 含量を非切離葉のそれと比較して同程度まで高めることができた。このように本章では、切離葉に遺伝子導入を行う方法を用いた実用レベルの有用タンパク質生産技術の確立に寄与する知見を得た。

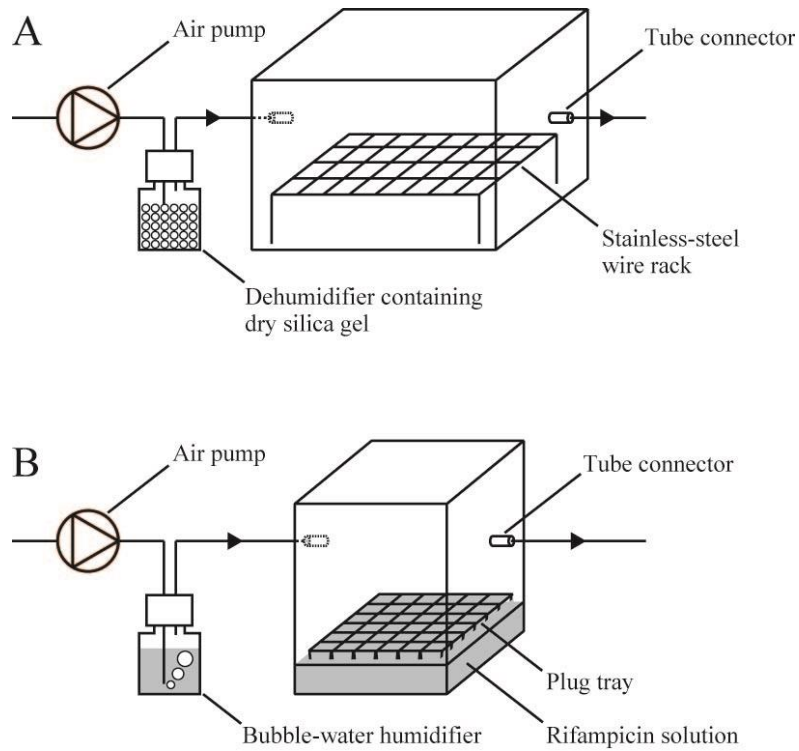


Fig. 16 Schematic diagram of equipment and diagrammatic illustrations of dehumidified chambers used for detached *N. benthamiana* leaves in the transpiration process (A) and a schematic diagram of equipment and diagrammatic illustrations of humidified chambers used for detached leaves in the incubation process (B). Arrows show the direction of airflow.

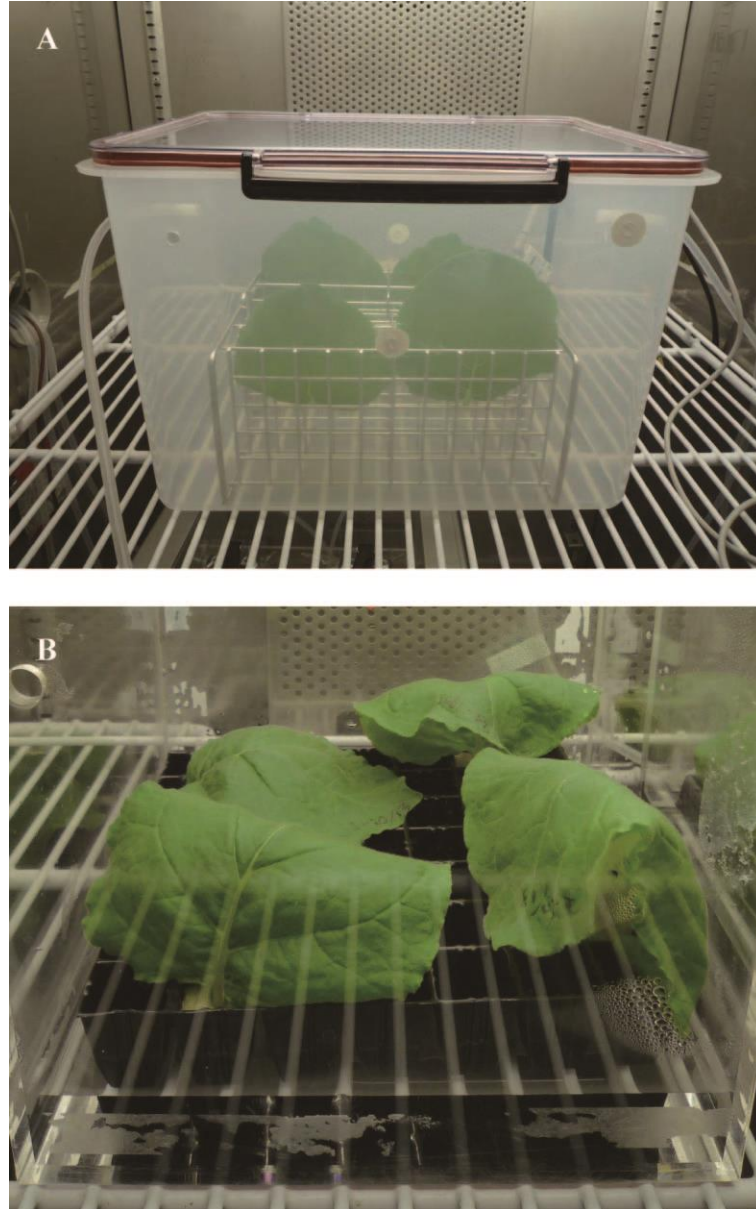


Fig. 17 Detached *N. benthamiana* leaves in the humidified chamber during the transpiration process (A) and in the humidified chamber during the incubation process (B). During the transpiration process, detached leaves were set on stainless steel wire racks inside the humidified chamber. During the incubation process, petioles of detached leaves were covered with flexible urethane foam that had been inserted into cells of a plug tray submerged in 1 L of 30 mg L⁻¹ rifampicin solution.

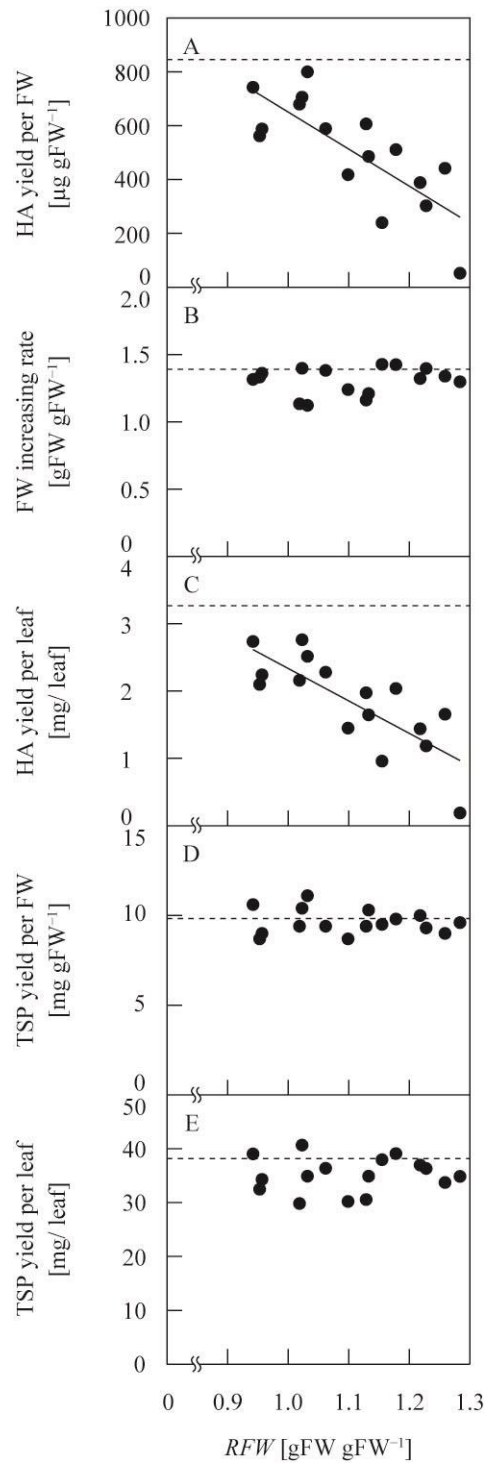


Fig. 18 Correlation of residual agrobacterium suspension remained in detached leaf tissue (RFW) with hemagglutinin (HA) yield per unit fresh weight (FW) (A), leaf FW increasing rate in incubation process (B), HA yield per leaf (C), total soluble protein (TSP) yield per unit FW (D) and TSP yield per leaf (E) of detached *N. benthamiana* leaves. Linear regression analysis was performed to analyze the correlation: $r^2 = 0.57$ and $P < 0.001$ (A) and $r^2 = 0.59$ and $P < 0.001$ (B). Dashed lines represent the mean values of intact leaves of whole plants ($n = 4$).

第5章

切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法における
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

1. 序論

前章の研究では、切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において、遺伝子導入直後に葉内のアグロバクテリウム懸濁液の水を蒸散させる処理（以後、水除去処理）が、切離葉の単位生体重あたりの HA 含量および葉あたりの HA 含量に及ぼす影響を調べた。その結果、水除去処理の指標である処理後相対生体重が 1.0 近傍となるまで水除去処理を行うことで、単位生体重あたりで大きな HA 含量を得られることが明らかとなった。他方、切離葉の培養中の葉成長の指標である培養後相対生体重は、非切離葉のそれと比較して小さい傾向であり、それに伴い葉あたりの HA 含量も小さい傾向であった。切離葉では、葉を植物体から切り離したことによって培養中の葉成長が抑制されていたと考えられる（第 4 章）。このため、葉あたりの有用タンパク質含量を大きくするためには、切離葉培養中に葉の成長を促進するような環境調節が必要であると考えられる。

葉面における PPF_D があるレベルに到達するまでは、一般に PPF_D が高いほど葉の純光合成速度は大きくなる。同様に、培養中の PPF_D 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。他方、葉あたりの有用タンパク質含量を構成するもう 1 つの要素である単位生体重あたりの有用タンパク質含量も、培養中の切離葉面における PPF_D を高めることで大きくなる可能性が高いと考える。遺伝子導入後の有用タンパク質の大量合成は、植物細胞内のエネルギーを大量に消費すると考えられる。このため、光照射に伴う光化学反応によってエネルギー供給が行われることで有用タンパク質合成が促進される可能性は高い。

しかしながら、切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において、PPF_D が単位生体重あたりの有用タンパク質含量および葉あたりの有用タンパク質含量に及ぼす影響に関する研究はほとんど見あたらない。多くの研究 (Arzola et al., 2011; Jung et al., 2014; Kingsbury and McDonald, 2014; Plesha et al., 2007; Plesha, 2008; Plesha et al., 2009) では、PPF_D が有用タンパク質生産に及ぼす影響が検討されないままに、暗黒、すなわち葉面における PPF_D が $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で切離葉が培養されている。このため、培養中の PPF_D が単位

生体重あたりの有用タンパク質含量および葉あたりの有用タンパク質含量に及ぼす影響を調べ、有用タンパク質生産に好適な PPFD のレベルを指摘することの意義は大きい。

そこで本章では、切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において有用タンパク質生産に好適な培養中の PPFD レベルを明らかにすることを目的として、切離葉の葉成長、単位生体重あたりの有用タンパク質含量、および葉あたりの有用タンパク質含量に培養中の PPFD が及ぼす影響を調べた。葉成長の指標として、培養前の生体重または乾物重に対する培養後の生体重または乾物重の比（以後、培養後相対生体重または培養後相対乾物重）を用いた。暗黒 (PPFD: $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) および第 4 章で適用した培養中の PPFD $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を含むように、培養中の切離葉面における PPFD が 0、50、100、または $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ である試験区を設定した。一過性遺伝子発現法として、プラスミド magnICON を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムをベンサミアナタバコに導入する magnifection 法 (Gleba et al., 2005) を用いた。また、モデルタンパク質として HA を用いた。magnifection 法を用いた一過性遺伝子発現法において、HA 蓄積量が遺伝子導入後 6 日目に最大値となったとの報告 (Matsuda et al., 2012) があることから、本研究では遺伝子導入後 6 日目における単位生体重あたりの HA 含量を評価することとした。

2. 材料および方法

2.1 供試植物および育成条件

第 4 章 2.1 と同様とした。

2.2 遺伝子組換えアグロバクテリウム

第 2 章 2.2 と同様とした。

2.3 切離葉の取得および遺伝子導入

播種後 5 週目のベンサミアナタバコから、第 9 葉または第 10 葉を切離し、8 枚の第 9 葉位切離葉および 8 枚の第 10 葉位切離葉を得た。その他の条件は、第 4 章 2.3 と同様とした。遺伝子導入前の生体重 (FW_{pre}) を測定した。また、遺伝子導入に供する切離葉以外で、8 枚の第 9 葉および 8 枚の第 10 葉を準備し、第 3 章 2.5 と同様にして、切離葉の生体重および乾物重を測定し、遺伝子導入前の乾物率を算出した。

2.4 水除去処理

水除去処理によって、処理後相対生体重 (RFW) が $1.04\text{--}1.10 \text{ gFW gFW}^{-1}$ である切離葉を用意した。水除去処理後の生体重 (FW_{post}) を測定した。水除去処理の時間は、 $1.3\text{--}4.0 \text{ h}$ であった。チャンバ内気温は約 25°C とし、相対湿度は $21\text{--}53\%$ であった。それ以外の条件は、第 4 章 2.4 と同様とした。

2.5 水除去処理後の培養

培養中のしおれを防ぐために葉柄からの吸水を促す目的で、水除去処理終了直後の切離葉の葉柄の先端を切除した後に、切離葉生体重 (FW_{cut}) を測定し、6 日間の培養に供した。上面が透明ポリスチレン製のポリプロピレン製チャンバ (Inner volume of 20.7 L; outer size of 456 mm wide \times 364 mm long \times 165 mm high) 内で培養を行った。加湿瓶によって加湿された空気を流量 1.39 mmol s^{-1} ($= 2.0 \text{ L min}^{-1}$) でチャンバ内に導入した。蓋に直径 5 mm の穴を開けたスチロール製丸型ケース (Size of $\Phi 78 \text{ mm} \times 24 \text{ mm high}$) 内に 30 mg L^{-1} カナマイシン水溶液を満たし、そこに切離葉の葉柄を浸し、木片に固定したアクリル製棒上に葉身を載せた。チャンバあたり 4 枚の切離葉を静置し、4 チャンバをそれぞれ異なる光環境下に置いた (Fig. 19)。4 つのチャンバのうち 3 つのチャンバ上面に、白色 LED (NSPW310DS-b2w; Nichia, Tokushima, Japan) を千鳥状に配置した LED パネル (Fig. 20) をそれぞれ設置した。直流電源装置 (PMC70-1A

または PAS60-6; Kikusui Electronics, Kanagawa, Japan) を用いて各 LED パネルに異なる電圧を印加することで、切離葉面における PPFD が 0 (以後、暗黒区)、50 (以後、P50 区)、100 (以後、P100 区)、および $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (以後、P500 区) となる 4 試験区を設定した。明暗周期は 16/ 8 h とし、すべての試験区の葉温は明期、暗期とも $19.1\text{--}20.5^\circ\text{C}$ であった。チャンバ内の相対湿度は、P500 区以外の試験区では明期、暗期とも約 100% であったが、P500 区では明期約 88%、暗期約 100% であった。

切離葉の培養中の純光合成速度を測定するための開放型同化箱システム (Fig. 21) を作製した。エアーポンプ (APN-110R, Iwaki, Tokyo, Japan) で、外気をソーダライム入りの瓶に送り CO_2 濃度が約 $0 \mu\text{mol mol}^{-1}$ の空気を作成し、それに 100% CO_2 ガスを混合することで、 CO_2 濃度を $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ に調節した空気を得た。各チャンバへの空気流入速度 (Q) を、マスフローコントローラー (MODEL3650, Kojima Instruments, Tokyo, Japan) およびマスフローコントローラー制御・表示器 (CR-300, Kojima Instruments, Tokyo, Japan) を用いて制御した。流入空気および 4 つの同化箱からの流出空気には、それぞれシリカゲル入りの瓶を通過させることで除湿した。シリカゲル入りの瓶を通過した空気は三方電磁弁に送られた。三方電磁弁の開閉タイミングは、マイクロコントローラー (Arduino Uno R3; Arduino, Italy) およびマイクロコントローラー-PC 間通信・計算アプリケーション (Processing; Ben Fry and Casey Reas) を用いて制御した。それぞれの空気を別々のタイミングで非分散形赤外線ガス分析計 (ZRH; Fuji Electric, Tokyo, Japan) に送ることで、4 つの同化箱 ($i = 1\text{--}4$) の流出空気中 CO_2 濃度 ($C_{s,i}$) [$\mu\text{mol mol}^{-1}$] およびそれぞれに対応する流入空気中 CO_2 濃度 ($C_{r,i}$) [$\mu\text{mol mol}^{-1}$] を測定した。それぞれの空気を非分散形赤外線ガス分析計で測定する順番は、 $C_{r,1}$ (2 min) \rightarrow $C_{s,1}$ (3 min) \rightarrow $C_{r,2}$ (2 min) \rightarrow $C_{s,2}$ (3 min) \rightarrow $C_{r,3}$ (2 min) \rightarrow $C_{s,3}$ (3 min) \rightarrow $C_{r,4}$ (2 min) \rightarrow $C_{s,4}$ (3 min) であり、1 サイクルを計 20 分とし、これを終日繰り返した。すなわち、チャンバ 1 個につき 3 h^{-1} の頻度で C_r および C_s を PC に送信し、通信・計算アプリケーションによって $C_{r,i}$ 、 $C_{s,i}$ 、および Q から以下の式でチャンバあたりの純光合成速度 ($P_{n,i}$) を算出した。

$$P_{n,i} = \frac{(C_r - C_s) \times P \times Q}{R \times T}$$

ここで、 P : 気圧、 R : 気体定数、 T : 気温である。

培養中のチャンバあたりの純光合成速度 ($P_{n,i}$) 経時変化を用いて、明期中の各チャンバあたりの純光合成速度の日平均値 ($P_{n,i(\text{light})d}$; $d = 1-5$; 以後、明期中純光合成速度) および暗期中の各チャンバあたりの純光合成速度の日平均値 ($P_{n,i(\text{dark})d}$; $d = 1-5$; 以後、暗期中純光合成速度) を算出した。 $P_{n,i(\text{light})d}$ および $P_{g,i(\text{dark})d}$ を用いて、培養開始 1 日目から 5 日目までの積算 CO_2 同化量を算出した。

6 日間の培養後、切離葉の培養後生体重 (FW_6) を測定し、主葉脈に沿って 2 分割し、片方は乾物重測定のための乾燥に、もう片方は HA 量および TSP 量の定量に供した。乾燥に供した部位は、内部気温を 80°C とした乾燥炉 (DX400; Yamato Scientific, Tokyo, Japan) 内で 3 日間乾燥させた後、培養後乾物重 (DW_6) を測定した。

2.6 ヘマグルチニン量の定量

第 3 章 2.6 と同様に磨砕液中の HA 濃度を定量した後に、葉の単位生体重あたりの HA 含量に換算した。

2.7 葉あたりのヘマグルチニン含量、培養後相対生体重、培養後相対乾物重、および乾物率算出

第 4 章 2.7 と同様にして、 FW_{cut} を遺伝子導入前のものに換算した生体重 (FW_0)、葉成長の指標である培養後相対生体重、および葉あたりの HA 含量を得た。葉あたりの HA 含量算出の際には、切離葉 16 枚の平均 $FW_0 = 3.8$ を用いた。

葉位に応じた遺伝子導入前の乾物率を FW_0 に乗じることで、遺伝子導入前のものに換算した乾物重を算出した。培養後の乾物重を遺伝子導入前のものに換算した乾物重で除することで、葉成長の指標である培養後相対乾物重を算出

した。また、培養後の生体重を培養後の乾物重で除することで、培養後の乾物率を算出した。

2.8 統計処理

試験区間での測定項目の平均値の差を、Tukey の HSD 検定により有意水準 5% で検定した。統計処理には、統計処理ソフトウェア R のパッケージである agricolae (De Mendiburu, 2009) 内の関数 HSD.test() を用いた。

3. 結果および考察

光照射区 (P50, P100, P500) の単位生体重あたりの HA 含量は、PPFD をが大きいほど大きい傾向であった (Fig. 22A)。それらは、暗黒区 (P0) の単位生体重あたりの HA 含量と比較して大きい傾向にあり、また、P500 のそれは P0 のそれと比較して有意に大きく約 5.6 倍であった (Fig. 22A)。葉成長の指標である培養後相対生体重に関しては、P50 のそれは 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 (Fig. 22B)。結果として、光照射区 (P50, P100, P500) の葉あたりの HA 含量は P0 のそれと比較して大きい傾向にあった (Fig. 22C)。これらの結果から、本研究で調べた範囲では培養中の PPFD が高いほど単位生体重あたりおよび葉あたりで大きい有用タンパク質含量を得られるといえる。ただし、P50 の HA 含量は P0 のそれと比較して、単位生体重あたりでは約 3.6 倍、葉あたりでは約 4.4 倍であった (Fig. 22A, C) ことから、PPFD が $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度の比較的低い PPFD レベルであっても HA 含量増大効果があるといえる。また、P50 と P500 間の HA 含量の差は、P0 と P50 の HA 含量の差と比較して小さい傾向にあった (Fig. 22A, C)。これらの結果から、HA 含量を増大させる目的での培養中における PPFD は $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で十分であるといえる。

PPFD が高いほど切離葉の純光合成速度は高くなり、切離葉の成長速度も大きくなるとの予想に反して、光照射区 (P50, P100, P500) では、PPFD が高いほど培養後相対生体重は小さい傾向にあった (Fig. 22B)。一方で、PPFD が高

いほど積算 CO₂ 同化量は大きく (Table 1)、培養後相対乾物重も大きい傾向にあった (Fig. 22D)。このような PPF_D に対する培養後相対生体重の傾向と PPF_D に対する培養後相対乾物重の傾向の不一致は、PPFD が高い区ほど大きかった。実際に、PPFD が高い区ほど乾物率が大きい傾向にあった (Fig. 22E)。植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法では、条件によっては有用タンパク質蓄積葉に蓄積によるストレスに起因すると考えられる壊死が発生することが報告されており (Hamorsky et al., 2015; Matsuda et al., 2012)、実際に本実験でも、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 (Fig. 23) ことから、P500 の切離葉では HA の蓄積がストレスとなっていたと推察する。このような壊死が、乾物率増大の要因の 1 つであると推察する。P500 の明期中の純光合成速度が、遺伝子導入後 2 日目から急激に低下している (Fig. 24) ことも、このような壊死に起因すると推察する。一過性遺伝子発現法において、壊死が発生しない糖鎖修飾となるように改変した遺伝子を導入することで生体重あたりの有用タンパク質量が 2 倍以上増大したという報告 (Hamorsky et al., 2015) があることから、P500 では壊死によって HA の蓄積が抑制された可能性も考えられる。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推察されるものの、その詳細は不明である。

培養中に暗黒下に置いた切離葉でも光照射下に置いた切離葉と同程度の単位生体重あたりの有用タンパク質含量が得られたという報告 (McDonald et al., 2014; Plesha et al., 2007; Plesha, 2008) とは異なり、本実験では、暗黒区の切離葉の単位生体重あたりの HA 含量および葉あたりの HA 含量はどちらも、光照射区のそれらと比較して小さい傾向にあった (Fig. 22A, C)。暗黒下では、約 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の PPF_D 下と比較して遺伝子組換えアグロバクテリウムによる植物細胞核への遺伝子導入効率が低かったとの報告 (Zambre et al., 2003) があることから、本研究においては暗黒下では光照射下と比較してアグロバクテリウムによる遺伝子導入効率が低下していたのかもしれない。

4. 結論

切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において、培養中 PPF_D が大きいほど単位生体重あたりおよび葉あたりで大きな HA 含量が得られることが示された。また、PPFD 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (暗黒条件) と PPF_D 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ での HA 含量の差は、PPFD 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と PPF_D 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ での HA 含量の差と比較して小さい傾向にあった。これらの結果から、単位生体重あたりおよび葉あたりで大きな有用タンパク質含量を得るためには培養中に光照射を行う必要があり、そのときの切離葉表面における PPF_D は 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で十分であるといえる。このように本章では、重要であることがこれまでに指摘されていた相対湿度の他に、PPFD が培養中の環境要素として重要であることを示し、50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度の比較的低い PPF_D レベルであっても有用タンパク質生産に有効であることを示した。

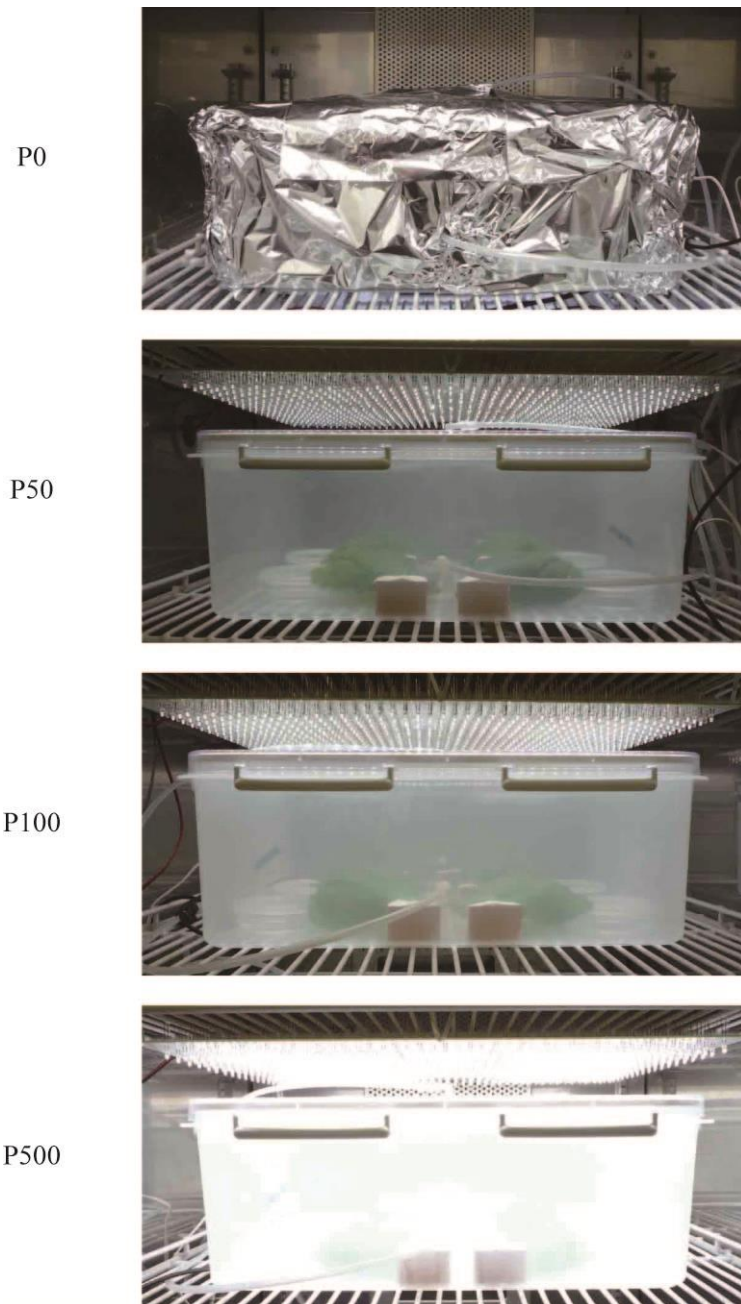


Fig. 19 Chambers and white-LED arrays used for incubation of detached *N. benthamiana* leaves at different PPFDs of 0 (P0), 50 (P50), 100 (P100), and 500 (P500) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The chamber of P0 was wrapped with aluminum foil. Petioles of detached leaves were soaked in small containers filled with distilled water. Laminae of detached leaves were placed on acrylic bars set on pieces of wood.

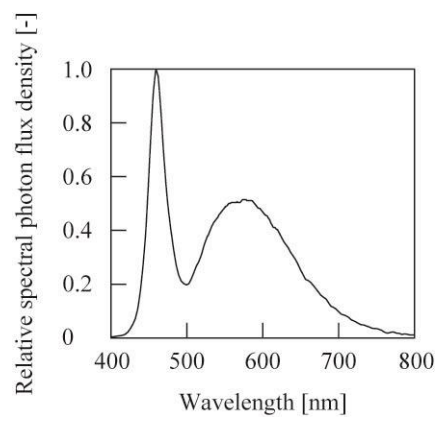


Fig. 20 Relative spectral photon flux density distribution on the bottom of the chambers used for the incubation of detached *N. benthamiana* leaves and irradiated with the white-LED array.

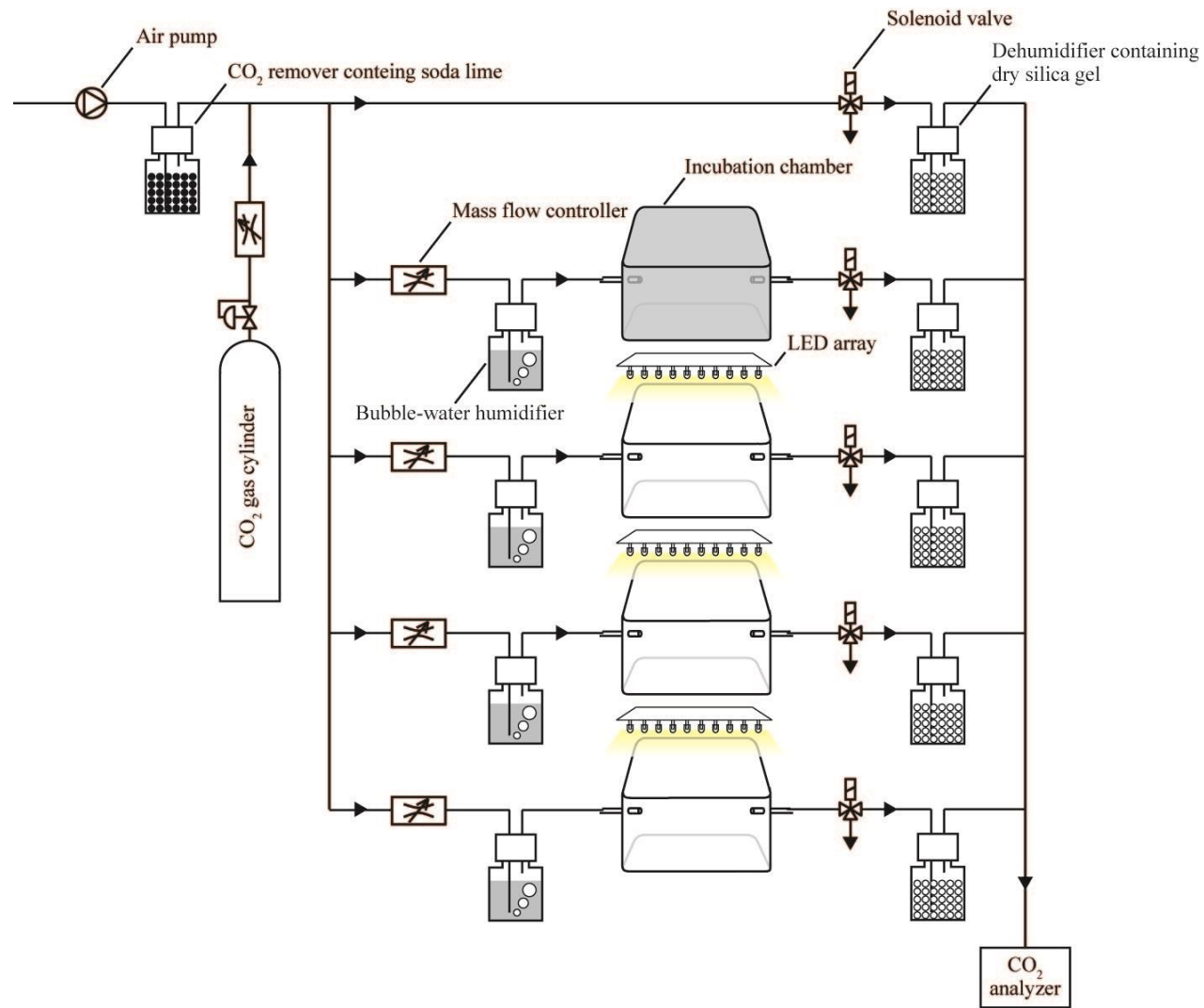


Fig. 21 Schematic diagram of the equipment used for incubation of detached *N. benthamiana* leaves. Arrows show the airflow direction.

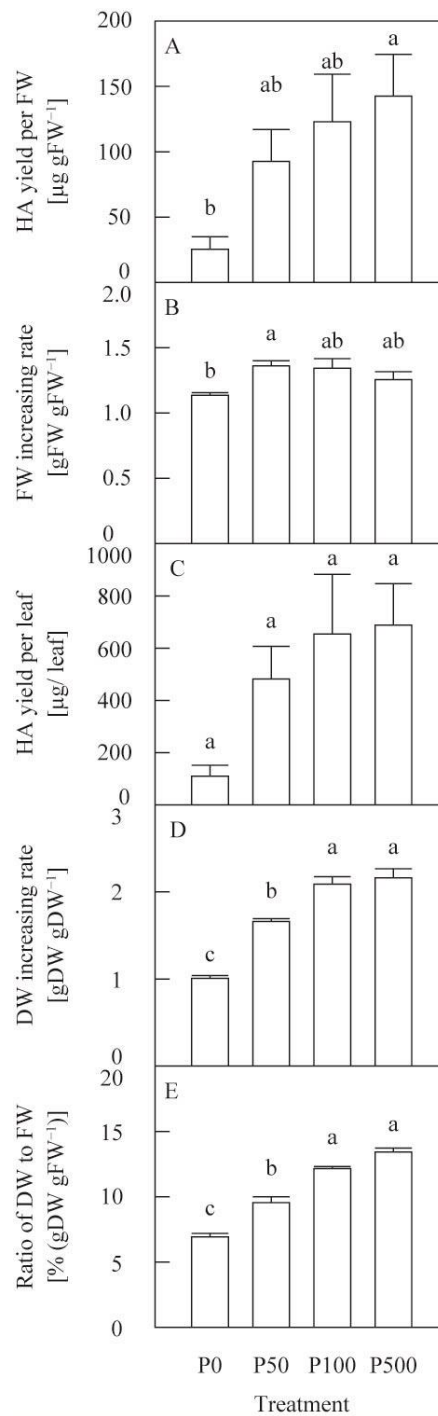


Fig. 22 Hemagglutinin (HA) yield per unit leaf fresh weight (FW) (A), FW increasing rate during incubation (B), HA yield per leaf (C), leaf dry weight (DW) increasing rate during incubation (D) and ratio of DW to FW (E) of detached *N. benthamiana* leaves incubated in the incubation chambers at different PPFs of 0 (P0), 50 (P50), 100 (P100), and 500 (P500) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vertical bars show standard errors of the mean ($n = 4$). Means labeled with different small letters in each panel mutually differ significantly at the 5% level, as determined using Tukey's HSD test.

Table 1 Total amounts of CO₂ assimilation per the incubation chambers in incubation of detached *N. benthamiana* leaves at different PPFDs of 0 (P0), 50 (P50), 100 (P100), and 500 (P500) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The total amount of CO₂ assimilation was calculated by integrating the net photosynthetic rates in each incubation chamber during the photoperiod and the dark period from 1 day post infiltration (dpi) to 5 dpi.

Treatment	PPFD [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	A_{CO_2} [g/ chamber]
P0	0	-1.00
P50	50	0.27
P100	100	0.99
P500	500	1.06



Fig. 23 Detached *N. benthamiana* leaves incubated for 6 days in the incubation chambers at different PPFDs of 0 (P0), 50 (P50), 100 (P100), and 500 (P500) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

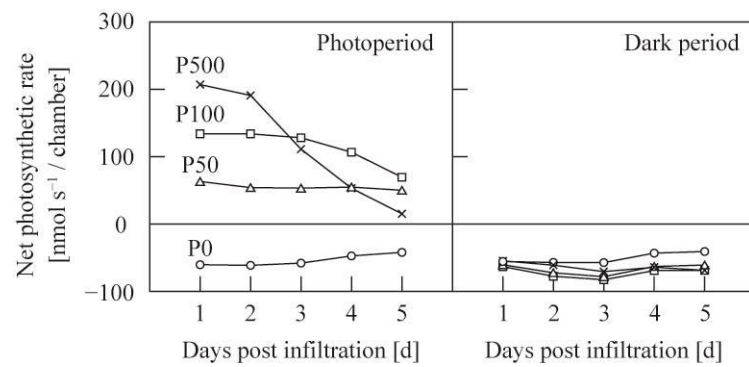


Fig. 24 Time course of net photosynthetic rates per chamber during the photoperiod (left) and the dark period (right) of the incubation chambers used for incubation of detached *N. benthamiana* leaves at different PPFs of 0 (P0, ○), 50 (P50, Δ), 100 (P100, □), and 500 (P500, ×) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

第6章

結語

1. 本論文の総括

一過性遺伝子発現法を用いた有用タンパク質生産における遺伝子導入前の植物の栽培および遺伝子導入後の植物培養は、温室または人工光型植物栽培施設内で行われる。そこでは、単位生体重あたりの有用タンパク質含量と単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質量の両方またはいずれか一方でも大きくなるように栽培・培養環境が調節されることが望ましい。ところが、有用タンパク質生産に好適な環境に調節する上で重要な、個々の環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響に関する研究はほとんど見あたらない。栽培中または培養中における個々の環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響を調べ、有用タンパク質生産に好適な環境要素のレベルは植物生産に好適なそれとは異なるのかについてなどの知見を得ることは、有用タンパク質生産に好適な環境調節の実現に寄与しうる。

第2章では、植物体地上部全体に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法（植物体法）において、遺伝子導入前の栽培で施用する液肥の硝酸濃度をベンサミアナタバコ栽培での標準的な濃度である 12 mmol L^{-1} から 60 mmol L^{-1} に高めることで、単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の目安である植物体あたりの HA 含量を大きく減少させることなく、単位生体重あたりの HA 含量を増大できることを示した。第3章では、単位栽培面積あたりの植物体地上部生体重が大きいことから栽植密度が高いほど望ましい植物生産の場合とは異なり、有用タンパク質生産の場合には $400 \text{ plants m}^{-2}$ の高栽植密度条件であっても単位栽培面積あたりの HA 量が $100 \text{ plants m}^{-2}$ の低栽植密度条件と比較して大きくなるとは限らないこと、むしろ高栽植密度条件では収穫物の単位生体重あたりの HA 含量が小さくなることを示した。これらの結果は、一過性遺伝子発現法を用いた有用タンパク質生産において環境調節を行うことが重要であることを示している。くわえて、有用タンパク質生産に好適な個々の環境要素のレベルは、単位栽培面積あたりの植物体地上部生体重が大きくなるようなものとは異なりうることを示している。これまでに、有用タンパク質生産に好適な遺伝子導入後の培養環境として、植物生産において一般に適用されるよりも低い気温（約 20°C ）が報告されている（Buyel and Fischer, 2012; Matsuda

et al., 2012)。本論文は、これまでにまったく着目されることのなかった遺伝子導入前の栽培環境に着目し、そこでの有用タンパク質生産に好適な環境要素のレベルは単位栽培面積あたりの植物体地上部生体重増大を目指した場合のそれらと比較して、高い液肥中硝酸濃度 (60 mmol L^{-1}) や低い栽植密度 ($100 \text{ plants m}^{-2}$) などでありうることを示した。このように本論文は、植物体法を用いた有用タンパク質生産における環境調節に寄与する知見を提供した。

他方、切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法（切離葉法）は、従来の植物体法と比較して、有用タンパク質生産の大規模化に適している可能性がある。切離葉法では、遺伝子導入のために遺伝子組換えアグロバクテリウム懸濁液を切離葉内へ浸潤させた直後に、懸濁液を蒸散させる処理（水除去処理）を行う必要がある。また、その後の培養環境は植物体法におけるそれとは異なるものとする必要がある。ところが、既往の研究で示されている水除去処理および培養環境を適用した場合においても、切離葉法で得られる単位生体重あたりの有用タンパク質含量は植物体法で得られるそれと比較して小さいという問題があった。水除去処理および培養中の個々の環境要素が単位生体重あたりの有用タンパク質含量に及ぼす影響を定量的に明らかにすることは、切離葉法において有用タンパク質生産に好適な環境調節を行う上で重要である。

第4章では、切離葉法での水除去処理の指標として、遺伝子導入前の切離葉の生体重に対する水除去処理終了時の生体重の比（以後、処理後相対生体重）を用い、それが単位生体重あたりの HA 含量に負の影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、処理後相対生体重が 1.0 近傍となるまで水除去処理を行うことで、植物体法と同程度の単位生体重あたりの HA 含量を得られることが明らかとなった。第5章では、 $50 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 程度の比較的低い PPF D レベルであっても PPF D $0 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の暗黒条件と比較して、単位生体重あたりまたは葉あたりの HA 含量が大きくなる傾向があることを示した。これらの結果は、適切な処理または培養環境によって切離葉法でも植物体法と同程度の有用タンパク質含量が期待できることを示している。このように本論文は、切離葉法の水除去処理において調節可能な指標として処理後相対生体重を、また、培養中の高湿度以外に重要な環境要素として PPF D を見出し、有用タンパク質生産に好適なそれらのレベルを示した。つまり、本論文は切離葉法での実用レ

ベルの有用タンパク質生産技術の確立に寄与する知見を提供した。

以上のように、本論文は植物体法および切離葉法において有用タンパク質生産に好適な環境調節を行う上で重要な知見を提供した。植物体法に関する知見は、いくつかの閉鎖または半閉鎖型施設で植物体法を用いて行われている大規模医薬用タンパク質生産 (Warzecha, 2012) に利用できるものであり、知見に基づいた環境調節によって生産効率が向上する可能性がある。一方で、切離葉法に関する知見は、切離葉法を用いた大規模な有用タンパク質生産の実行可能性を高めるものである。現在のところ、切離葉法を用いた大規模な有用タンパク質生産は実現されていない。しかし、切離葉法における水除去処理または環境調節を省スペースで自動的に行うシステムが開発されたならば、植物体法よりも単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量が大きい方法として大規模生産に用いられるようになることが期待される。

2. 今後の展開

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に関する研究の最終目的は、有用タンパク質生産に最適な環境を明らかにすることである。そのためには、個々の環境要素などが単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量に及ぼす影響のさらなる解明、および個々の環境要素が遺伝子導入後の葉内における分子細胞レベルの反応に及ぼす影響の解明が必要であると考えられる。

第2章および第3章では単位生体重あたりの有用タンパク質含量に影響を及ぼす可能性が高いと考えられる環境要素に着目した。他方、本論文で着目した環境要素以外の環境要素であっても、遺伝子導入前の植物周囲の物理環境によって単位時間・単位栽培面積あたりの植物体地上部生体重が大きく異なることを考えると、遺伝子導入前の PPFD や CO₂ 濃度などの環境要素が単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量に大きな影響を及ぼす可能性は高い。気温および PPFD 以外のいまだその影響が明らかになっていない遺伝子導入後の環境要素も含めて、個々の環境要素が単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量に及ぼす影響

のさらなる解明が必要であると考え。最適環境決定のための多水準系実験計画または応答曲面法による解析を行うためには、個々の環境要素が及ぼす影響に関する知見を蓄積し、影響の大きいいくつかの要素を選抜した上で適切な水準を設定する必要がある。また、環境要素のみならず、生産周期すなわち遺伝子導入前の栽培期間が及ぼす影響についても考慮する必要があると考える。これまでに、栽培期間によって収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量が異なることが報告されている (Buyel and Fischer, 2012)。本論文では栽培期間が一定である場合の環境要素の影響を調べたものの、最適環境を決定する場合には、栽培期間のみが有用タンパク質生産に及ぼす影響にくわえて、栽培期間と環境要素の交互作用も考慮する必要があると考える。

他方、環境が遺伝子導入後の葉内における分子細胞レベルの反応に及ぼす影響を明らかにすることも必要であると考え。一過性遺伝子発現法における遺伝子導入後の葉内では、アグロバクテリウムによる植物核内への T-DNA 導入、核内での T-DNA を鋳型とする mRNA 合成、リボソームなどによる有用タンパク質合成などの反応が連続して進行する。これらの反応の速度がそれぞれ異なる応答を環境に対して示すのであれば、それぞれの反応に好適な環境を逐次適用することで、全体の反応速度、すなわち有用タンパク質合成速度を増大でき、単位生体重あたりの有用タンパク質含量を増大できる可能性がある。実際に、アグロバクテリウムを利用した一過性遺伝子発現法において、遺伝子導入後 1.5 d の気温を 20°C に調節し、その後 4.5 d の気温を 30°C に調節することで、遺伝子導入後の 6 d の気温を 20°C に調節した場合と比較して単位生体重あたりの有用タンパク質含量が約 5 倍になったとの報告 (Jung et al., 2015) がある。この結果は、葉内で連続して進行する複数の反応の速度がそれぞれ異なる応答を気温に対して示すこと、および現行よりも短い時間スケールで環境調節を行うことの有用性を示している。最適環境決定のためには、気温を含めた環境がそれぞれの分子細胞レベルの反応に及ぼす影響を経時的に明らかにし、異なる環境調節を行う時間スケールをより詳細に決定することが必要であると考え。気温以外に分子細胞レベルの反応に大きな影響を及ぼす可能性が高い要素として、第 4 章および第 5 章で着目した処理後相対生体重および PPF D が挙げられる。これらの要素が個々の反応に影響を及ぼすことを示唆するいくつかの報告

(Boyko et al., 2000; Dillen et al., 1997; Opabode, 2006; Salas et al., 2001; White and Dawson, 1978; Zambre et al., 2003) がある。

要約

第1章 緒言

植物利用型有用タンパク質生産法の中でも、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。温室や人工光型植物栽培施設のような閉鎖型または半閉鎖型施設内で一般に行われる一過性遺伝子発現法での植物栽培・培養環境は、単位生体重あたりの有用タンパク質含量と単位時間・単位栽培面積あたりの有用タンパク質生産量の両方が大きくなるように、またはいずれか一方でも大きくなるように調節されることが望ましい。ところが、有用タンパク質生産に好適な環境に調節する上で重要な、個々の環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響に関する研究はほとんど見あたらない。

他方、植物体から一部の葉を切離して、その切離葉に遺伝子導入を行って有用タンパク質生産を行う方法（以後、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。切離葉法では、遺伝子導入直後の低湿度条件下での水除去処理およびその後の高湿度下での培養が必要とされる。しかしながら、単位生体重あたりの有用タンパク質含量が大きくなるような水除去処理のレベルまたは培養環境要素のレベルは明らかではない。

以上のような背景から本論文では、植物利用型有用タンパク質生産法の1つである一過性遺伝子発現法において、有用タンパク質生産に好適な環境調節を行う上で重要な知見を得ることを目的として4つの研究を行った。そのうち2つの研究は、植物体地上部に遺伝子導入を行う方法において、個々の環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響を調べ、有用タンパク質生産に好適な環境要素のレベルは植物生産に好適なそれと異なるのかなどについて明らかにすることを目的としたものである。残りの2つの研究は、切離葉に遺伝子導入を行う方法において、水除去処理または培養中の環境要素が有用タンパク質生産に及ぼす影響を調べ、有用タンパク質生産に好適な水除去処理のレベルおよび環

境要素のレベルを明らかにすることを目的としたものである。一過性遺伝子発現法として、プラスミド magnICON を有する遺伝子組換えアグロバクテリウムをベンサミアナタバコに導入する magnifection 法を用いた。また、モデルタンパク質としてヘマグルチニン（以後、HA）を用いた。

第 2 章 植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現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液体培地中の硝酸濃度を高めることで、有用タンパク含量を大幅に高められることが報告されている。このような高硝酸濃度による有用タンパク質含量増大効果は、ベンサミアナタバコを用いた一過性遺伝子発現法においても、高硝酸濃度の液肥を根圏に施用することで得られると考えた。そこで、植物体を用いる一過性遺伝子発現法において、遺伝子導入前の栽培において植物体根圏に施用する硝酸濃度を高めることで、葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量と植物体あたりの有用タンパク質含量の両方またはいずれか一方でも増大するかについて調べることを目的とした。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遺伝子導入を行った。それらをその後 1 週間培養した。

N60 の単位生体重あたりの HA 含量は、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 の単位生体重あたりの可溶性還元態窒素含量は、他の試験区のそれと比較して有意に大きかった。N60 の単位生体重あたりの可溶性タンパク質体窒素含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単位生体重あたりの可溶性還元態窒素含量が増大し、それに伴って単位生体重あたりの可溶性タンパク質態窒素含量および単位生体重あたりの HA 含量が増大したことが示唆された。

N60 の遺伝子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。植物体あたりの HA 含量では試験区間に有意な差が認められなかった。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。

高濃度硝酸 (60 mmol L^{-1}) 液肥施用は、植物生産に用いられる標準的な硝酸濃度 (12 mmol L^{-1}) の液肥施用と比較して、植物体あたりの HA 含量を大きく減少させることなく、単位生体重あたりでより高い HA 含量をもたらした。このことから液肥中の硝酸濃度を高めることは、単位量の有用タンパク質を得るために必要な葉収穫量の低減に寄与し、結果的に有用タンパク質の抽出および精製に要する費用を減少しうるため、有用タンパク質生産に好適な環境調節であるといえる。このように本章では、遺伝子導入前における有用タンパク質生産に好適な液肥中硝酸濃度のレベルは、植物生産に好適なそれと比較して高いことを示した。

第 3 章 植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現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単位時間・単位栽培面積あたりの植物体地上部生体重は大きい。一方で、有用タンパク質生産の場合には好適な栽植密度のレベルが存在する可能性がある。一過性遺伝子発現法において上位葉の単位生体重あたりまたは可溶性タンパク質量あたりの有用タンパク質含量は下位葉のそれと比較して大きい傾向があったとの報告を考慮すると、葉位別葉生体重分布などの植物体の形態に影響を及ぼす栽植密度が単位生体重あたりの有用タンパク質含量に影響を及ぼす可能性は高い。そこで、植物体地上部に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法において、栽植密度が葉生体重の葉位別分布および単位生体重あたりの有用タンパク質含量の葉位別分布に及ぼす影響を調べ、収穫物の単位生体重あたりの有用タンパク質含量および単位栽培面積あたりの有用タンパク質量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。ベンサミアナタバコを遺伝子導入前後に 100 または $400 \text{ plants m}^{-2}$ の栽植密度で栽培した。

地上部全体を収穫する場合には、 $400 \text{ plants m}^{-2}$ での単位栽培面積あたりの地上部生体重は、 $100 \text{ plants m}^{-2}$ でのそれと比較して有意に大きかった。他方、 $400 \text{ plants m}^{-2}$ での収穫物の単位生体重あたりの HA 含量は、 $100 \text{ plants m}^{-2}$ でのそれと比較して有意に小さかった。このことは、 $400 \text{ plants m}^{-2}$ 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、

単位生体重あたりの HA 含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の葉の単位生体重あたりの HA 含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、収穫物の単位生体重あたりの HA 含量、および単位栽培面積あたりの 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。

このように本章では、単位栽培面積あたりの収穫物生体重が大きいような高栽植密度条件であっても、単位栽培面積あたりの HA 量が低栽植密度条件と比較して大きくなるとは限らないことを示した。むしろ高栽植密度条件では、収穫物の単位生体重あたりの HA 含量が小さいことで、HA の抽出および精製に要する費用の点で不利となる可能性があることが示された。栽植密度が高いほど望ましい植物生産の場合とは異なり、有用タンパク質生産の場合には低栽植密度が望ましい場合があるといえる。

第 4 章 切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現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、遺伝子導入直後に葉内に浸潤したアグロバクテリウム懸濁液の水を蒸散によって除去する処理（以後、水除去処理）後に、高湿度下で培養するという 2 つ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、切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現法における遺伝子導入直後の水除去処理の指標を新たに設定し、それが単位生体重あたりの有用タンパク質含量に及ぼす影響を明らかにすることで、有用タンパク質生産に好適な水除去処理方法を提案することを目的とした。水除去処理の指標として、遺伝子導入前の切離葉の生体重に対する水除去処理終了時の生体重の比（以後、処理後相対生体重）を用いた。処理後相対生体重が異なる複数の切離葉の、培養終了時の単位生体重あたりまたは葉あたりの HA 含量を調べた。

切離葉の単位生体重あたりの HA 含量は、処理後相対生体重が大きいほど小

さい傾向であった。切離葉の葉成長の指標である培養後相対生体重は、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。このため、切離葉の葉あたりの HA 含量は、単位生体重あたりの HA 含量と同様に処理後相対生体重が大きいほど小さい傾向であった。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水量が大きいほど大きいことを示唆している。HA 含量と異なり、培養後相対生体重および TSP 含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、水除去処理後に切離葉内に残存する懸濁液水は HA 蓄積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、切離葉法において処理後相対生体重が 1.0 近傍となるまで水除去処理を行うことで、単位生体重あたりまたは葉あたりで大きな HA 含量を得られることが明らかとなった。

第 5 章 切離葉に遺伝子導入を行う一過性遺伝子発現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（以後、PPFD）が高いほど葉の純光合成速度は大きくなる。同様に、切離葉法において遺伝子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、切離葉の単位生体重あたりの有用タンパク質含量および葉あたりの有用タンパク質含量に培養中の 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。

光照射を行った試験区（以後、光照射区）の単位生体重あたりの HA 含量は、PPFD が大きいほど大きい傾向であった。それらは暗黒区 (P0) のそれと比較して大きい傾向にあり、P500 のそれは P0 のそれと比較して有意に大きかった。切離葉の葉成長の指標である培養後相対生体重に関して、P50 のそれは 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。このため、単位生体重あたりの HA 含量と同様に、光照射区間では葉あたりの HA 含量は同程度であり、また、暗黒区のそれと比較して大きい傾向にあった。これらの結果から、本研究で調べた範囲では培養中の PPFD が高いほど単位生体重あたりおよび葉あたりで大きい有用タンパク質含量を得られるといえる。ただし、P50 の HA 含量は P0 のそれと比較して、単位生体重あたりでは約 3.6 倍、葉あたりでは約 4.4 倍であったことから、PPFD が $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度の比較的低い PPFD レベルであっても HA 含量増大効果があるといえる。また、P50 と P500 間の HA 含量の差は、P0 と P50 の HA 含量の差と比較して小さい傾向にあった。これらの結果から、HA 含量を増大させる目的での培養中における PPFD は $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で十分であるといえる。

このように本章では、重要であることがこれまでに指摘されていた相対湿度の他に、PPFD が培養中の環境要素として重要であることを示し、 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度の比較的低い PPFD レベルであっても有用タンパク質生産に有効であることを示した。

第 6 章 結語

第 2 章および第 3 章では、これまでにまったく着目されることのなかった遺伝子導入前の栽培環境に着目し、そこでの有用タンパク質生産に好適な環境要素のレベルは単位栽培面積あたりの植物体地上部生体重増大を目指した場合のそれらと比較して、高い液肥中硝酸濃度 (60 mmol L^{-1}) や低い栽植密度 ($100 \text{ plants m}^{-2}$) などでありうることを示した。第 4 章および第 5 章では、切離葉法の水除去処理において調節可能な指標として処理後相対生体重を、また、培養中の高湿度以外に重要な環境要素として PPFD を見出し、有用タンパク質生産に好適なそれらのレベルを示した。以上のように本論文により、一過性遺伝子発現法において有用タンパク質生産に好適な環境調節を行う上で重要な知見が得られた。

引用文献

- Arzola L, Chen J, Rattanaporn K, Maclean JM, McDonald KA. 2011. Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein. *Int. J. Mol. Sci.* **12**:4975–4990.
- Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM. 1986. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* **6**:347–357.
- Boyko V, Ferralli J, Heinlein M. 2000. Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. *Plant J.* **22**:315–325.
- Buonaguro FM, Butler-Ransohoff J-E. 2010. PharmaPlant: the new frontier in vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **9**:805–807.
- Buyel JF, Fischer R. 2012. Predictive models for transient protein expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) can optimize process time, yield, and downstream costs. *Biotechnol. Bioeng.* **109**:2575–2588.
- Cabanes-Macheteau M, Fitchette-Lainé A-C, Loutelier-Bourhis C, Lange C, Vine ND, Ma JK-C, Lerouge P, Faye L. 1999. N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* **9**:365–372.
- Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs VL. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant-tissue by nitration of salicylic-acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **6**:71–80.

- D'Aoust M-A, Couture MM-J, Charland N, Trépanier S, Landry N, Ors F, Vézina L-P. 2010. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J.* **8**:607–619.
- D'Aoust M-A, Lavoie P-O, Couture MM-J, Trépanier S, Guay J-M, Dargis M, Mongrand S, Landry N, Ward BJ, Vézina L-P. 2008. Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol. J.* **6**:930–940.
- Davies HM. 2010. Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of protein products: evolution and prospects. *Plant Biotechnol. J.* **8**:845–861.
- Desai PN, Shrivastava N, Padh H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnol. Adv.* **28**:427–435.
- Dillen W, De Clercq J, Kapila J, Zambre M, Van Montagu M, Angenon G. 1997. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. *Plant J.* **12**:1459–1463.
- Fischer R, Emans N. 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.* **9**:279–299.
- Fischer R, Schillberg S, Buyel J, Twyman R. 2013. Commercial aspects of pharmaceutical protein production in plants. *Curr. Pharm. Des.* **19**:5471–5477.
- Fischer R, Schillberg S, Hellwig S, Twyman RM, Drossard J. 2012. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnol. Adv.* **30**:434–439.
- Fischer R, Twyman RM, Schillberg S. 2003. Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine* **21**:820–825.

- Floss DM, Falkenburg D, Conrad U. 2007. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res.* **16**:315–332.
- Gaertner H, Cerini F, Escola J-M, Kuenzi G, Melotti A, Offord R, Rossitto-Borlat I, Nedellec R, Salkowitz J, Gorochov G, Mosier D, Hartley O. 2008. Highly potent, fully recombinant anti-HIV chemokines: reengineering a low-cost microbicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:17706–17711.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science.* **220**:1049–1051.
- Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnewald U, Stitt M. 1999. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell Environ.* **22**:1177–1199.
- Gils M, Kandzia R, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y. 2005. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol. J.* **3**:613–620.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2005. Magniffection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* **23**:2042–2048.
- Gleba YY, Tusé D, Giritch A. 2014. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. In: Palmer, KE, Gleba, YY, editors. *Plant Viral Vectors*. Berlin/ Heidelberg: Springer, pp. 155–192.
- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. plant-microbe Interact.* **21**:1015–1026.

- Häkkinen ST, Raven N, Henquet M, Laukkanen M-L, Anderlei T, Pitkänen J-P, Twyman RM, Bosch D, Oksman-Caldentey K-M, Schillberg S, Ritala A. 2013. Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody. *Biotechnol. Bioeng.* **111**:336–346.
- Hamorsky KT, Kouokam JC, Jurkiewicz JM, Nelson B, Moore LJ, Husk AS, Kajiura H, Fujiyama K, Matoba N. 2015. N-Glycosylation of cholera toxin B subunit in *Nicotiana benthamiana*: impacts on host stress response, production yield and vaccine potential. *Sci. Rep.* **5**:8003.
- Holland T, Sack M, Rademacher T, Schmale K, Altmann F, Stadlmann J, Fischer R, Hellwig S. 2010. Optimal nitrogen supply as a key to increased and sustained production of a monoclonal full-size antibody in BY-2 suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **107**:278–289.
- Hood EE, Woodard SL, Horn ME. 2002. Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants—myths and realities. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**:630–635.
- Horie T, Karahara I, Katsuhara M. 2012. Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice* **5**:1–18.
- Huang Z, LePore K, Elkin G, Thanavala Y, Mason HS. 2008. High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system. *Plant Biotechnol. J.* **6**:202–209.
- Huang Z, Santi L, LePore K, Kilbourne J, Arntzen CJ, Mason HS. 2006. Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine* **24**:2506–2513.
- Joh LD, Wroblewski T, Ewing NN, VanderGheynst JS. 2005. High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnol. Bioeng.* **91**:861–871.

- Jung S-K, Lindenmuth BE, McDonald KA, Hwang MS, Bui MQN, Falk BW, Uratsu SL, Phu ML, Dandekar AM. 2014. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient expression of plant cell wall-degrading enzymes in detached sunflower leaves. *Biotechnol. Prog.* **30**:905–915.
- Jung S-K, McDonald KA, Dandekar AM. 2015. Effect of leaf incubation temperature profiles on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression. *Biotechnol. Prog.* **31**:783–790.
- Kingsbury NJ, McDonald KA. 2014. Quantitative evaluation of E1 endoglucanase recovery from tobacco leaves using the vacuum infiltration-centrifugation method. *Biomed Res. Int.* **2014**:483596.
- Koncz C, Schell J. 1986. The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**:383–396.
- Lindbo JA. 2007. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiol.* **145**:1232–1240.
- Liu C, Nelson RS. 2013. The cell biology of Tobacco mosaic virus replication and movement. *Front. Plant Sci.* **4**:1–10.
- Lucas WJ, Ham BK, Kim JY. 2009. Plasmodesmata - bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* **19**:495–503.
- Ma JK, Drake PM, Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* **4**:794–805.
- Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. 2004. In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:6852–6857.

- Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.* **23**:718–723.
- Matoba N, Davis KR, Palmer KE. 2011. Recombinant protein expression in *Nicotiana*. *Methods Mol. Biol.* **701**:199–219.
- Matoba N, Husk AS, Barnett BW, Pickel MM, Arntzen CJ, Montefiori DC, Takahashi A, Tanno K, Omura S, Cao H, Mooney JP, Hanson C V, Tanaka H. 2010. HIV-1 neutralization profile and plant-based recombinant expression of actinohivin, an Env glycan-specific lectin devoid of T-cell mitogenic activity. *PLoS One* **5**:e11143.
- Matsuda R, Tahara A, Matoba N, Fujiwara K. 2012. Virus vector-mediated rapid protein production in *Nicotiana benthamiana*: effects of temperature and photosynthetic photon flux density on hemagglutinin accumulation. *Environ. Control Biol.* **50**:375–381.
- Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stitt M. 2001. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant, Cell Environ.* **24**:177–190.
- McDonald KA, Lindenmuth BE, Dandekar AM, Falk BW. 2014. Production of cellulase enzymes in plant hosts using transient agroinfiltration. US Patent 8674178 B2. The Regents of the University of California.
- De Mendiburu F. 2009. Una herramienta de análisis estadístico para la investigación agrícola. *Ph.D. thesis*; Universidad Nacional de Ingeniería (UNI-PERU).
- Mett V, Farrance CE, Green BJ, Yusibov V. 2008. Plants as biofactories. *Biologicals* **36**:354–358.

- Musiychuk K, Stephenson N, Bi H, Farrance CE, Orozovic G, Brodelius M, Brodelius P, Horsey A, Ugulava N, Shamloul A-M, Mett V, Rabindran S, Streatfield SJ, Yusibov V. 2007. A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza Other Respi. Viruses* **1**:19–25.
- Opabode JT. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **1**:12–20.
- Paul M, Ma JK-C. 2011. Plant-made pharmaceuticals: leading products and production platforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **58**:58–67.
- Plesha MA. 2008. Development of a viral amplicon-based process for production of biopharmaceuticals in plant tissues. *Ph.D. Thesis*; University of California, Davis.
- Plesha MA, Huang T-K, Dandekar AM, Falk BW, McDonald KA. 2007. High-level transient production of a heterologous protein in plants by optimizing induction of a chemically inducible viral amplicon expression system. *Biotechnol. Prog.* **23**:1277–1285.
- Plesha MA, Huang T-K, Dandekar AM, Falk BW, McDonald KA. 2009. Optimization of the bioprocessing conditions for scale-up of transient production of a heterologous protein in plants using a chemically inducible viral amplicon expression system. *Biotechnol. Prog.* **25**:722–733.
- Preis J. 2012. Market incentives for pandemic influenza vaccines. *Ph.D. thesis Massachusetts Inst. Technol.*
- Qiu X, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, Fausther-Bovendo H, Wei H, Aviles J, Hiatt E, Johnson A, Morton J, Swope K, Bohorov O, Bohorova N, Goodman C, Kim D, Pauly MH, Velasco J, Pettitt J, Olinger GG, Whaley K, Xu B, Strong JE, Zeitlin L, Kobinger GP. 2014. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* **514**:47–53.

- Roque ACA, Lowe CR, Taipa MÂ. 2004. Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnol. Prog.* **20**:639–654.
- Salas MG, Park SH, Srivatanakul M, Smith RH. 2001. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Rep.* **20**:701–705.
- Santi L, Giritch A, Roy CJ, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y, Webb R, Arntzen CJ, Mason HS. 2006. Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:861–866.
- Scaife A, Cox EF, Morris GEL. 1987. The relationship between shoot weight, plant density and time during the propagation of four vegetable species. *Ann. Bot.* **59**:325–334.
- Scaife M, Jones D. 1976. The relationship between crop yield (or mean plant weight) of lettuce and plant density, length of growing period, and initial plant weight. *J. Agric. Sci.(Camb.)* **86**:83–91.
- Sheludko V, Sindarovska Y, Gerasymenko I, Bannikova M, Nuchuk N. 2007. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnol. Bioeng.* **96**:608–614.
- Shinozaki K, Kira T. 1956. Intraspecific competition among higher plants. VII. Logistic theory of the CD effect. *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. Ser. D* **7**:35–72.
- Shoji Y, Jones RM, Mett V, Chichester JA, Musiychuk K, Sun X, Tumpey TM, Green BJ, Shamloul M, Norikane J, Bi H, Hartman CE, Bottone C, Stewart M, Streatfield SJ, Yusibov V. 2013. A plant-produced H1N1 trimeric hemagglutinin protects mice from a lethal influenza virus challenge. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**:553–560.

- Simmons CW, VanderGheynst JS, Upadhyaya SK. 2009. A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression. *Biotechnol. Bioeng.* **102**:965–970.
- Soderquist RG, Lee JM. 2005. Enhanced production of recombinant proteins from plant cells by the application of osmotic stress and protein stabilization. *Plant Cell Rep.* **24**:127–132.
- Stoger E, Sack M, Perrin Y, Vaquero C, Torres E, Twyman RM, Christou P, Fischer R. 2002. Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Mol. Breed.* **9**:149–158.
- Stöhr C. 1999. Relationship of nitrate supply with growth rate, plasma membrane-bound and cytosolic nitrate reductase, and tissue nitrate content in tobacco plants. *Plant. Cell Environ.* **22**:169–177.
- Sudarshana MR, Plesha MA, Uratsu SL, Falk BW, Dandekar AM, Huang T-K, McDonald KA. 2006. A chemically inducible cucumber mosaic virus amplicon system for expression of heterologous proteins in plant tissues. *Plant Biotechnol. J.* **4**:551–559.
- Tusé D, Tu T, McDonald KA. 2014. Manufacturing economics of plant-made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes. *Biomed Res. Int.* **2014**:256135.
- Tzfira T, Citovsky V. 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.* **12**:121–129.
- Valdés R, Gómez L, Padilla S, Brito J, Reyes B, Álvarez T, Mendoza O, Herrera O, Ferro W, Pujol M, Leal V, Linares M, Hevia Y, García C, Milá L, García O, Sánchez R, Acosta A, Geada D, Paez R, Vega JL, Borroto C. 2003. Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**:94–100.

- Vandenbussche F, Pierik R, Millenaar FF, Voeselek LACJ, Van Der Straeten D. 2005. Reaching out of the shade. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:462–468.
- Warzecha H. 2012. Biopharmaceuticals from plants. In: Kayser, O, Warzecha, H, editors. *Pharm. Biotechnol. drug Discov. Clin. Appl.* second. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, pp. 59–69.
- Wechsler J. 2014. Biopharma manufacturers respond to Ebola crisis. *Pharm. Technol.* **38**.
- White JL, Dawson WO. 1978. Effect of Supraoptimal Temperatures upon Tobacco Mosaic Virus RNA Replicase. *Intervirology* **10**:221–227.
- Wilken LR, Nikolov ZL. 2012. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.* **30**:419–433.
- Yang S-J, Carter SA, Cole AB, Cheng N-H, Nelson RS. 2004. A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:6297–6302.
- Zambre M, Terryn N, De Clercq J, De Buck S, Dillen W, Van Montagu M, Van Der Straeten D, Angenon G. 2003. Light strongly promotes gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Planta* **216**:580–586.
- Zeitlin L, Pettitt J, Scully C, Bohorova N, Kim D, Pauly M, Hiatt A, Ngo L, Steinkellner H, Whaley KJ, Olinger GG. 2011. Enhanced potency of a fucose-free monoclonal antibody being developed as an Ebola virus immunoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**:20690–20694.

参考ウェブサイト

Medicago Inc., <http://www.medicago.com/English/Technologies/medicago-technologies/default.aspx>

謝辞

本論文を取りまとめるにあたっては、多くの方々に御指導、御教示、御支援、御協力を賜った。

指導教員の東京大学大学院農学生命科学研究科教授富士原和宏先生（生物環境工学研究室）には、本研究の遂行にあたり始終貴重な御指導、御鞭撻を賜った。心より厚く御礼申し上げる。同研究科教授芋生憲司先生（生物機械工学研究室）、同研究科教授大下誠一先生（生物プロセス工学研究室）、同研究科教授大政謙次先生、ならびに同研究科講師松田怜先生（生物環境工学研究室）には、本論文の審査を快くお引き受け頂くとともに、多くの有益な御教示、御助言を頂戴した。松田先生には、本研究に取り組む契機を与えて頂き、また細部にわたる懇切丁寧な御指導、御教示を頂戴した。本研究はまさしく松田先生の御指導があつてこそと存ずる。芋生先生、大下先生、大政先生、松田先生に厚く御礼申し上げる。

米国オーエンズボロ癌研究プログラムディレクター・米国ルイビル大学医学部准教授的場伸行先生には、本研究への御理解と多大なる御教示、御助言を頂戴した。厚く御礼申し上げる。

独国 ICON Genetics 社には、magnICON プラスミドの使用を許可して頂いた。厚く御礼申し上げる。米国 Kentucky BioProcessing 社には、pNM216 プラスミドを御提供頂いた。厚く御礼申し上げる。日本たばこ産業株式会社には、ベンサミアナタバコ種子を御提供頂いた。厚く御礼申し上げる。慶應義塾大学政策・メディア研究科特任助教青木翔平氏には、Arduino および Processing を用いた実験装置を作製する契機を与えて頂いた。厚く御礼申し上げる。

筆者の在籍した生物環境工学研究室の研究員、学生諸兄姉には、研究遂行に際し多大なる御協力、御助言を頂いた。深甚の謝意を表す。また同研究室秘書吉井友子氏には、筆者が研究に専念できるよう温かい御支援、御配慮を頂いた。心より感謝申し上げます。

最後に、私事ながら、筆者が何不自由なく学業に専念できるよう支援してくれた両親と、常に温かく励ましてくれた祖父母と兄に対し、謝意を表する次第である。

平成 27 年 9 月

藤内直道