

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20560729

研究課題名（和文） 赤外・近赤外分光法を援用したバイオマス由来の糖を用いる植物細胞培養系の糖代謝解析

研究課題名（英文） IR spectroscopic analysis on sugar metabolic kinetics of suspension plant cells for efficient utilization of biomass materials

研究代表者

末原 憲一郎 (Ken-ichiro Suehara)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：70291614

研究成果の概要（和文）：本研究は、3つのタイプの植物細胞を用いた培養系で、糖の種類が糖代謝速度に与える影響を評価することにある。赤外分光法により培地中の糖を同時計測（HPLCと同等の精度）して細胞の糖の取込み速度を算出できる手法を確立した。糖の取込み速度は糖の種類に大きく依存したが、細胞増殖を基準とした糖代謝には大きく影響しなかった。バイオマス由来の様々な糖と混合状態の糖を用いた際の細胞の挙動が把握できた。以上の成果は、バイオマス由来の糖を有効利用するための植物細胞利用（混合状態の糖化液を用いる際の培養特性の予測や糖成分をコントロールすることによる細胞増殖速度調整など）ならびに赤外分光法によるバイオプロセス計測制御法の進展に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this work was to study the influence of sugar species in the culture media on the kinetic sugar uptake phenomena for three types of plant cell cultivation. We developed the measurement method of sugar content in culture media suspended plant cells using the FT-IR/ATR method, and the sugar uptake rate of the suspension plant cells were calculated. The sugar uptake rate of the plant cell was different greatly on the kind of sugar, however, characteristic of sugar metabolism based on cell growth period was stable. Characteristic of metabolism of various sugars and sugar mixture (that is biomass degradation product) for three types of plant cells were obtained. These results will contribute to the development of a plant cell cultivation process planning and bioprocess monitoring by IR method to utilize the sugar derived from biomass materials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究代表者の専門分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：懸濁植物細胞、赤外・近赤外分光法、再資源化糖、バイオマス

1. 研究開始当初の背景

植物細胞培養では、「炭素源はスクロース」という固定概念が確立しており、スクロース以外の糖を用いた場合の植物細胞の培養例は皆無に等しい。しかし、バイオ新素材や薬品などの物質生産や食料生産などのバイオマス有効利用につながる。一方で、単なる炭素源と思われていた糖が、細胞内外で様々な情報伝達に関わっていることがわかりつつある。申請者らは、他に先がけて様々な種類の糖を用いたタバコ細胞の培養研究を行い、赤外分光法で培養液中の糖を定量計測し、植物細胞が糖を取り込み増殖する過程を定量的に評価する手法を開発している。本申請課題では、懸濁植物細胞培養系の代表的な3種の植物細胞に関する糖代謝挙動の解析法を開発する。後の遺伝解析や培養プロセス管理法の開発、再資源化された糖の有効利用など、基礎研究から応用まで幅広い展開が期待できる先進的な研究課題となりうる。

2. 研究の目的

バイオマス・廃棄物の有効利用が叫ばれる中、様々な糖化プロセスが開発され、近い将来廃棄物から多種多様な糖が生産される状況にある。これらの糖は、微生物によるバイオマスエネルギーや有用物質生産のための炭素源として用いられる。一方で、植物細胞培養においては、一般的な炭素源であるスクロース以外の糖を用いた培養例の報告はほとんどない。しかし、植物細胞培養系は、微生物培養系に勝るとも劣らない可能性を秘めており、有用物質や優良植物体・食品生産プロセスへの応用が期待できる。そこで本研究では、植物細胞の培養における炭素源としての糖に着目し、代表的な3種の細胞培養系（タバコ、イネ、アラビドプシス）を選んで、以下の検討を行う。

- ① 様々な糖を用いて培養した場合の植物細胞の糖代謝挙動把握
- ② 赤外・近赤外分光法を用いた糖代謝挙動の計測手法の開発
- ③ 糖化プロセス由来の糖を用いる植物細胞培養の可能性

3. 研究の方法

代表的な植物細胞培養系であるタバコ、イネおよびアラビドプシス細胞を用いる。また、単糖類としてグルコース、フルクトース、マンノースおよびガラクトースを、二糖類としてスクロースとマルトースを炭素源に用いて培養を行った（図1）。培養液中の糖濃度を赤外・近赤外分光法で経時的に計測するために、糖水溶液や培養液の赤外分光スペクトルを測定し、HPLCにて測定した結果を用いて検量線を作成し、糖濃度測定のための検量式を構築する。得られた検量式に基づいて、培養中の糖濃度変化を計測する。細胞量については、乾燥重量法により直接乾燥重量を測定する方法と、濁度法および電気伝導度による乾燥細胞重量推定法を試験して測定を行った。得られた測定データを用いて、細胞増殖と糖消費を速度論的に把握するための方法を考案し、時間軸を無次元化することによって両者の関係を把握し、炭素源の違いと植物細胞種の違いが、糖代謝挙動に与える影響の把握を試みた。

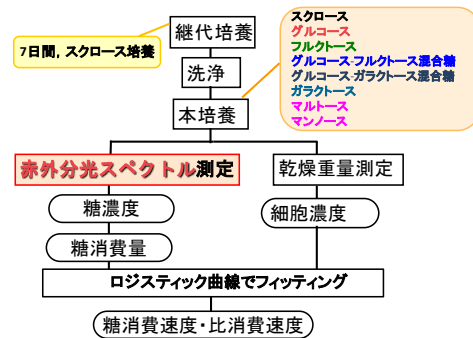


図1 培養から計測までの実験手順

4. 研究成果

4.1 培養液の赤外分光スペクトル変化

図1にアラビドプシス細胞で培養を行った際の、培養液スペクトルの経日変化の例を示す。一般的な炭素源であるスクロースを用いて培養を行ったところ、培養日数が経過するにつれて吸光度は小さくなり、スペクトルパターンに若干の変化が認められた（図2a）。スクロースがグルコースとフルクトースに分解され、比較的早く細胞に取込まれていると考えられる。単糖類を用いた培養では、スペクトルパターンはほとんど変化しな

った (図 2b, c). マンノースを用いた培養では、細胞は増殖しなかった。また、グルコースとフルクトースの混合糖を用いた培養では、スクロース培養よりスペクトルパターンの変化は大きく、細胞がグルコースとフルクトースを取込むタイミングは異なると考えられる。試しに、スクロースの構成糖であるグルコースとフルクトースを混合して培養 (バイオマス由来糖のモデル系のひとつ) したところ、やはりスペクトルパターンの変化を伴って吸光度が減少した (図 2d)。赤外分光スペクトルの変化を観察することで、単糖、二糖、混合糖のそれぞれで植物細胞が糖を認識して消費する様子は大きく異なることが示唆された。これらの現象を定量的に把握するためには、培地中の糖濃度を計測するための検量式の作成が必要である。

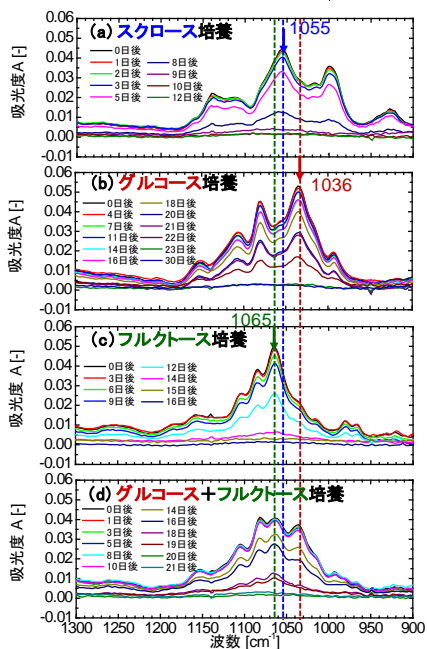


図2 アラビドプシス細胞培養における培養液の赤外分光スペクトルの変化

4.2 細胞濃度と糖濃度計測手法の開発

タバコ BY-2 細胞については、乾燥重量法による細胞濃度と濁度 (OD₆₀₀) との関係が定式化可能であった。両者の関係に直線性は見られなかったが、OD₆₀₀ で 3 程度までは非線形の式でフィッティングが可能であり、一般的なタバコ細胞培養系の範囲では、希釈することなく測定が可能 (オンライン化に適した) 検量式が得られた。アラビドプシス細胞とイ

ネ細胞については、凝集・沈殿しやすい性質から電気伝導度による推定が有効であった。

次に、赤外・近赤外分光法を用いた糖の定量法を検討した。赤外分光スペクトルで、糖の構造 (官能基の結合) に由来する情報をもとに、それぞれの糖で特徴的な吸収波数を用いて検量線を作成した。具体的には、スペクトルの加減性を考慮して、式 1 のような行列式で混合状態のそれぞれの糖を定量した。スクロース、グルコースおよびフルクトースが混在した培養液の例では、1055、1036 および 1065 cm⁻¹ における吸光度のデータを用いて計算している。また、酸素などが不足してエタノール発酵を行う場合が見られたため、エタノール (1045 cm⁻¹) を含んだ式も作成した。

$$\begin{bmatrix} C_{suc} \\ C_{glc} \\ C_{frc} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{suc,1055} & a_{glc,1055} & a_{frc,1055} \\ a_{suc,1036} & a_{glc,1036} & a_{frc,1036} \\ a_{suc,1065} & a_{glc,1065} & a_{frc,1065} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} A_{1055} - b_{1055} \\ A_{1036} - b_{1036} \\ A_{1065} - b_{1065} \end{bmatrix} \quad (1)$$

ここで、 C 、 A 、 a はそれぞれ糖濃度、吸光度、 a は検量線の傾きであり、 b は培地成分に由来する検量線の切片である。図 3 に計測結果の一例を示す。

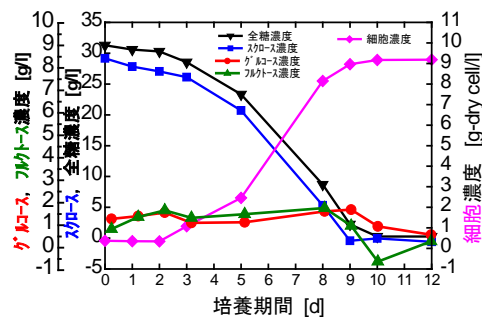


図3 スクロースで培養したアラビドプシス細胞の細胞濃度と糖濃度の経時変化

4.3 糖代謝挙動の速度論的解析

計測した細胞濃度と糖濃度の経時変化をもとに、細胞増殖と糖消費をロジスティック関数 (式 2) でフィッティングした。これを微分して細胞増殖速度と糖消費速度を算出した。

$$C(t) = \frac{C_{ini} - C_{fin}}{1 + e^{\frac{t-t_0}{w}}} + C_{fin} \quad (2)$$

ここで、 C_{ini} は初期濃度、 C_{fin} は最終濃度、 t と w は時間と時間刻みである。

図 4 にフィッティング結果を示す。また、図 5 に単糖、二糖および混合糖による培養結果から算出した糖の比消費速度を示す。

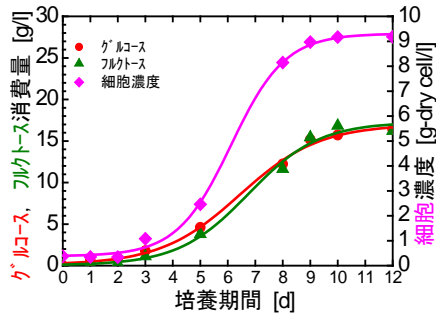


図4 細胞増殖と糖消費量のフィッティング結果

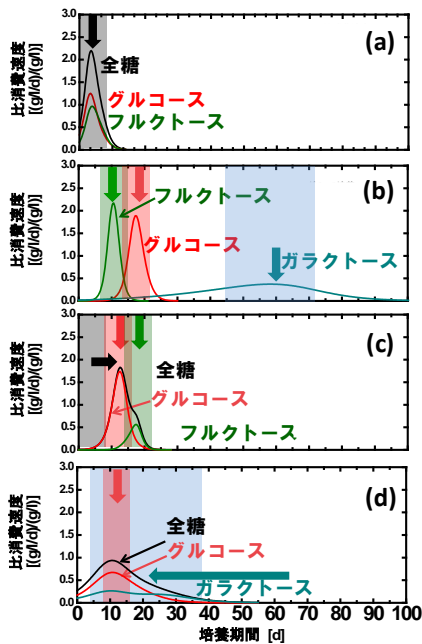


図5 単糖、二糖および混合糖で培養したアラビドプシス細胞の比消費速度

スクロースを用いて培養した場合、二糖であるスクロースは細胞が算出するインペルターゼによって単糖のグルコースとフルクトースに分解されたのち、比較的早くかつほぼ同時に細胞によって取り込まれていると考えられる (図 5a)。

一方、グルコースまたはフルクトース単糖で与えた場合、スクロース培養より代謝するのに時間がかかった。フルクトースで数日、グルコースでは 14 日近く遅くなった。ガラクトース単糖では、糖代謝を始めるのに 60 日近くを要した (図 5b)。混合状態の糖 (バイオマス由来の糖は複数の糖が混在する) で培養した結果、グルコース+フルクトース混合糖では、グルコースがフルクトースよりも

先に取り込まれ、その消費のタイミングはスクロース培養とグルコース単糖での培養の中間であった (図 5c)。また、グルコース+ガラクトースの混合糖で培養した場合、60 日近くを要したガラクトースは比較的早い培養日数で取り込まれた (図 5d)。

この培養系では、グルコースの存在がそれ自身と他の糖の代謝に大きく影響していることが示唆された。バイオマス由来の混合糖を用いる場合や糖の成分を変えて糖代謝を制御することを考えた場合、グルコースの特徴的な性質を把握することが重要であると考えられる。

4.4 糖代謝挙動の速度論的解析

さまざまな糖を用いた培養を行い、さらにアラビドプシス細胞以外のタバコ BY-2 細胞とイネ細胞についても同様の実験を行い、解析を試みた。図6にアラビドプシス細胞とタバコ BY-2 細胞を比較した例を示す。

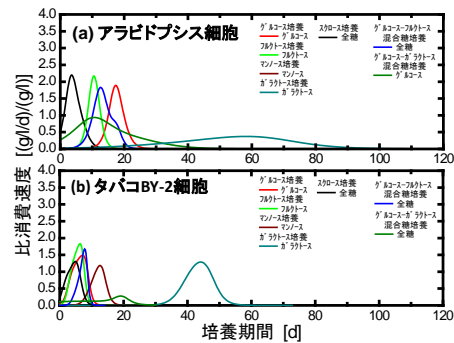


図6 アラビドプシス細胞とタバコ BY-2 細胞の糖代謝挙動の比較

植物種によって各糖の取込み挙動に違いが見られた。特にトレハロースはアラビドプシス細胞で取込みが遅く、しかしタバコ BY-2 細胞では比較的早く消費された。また、アラビドプシス細胞に見られたグルコース培養に特徴的な挙動は、タバコ BY-2 細胞ではそれほど顕著に観察されなかった。BY-2 は増殖の際細胞塊になりにくい (比較的微生物に近い増殖形態) ことから、小さな細胞塊を形成して増殖するアラビドプシス細胞とは糖に対する代謝挙動が異なっている可能性がある。しかし、図6各糖で培養した際の細胞増殖速度は糖の種類と細胞種 (増殖形態) に依

存する結果となった。そこで、培養時間軸を無次元化することによって、細胞増殖ステージを基準にした糖代謝挙動の把握を行った。

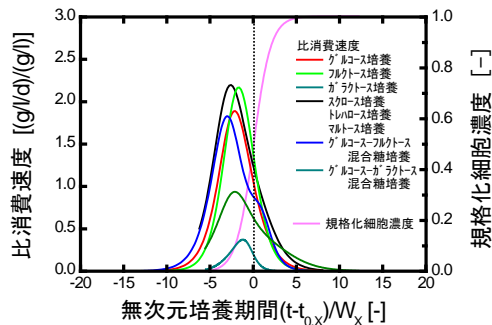


図7 細胞増殖曲線を規格化して時間軸を無次元化したアラビドプシス細胞の糖代謝挙動

時間軸を無次元化した結果、アラビドプシス細胞においては、実時間上では様々な糖で糖代謝速度が大きく異なったが、細胞増殖ステージを規格化した糖代謝挙動はほぼ一致している（糖を取り込んでから細胞増殖が始まり、そのタイミングは糖の種類によらない）ことがわかった。そこで、同様の解析をタバコとイネ細胞にも適用し、アラビドプシス細胞と比較した（図8）。

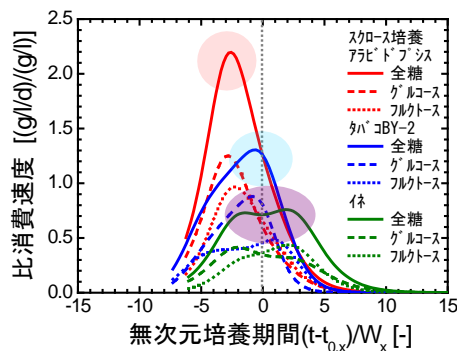


図8 無次元化時間軸での細胞種の違いによる糖代謝挙動の違いの把握

比較的増殖が速い（細胞塊を形成しにくい）タバコ細胞 BY-2 では、細胞増殖のピーク（図8 中の縦の点線＝無次元時間軸ゼロ）と糖の比消費速度のピークはほぼ同じ時間となり、糖の取込み後比較的早く細胞が増殖していることが示唆された。また、イネ細胞においては、無次元時間ゼロ野前後でピークが観察

され、細胞塊の状態で増殖するイネ細胞の糖代謝挙動は他の植物種と異なることが示唆された。

モデル糖化液（バイオマス由来の再資源化糖を想定）を用いた検討においても

4.5 解析結果の総括

バイオマス由来の再資源化糖（様々な糖およびその混合糖）を利用した培養系を構築する際、糖の種類によって糖代謝速度は異なる点に注意が必要である。モデル糖化液（バイオマス由来の再資源化糖を想定）を用いた検討においても、アラビドプシス細胞においてはグルコースの存在が糖代謝挙動に与える影響が大きいことが示唆された。加えて、細胞種の違いによる糖代謝挙動の違いにも注意が必要である。一方で、今回の解析で明らかになった知見として、糖の種類によって代謝速度が大きく異なるにもかかわらず、細胞増殖ステージを規格化して糖代謝挙動を比較するとほぼ同じタイミングで糖消費と細胞増殖が観察された。糖代謝速度の変化を定量的に把握することで、バイオマス由来の様々な糖およびその混合糖を有効利用するための培養系を構築できると考えられる。また、これらの知見は、培地中の糖の種類を変えることで、生物として自然な条件（遺伝子組み換えやプロモータコントロールなどが不要）で細胞増殖のコントロールが可能であることも意味し、バイオマス由来の糖を利用する以外にも培養工学的に有用な知見が得られたと考えられる。さらに、本研究で開発した赤外・近赤外分光法による混合糖の同時定量・消費速度・糖代謝解析法は、植物細胞以外にも様々な培養の解析や培養プロセスの計測制御にも応用可能な基礎技術になりうる。

今後の課題としては、それぞれの糖で馴化した細胞の遺伝子発現との関係や、混合状態の糖で培養した際の詳細な解析、混合糖による五炭糖資化の可能性、バイオマス由来の糖を用いるための培養プロセスの設計指針（増殖が糖の種類または混合糖によって影響を受ける度合いの評価）とその際の増殖コントロールなどについて検討することが望

まれる。本研究によって開発した計測・解析技術と得られた知見に基づいて、今後の課題および将来的な計測制御系の確立への展開が期待できることから、本研究の当初の目的はほぼ達成できたと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① K Suehara and A Hashimoto, Infrared spectral feature of plant-cell culture media, Proceedings of 14th international conference of near infrared spectroscopy, pp1141-1145 (2010)
(査読あり)

[学会発表] (計3件)

① 末原 憲一郎・川口 摩悠美・亀岡 孝治・橋本 篤, 中赤外分光法を援用した懸濁植物細胞の糖代謝挙動に及ぼすグルコース前培養の影響評価, 化学工学会第72年会 (2011年3月22日、小金井)

② 末原 憲一郎・江川 芳美・酒井 麻衣・亀岡 孝治・橋本 篤, 中赤外分光法を援用した懸濁アラビドプシス細胞の糖代謝挙動の速度論的検討, 化学工学会第42回秋季大会 (2010年9月8日、京都)

③ K Suehara and A Hashimoto, Grasping of Spectral Feature on MIR and NIR Regions for Analysis of Plant-cell Culture Broth, International conference of near infrared spectroscopy(NIR-2009) (2009年11月10日、タイ・バンコク)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末原 憲一郎 (Ken-ichiro Suehara)
三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
研究者番号：70291614

(2) 研究分担者

橋本 篤 (Atsushi Hashimoto)
三重大学・大学院生物資源学研究科・教授
研究者番号：40242937

以上