

氏名	あき た とおる 秋 田 徹
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2439号
学位授与の日付	平成14年7月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	テーブルビート (<i>Beta vulgaris</i> L.) 培養細胞によるベタシアニン生産に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 関谷次郎 教授 佐藤文彦 教授 林力丸

論文内容の要旨

テーブルビート (*Beta vulgaris* L.) の根より得られる赤色色素ベタシアニンはビートレッドと呼ばれ、食品用色素として広く使用されている。テーブルビート培養細胞を用いたベタシアニン生産が試みられているが、生産性が低いために実用化レベルには至っていない。本論文では、実用化可能なベタシアニン生産性を示す細胞培養系の確立を目的として行われた一連の研究結果および実用的利用において重要な色素成分の色調やその特性などを根由来の色素と比較検討した結果をとりまとめている。

第1章では、安定的にベタシアニンを生産するテーブルビート培養細胞系の確立について述べている。テーブルビート2品種の胚軸より Linsmaier-Skoog (LS) 培地上でカルスを誘導し、より赤紫色に富み、根の抽出物と同様の吸光スペクトルを示すカルスを得た。この赤紫色のカルスより得た液体懸濁培養細胞株は、暗条件下でベタシアニン収量 100 mg/l 以上の生産性を維持しながら安定に継代培養することができた。さらにプレーティング法による選抜の結果、ベタシアニン収量 400 mg/l 以上の高ベタシアニン生産株が得られ、この細胞株では細胞生育とベタシアニン生産が両立することを示した。

第2章では、培地成分がベタシアニン生産に及ぼす影響について述べている。オーキシンの種類と濃度の影響を調べた結果、比較的低濃度のオーキシン (10^{-7} M 2,4-D あるいは 10^{-5} M IAA) で高い細胞生育およびベタシアニン収量が得られることを明らかにした。LS 培地中の各無機成分について至適濃度などを検討した結果、無機窒素濃度を LS 培地の 1/2 である 30 mM に減らし、 NH_4^+ と NO_3^- の比を LS 培地の 1:2 から 1:14 に変えることでベタシアニン含量が増加することを示した。また微量成分では鉄と亜鉛がベタシアニン生産に影響を及ぼすことを明らかにした。すなわち、鉄は LS 培地の 20 倍 (2 mM) 添加においてベタシアニン収量が最も高くなった。一方、亜鉛は無添加においてベタシアニン含量が増加し、亜鉛濃度の増加とともにベタシアニン含量が低下した。しかし、亜鉛無添加培養では継代にともない細胞の生育、ベタシアニン生産は急激に低下した。

第3章では、培地中の無機成分の解析結果にもとづいて、ベタシアニン生産を最適化した培地の作成について述べている。鉄と亜鉛の最適濃度の相加性を検討し、亜鉛の効果が鉄の効果より優位であることを明らかにした。培地を簡略化するため微量元素のうち効果のなかった銅とコバルトを除去した。これらの結果をもとに LS 培地を改変した高ベタシアニン生産培地 (HB 培地) を確立した。ベタシアニン生産性の異なる細胞株を HB 培地で培養したところ、いずれの株においてもベタシアニン収量が増加した。また HB 培地では、高濃度のシヨ糖添加培養によるベタシアニン含量の低下は認められず、50 g/l シヨ糖添加培養でベタシアニン収量は最も高くなった。さらにベタシアニン高生産細胞株を14日間 HB 培地で培養することにより、ベタシアニン収量が 550 mg/l に達し、実用化可能なレベルに到達したことを示した。

第4章では実用化に必要な大量培養について述べている。まず光照射の効果を検討した。LS 培地では光照射によりベタシアニン収量が増加したが、HB 培地では暗条件下でベタシアニン収量が高くなることを示した。従って HB 培地を用いると光照射なしでベタシアニン生産を行うことができ、大量培養装置の単純化が可能となった。30 l ジャーファーマンターで

培養を行うと、LS培地では108 mg/l、HB培地では230 mg/lのベタシアニン収量を示し、30 lジャーファーメンターにおいても実用化可能な生産性を示した。

第5章では、テーブルビート培養細胞由来色素の特性を栽培品の根由来の色素と比較し、さらに食品への応用について述べている。培養細胞由来の色素の色調は、根由来の色素と比較して黄色成分が少なく青みの強い赤色であった。種々のpHでの耐熱性や耐光性に関して、培養細胞由来色素と根由来の色素はほぼ同じ値を示した。また、加熱処理をともなう食品（魚肉ソーセージ、豚肉ソーセージ）においても、培養細胞由来色素と根由来色素の特性は同じであった。色調が少し異なることを考慮する必要はあるが、培養細胞由来色素は、根由来の色素と同等に食品用色素として使用できることを示した。

論文審査の結果の要旨

テーブルビートの根より得られる赤色色素ベタシアニンはビートレッドと呼ばれ、食品用色素として使用されている。しかし植物細胞培養を用いてベタシアニン生産を試みたこれまでの報告では、ベタシアニン生産性が低く、実用化可能なレベルには至っていない。本論文は、テーブルビート培養細胞を用いてベタシアニン生産の確立を目的として行われた一連の研究成果および培養細胞由来ベタシアニンの食用色素としての特性の検討結果をとりまとめたもので、評価すべき主な点は次のとおりである。

(1) テーブルビート胚軸より得られた赤紫色のカルスから、LS培地でベタシアニンを生産する液体懸濁培養系を確立した。さらにプレティング法で選抜し、暗条件下でもベタシアニン収量400 mg/l以上の高ベタシアニン生産株を得ている。またこの細胞株ではベタシアニンは主に対数増殖期に合成・蓄積され、細胞生育とベタシアニン生産が両立することを示した。

(2) ベタシアニン生産に及ぼすLS培地中の各成分の影響について検討し、オーキシシン、窒素、鉄、亜鉛などがベタシアニン含量や収量に影響することを見いだした。鉄と亜鉛の効果は相加的ではなく、亜鉛の効果が優位であることを示した。LS培地をもとにこれらの成分を最適化し、オーキシシンは 10^{-7} M 2,4-D、総窒素濃度30 mM ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 1 : 14$)、亜鉛濃度 3×10^{-7} Mが至適濃度であること、銅とコバルトは除去することができることを示した。これらの結果にもとづいて高ベタシアニン生産培地（HB培地）を考案した。HB培地は、異なるベタシアニン生産性株においていずれも生産性を大幅に向上させ、高ショ糖濃度でもベタシアニン含量を低下させることなく、また光照射なしでも高生産性を維持することを可能とし、ベタシアニン生産において有効であることを明らかにした。

(3) 実用化に不可欠な大量培養を実証した。30 lジャーファーメンター培養でもHB培地を用いると光照射なしでベタシアニン生産が可能であり、実用化可能なベタシアニン収量（230 mg/l）を示した。

(4) 培養細胞由来のベタシアニンは、耐熱性や耐光性、色調などが根由来の色素とほぼ同じであり、食品用色素として根由来の色素と同等に使用できることを示した。

以上のように、本論文はテーブルビート培養細胞を用いて高ベタシアニン生産系を確立し、その色素が食用色素としての特性を備えていることを明らかにしたもので、植物生化学および植物細胞培養の実用的技術の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年6月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。