

氏 名	久保井 徹 くほい とおる
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 287 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	The regulatory mechanism of lignin synthesis in cultured tobacco cells (タバコ培養細胞のリグニン生産制御)

論文調査委員 (主 査)
教 授 高 橋 英 一 教 授 中 島 稔 教 授 樋 口 隆 昌

論 文 内 容 の 要 旨

本論文はタバコ培養細胞におけるリグニン生成の制御機構について検討を試みたもので、その内容は以下に要約される6章からなっている。

I. タバコ培養細胞の形態とリグニン生成に対するサイトカイニンの影響

Nicotiana tabacum cv. Bright Yellow の髓組織起源の培養細胞は、オーキシシン (2,4-D) を含む寒天培養および液体培養ではほとんどリグニンを生成しないが、これをサイトカイニン (kinetin, 6-benzyladenine 以下 BA と略称) を 1~10 μ M 含む培地に移植すると、8~10日後にリグニンを多量に生成した。一方それとともに培養細胞の集塊化、組織化、仮道管様細胞の分化を生じた。

II. タバコ培養細胞の集塊化と木化

液体培養した細胞を細胞塊の大きさによって大、中、小の3画分にわけて、サイトカイニン (BA) を含む培地で培養を行ない、リグニン生成に対する培養細胞の集塊化の影響を検討したところ、サイトカイニンは細胞塊を大きく生長させ、その大きさに平行してリグニン生成量も増大することをみとめた。

III. タバコ培養細胞のカイネチンおよび 2,4-D のとりこみと木化

2,4-D-2- 14 C, kinetin-8- 14 C とも培養細胞中へよくとりこまれたが、2,4-D-2- 14 C は初期にとりこみが盛んであり、細胞塊の大きさによる差異はみられなかったのに対し、kinetin-8- 14 C はカイネチン処理によって木化がはじまる9日目以降からとりこみが増加し、また細胞塊の大きいものほどエタノール可溶画分における kinetin-8- 14 C の含量は高かった。

IV. タバコ培養細胞の木化における O-methyltransferase 活性の意義

リグニン生合成の鍵酵素の一つと考えられている O-methyltransferase の活性を caffeic acid を基質として測定 (以下 C-OMT 活性と略称) し、リグニン生成との関連をしらべたところ、サイトカイニン (kinetin, BA) を含む培地では、寒天培養および液体培養ともに培養後期に C-OMT 活性は増大し、それはリグニン生成率の増加と一致した。

V. タバコ培養細胞の細胞塊の大きさと O-methyltransferase 活性

サイトカニンを含む培地で液体培養した細胞の細胞塊の C-OMT 活性と細胞塊の大きさとの関係をしらべたところ、両者は傾向を同じくし、C-OMT 活性は細胞塊の大きさに依存することがみとめられた。

VI. タバコ培養細胞塊におけるリグニン生成に関連する酵素活性の変動

一次代謝系の 4 酵素 (malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, G-6-P dehydrogenase) の活性とリグニン生合成系の 6 酵素 (shikimate dehydrogenase, phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase, caffeic acid-O-methyltransferase, 5-hydroxyferulic acid-O-methyltransferase, peroxidase) の活性のリグニン生成にともなう変動をしらべたところ、一次代謝系酵素の活性変動はリグニン生成と関連しなかったが、リグニン生合成系酵素群の活性はサイトカニン培養 8 日目以降急激に増加し、リグニン生成時期と一致した。また phenylalanine ammonia-lyase と peroxidase を除くリグニン生合成系酵素の活性は細胞塊依存性を示した。

論文審査の結果の要旨

植物細胞培養技術の発展に伴って植物有用二次代謝産物を培養細胞に生産させようとする試みが最近盛んになってきている。しかしながら、培養細胞が植物の生産する有用物質を多量に生産した例は未だ少ない。その原因の一つとして、二次代謝産物生産系の発現には細胞塊形成などの組織分化が前提となる可能性が考えられる。このことは本来多細胞生物である高等植物が、培養細胞の状態で諸機能を発揮できるかどうかという基本的な問題とも関係している。それ故植物培養細胞の組織分化と二次代謝発現との関係についての基礎的な研究を行なうことが必要となってきた。

本論文は広く使われているタバコ髓組織起源の培養細胞を実験材料とし、高等植物に普遍的に存在し、またその生成経路がほとんど明らかになっているリグニンを二次代謝産物としてとりあげ、培養細胞におけるリグニン生産制御機構について検討を行なったもので、その結果以下に要約されるような成果をあげている。

すなわちタバコ培養細胞はオーキシンを含む培地で培養している間はリグニンをほとんど生成しないが、これを 1~10 μM のサイトカニンを含む培地に移植すると一定期間 (8~10 日) 後リグニンを生成し、それとともに培養細胞の集塊化、組織化がおこることをみいだした。

ついで培養細胞のリグニン生成量は、サイトカニンによって生長させられる細胞塊の大きさに依存することを明らかにした。

さらにリグニン生成と一次代謝系およびリグニン生合成系諸酵素の活性との関係をしらべ、リグニン生合成にともないその生合成に関与する酵素群の活性が特異的に増加すること、その中のあるものの活性は細胞塊依存性を示し、細胞塊形成が不十分であると活性が十分に増大せず、結果としてリグニン生成にいたらないことを示唆した。

これらの結果からタバコ培養細胞によるリグニン生産には、一定期間サイトカニンを含む培地で培養することおよび少なくとも数十細胞からなる細胞塊を形成することの二点が重要であると結論した。

以上のように本論文は、植物培養細胞による物質生産は、植物生長調整物質を中心とした培養液組成を

検討することにより増大せしめ得る可能性があり，また細胞の集合度が二次代謝系の発現に重要であることを示唆しており，組織培養工学，細胞生理学に貢献するところが大きい。

よって，本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。