

[生物工学会誌 第77巻 第5号 187-196. 1999]

総合論文

植物細胞の培養と再分化に関する 工学的研究

(平成10年度 日本生物工学会照井賞受賞)

魚 住 信 之



Bioengineering Studies on Plant Cell Cultures and Their Regeneration —Monograph—

NOBUYUKI UOZUMI (*Bioscience Center, Nagoya University, Nagoya 464-8601*) *Seibutsu-kogaku* **77**: 187-196, 1999.

There are two main strategies for obtaining biochemical products from plant cells: 1. High-density culture of cells using bioreactors in combination with an effective control technique. 2. The micropropagation of cells. This review shows that processes developed for procuring biochemical products from callus, embryogenic callus, transgenic plant cells, and hairy roots provide promising means for the bioengineering exploitation of plant cells.

[**Key words:** bioreactor, high-density culture, regeneration, micropropagation, callus, hairy root]

はじめに

躍進するアメリカと撤退する日本の植物バイオ産業
アメリカ合衆国のカリフォルニア州サンディエゴ近郊に製薬会社が出資する応用をめざした植物バイオ研究所がつくられる。その研究所に勧誘された教授や実際に合衆国の大学をやめてその研究所に移る若い教授がいる。また、その製薬会社は有名研究室のポスドクをごっそり社員としてリクルートした。1994年遺伝子組換えトマトが合衆国の市場に開放されて以来、欧米の植物バイオ産業は着実な躍進を続けている。日本でも他人事ではなく、すでに遺伝子組換え大豆をはじめとする遺伝子導入野菜が欧米から輸入され、実際に豆腐原料のように加工され我々の口に入っている。地球の田畑に植えられる植物はすべて欧米企業などの数社の製品である遺伝子組換え植物となる日も遠い未来ではなくなった。欧米では「植物バイオはカネのなる木」と考えられ、投資が続けられている。

一方、国内の企業に勤める友人、知人から聞くところによれば、「植物バイオはやめた」とか「植物部門はバブルの崩壊とともに縮小されたよ」とのことである。日

本では植物の応用研究は儲からないということになっているようだ。これは企業規模や日本という国の事情によるのだろうが、国内植物バイオ部門の縮小は、海外企業の日本への進出をより助長することになると考えられる。

本稿の研究を遂行中に、毛状根の再分化植物プロセスに関する原稿を本学会誌JFB(現JBB)に投稿した。その際、国内の論文審査員に、遺伝子組換え植物の野外試験はまだ遠い未来の話で、法律的に整っていないことを意見され、そういう指摘にはどう答えて良いのか困ったことを覚えている。しかし、それから3年もたたずに、遺伝子組換えトマトは合衆国市場に出回った。その頃、別刷り請求とともに、遺伝子組換え植物の大量生産プロセス構築は必要かつ興味ある研究であると海外研究者から感想をもらい私達は素直に喜んだ。

察するに、遺伝子組換えトマトは合衆国だから認可されたのであろう。もし、同時期に日本で同じことをやれば時期尚早と猛反対でつぶされたであろう。遺伝子組換え大豆の輸入は日本でも許可されたが、最初に日本国内の企業が同じものを作っても簡単には許可されなかったと想像する。海外において前例がないと日本では認めて

著者紹介 名古屋大学生物分子応答研究センター導入形質統御分野(助教授)

〒464-8601 名古屋市千種区不老町 TEL. 052-789-5202 FAX. 052-789-5206 E-mail: uozumi@agr.nagoya-u.ac.jp

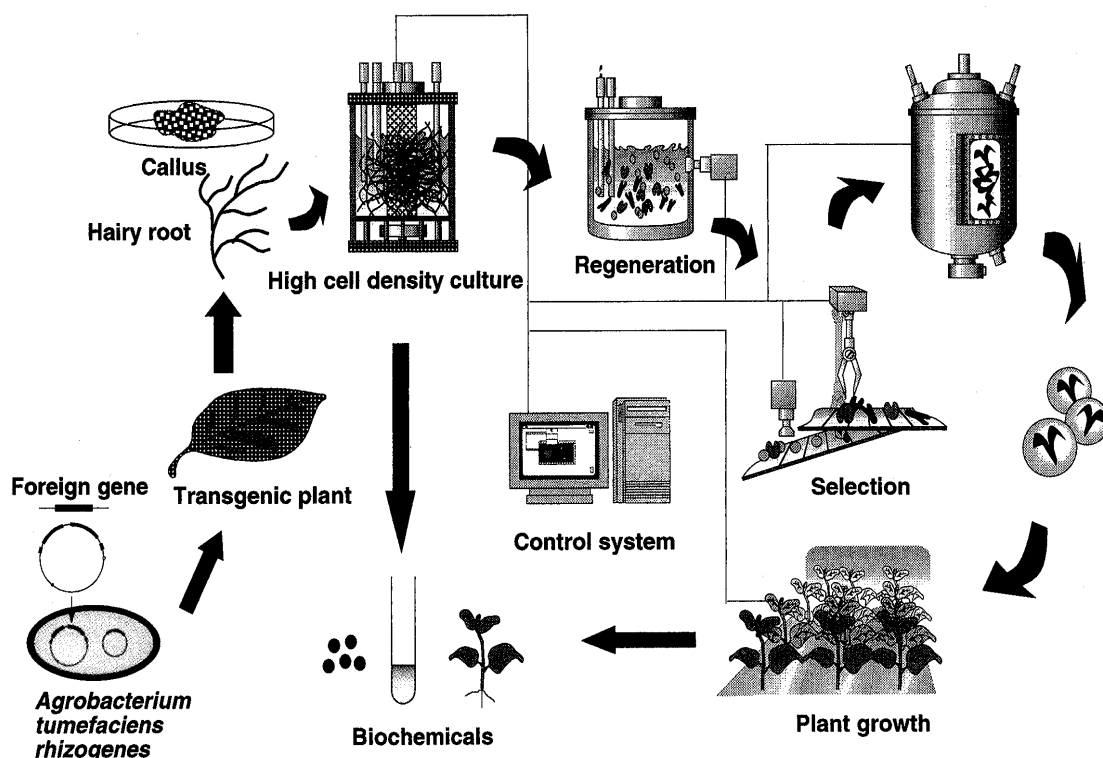


Fig. 1. Process for production of biochemical products and plants from callus and hairy roots.

もらえないのである。このような状態の国内でこの先どのように植物バイオテクノロジーが進んでいくのかに興味を持っている。

植物細胞を用いた物質生産では、培養槽のように閉ざされた空間で増殖させて目的生産物を回収する方法と、植物工場や野外のような開放系で植物を光合成によって生長させて目的産物を回収する方策の両者が考えられる (Fig. 1)。本稿は2種類の物質生産プロセスの構築を目標にした応用研究の結果報告である。

1. 物質生産系としての植物細胞と培養プロセス

植物は土の上で生長させるという固定観念から脱却して、近年では液体培養技術の利用方法が盛んに研究されている。特に、細胞や小植物体を扱う場合には、集中管理が可能で、外的環境に比較的敏感な生長段階を保護するなどの理由から最適な培養槽を用いた閉鎖空間での培養が研究されるようになった。

植物細胞の液体培養は微生物培養技術を土台にして発展してきたが、放線菌や糸状菌のように集塊を形成し、高濃度培養時には培養液が擬塑性流体を呈するなどの点は微生物培養に類似している。微生物の発酵プロセスにおける計測項目の大部分は植物細胞培養にも適用可能である。しかし、植物の形態は多様であり、カルス（未分化細胞）、植物の外植片、不定根、不定胚、不定芽、毛

状根、小植物体などがあることから、植物細胞特有の問題も考慮に入れて培養を行う必要がある。植物細胞の一般的特徴は植物種、培養環境条件などによって多少相違するが、(1) 増殖速度が遅い、(2) せん断力に弱い、(3) 酸素要求性が小さい、(4) 細胞集塊の形成、(5) 代謝産物は細胞内蓄積型が多い、(6) 細胞形状、大きさが不均一、(7) 細胞径が大きい、(8) 分化全能性を有する、などが微生物との相違である。したがって、培養環境の計測項目は微生物培養と比較して多くなり、その制御もより複雑となる。このため、植物細胞培養にあわせた計測方法の開発が研究されるようになった。本研究ではカルスの他に、植物細胞に土壌細菌 *Agrobacterium rhizogenes* が持つ Ri プラスミドが導入されて誘発された毛状根を材料に物質生産プロセスに関する研究を行った。

流加培養による高密度培養と細胞収率・維持エネルギー係数の算出 微生物の培養で行われているようにバイオリクターを用いた高密度培養を行うことが望まれる。回分培養は培養途中における雑菌汚染の心配がないが、応用をめざした植物細胞から物質を効率的に生産させるには適当でない場合が多い。植物細胞では微生物や動物細胞のように増殖途中で細胞外へ代謝産物を大量に分泌し細胞活性を阻害することは比較的少ないので、培養液を交換する反復回分や連続培養は必須ではない。植物細胞の培養特性と培養操作を考慮すると流加培養が

Table 1. Concentrations of major components and metal ions in media for fed-batch culture.

	MS	Carrot hairy root	Ajuga hairy root	BY-2
NH ₄ NO ₃	1.65	1.80	1.10	1.49
KNO ₃	1.90	2.00	2.00	1.71
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.44	0.15	0.15	0.22
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.37	0.27	0.27	0.26
KH ₂ PO ₄	0.17	0.20	0.30	0.60

効率的な培養方法の一つとなる。流加培養では、植物細胞に取り込まれた栄養成分を培養進行とともに添加し、植物細胞に吸収された栄養成分を最適値（例外を除いて初期値）に保つ操作を行う。このため培地のサンプリングが必要となるが、測定すべき成分の数が多くすべての栄養源を測定することは現実的ではない。そこで細胞増殖（培地の電気伝導度変化）をモニターしながら栄養源を一定範囲の濃度に供給する方法を開発する必要がある。¹⁾

植物細胞内の培養液成分は、糖、金属イオン、ビタミン、植物ホルモンであり微生物用培地における合成培地に匹敵し単純かつ安価である。栄養源の流加には、細胞1g 増えるのに何g の各栄養成分が必要となるか（細胞収率）をはじめに知る必要がある。イオン成分は、増殖中に培養槽外へ排出されないことから、常に細胞の増加量と培養液中のイオン成分の減少量は比例すると考えられる。我々はこの各イオン成分の値に基づいて、流加培養用に修正 MS 培地を調製した (Table 1)。この培地の5倍から10倍の濃縮修正 MS 液を加えれば特定栄養成分だけ蓄積したり、または加えているにも関わらずそれ以

上の消費から枯渇してしまうことがなく、ほぼ各栄養成分濃度を一定値に保つことが可能であった。

糖源としては一般に二糖類であるスクロースが用いられる。しかし、スクロースはグルコースとフルクトースに加水分解されるので糖濃度を制御するためには3種類の糖濃度測定が必要となり複雑となる。単糖を用いれば、測定方法が単純となり制御も容易になる。特にグルコースは、オンライングルコースアナライザーを用いることによるオンライン制御が可能である。予備実験として植物種に応じたスクロースの代わりの細胞の増殖に最適となる単糖を検討しそれらを用いた。グルコースまたはフルクトースを用いれば、スクロースと比較して細胞増殖速度、目的生産物の含有量の点でまったく遜色はなかった。²⁻⁴⁾

下記に示すように流加培養を行った際、その培養曲線から培養パラメーターを求めることができた。糖つまり炭素源の一部は培養槽外へCO₂ ガスとなって抜け出てしまうので物質収支をとることはできない。そのため増殖に関する方程式が必要である。毛状根は生長点増殖のため微生物やカルスで適用される方程式は用いることはできない。

対数増殖を示す細胞（微生物やカルス）

$$-d^2S/dt^2 = m dx/dt + (d^2x/dt^2)Y_G$$

生長点で直線増殖する細胞（不定根や毛状根）

$$-dS/dt = mX + (dx/dt)Y_G$$

m: 維持エネルギー係数 Y_G: 細胞収率 X: 細胞量
S: 糖量 t: 時間

この簡単な式から、毛状根の細胞収率、維持エネルギー係数を求めることができた。求められた細胞収率、維持

Table 2. Comparison of biomass yields from saccharides and maintenance coefficients for saccharides with published values.

Organism	Substrate	Cell yield Y _G [g·g ⁻¹]	Maintenance coefficient, m [g·g ⁻¹ ·d ⁻¹]
Plant			
Carrot hairy root	fructose	0.60	0.085
Ajuga hairy root	glucose	0.77	0.105
<i>Eschscholtzia californica</i> callus	sucrose	0.71	0.074
Apple callus	sucrose	0.57	0.012
<i>Nicotiana tabacum</i> callus	sucrose	0.60	0.086
<i>Nicotiana tabacum</i> callus	glucose	0.52	0.106
<i>Medicago sativa</i> callus	lactose	0.77	0.113
Microorganisms			
<i>Candida utilis</i>	glucose	0.51	—
<i>Penicillium chrysogenum</i>	glucose	0.43	0.528
<i>Pseudomonas methanica</i>	methane	0.56	—
<i>Aerobacter cloacae</i>	glucose	0.44	2.256

エネルギー係数は、細胞活性の評価にも用いられる。植物の維持エネルギー係数は運動性のある微生物と比較して小さい。³⁾ (Table 2)。

毛状根についてタービン内蔵型フーメンターを用いることで良好に高密度培養することができた。上記の修正 MS 培地を用いて電気伝導度が一定になるように濃縮修正 MS 培地を流加することで、糖、硝酸イオン、アンモニアイオン、およびリン酸イオン濃度をほぼ一定の範囲の濃度に培養期間維持することができた。ニンジン毛状根を 30.1 g 乾重/l,²⁾ アジュガ毛状根を 27.2 g 乾重/l³⁾ にまでバイオリクターを用いて増殖させることができた (Fig. 2, 3)。細胞収率の値を求めて調製した修正 MS 濃縮液は毛状根に限らず、以下に示す実験のようにカルの流加培養でも使用することは可能であった。

目的生産物の回収操作 生物はフィードバック制御機構を持っているため、生産物が細胞内に蓄積するとその合成を止めてしまう。その生産物を細胞から培養途中

に取り出すことができれば細胞は生産を続けると考えられる。我々は金属イオンを培養液中に添加することにより、西洋わさび毛状根からペルオキシターゼを長期間生産させることに成功した。⁵⁾ 添加する金属イオンの中でもカルシウムイオンがもっとも効果があった。培養液中に漏出したペルオキシターゼをカラムに吸着させ、残りの培養液は細胞培養槽に返す操作で150日にわたってペルオキシターゼの生産と回収が可能であった。⁶⁾

高密度培養における遺伝子誘導型物質生産 植物細胞はタンパク質の生産工場として、微生物や動物細胞の代替宿主として研究されている。遺伝子誘導は適切な遺伝子発現プロモーターを用いれば容易に行える。しかし、微生物や動物細胞と同様に遺伝子誘導時期、誘導物質の濃度などの最適化が必要であり、タンパク質生産開始とともに植物宿主にかかるエネルギー的負荷を考慮する必要がある。

我々は、光で誘導されるルビスコ (rbcS3B) プロモーター (ribrose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) とジャスモン酸 (CDI) プロモーター (cathepsin D inhibitor promoter) のタバコ培養細胞における誘導生産について検討した。

タバコ培養細胞 BY-2 は光シグナルに関する情報伝達系に変異が起きていることに加え、光照射下でも緑化

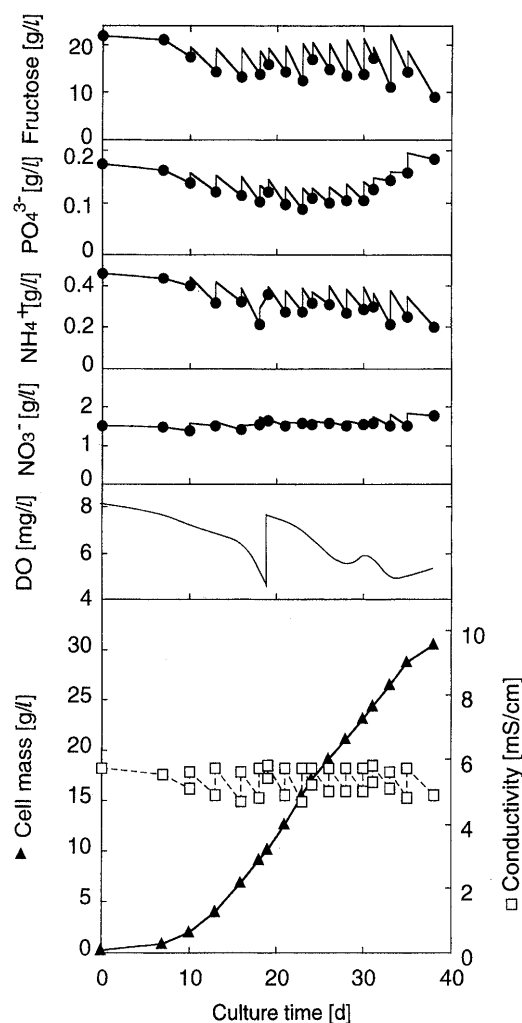


Fig. 2. Fed-batch culture with controlled fructose concentration in carrot hairy root medium.

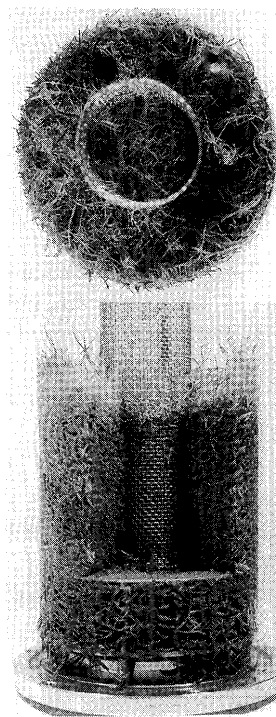


Fig. 3. Growth of carrot hairy root in fed-batch culture using fructose as a carbon source at 38 d. The lower illustration presents a vertical-section view of condensed hairy root material.

しない。この理由から BY-2 では *rbcS3B* プロモーターの光誘導は起こらないと予想していた。ところが、実際には光による誘導発現が観測され、光という槽外からの誘導による遺伝子発現として物質生産に用いることができることが分かった。流加培養終期には、培養液の体積分がすべて細胞にとってかわるほど高密度に細胞は増殖した。最終到達細胞密度は 47.6 g 乾重/l と高い値となった。⁷⁾

CDI プロモーターはジャスモン酸 (methyl jasmonate) の添加で強力に活性化される。我々はフラスコ培養から培養液量 3 l のフェーメンターを用いて高密度培養のスケールアップを試みた。BY-2 の培養では高密度になると攪拌されにくくなる。粘性が高い細胞においても攪拌が行われる Maxblend-type のフェーメンターを用いる培養を試みた。本フェーメンターは攪拌板が大きいことから、おおよそ培養槽が細胞によって埋め尽くされるまで攪拌は行われた。しかし、さらに細胞が増殖されると攪拌板が回転しなくなった。このことは流加培養によって細胞が増殖できる隙間がないほど密になるまで培養できることを意味している。

遺伝子発現誘導とほぼ同時に細胞の増殖が急激に低くなることが分かった。調べてみると、何らかの増殖阻害代謝物質が生産されていることが明らかとなった。これを解決するために、阻害物質をフィルターで槽外へ除去する培養を行った。この結果、細胞増殖および遺伝子産物の生産量は、流加培養の 1.3 倍および 1.5 倍に増加した。⁸⁾

最終到達細胞密度はカルスの方が毛状根に比べて高い。これは毛状根はひと続きの器官であるため、細胞では埋められない根と根の空間ができることに起因すると考えられる。いずれにしても、流加培養を基本とした方法で培養液の体積まで、ぎっしり高密度に培養することが可能である。

シミュレーションを用いた培養環境制御 シミュレーションの利用は、製造工場や生産現場では広く用いられている方法である。大規模培養のように数多くのデータの蓄積が難しい場合などに、試験管やフラスコなどの小規模または簡便な装置を用いてデータを蓄積した後、シミュレーションを行い培養状態を推定することに用いられる。また、培養中には実測が不可能なパラメーターをシミュレーションを用いて推定しながら、培養環境を制御するのに利用できる。ここではアジュガ毛状根から昆虫脱皮ホルモン (20-ヒドロキシエクダイソン) を生産させた具体例をあげてシミュレーション利用の有

効性を考えてみる。

増殖段階と二次代謝産物の生産段階の 2 段階に分けてプロセスを考える必要がある。増殖段階において、毛状根の生長点を増加させるにはオーキシンを添加することが有効であることを見いだした⁹⁾ (Fig. 4)。しかし、オーキシンは目的生産物の生産には阻害的であるため二次代謝産物の生産段階では枯渇させる。二次代謝産物の生産段階に培養を移行させるには、細胞を生かした状態で増殖を止めればよい。我々は培養途中に細胞内リン酸濃度を低く保つことによって、昆虫脱皮ホルモンが細胞内に蓄積され、細胞増殖はほぼ停止することを確認した。もし細胞内リン酸濃度を測定することができれば、培養液に添加する細胞外リン酸濃度を制御して目的生産物である昆虫脱皮ホルモンの効率よく多量に蓄積させることが可能である。

ところが、毛状根をフェーメンターで培養する際に、細胞のサンプリングとリン酸含有量の測定は以下の理由から非常に難しい。1) サンプリングを行うためには小さな操作口から、絡み合いひとつづきに伸びている毛状根を何らかの方法で切断して取り出さなければならない。2) 通気や運転を停止する時間は限られており、雑菌汚染を考慮して操作をすることは困難。3) 細胞内のリン酸濃度 (含有量) を測定することは手間が掛かり、時間

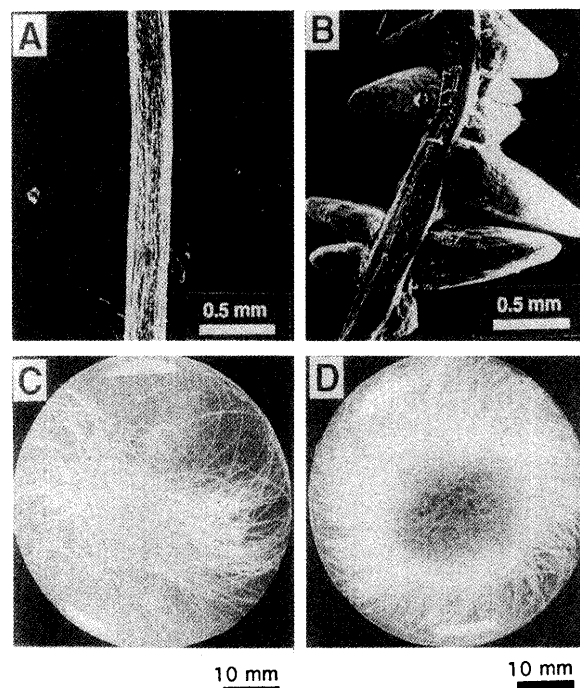


Fig. 4. Scanning electron micrographs of horseradish hairy root cultured in MS medium at 6 d (A and B) and photographs of the same in flask cultures at 15 d (C and D). Auxin concentration: no addition of NAA (A and C) and 1 mg/l NAA (B and D).

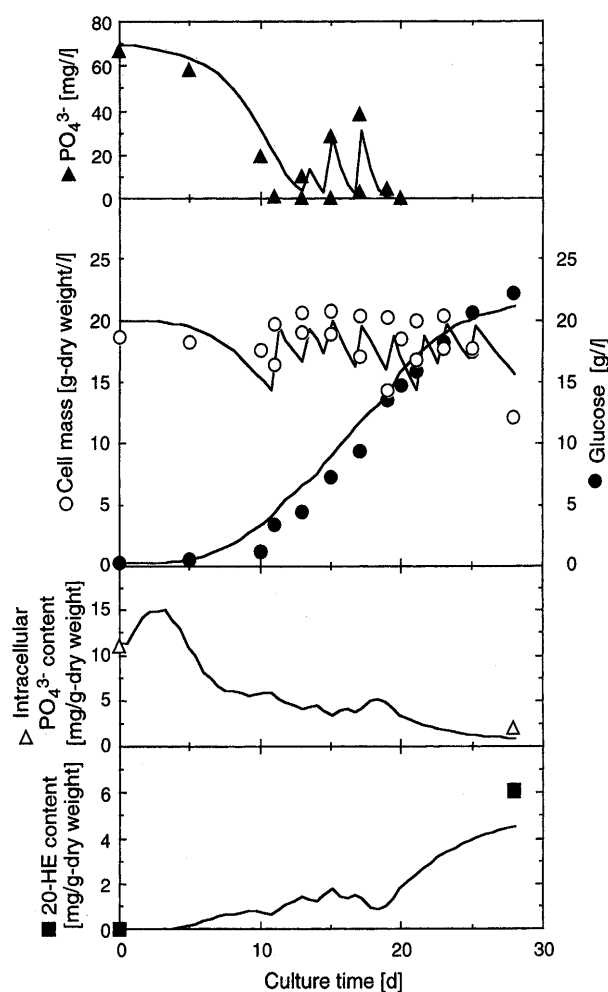


Fig. 5. Fed-batch culture of *Ajuga* hairy root. Symbols represent experimental data. Lines depict calculated results based on the kinetic model.

制約のある中で迅速かつ簡単に濃度を測定することは不可能。

そこで最初に毛状根の増殖パターン、リン酸濃度と二次代謝生産物の蓄積のデータから kinetic model を構築した。構築したモデル式と、添加した各種栄養成分、細胞量の実測値（電気伝導度）から、シミュレーションにて細胞内のリン酸濃度（含有量）を推定して、リン酸量を最適濃度になるように添加し細胞内のリン酸濃度を制御して、昆虫脱皮ホルモンを効率的に生産することを行った。シミュレーションの値と実測値はほぼ一致し、培養途中では実測不可能なパラメーターを予備実験からのシミュレーションにて推定し、培養の最適化、合理的なファーマンターを用いた植物培養が可能となった^{4,10} (Fig. 5)。

2. クローン植物の大量増産方法の確立

クローン動物が昨今話題となっているが、植物のク

ローン増殖は挿し木に代表できるように古くから行われている技術である。これは植物の分化全能性、すなわち植物は一つの細胞からでも完全な植物体に再生することができるという性質を利用したものである。地球の温暖化により生態学的植生の変動が予想され、急速な砂漠化および中期的観点から食糧不足が危惧されている。このような状況に迅速に対応できる優秀な品種の配給システムの構築は、産業的な必要性にとどまらない。しかし、種子繁殖を前提とした従来の育種法では優良植物の作出と遺伝的固定に10年単位の年月が必要であるため、迅速な育種法および優良植物の大量繁殖法の確立が急務である。1980年頃から人工種子という概念にもとづき、クローン増殖で得られた小植物体を内封物として高分子ゲルにより包括し、疑似種子として市場に供給しようという研究が報告されてきた。人工種子を含めた種苗生産は、この問題点を克服し将来的な地球規模の急激な人口増加に対応した食糧増産、および社会のニーズに対応した新しい品種の迅速な大量繁殖を可能にし、直接社会に成果を還元することができる重要性が高い技術となりうる。内封する植物体としては、一般にカルスから誘導される不定胚が用いられている。

不定胚の連続生産 不定胚形成段階においてセロリカルスをアルギン酸カルシウムゲルにより包括し、ゲルから遊離する植物組織は不定胚のように再分化活性の高い組織であることを見いだした。これは、活発な植物塊はゲルの包埋を振り切って培地中に遊離するであろうという発想に基づいている。実際、緑化しかけた細胞塊（不定胚）がゲルから漏出し、未分化細胞の漏出は抑えられ予想通りの結果を示した (Fig. 6)。しかし、培養が進むにつれてゲル架橋物質のカルシウムがゲルから溶けだしゲルの崩壊がおきることが問題となった。そこでゲルの形状を長期に維持するために 10 mM CaCl_2 の添加を行い18回以上のサンプリング（1週間毎1回）が可能であることを実証した。¹¹ さらに回収に最適な培養槽を試作して不定胚を同調的かつ連続的に生産させた。^{12,13}

再分化組織の形態計測技術 形態変化を含む不定胚生産の計測と培養環境の制御方法は再分化植物の利用には必要不可欠である。不定胚の形成過程は、不定胚形成能を持った細胞の誘導期と胚として形態が分化・発達する過程に大別できる。後者は、細胞分裂が盛んに行われて球状型胚を形成する段階、外見的变化が顕著にみられる心臓型胚から魚雷型胚へと発達する段階、成熟して発芽していく段階に分けることができる。不定胚生産は、分化能力を維持したカルスの増殖、カルスから不定胚を

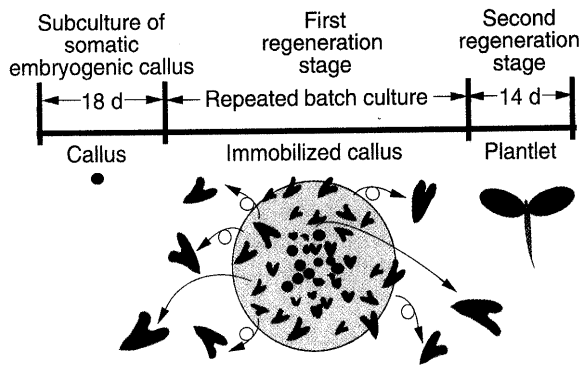


Fig. 6. Culture procedure and schematic diagram of embryo and plantlet regeneration from immobilized callus.

経て健全な植物体に変化させる形態制御の複合培養から成り立っている。

不定胚誘導ではすべてのカルスが分化するのではなくその一部が分化して不定胚が得られる。したがって、不定胚誘導培地中には不定胚の他に未分化の細胞や死んだ細胞など多種多様なものが浮遊する。発芽体を得るために不定胚以外の不純物までも発芽体誘導培地へ移すのでは培地量あたりの発芽体の生産性は低下する。そこで不定胚と不純物の混合状態から不定胚だけを選び出して発芽体誘導培地へ移す必要があるが、人間が一つ一つ物体をすべて判別するのでは時間がかかり効率が悪い。さらに人間の感覚は人によって異なり、同じ人でもその時によって異なる。そして人間は正確に不定胚を見分けるまでにある程度の期間の訓練を要するために安定した品質の発芽体を得ることは難しい。人間の優れているが数値化し難い視覚と認識を代替する認識方策を開発する必要に迫られている。

画像処理技術の課題の一つは、三次元の形を二次元の画像でどのように判別するかである。対象の回転に対応できるニューラルネットワークを組み合わせた不定胚の分化度評価の方法について検討した。画像処理は非破壊で生体情報を測定することができる点で際だった利点を持っている。このシステムは、オリジナル画像をコンピューターに取り込み、二値化、トリミングなどの処理を行った後、計測したパラメーターをニューラルネットワークに入力し不定胚の分化程度を識別する。我々が用いたニューラルネットワークは一般的な入力層、中間層、出力層、の3層構造で結合させたものを用いた。セロリ不定胚の識別には入力パラメーターを面積、縦横比、真円度の3つを用いた場合に90%近くの同じ高い認識率が得られた。3つの入力パラメーターに、6つの中間層、4つの出力層を持つニューラルネットワークを用いて認識実験を行ったところ、このニューラルネットワークは人間

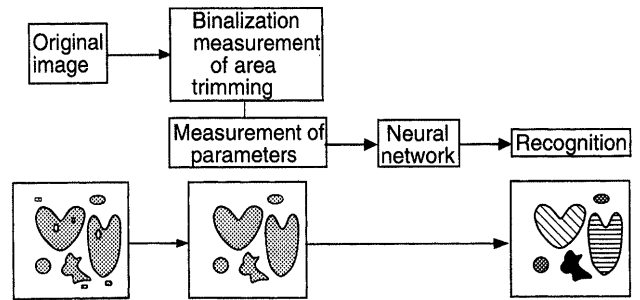


Fig. 7. Image analysis process for recognition of embryogenic callus.

と比較して不定胚とその他の浮遊物を95%以上の認識率で判別した (Fig. 7)。また球状型胚、心臓型胚 (中間体) と魚雷型胚の3種類への分別については80%以上の確率で正しく判別された¹⁴⁾ (Table 3)。

次に、ニューラルネットワークによって認識された不定胚がその後の発芽体形成につながっているかを調べるために、認識実験を行った試料を発芽体誘導し、誘導された発芽体数と推定した不定胚数を比較した。不定胚総数と収穫総数はほぼ同じ値となっており、その内訳においても球状胚数と非正常の発芽体数、中間体と魚雷胚の合計数と正常な発芽体数もほぼ同じ値を示した。したがってニューラルネットワークの認識結果を用いて、その後の発芽体生産数を予測できた。画像処理システムを用いることにより人間の認識の代替が可能となることを示した。

毛状根の種苗生産プロセス 上述したように不定胚は育種分野の研究者を中心に最適な誘導方法が開発されている。しかし、最大の問題点は再分化能をもつカルス (embryogenic callus) の長期維持の困難さである。セロリの場合にはカルス誘導後から最長でも2年、イネカルスでは2カ月で再分化能は失われる。再分化能が失われたら、植物体の葉等の組織からカルスを誘導しなければならない。これは矛盾である。¹⁵⁾つまり、カルスの誘導には遺伝固定をして種子が取れていることが前提となりそれならばクローン増殖の必要はない。不定胚増殖法の研究は続けられているが、再分化カルスを安定に培養または供給する方法が確立しない限り本来の種子の必要性からは逃れられない。

我々は不定胚によらない方法として毛状根を利用することを提案した。いくつかの毛状根は再分化することが分かっていた。研究室では6年間以上にわたり西洋わさび、アジュガの毛状根を維持してきたが再分化効率は安定していた。そのためクローン増殖に適用できる植物細胞として有望である。このすぐれた性質は根という器官

Table 3. Classification efficiency by neural network with three parameters-area, circularity, and ratio of length to width.

	Human ^a (A)	Neural Network ^b (B)	Correct ^c (C)	Accuracy (%)	
				C/A	C/B
Embryo	248	226	214	86.3	94.7
Globular	75	77	71	94.7	92.2
Heart	90	76	74	82.2	97.4
Torpedo	83	73	69	83.1	94.5
Nonembryo	431	453	429	99.5	94.7

^a Number of all embryos (globular, heart, and torpedo) or nonembryos recognized by a human expert.

^b Number of all embryos (globular, heart, and torpedo) or nonembryos recognized by a trained neural network.

^c Number of embryos or nonembryos correctly classified as globular-, heart-, or torpedo-embryo, or nonembryo by both a human expert and a neural network.

に分化して遺伝的変異し難い状態に免れているためではないかと予想しているが、理由については明らかではない。毛状根は形質転換されており、通常の植物と比較して二次代謝産物などの有用物質が多く含まれているものを選別できる。また、再分化した植物体は矮化、頂芽優勢の消失、旺盛な根の増殖などの農業上すぐれた性質をもつ。さらに毛状根を誘導する際、Riプラスミドに外来遺伝子を挿入する操作により、抗菌性、抗ウイルス性、また植物本体への分化・成長を促進する性質などを遺伝子レベルで付与した新しい機能を持つ植物を育種することが容易である。以上のようなすぐれた特徴をもつ毛状根を種苗生産プロセスに応用した報告例はなかった。先にも述べたように、遺伝子組換え野菜を食べる時代が到来し、今後はますます遺伝子組換え植物は一般になっていくであろう。また、目的生産物が緑化した葉のような分化した地上部の細胞に含量が高い場合は、植物体に生長させてから目的生産物を回収する方法としても利用できる。

毛状根はひと続きの根であるため、種苗として用いるには断片化操作が必須となる。根の断片,¹⁶⁾ 不定芽原

基¹⁷⁾ または不定芽^{18,19)} を種苗として用いるのがふさわしいと考え、断片化を行う時期を決定した (Fig. 8)。3種類の組織体を効率よく獲得するために各々の培養条件と小植物体形成効率の促進を西洋わさび毛状根を用いて検討した。その中でも、植物体への再分化効率がほぼ100%である不定芽の効率性産方法を主に検討した。再分化しやすい毛状根の箇所を調べたところ分枝を含む断片からは高頻度で芽が出ることがわかった。分枝数を毛状根上に増やすには生長点を増やすことと同じことである。先に書いたようにオーキシン添加によって分枝を増大させた。次にこの毛状根を人の手に依らないで断片化するために、ブレンダーにより機械的に断片化する方法を試み、省力化、機械化への方策を提案した。機械的に断片化した毛状根をサイトカイニン存在下かつ光照射することで効率的に再分化し小植物は植物へ再生した。 β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を導入したアジュガ毛状根についても本プロセスを試したところ有効に機能した²⁰⁾ (Fig. 9)。再分化培養には攪拌板のない培養槽が望まれる。候補培養槽の一つとして vessel 型フーメンターを用いてフラスコにおける小スケールと同等の効率で2-4 mmの小植物体の生産が可能であることを示した。²¹⁾

不定胚や苗条原基の再分化ではしばしば発根しないことが問題となる。毛状根を用いた再分化では発根については問題ない。遺伝的安定性、物理的強度、扱い易さの点で、再分化能を保持するカルスと比べて毛状根は有効な植物細胞である。本検討により再分化能をもつ毛状根の再生植物の有効性と植物体大量繁殖プロセスそして毛状根の新しい利用法を示すことができた。^{4,22-25)}

おわりに

この研究を始める前は、バイオリクターで植物細胞

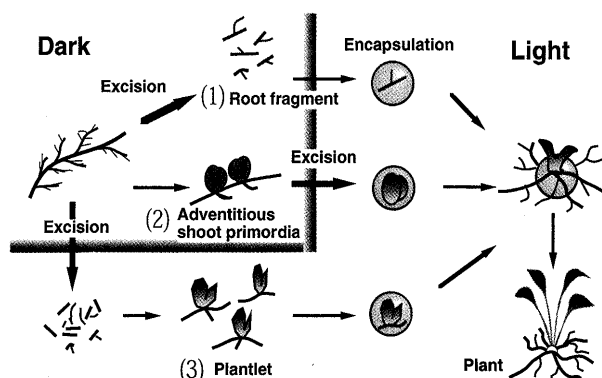


Fig. 8. Three routes for encapsulation from hairy root.

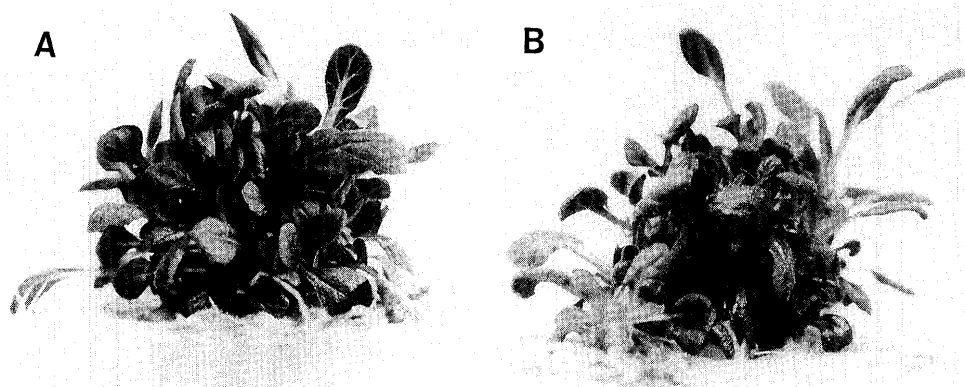


Fig. 9. Regeneration of *Ajuga* hairy root having GUS activity (B), and without the GUS gene as a control (A).

を高密度に培養することはたやすいことと私は考えていた。ところが、理論に基づいてさらにアイデアを加えて実行しなければ目的は達成されないことをすぐに実感させられた。また、100個に1個の効率でしか再分化しないものを100個に90個以上の効率にするにはさまざまな工夫がいるという当たり前のことが分かった。常に実験の再現性を念頭に置き、いわゆる工学への昇華を目標に研究者全員で仕事をした。一方では、カルス、不定胚、毛状根などさまざまな植物組織を相手に植物生理学研究者が行わないことを繰り返し実験することで、教科書には書かれていない特殊性と一般性を見いだすこともあった。植物細胞の増殖や分化を工学という視点で研究することで、目的に応じた再現性の高い物質生産が可能になっていく。巷の植物細胞工学なる雑誌などの中身が工学とはほど遠いことがしばしばある。工学という言葉を使う限りは、名実ともに工学となり、本分野が正しく認識され、ますます発展することを期待している。

本稿は名古屋大学大学院工学研究科で行われた研究をまとめたものである。本研究を進めるにあたり、終始ご指導いただいた小林猛教授に深く御礼申し上げます。同時に、本研究の膨大なデータの作成に関わられた教官、卒業生、共同研究者の皆様にも厚く御礼申し上げます。今回、本研究成果に著者が代表してその栄誉を与えていただいたものと考えております。心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 魚住信之, 小林 猛: インテリジェント農業—自動化・知識化のすすめ, p. 76-89, 工業調査会 (1996).
- 2) Uozumi, N., Kohketsu, K., Kondo, O., Honda, H., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 457-460 (1991).
- 3) Uozumi, N., Kohketsu, K., and Kobayashi, T.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **57**, 155-161 (1993).
- 4) Tanaka, N., Uozumi, N., and Kobayashi, T.: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, (Bajaj, Y. P. S.), vol. 45, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1999) in press.
- 5) Kato, Y., Uozumi, N., Kimura, T., Honda, H., and Kobayashi, T.: *Plant Tissue Culture Lett.*, **8**, 158-165 (1991).
- 6) Uozumi, N., Kato, Y., Nakashimada, Y., and Kobayashi, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 560-565 (1992).
- 7) Uozumi, N., Inoue, Y., Yamazaki, K., and Kobayashi, T.: *J. Biotechnol.*, **36**, 55-62 (1994).
- 8) Suehara, K., Takao, S., Nakamura, K., Uozumi, N., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 51-55 (1996).
- 9) Nakashimada, Y., Uozumi, N., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 178-182 (1994).
- 10) Uozumi, N., Makino, S., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 362-368 (1995).
- 11) Suehara, K., Kohketsu, K., Uozumi, N., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 585-588 (1995).
- 12) Suehara, K., Nagamori, E., Honda, H., Uozumi, N., and Kobayashi, T.: *J. Chem. Eng. Japan*, **31**, 613-617 (1998).
- 13) Uozumi, N., Kohketsu, K., Okamoto, A., and Kobayashi, T.: *Plant Tissue Culture Lett.*, **10**, 25-32 (1993).
- 14) Uozumi, N., Yoshino, T., Shiotani, S., Suehara, K., Arai, F., Fukuda, T. and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 505-509 (1993).
- 15) 末原憲一郎, 後藤伸介, 魚住信之, 小林 猛: 化学工学論文集, **22**, 691-694 (1996).
- 16) Uozumi, N., Nakashimada, Y., Kato, Y., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 21-26 (1992).
- 17) Uozumi, N., Asano, Y., and Kobayashi, T.: *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **36**, 183-190 (1994).
- 18) Nakashimada, Y., Uozumi, N., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 458-464 (1995).
- 19) Nakashimada, Y., Uozumi, N., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 87-89 (1996).
- 20) Uozumi, N., Ohtake, Y., Nakashimada, Y., Morikawa, Y., Tanaka, N., and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 374-385 (1996).

- 21) Honda, H., Hattori, T., Uozumi, N., Kobayashi T., Kato, Y., and Hiraoka, S.: *J. Chem. Eng. Japan.* **30**, 179-182 (1997).
- 22) Kobayashi, T. and Uozumi, N.: *Biochemical Engineering for 2000*, (Furusaki, S., Endo, I., Matsuno, R.), p. 270-273, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1992).
- 23) Uozumi, N. and Kobayashi, T.: *Advances in Plant Biotechnology*, (Ryu, D. D. Y.) p. 307-338, Elsevier, Amsterdam (1994).
- 24) Uozumi, N. and Kobayashi, T.: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, (Bajaj, Y. P. S.), vol. 30, p. 170-180, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1995).
- 25) Uozumi, N. and Kobayashi, T.: *Hairy Roots Culture and Applications*, (Doran, P. M.), p. 113-122, Harwood Academic Publishers, Amsterdam (1997).