

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6840375号
(P6840375)

(45) 発行日 令和3年3月10日(2021.3.10)

(24) 登録日 令和3年2月19日(2021.2.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/04 (2006.01)
C 12 P 17/18 (2006.01)C 12 N 5/04
C 12 P 17/18

B

請求項の数 9 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2016-155754 (P2016-155754)
 (22) 出願日 平成28年8月8日 (2016.8.8)
 (65) 公開番号 特開2018-23290 (P2018-23290A)
 (43) 公開日 平成30年2月15日 (2018.2.15)
 審査請求日 令和1年8月1日 (2019.8.1)

(73) 特許権者 519135633
 公立大学法人大阪
 大阪府大阪市阿倍野区旭町一丁目2番7-
 601号
 (74) 代理人 110001896
 特許業務法人朝日奈特許事務所
 德本 勇人
 大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学
 法人大阪府立大学内
 (72) 発明者 竹田 恵美
 大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学
 法人大阪府立大学内
 (72) 発明者 吉原 静恵
 大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学
 法人大阪府立大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】植物細胞培養用の液体培地および植物細胞の培養方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酸化亜鉛粒子、酸化チタン粒子、および酸化ケイ素粒子からなる群より選ばれる1以上の金属酸化物粒子を配合してなる植物細胞培養用の液体培地。

【請求項 2】

M S 培地またはB 5 培地に、植物ホルモンと、前記金属酸化物粒子とを配合してなる請求項1記載の液体培地。

【請求項 3】

前記金属酸化物粒子が、酸化亜鉛粒子および/または酸化チタン粒子である請求項1または2記載の液体培地。

10

【請求項 4】

前記金属酸化物粒子の平均粒子径が3000 nm以下である請求項1~3のいずれか1項に記載の液体培地。

【請求項 5】

前記金属酸化物粒子の含有量が5~200 mg/Lである請求項1~4のいずれか1項に記載の液体培地。

【請求項 6】

光照射環境下で、請求項1~5のいずれか1項に記載の液体培地を用いる植物細胞の培養方法。

【請求項 7】

20

照射光が白色光である請求項6記載の培養方法。

【請求項 8】

照射光が青色光および／または赤色光である請求項6記載の培養方法。

【請求項 9】

請求項6～8のいずれか1項に記載の培養方法による植物細胞の培養工程を含む、クロロフィルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は植物細胞培養用の液体培地、およびこの液体培地を用いる植物細胞の培養方法 10 に関する。

【背景技術】

【0002】

植物細胞は分化全能性を有することから、植物細胞を用いて特定の植物組織を培養する組織培養や、異種植物のプロトプラストを細胞融合させる雑種形成などの研究が盛んに行われている。

【0003】

植物細胞は、植物体をカルス誘導用MS（ムラシゲスクーラー）培地に植えることで未分化植物細胞の塊であるカルスを誘導し、得られたカルスの一部を固体培養や懸濁培養により増殖させて製造することが一般的である。懸濁培養は、カルス化した小細胞塊または細胞集団を液体培地に移植し、振とうまたは攪拌によって通気しながら、浮遊状態で培養する方法である。懸濁培養は、固体培地に比べて培地に加えた物質の影響が出やすく、比較的均一な細胞集団を形成し、細胞増殖速度に優れるという特徴を有する。しかし、さらなる増殖速度の向上が求められている。

【0004】

特許文献1には、ジベレリンが添加されていることを特徴とする植物細胞懸濁培養用の液体培地が記載されており、この液体培地を用いて培養することにより、形成される細胞塊を小型化できることが記載されている。しかしながら、細胞増殖速度の向上については考慮されていない。

【先行技術文献】

30

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2011-250727号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

植物細胞および／またはクロロフィルの増殖速度に優れた植物細胞培養用の液体培地、および植物細胞および／またはクロロフィルの増殖速度に優れた植物細胞の培養方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

本発明は、金属酸化物粒子を配合してなる植物細胞培養用の液体培地に関する。

【0008】

前記金属酸化物粒子が、酸化亜鉛粒子および／または酸化チタン粒子であることが好ましい。

【0009】

前記金属酸化物粒子の平均粒子径が300nm以下であることが好ましい。

【0010】

前記金属酸化物粒子の含有量が5～200mg/Lであることが好ましい。

【0011】

50

また、本発明は光照射環境下で、前記の液体培地を用いる植物細胞の培養方法に関する。

【0012】

照射光が白色光であることが好ましい。

【0013】

照射光が青色光および／または赤色光であることが好ましい。

【0014】

さらに、本発明は前記の培養方法による植物細胞の培養工程を含む、クロロフィルの製造方法に関する。

【発明の効果】

10

【0015】

本発明の液体培地を用いて植物細胞を培養することにより、細胞および／またはクロロフィルの増殖速度が向上し、従来よりも効率的に植物細胞および／またはクロロフィルを製造することができる。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の植物細胞培養用の液体培地は、金属酸化物粒子を配合してなることを特徴とする。

【0017】

前記液体培地としては、植物細胞培養用の液体培地であれば特に限定されない。例えば、M S (ムラシゲスクーラー) 培地や B 5 培地が挙げられる。

20

【0018】

前記金属酸化物粒子を配合してなる液体培地を用いて植物細胞を培養することにより、細胞および／またはクロロフィルの増殖速度が向上し、従来よりも効率的に植物細胞を製造することができる。

【0019】

金属酸化物粒子としては、酸化亜鉛粒子、酸化チタン粒子、酸化ケイ素粒子、酸化鉄粒子、酸化銅粒子などの生体に悪影響を及ぼし難い金属の酸化物粒子が挙げられる。なかでも、白色光照射環境下および青色光照射環境下での培養で細胞増殖速度が顕著に向上的するという理由からは酸化亜鉛粒子が好ましく、青色光照射環境下および赤色光照射環境下での培養でクロロフィル増殖速度が向上するという理由からは酸化チタン粒子および酸化ケイ素粒子が好ましい。

30

【0020】

金属酸化物粒子の平均粒子径は、本発明の効果がより発揮されるという理由から、300 nm 以下が好ましく、2000 nm 以下がより好ましく、クロロフィルの形成がより促進されるという理由から、100 nm 以下がさらに好ましく、50 nm 以下が最も好ましい。また、金属酸化物粒子の平均粒子径は、培地中での凝集を抑制するという理由から、10 nm 以上が好ましく、20 nm 以上がより好ましい。なお、本明細書における金属酸化物粒子の平均粒子径は、B E T 法により求められる値である。

【0021】

40

金属酸化物粒子の液体培地中の配合量は、完全に溶解してしまうことを抑制し、本発明の効果を効果的に発揮するという理由から、5 mg / L 以上が好ましく、20 mg / L 以上がより好ましく、クロロフィルの形成がより促進されるという理由から、40 mg / L 以上がさらに好ましい。また、金属酸化物粒子の液体培地中の配合量は、200 mg / L 以下が好ましく、150 mg / L 以下がより好ましく、120 mg / L 以下がさらに好ましい。配合量が200 mg / L を超える場合は、液体培地中の固形分(金属酸化物粒子)が多すぎて植物細胞の培養が困難となる傾向がある。

【0022】

本発明の液体培地を用いて植物細胞を懸濁培養する場合、金属酸化物粒子の他に植物細胞培養に必要な植物ホルモンを適宜配合する必要がある。植物ホルモンとしては、オーキ

50

シン、サイトカイニン、ジベレリンなどが挙げられ、培養する植物細胞に応じた植物ホルモンを所定量含有する液体培地とすればよい。

【0023】

本発明の液体培地の製造方法は特に限定されず、従来の方法により製造することができる。例えば、M S 培地に植物ホルモン添加およびp H 調整を行った後、オートクレープなどで滅菌した液体培地に、乾熱滅菌などで滅菌した金属酸化物粒子を添加して攪拌する方法がある。液体培地中の金属酸化物粒子を攪拌する方法としては、金属酸化物粒子を効率的に分散させることができるという理由から超音波洗浄機を用いた方法が好ましい。

【0024】

本発明の植物細胞の培養方法は、光照射環境下で前記の液体培地を用いることを特徴とし、この液体培地を用いること以外は従来の培養方法と同様とすることができる。 10

【0025】

光照射環境は、植物細胞増殖速度、クロロフィル生成量の観点から、自然光または白色光を照射する環境が好ましい。ここで、白色光とは自然光に近い人工光であり、白色蛍光灯による光や、青色光と緑色光と赤色光とを所定の分布で混合した光とすることができる。自然光または白色光を照射する場合の光照射量は、従来の植物細胞培養条件であれば特に限定されず、5 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 l u x が好ましい。

【0026】

光照射にかかる電力を低減できるという理由からは、青色光および赤色光の少なくとも1つを照射する環境が好ましい。なお、本明細書における青色光は4 5 0 ~ 4 9 5 n m 領域の光成分が優勢である光であり、赤色光は6 2 0 ~ 7 5 0 n m 領域の光成分が優勢である光である。青色光および赤色光の照射機器としては特に限定されず、青色L E D、赤色L E Dなどを用いることができる。青色光および／または赤色光を照射する場合の光照射量は、従来の植物細胞培養条件であれば特に限定されず、5 0 0 ~ 3 0 0 0 l u x が好ましい。 20

【0027】

本発明の培養方法に用いる植物細胞は、本発明の効果が損なわれない限り特に限定されない。例えば、タバコ、シロイヌナズナ、エンドウなどの双子葉類植物、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギなどの単子葉類植物の植物細胞の培養に用いることができる。 30

【0028】

本発明の一実施形態に係る植物細胞の培養方法によれば、細胞増殖速度が向上し、従来よりも効率的に植物細胞を製造することができる。また、一実施形態に係る培養方法により増殖した植物細胞は、クロロフィルの形成が促進されるため、本発明の培養方法による植物細胞の培養工程を含む、クロロフィルの製造方法とすることが好ましい。

【0029】

本発明のクロロフィルの製造方法は、前記の培養方法により培養された植物細胞からクロロフィルを抽出することを特徴とする。

【0030】

クロロフィルの抽出方法としては、従来の方法を採用することができる。例えば、植物細胞をアセトンなどの有機溶媒中ですり潰すなどして、有機溶媒中に溶解させ、遠心分離などで精製することで抽出することができる。 40

【実施例】

【0031】

本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

【0032】

以下に実施例および比較例において用いた各種薬品をまとめて示す。

M S 培地：和光純薬工業株式会社製のM S 培地、p H 5 . 6 ~ 5 . 7

発芽用固体培地：0 . 2 5 質量% のゲランガムを含有するM S 培地、p H 5 . 6 ~ 5 . 7

カルス誘導用固体培地：0 . 2 5 質量% のゲランガム、1 0 ⁻⁵ M のナフタレン酢酸、1 0

50

10^{-6} M のベンジルアデニンを含有する M S 培地、 pH 5 . 6 ~ 5 . 7
 カルス誘導用液体培地 : 10^{-7} M のナフタレン酢酸、 10^{-5} M のベンジルアデニンを含有する M S 培地、 pH 5 . 6 ~ 5 . 7

酸化亜鉛粒子 1 : シーアイ化成株式会社製、平均粒子径 3 4 nm
 酸化亜鉛粒子 2 : シーアイ化成株式会社製、平均粒子径 2 0 0 0 nm
 酸化チタン粒子 : シーアイ化成株式会社製、平均粒子径 3 6 nm
 酸化ケイ素粒子 : シーアイ化成株式会社製、平均粒子径 2 5 nm

【 0 0 3 3 】

カルス細胞の誘導

エッペンチューブにタバコの種子と 7 0 % エタノール 1 mL を加え、 3 0 秒攪拌後 6 0 10 0 0 rpm で遠心分離し上清を取り除いた。次に、次亜塩素酸濃度 0 . 6 % の滅菌液 1 mL を加え、 3 ~ 5 分攪拌後 6 0 0 0 rpm で遠心分離し上清を取り除いた後、滅菌水を 1 mL 加え、よく攪拌後 6 0 0 0 rpm で遠心分離し上清を取り除いた。この洗浄操作を計 3 回行った。洗浄後のタバコの種子を寒天濃度 0 . 1 % のアガーリ液に懸濁し、シャーレ中の発芽用固体培地上に播種した。シャーレのふたを閉じサジカルテープを巻き 2 週間、 2 5 20 の人工気象器 (E Y E L A 製) で生育させた。生育したタバコの葉を葉脈を傷つけるようにメスで切り取りカルス誘導用固体培地に静置した。シャーレのふたを閉じサジカルテープを巻いた後、約 1 週間、 2 5 の人工気象器 (E Y E L A 製) で培養した。葉の切片から形成したカルスを暗所において継代培養繰り返すことによって作成した遺伝子レベルで同一の細胞を実施例および比較例に使用した。培地の作製、種子の滅菌、カルスの誘導は滅菌条件で行うことが重要であるため、使用する器具は滅菌し、作業は全てクリーンベンチで行った。

【 0 0 3 4 】

試験用液体培地の調製

表 1 ~ 3 に示す处方に従い各液体培地を調製した。まず、 7 0 で一晩乾熱滅菌処理した各金属酸化物をカルス誘導用液体培地に添加し、超音波洗浄機で 1 5 分間分散処理を行うことで各試験用液体培地を調製した。

【 0 0 3 5 】

実施例 1 ~ 6 、比較例 1 ~ 3

表 1 に示す各試験用液体培地が 1 2 . 5 mL ずつ入った三角フラスコ (5 0 mL) に、 30 0 . 2 g のタバコカルスを投入し、実施例 1 ~ 6 および比較例 1 は白色蛍光灯 (光量 7 0 0 0 1 lux) 照射環境下、比較例 2 および 3 は暗所で、 2 週間、 2 5 で懸濁培養した。

【 0 0 3 6 】

実施例 7 ~ 9 、比較例 4

表 2 に示す各試験用液体培地が 7 mL ずつ入った 6 穴マルチウェルプレートのウェルに、 0 . 2 g のタバコカルスを投入し、青色 LED (光量 1 5 0 0 1 lux) 照射環境下、 2 週間、 2 5 で懸濁培養した。

【 0 0 3 7 】

実施例 10 ~ 12 、比較例 5

表 3 に示す各試験用液体培地が 7 mL ずつ入った 6 穴マルチウェルプレートのウェルに、 0 . 2 g のタバコカルスを投入し、赤色 LED (光量 1 5 0 0 1 lux) 照射環境下、 2 週間、 2 5 で懸濁培養した。

【 0 0 3 8 】

評価

培養後のタバコ培養細胞について、細胞量およびクロロフィル量を評価した。結果を表 1 ~ 3 に示す。

【 0 0 3 9 】

細胞量の測定

懸濁培養後の培養液から吸引ろ過により液体培地を取り除き、残った培養細胞の重量を測定した。

10

20

50

30

40

50

【0040】

クロロフィル量の測定

細胞量の測定で得られた細胞培養を、細胞量の約4倍量の100%アセトンを用いて乳鉢上で乳棒を用いてカルスを摩碎した。摩碎後の細胞をバストールピペットを用いて十分冷えた試験管に回収した。回収した摩碎液を3500 rpmで10 min遠心分離した後、上澄み液を目盛り付き試験管に回収した。上澄み液を85%アセトンでメスアップし、分光光度計を用いて663.6 nmおよび646.6 nmの吸光度を測定した。ただし750 nmにおいてゼロ点合わせを行った。測定した吸光度と下記式によりクロロフィル含有量(μg/mL)を算出した。

$$\text{クロロフィル含有量} (\mu\text{g}/\text{mL}) =$$

10

$17.76 \times 646.6 \text{ nm}$ の吸光度 + $7.34 \times 663.6 \text{ nm}$ の吸光度
そして、クロロフィル含有量、加えたアセトンの量およびカルスの生重量を用いて培養細胞あたりのクロロフィル量を算出した。

【0041】

【表1】

表 1

	比較例			実施例					
	1	2	3	1	2	3	4	5	6
照射光	白色	暗所	暗所	白色	白色	白色	白色	白色	白色
金属酸化物粒子濃度 (mg/L)									
酸化亜鉛粒子1	—	—	100	100	—	—	—	25	50
酸化亜鉛粒子2	—	—	—	—	100	—	—	—	—
酸化チタン粒子	—	—	—	—	—	100	—	—	—
酸化ケイ素粒子	—	—	—	—	—	—	100	—	—
評価									
細胞量 (g)	2.27	1.01	0.49	4.90	4.23	1.15	0.98	5.68	6.40
クロロフィル量 (μg/g)	2.93	4.55	2.99	5.77	3.85	3.26	2.56	3.33	5.81

【0042】

20

30

【表2】

表 2

	比較例 4	実施例		
		7	8	9
照射光	青色	青色	青色	青色
金属酸化物粒子濃度 (mg/L)	—	100	—	—
酸化亜鉛粒子	—	—	100	—
酸化チタン粒子	—	—	—	—
酸化ケイ素粒子	—	—	—	100
評価				
細胞量 (g)	0.18	0.23	0.22	0.18
クロロフィル量 (μg/g)	0.38	6.12	4.90	0.92

10

20

【0043】

【表3】

表 3

	比較例 5	実施例		
		10	11	12
照射光	赤色	赤色	赤色	赤色
金属酸化物粒子濃度 (mg/L)	—	100	—	—
酸化亜鉛粒子	—	—	100	—
酸化チタン粒子	—	—	—	—
酸化ケイ素粒子	—	—	—	100
評価				
細胞量 (g)	0.11	0.10	0.10	0.07
クロロフィル量 (μg/g)	0.38	0.42	1.17	1.14

30

40

【0044】

上記表1～3の結果より、本発明の液体培地が植物細胞および／またはクロロフィルの増殖速度に優れた植物細胞培養用の液体培地であり、さらに本発明の培養方法が植物細胞および／またはクロロフィルの増殖速度に優れた植物細胞の培養方法であることがわかる。

フロントページの続き

(72)発明者 野村 俊之
大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学法人大阪府立大学内
(72)発明者 中島 淑乃
大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学法人大阪府立大学内
(72)発明者 山本 花純
大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学法人大阪府立大学内

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2016/0044882(US, A1)
特開2009-159890(JP, A)
Int. J. Environ. Res. Public Health, 2013, Vol.10, pp.47-71
Frontieres in Plant Science, 2016, Vol.7, Article 535, pp.1-8
日本植物学会第78回大会研究発表記録, 2014, Vol.78, p.220, P-077
日本植物学会第79回大会研究発表記録, 2015, Vol.78, p.207, P-092

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 1 / 00 - 7 / 08
C 12 P 1 / 00 - 41 / 00
C 12 Q 1 / 00 - 3 / 00
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)