

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K06871

研究課題名（和文）回転円板型培養器を用いたコルジセピン生産プロセスの開発

研究課題名（英文）Development of cordycepin production process using rotating disk contactor

研究代表者

櫻井 明彦（Sakurai, Akihiko）

福井大学・学術研究院工学系部門・教授

研究者番号：40283163

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：冬虫夏草が生産するコルジセピンは、抗腫瘍などの生理活性を示すことから新たな医薬品や化粧品、機能性食品の原料として期待されている。しかしながら、冬虫夏草は通常の培養法ではコルジセピンを生産しないため、実用レベルの生産技術は確立していない。本研究では、回転円板型培養器を用いて冬虫夏草を培養することにより、コルジセピンの生産速度、生産濃度ともに実用レベルにある生産技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コルジセピンは冬虫夏草の有効成分として古くから漢方薬として注目されてきた。しかし、生産技術が確立していないために価格が高く、新たな医薬品原料として期待されながらも、実用化に向けた評価が進んでいなかった。本研究は、高齢社会に突入した日本において需要が高まる機能性食品の開発の一助となるものである。現在、多くの有用物質が組換え菌によって生産されているが、コルジセピンなどの代謝経路が確定していない物質については、野生株の変異による高性能化と特殊な培養方法の適用意外に実用的な生産手段がない。本研究は、キノコなどのように培養条件によって代謝産物が大きく変化する微生物の新たな培養法を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Cordycepin, one of *Cordyceps militaris* metabolites, is expected as a raw material for drugs, cosmetics, and functional foods because of its physiological activities such as antitumor. However, the cordycepin production process has not been established because it is hardly produced by the conventional culture method. In this study, we developed a new cordycepin production process using rotating disk contactor at a practical productivity level.

研究分野：生物プロセス工学

キーワード：コルジセピン 冬虫夏草 回転円板型培養器 円板素材 反復回分培養 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

コルジセピン (3'-デオキシアデノシン、図1) は漢方薬などに使用されている冬虫夏草 (図2) に固有の成分であり、抗腫瘍や抗菌などの多くの薬理活性が報告されている。その基本となる作用機序は、リボースの3'位のヒドロキシ基の欠落により、核酸の伸長を阻害するものである。この他にも、最近では高脂血症の予防や認知機能の改善、抑毛などの効果が報告されており、医薬品や化粧品、特定保健用食品の原料として期待されている。しかし、天然の冬虫夏草は収穫量が少なく、さらに子実体のコルジセピン含有量が著しく低いため、天然子実体の採取によるコルジセピンの生産量は極めて少ない。また、生産性の高い微生物株や培養技術の開発が進んでおらず、菌糸体の培養による生産技術は確立していない。このため、コルジセピンは供給量が少なく高価格なため (Sigma 製 137,200 円/100mg)、誘導体合成や *in vivo* での生理活性評価などが進んでいない。これらはコルジセピン実用化への障害となっている。

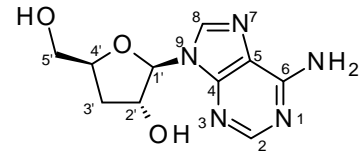


図1 コルジセピンの構造

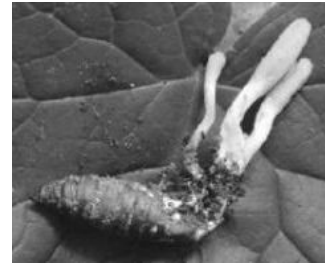


図2 冬虫夏草子実体 (*Cordyceps militaris*)

冬虫夏草サナギタケ (*Cordyceps militaris*) の菌糸体培養によるコルジセピンの生産に関しては、台湾や韓国、中国の研究グループが精力的に研究を進めている。しかし、使用されている野生株のコルジセピン生産性が低いいため、生産量は最高でも 2g/L をわずかに超える程度にすぎない。一方、コルジセピンの生合成については古くから解析が進められており、*Cordyceps militaris* の全ゲノム配列は 2011 年に決定されているが、コルジセピン合成経路の解析は未だ推定のレベルに止まっている。このため、遺伝子組換え菌によるコルジセピン生産は、これまでに報告されていない。また、冬虫夏草については食品素材としての利用が期待されているため、遺伝子組換えは好ましくない。このような背景から、本研究ではイオンビーム照射による変異技術を用いて冬虫夏草の育種を行ってきた。現在までに、プロトンビーム照射によってコルジセピン高生産株 G81-3 (寄託番号 FERMAP-21315) を作出することに成功し、液体表面培養において 9g/L 以上のコルジセピンを生産できる条件を明らかにしている。これは、現在の世界最高レベルのコルジセピン生産技術である。

変異株 G81-3 は、液体表面培養法においては高いコルジセピン生産性を示すが、液体表面培養法では大量生産が難しい。そこで大量生産に適した深部培養を検討したところ、フラスコを用いた振盪培養法、ジャーファーメンターを用いた通気攪拌培養法のいずれにおいても、コルジセピン生産性は著しく低く、生産濃度は 0.5g/L に達しなかった。この結果より、冬虫夏草の菌糸体は、空気に接していなければコルジセピンを生産しない、あるいは、菌糸体に攪拌などの機械的ストレスがかかるとコルジセピンを生産しないと考えられた。

2. 研究の目的

上述のようにコルジセピンを効率よく生産するには、液体表面培養法のような菌糸体への機械的ストレスが小さな培養法が好ましい。この方法の 1 つとして液体表面培養と深部培養の中間の特徴を持つ回転円板型培養がある。回転円板型培養器 (図3) では、円板上に固定化された菌糸体を円板の緩やかな回転により気相と液相を交互に移動させる。これにより、培養液の攪拌を行わずに菌糸体への酸素の供給が可能であり、また培養液への通気を必要としないことから菌糸体への機械的ストレスが少ない。さらに、菌糸体を空気に接触させることも可能である。

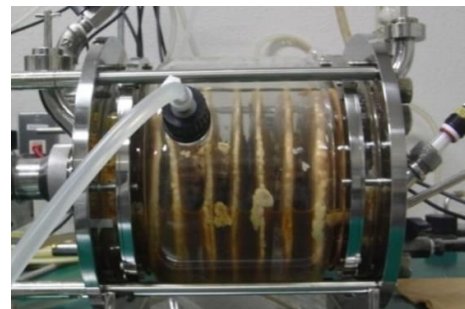


図3 回転円板型培養器 (RDC)

本研究では回転円板型培養器によるコルジセピン生産の可能性を明らかにし、その操作条件を最適化することを目的として、以下の内容について検討した。

(1)冬虫夏草菌糸体の固定化用円板素材の最適化

マクロ構造および化学構造の異なる固定化用円板素材を作製し、円板素材と冬虫夏草菌糸体の付着性およびコルジセピン生産性との関係を明らかにし、最適な円板素材を決定する。

(2)回転円板型培養器によるコルジセピン生産条件の最適化

項目(1)で選択した円板素材を用いて、培養条件 (円板枚数、回転速度、培養液量) とコルジセピン生産性との関係を明らかにし、操作条件を最適化する。

(3)培養液のアミノ酸組成の最適化

培養液のアミノ酸組成とコルジセピン生産との関係からコルジセピン生合成に関わる主要なアミノ酸を明らかにし、培養液のアミノ酸組成を最適化する。

3. 研究の方法

培養には、内径 15 cm、長さ 20 cm (容積 3.5 L) のガラス製横置き円筒型の回転円板型培養器 (図 3) を用い、内部には目開き 1.5 mm のステンレスメッシュと編物などの固定化担体を組み合わせた円板を等間隔で 4~12 枚設置した。固定化担体としては、八田経編製のダブルラッセル編物 (図 4) を用いた。培養温度は 25 °C とし、円板の回転速度は 2~10 rpm の範囲に設定した。培養液量は 150~1200 mL とし通気量は 0.1~1.0 vvm の範囲に設定した。コルジセピン生産菌としては *Cordyceps militaris* G81-3 を用い、培地組成は液体表面培養用に最適化したもの (Bacto yeast extract 93.8 g/L, glucose 86.2 g/L) を基本とした。また、培地のグルコース濃度が 3 g/L 以下に低下した時点で培養液の入れ替えによる反復回分培養を行った。

4. 研究成果

(1) 冬虫夏草菌系体の固定化用円板素材の影響

固定化用の円板素材として、数種類の不織布や織物、編物を検討した結果、編物の中でもダブルラッセル編物 (図 4、5) を用いることにより菌系体が容易に付着し、コルジセピンの生産が可能ながことが分かった。そこで、ナイロン繊維とポリプロピレン繊維を用いてダブルラッセル編物を作製し、化学構造とコルジセピン生産性との関係について解析した。また、編み目の開きについても、平均 1.2 mm と 1.8 mm の場合について検討した。

固定化編物のコルジセピンの生産への影響を反復回分培養により検討した結果を図 6 に示す。ナイロン製で目開きの異なる編物を用いた場合には、目開きが小さいものの方がコルジセピン生産性が高くなることが分かった。1.2 mm よりも小さい目開きについては、加工が困難なため目開きは 1.2 mm が最適であるとした。繊維の化学構造の影響を検討したところ、親水性のナイロンと疎水性のポリプロピレンでは、予想に反して菌系体の付着量に大きな違いはみられなかった。一方コルジセピンの生産速度については、ナイロン製はポリプロピレン製の約 2 倍の値を示した。増殖量に大きな違いがみられないことから、代謝経路に何らかの影響を及ぼしたと考えられるが、菌系体破砕物のタンパク質構成には大きな違いは確認されなかった。以降、ナイロン製の目開き 1.2 mm のダブルラッセル編物を用いて検討を進めた。

(2) 回転円板型培養器によるコルジセピン生産条件の検討

円板枚数の影響

はじめに円板枚数を 4~12 枚に設定して検討したところ、円板間隔が 3 cm 程度となる円板枚数が 4 枚では円板に付着せず培養液に浮遊する菌系体が多く、円板枚数を 6 枚にした場合でも 20% 程度の浮遊がみられた。9 枚と 12 枚ではどちらも菌系体の浮遊はみられなかったが、円板枚数 12 枚では円板間隔が 1.2 cm 以下となり、反復回分培養時には付着した菌系体の増殖により円板同士が接触し酸素が十分に供給されなかった。これらの結果から、最適な円板枚数を 9 枚とし以降の実験を進めた。

円板回転速度の影響

同様に円板の回転速度の影響について検討した。ここでは回転速度の影響を確認しやすいように培養液量を 1200 mL に設定した。図 7 に示すように、円板回転速度 10 rpm では機械的ストレスによりコルジセピンはほとんど生産されず、2 rpm では酸素の供給不足により生産量が低下し、5 rpm で最も高いコルジセピン生産速度が得られた。回転円板型培養器では、菌系体が付着した円板が回転することにより菌系体を培養液中から空気中に移動させ空気中から酸素を供給する、同時に円板上に付着した酸素を豊富に含む培養液が培養液に戻るにより培養液にも酸素が供給される。従って、回転速度が高い方が全体として酸素の供給速度が高くなるが、円板

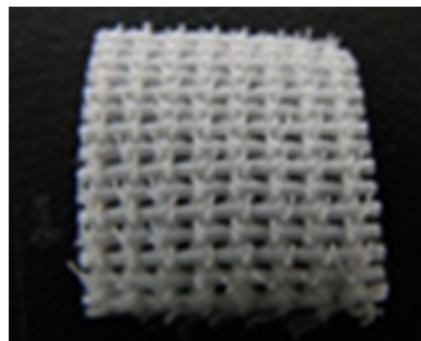


図 4 ダブルラッセル編物

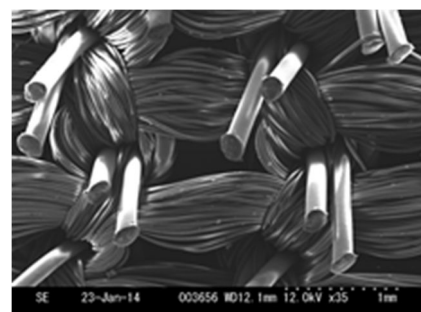


図 5 ダブルラッセル編物の微細構造

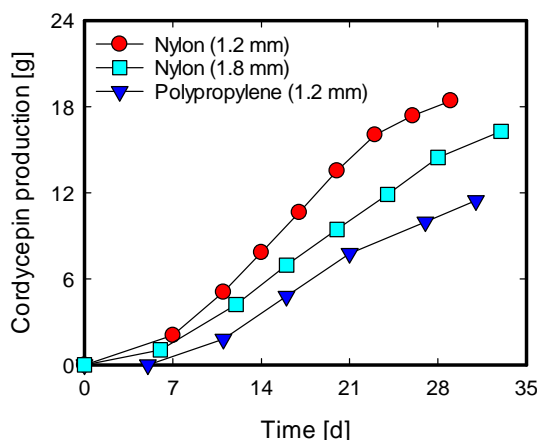


図 6 円板素材のコルジセピン生産性への影響

上の菌糸体が回転により受ける培養液からの機械的ストレスが増加する。今回使用した培養器では 5 rpm が最適条件となったが、円板の径により先端速度が変わるため、スケールアップを考慮した最適化には先端速度によるデータ解析が必要である。

培養液量の影響

円板枚数を 9 枚、円板回転速度を 5 rpm として培養液量の影響について反復回分培養法で検討した。図 8 に示すように、培養初期では培養液量が多い方が生産量が多くなる傾向にあるが、培養後期になると菌糸体の増殖により円板間の空気層が狭くなり、酸素の供給が低下するためコルジセピンの生産速度が低下する。従って、両者のバランスを考慮した培養液量の設定が必要になる。この培養器の場合には、培養後期までコルジセピンの生産速度を高く維持し、最終的に生産量が最も高くなった 300 mL が最適である。

コルジセピン生産性と培養液の関係を菌糸体の比表面積 A/V で整理した結果を図 9 に示す。ここで、 A は円板上に固定化された菌糸体の表面積を、 V は培養液量を表し、比表面積 A/V は菌糸体の表面近傍だけがコルジセピン生産に関与すると仮定した際の培養液量に対する有効菌糸体量を表す。なお、菌糸体は培養液につかっている部分だけに増殖するため、菌糸体の表面積 A は横置き円筒型となっている回転円板型培養器の特性から、 V には比例しない。最大コルジセピン濃度、菌糸体の表面積当たりの比生産速度、体積基準での生産速度とともに A/V が 5.0 付近（培養液 300 mL、円板枚数 9 枚）で最大となった。これらの値を液体表面培養と比較すると、比生産速度と最大コルジセピン濃度は同等以上の値が得られ、生産速度は約 10 倍になっていることが分かる。生産速度が大幅に高くなった原因としては、比生産速度がやや高くなる事に加えて、菌糸体の比表面積が大幅に大きくなり、有効に働く菌糸体が多くなっていることが挙げられる。最大の生産性が得られた $A/V = 5.1$ （培養液量 300 mL、円板枚数 9 枚）の場合の培養の経時変化を図 10 に示す。培養 26 日目まで効率よくコルジセピンが生産されていることが分かる。これ以降、コルジセピンの生産濃度が低下するのは、円板上の菌糸体の過剰増殖により円板間の空間が極端に狭くなり菌糸体に酸素が供給されなかったためと考えられる。菌糸体の増殖を制御することにより、コルジセピンを長期間安定的に生産することが今後の課題として挙げられる。

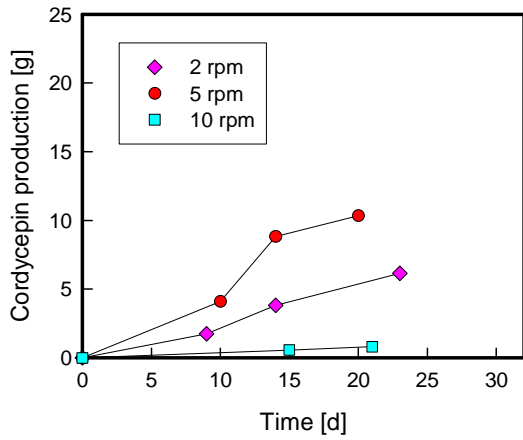


図 7 円板回転速度のコルジセピン生産性への影響

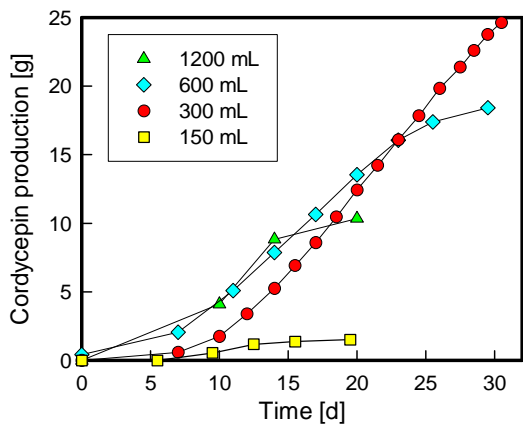


図 8 培養液量のコルジセピン生産性への影響

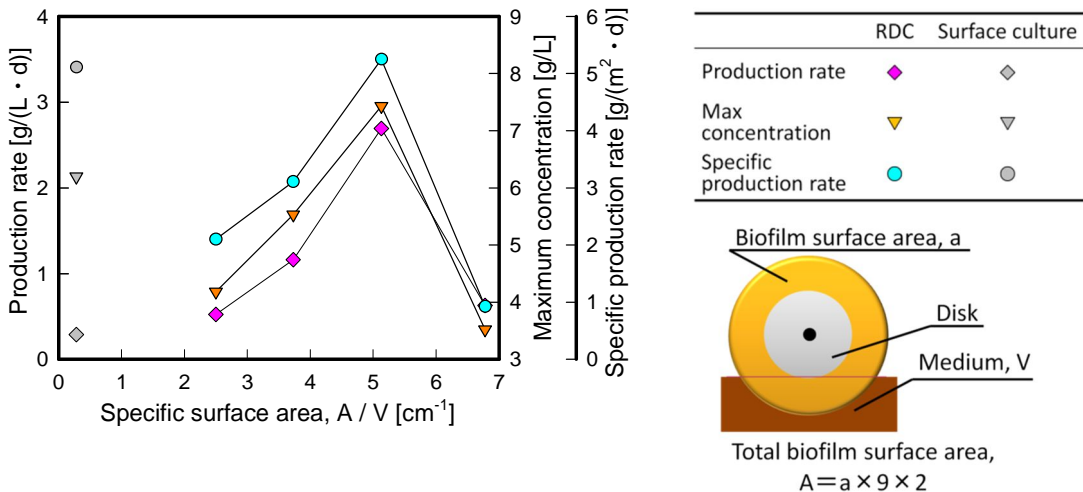


図 9 菌糸体の比表面積 A/V とコルジセピン生産性の関係

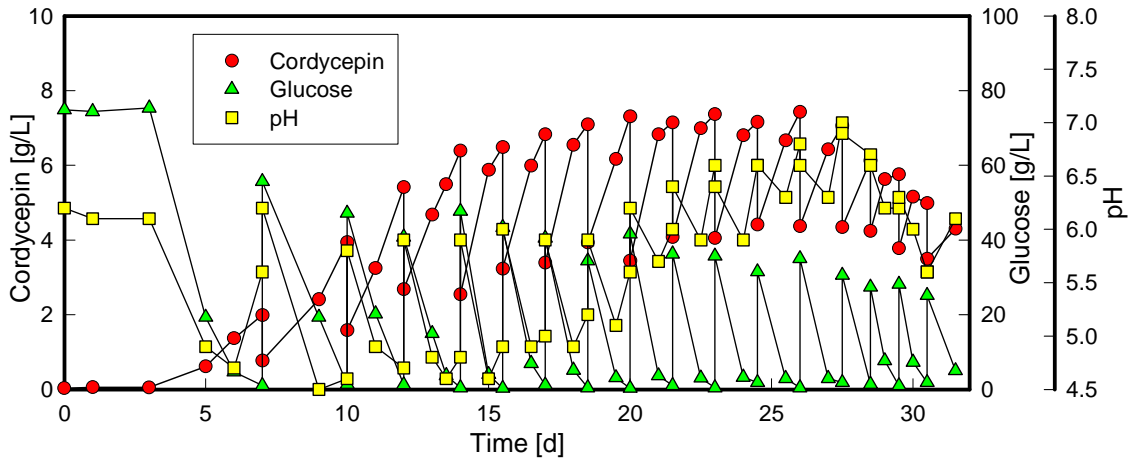


図 10 A/V = 5.1 の場合の反復回分培養によるコルジセピン生産の経時変化

(3) 培地のアミノ酸組成の最適化

前項で示したように菌糸体の増殖をコルジセピンの生産に影響しないレベルまで抑制することにより、長期間のコルジセピン生産が可能と考えられる。そのためには培養液中の窒素成分（アミノ酸）の添加量を抑制する必要がある。そこで、コルジセピン生産へのアミノ酸の影響をオミット試験により解析した。ここでは、窒素成分である yeast extract の濃度を基本培地の 1/4 である 23.5g/L まで低下させ、20 種類のアミノ酸を添加した培地をコントロールとして用い、ここから特定のアミノ酸を添加しないことによって、その影響を検討した。培養の結果を図 11 に示す。図中、例えば Ala(-) は、Ala だけを添加せず、残りの 19 種類のアミノ酸は添加している事を意味する。Ala (アラニン)、Gln (グルタミン)、Glu (グルタミン酸)、Ile (イソロイシン) を添加しないと有意にコルジセピン生産性が低下することが分かった。これらのアミノ酸に影響について詳細に解析したところ、グルタミン (Gln) の添加により菌糸体の増殖量を変化させずにコルジセピン生産性を 4 倍とすることが可能であった。現時点での最適培地は、Yeast extract、グルコース、グルタミンだが、グルタミンは価格が高いことから工業的には、グルタミン含有量の高い窒素源を探索する必要がある。

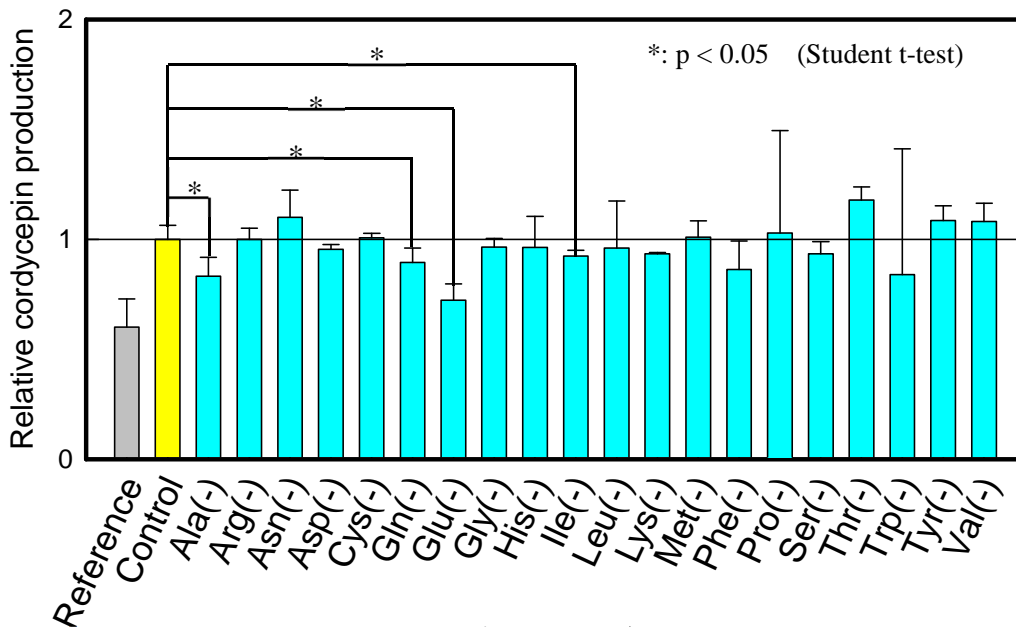


図 11 コルジセピン生産に及ぼすアミノ酸の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木章弘、櫻井明彦、畑下昌範
2. 発表標題 冬虫夏草が生産するコルジセピンの誘導体化と、その性質
3. 学会等名 第13回北陸地区化学工学研究交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井明彦
2. 発表標題 冬虫夏草を用いた生理活性物質コルジセピンの高効率生産
3. 学会等名 MOBIO北陸地域大学による合同研究シーズ発表会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 櫻井明彦
2. 発表標題 冬虫夏草サナギタケを使った生理活性物質の生産
3. 学会等名 第8回化粧品開発展 CosmeTech2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小楠 夏海、増田 美奈、櫻井 明彦
2. 発表標題 冬虫夏草を用いた液体表面培養によるコルジセピン生産のスケールアップ
3. 学会等名 化学工学会第49回秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小楠 夏海、増田 美奈、畑下 昌範、櫻井 明彦
2. 発表標題 冬虫夏草を用いたコルジセピン生産に及ぼす酸素供給量の影響
3. 学会等名 化学工学会 第83年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川優一、櫻井明彦、畑下昌範
2. 発表標題 イオンビーム照射を用いた振盪培養用冬虫夏草の作出
3. 学会等名 第11 回北陸地区化学工学研究交流会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考