

令和元年6月13日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06879

研究課題名(和文) 遺伝子発現プロファイリングによる高効率抗がん剤生産バイオプロセスの開発

研究課題名(英文) Development of effective bioprocess of anticancer drug taxanes by profiling of gene expression

研究代表者

山本 進二郎 (YAMAMOTO, Shinjiro)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：40262307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤パクリタキセル(PTX)を安価に培養生産するにはPTXのフィードバック阻害を軽減することが重要である。本研究では、疎水的なイオン液体1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethanesulfonyl)imideを利用する二相系培養を試み、PTXを含むタキサン類の生産性を高めることに成功した。エリシターを加える二相系培養ではタキサン類生産をさらに向上できた。代謝過程からPTX生産の律速段階は、10-DABからBIIIに關与する酵素の活性が示唆され、この遺伝子発現や活性強化がPTXを含むタキサン類の効率的生産に重要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、植物培養細胞の代謝機能を向上させてイチイ由来のタキサン類を生産するグリーンバイオプロセスの構築を目指している。申請者らは、脂肪族系イオン液体がタキサン類を顕著に生産させることに成功した。本研究の培養生産レベルはかなり高いので、産業応用上意義が大きいと考えられる。また、疎水性の有用代謝産物へ応用が可能でイソフラボノイドやステロイド化合物などへの利用が考えられ、培養産業への波及効果は大きい。本研究の目標達成により有用産物の大量かつ安価な生産が可能となり、植物細胞を利用する本提案の技術は、産業生産に対するインパクトや意義も大きく、これからの産業シーズになりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to inexpensively produce the anticancer drug paclitaxel (PTX) by plant cell culture, the feedback inhibition of PTX should be reduced. In this study, we attempted a two-phase culture using hydrophobic ionic liquid 1-butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide, and succeeded in increasing the productivity of PTX-containing taxanes. The biphasic culture with the addition of elicitors could further improve taxane production. From the metabolic process to the rate-limiting step of PTX production, it was suggested that the activity of the enzyme involved in 10-DAB to BIII, and it was found that the gene expression and the enhancement of the activity are important for the efficient production of PTX-containing taxanes.

研究分野：生物工学

キーワード：タキサン類 パクリタキセル 細胞培養 イオン液体 エリシター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物をそのまま利用して生活に重要な有用物質を生産する方法は、環境適合型で地球環境に優しい持続可能な技術であり、近年注目されているグリーンケミストリーの1つでもある。植物細胞を利用する細胞培養法は、常温常圧で様々な生理活性物質を合成できるため効果的な生産手段と言える。ニホンイチイ (*Taxus cuspidata*) は、二次代謝産物としてタキサン類の抗がん剤パクリタキセル (PTX) を生産する。様々ながん治療に使われ、近年では、アルツハイマー病治療薬としても注目される PTX は潜在需要が極めて大きい。PTX の主な製造法は、PTX 前駆体のタキサン類 10-デアセチルバカチン III (10-DAB) やバカチン III (BIII) などを初発物質として多量の有機溶媒を用いる多段階の反応を経て PTX が合成される半合成法であるが、十分量の PTX を合成するためには多量の葉を必要とすること、植物(葉)の生育が生育環境に左右されること、半合成法での PTX 合成収率が低いことなどから PTX は高価な薬剤となっている。PTX の安心安定安価な生産技術の開発は患者の QOL の向上や今後の需要増への対応として極めて重要と考えられる。

培養細胞は植物と同様な機能を持ち、PTX を含むタキサン類を全合成し、さらに半合成法に利用できる前駆体 10-デアセチルバカチン III (10-DAB) やバカチン III (BIII) も生合成するので、細胞培養法は極めて効率的な合成方法であり、有用性が高まると考えられる。しかし、細胞は、増殖速度や生産物生産性が小さい上に PTX の増殖阻害を受けるため、この阻害回避が大きな課題である。PTX の疎水性に着目して有機溶媒を利用する *in situ* 分離法に関する研究もあるが、本研究は、有機溶媒に代わる疎水性イオン液体を植物細胞培養に初めて使用し、タキサン類の生産性が向上することを世界で初めて見出している()。図1には、PTX の代謝経路と反応に関わる重要な酵素を示す。タキサン類が疎水性であることに着目し、疎水性媒体を利用する二相系培養を行って PTX の阻害を回避し、効率的な PTX 生産が可能と考えられる。

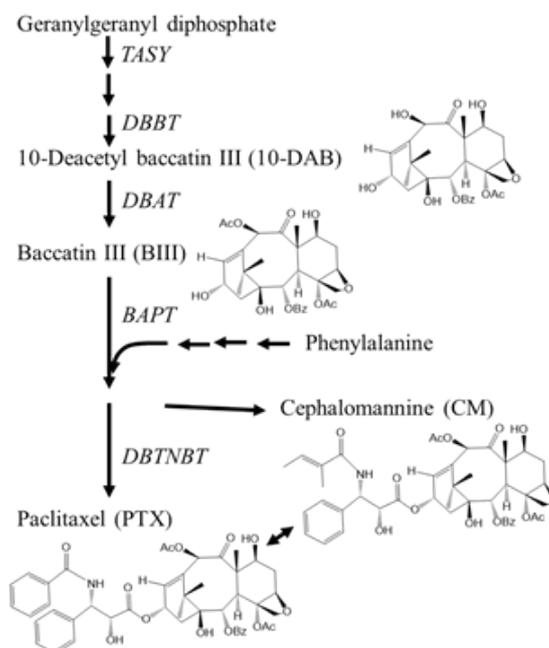


図1 ゲラニルゲラニルダイフォスフェートから PTX のタキサン類の主な生合成過程

TASY: taxadiene synthase, DBBT: taxane 2a-O-benzoyl transferase, DBAT: 10-deacetyl baccatin III-10-O- acetyltransferase, BAPT: baccatin III 13-o-(3-amino-3- phenylpropanoyl)transferase, DBTNBT: 3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol-N-benzoyltransferase c.

2. 研究の目的

本研究では、PTX の代謝過程に関係する種々の酵素の活性や遺伝子プロファイルも検討し、イオン液体を利用してタキサン類を効率的に生産するバイオプロセスの開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

細胞は、崇城大学で栽培しているニホンイチイ (*Taxus cuspidata*) から誘導した培養細胞を実験に利用した。培地は、スクロース 20 g/L、ナフタレン酢酸 0.5 mg/L、ベンジルアデニン 0.05 mg/L を含むガンボルグ B5 培地を使用した。

本研究で使用したイオン液体は、市販されているもので細胞毒性が低いと考えられるものを選択した(表1)。これまでの研究からタキサン類生産が有効であったイミダゾリウム系 (HMIN-PF6) と新規の脂肪族系イオン液体 (PP13-TFSI、P14-TFSI) を実験に用いた。

エリシターは、タキサン類生産を向上させるジャスモン酸メチル (MJ、図2) を利用した。

表1 本研究で利用したイオン液体の特徴

	イオン液体	略称	式量 (g/mol)	密度 (g/mL)
イミダゾリウム系	1-Hexyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate	HP	312	1.3
	N-Methyl-N-propylpiperidinium bis (trifluoromethanesulfonyl)imide	PP13	422	1.4
脂肪族系	N-Methyl-N-butylpyrrolidinium bis (trifluoromethanesulfonyl)imide	P14	422	1.39

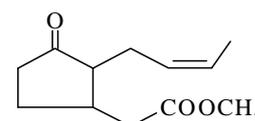


図2 MJ

(2) タキサン類を効率的に抽出するイオン液体の検討

所定量のタキサン類を溶解した B5 培地にイオン液体を加えて、所定時間後イオン液体を採取した。培地中とイオン液体中のタキサン類を HPLC 分析して、イオン液体へのタキサン類の分配係数 P_{taxane} ((1) 式) を求め、タキサン類を分配するイオン液体を選択した。

$$P_{taxane} = C_{IL} / C_{medium} \quad (1)$$

ただし、 C_{IL} はイオン液体中タキサン類濃度 [g/l]、 C_{medium} は培地中タキサン類濃度 [g/L] を示す。

(3) イオン液体の細胞毒性

前培養した植物細胞を培地 20 mL を含む 100mL 容三角フラスコに、5 vol% となるようにイオン液体を添加して培養を開始した。イオン液体を含まない培養をコントロールとした。所定時間培養後、サンプリングして細胞の湿重量 (fresh cells weight ; FCW) を測定した。細胞毒性 (Cytotoxicity) は次式で定義し、コントロールの細胞増殖量 (FCW_C) とイオン液体を含む二相系培養の細胞増殖量 (FCW_{IL}) との比 (R_{FCW}) から評価した。 R_{FCW} の値が 1 以下では細胞毒性が無く、これより小さい値では細胞毒性があると判定できる。

$$R_{FCW} = FCW_C / FCW_{IL} \quad (2)$$

(4) イオン液体を利用する植物細胞の二相系培養

(3) と同様な培養を行い、所定時間培養後、サンプリングして湿重量とタキサン類生産量を測定した。培地・細胞・イオン液体中に含まれる各タキサン類は HPLC システムで分析した。タキサン類の生産性の効率を検討するため、タキサン類比生産速度 E_{taxane} を次式で定義した。タキサン類の生産量はコントロールと比較した。

$$E_{taxane} [\mu\text{g}/(\text{g-cell} \cdot \text{d})] = \Delta P / (x \cdot \Delta t) \quad (3)$$

ここで、 ΔP は 培養期間で生産されたタキサン量 (10-DAB、BIII、PX、CM) で、Total とはこれら 4 つを合計した量、 Δt は培養時間 (7 d)、 x は Δt 培養後の細胞の FCW を示す。

(5) イオン液体を利用する二相系培養に対するエリシターの添加効果

(4) の実験でタキサン類生産に有効なイオン液体を選択し、エリシターを添加する二相系培養に利用した。培養条件は (4) とほぼ同様であるが、添加するイオン液体の量を 5vol% から 2.5vol% に減らした。エリシターのジャスモン酸メチル (MJ) は、1 ~ 100 μM となるように三角フラスコに加えた。所定の培養時間後サンプリングして、細胞の湿重量とタキサン類の生産量を測定し、タキサン類の生産性の良好な条件を検討した。

(6) 遺伝子発現プロファイルの検討

市販のキットを使ってトータル RNA を分離して cDNA を合成し、プライマーを使って PTX 代謝過程における各種酵素の遺伝子発現を検討した。

(7) 分析

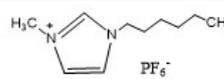
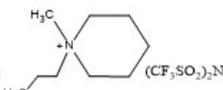
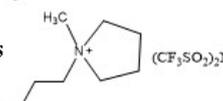
細胞の湿重量やタキサン類の分析は参考文献 () に従って行った。

4. 成果

(1) タキサン類を効率的に抽出するイオン液体の検討

表 3 には、各イオン液体へのタキサン類の分配係数を示す。イミダゾリウム系に比べて脂肪族系は何れのタキサン類も分配係数は大きくなったが、培地への溶解性は小さいことも明らかとなった。イオン液体は高価なため、実際の培養で利用する上では、再利用が不可欠である。溶解度が小さい脂肪族系のイオン液体が実用性に優れると言える。

表 3 イオン液体の溶解性とタキサン類の分配計数

IL	Chemical formula	Abbreviation	Solubility in aqueous medium [mM]	Partition coefficient of paclitaxel in IL-medium two phase system [-]
1-Hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate		HMIN-PF ₆	29.5	160
N-Methyl-n-propylpiperidinium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide		PP13-TFSI	19.9	37.1
N-Methyl-n-butylpyrrolidinium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide		P14-TFSI	16.1	45.4

(2) イオン液体の細胞毒性

図 3 には各イオン液体の細胞毒性 (R_{FCW}) を示す。何れも R_{FCW} 値もほぼ 1 であることから、本研究で使用したイオン液体はすべて細胞毒性がないことが明らかとなった。表 1 で示したように、何れのイオン液体も培地への溶解度が小さく疎水性が極めて高いため、細胞内への浸透が小さく、細胞毒性が無かったと考えられる。

(3) イオン液体を利用する二相系培養

図4には、タキサン類生産速度 E_{taxane} に及ぼすイオン液体の種類の影響を示す。何れの条件もコントロールに比べてタキサン類生産速度が大きくなることが観察された。どのイオン液体においても生産されたタキサン類がイオン液体に分配したために、タキサン類の生産速度が大きくなったと考えられる。イオン液体の中で P14-TFSI が最もタキサン生産速度が大きく、全タキサン類生産速度においては HMIN-PF6 や PP13-TFSI に比べて数倍大きいことが認められた。生産されたタキサン類がイオン液体に分配したことによるフィードバック阻害の低減に加えて、P14-TFSI はエリシター的な効果をもつと考えられる。有機溶媒のオレイン酸を添加する培養で PTX の生産性が向上する報告があり、この中でオレイン酸が培養細胞に対して非生物学的なストレスを与え、PTX (二次代謝産物) の生産性の向上に寄与したと考察している。本研究においてもイオン液体が細胞にストレスを与えたため、これを回避するために二次代謝産物のタキサン類を多量に生産したと考えられる。P14-TFSI は水に難溶で再利用が容易なため、優秀な媒体と考えられる。

(4) イオン液体を利用する二相系培養に対するエリシターの添加効果

図5には、エリシターを含む二相系培養の増殖量を示す。増殖量とは1フラスコあたりの湿重量を示す。MJの添加濃度1~100 μM 、培養時間が1~2週間の何れの培養条件も、培養初期よりも減少した。これは生産されたタキサン類が細胞増殖を阻害したためと考えられる。また、何れの条件においてもコントロールとほぼ同様な細胞増殖となり、高い MJ 濃度においてもコントロールと同等の細胞増殖量が得られた理由としては、生産されたタキサン類がほとんどイオン液体に分配されたためと考えられる。

図6には、培養2週間後のタキサン類の生産量を示す。コントロールに比べてイオン液体を含む二相系培養はタキサン類の生産量は大きく、MJ添加によってタキサン類生産量がさらに増加し、10 μM の MJ が最もタキサン類生産が大きくなった。生産されたタキサン類がイオン液体に抽出されたため、タキサン類の生産が維持され、大きなタキサン量生産が得られたと考えられる。100 μM では低下することが観察されたが、これは MJ の阻害作用と考えられる。Yukimune らも 100 μM の高濃度では PTX の生産性が低下することを報告している ()。

二相系培養における細胞増殖に対する MJ 濃度の影響を図7に示す。MJの添加により細胞増殖がコントロールに比べて低下したが、100 μM の MJ では細胞増殖がコントロールと同等になることが観察された。タキサン類が顕著に生産されていることから細胞増殖も低下したと考えられるが、100 μM の MJ で増殖が回復している理由についてははっきりわからないが、次のことが1つ考えられる。

すべての細胞内タキ

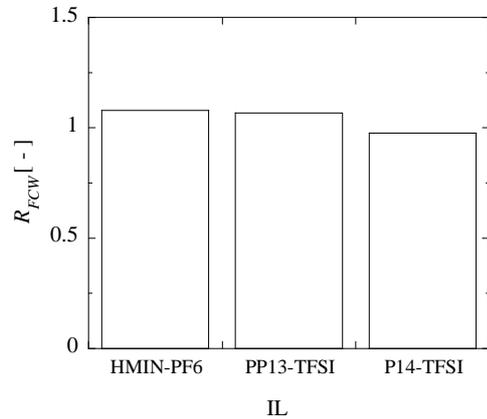


図3 イオン液体の細胞毒性

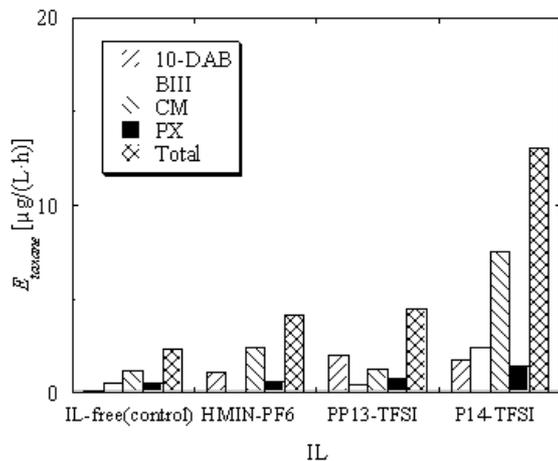


図4 イオン液体 5vol%を含む二相系培養でのタキサン類の生産速度、Total は全タキサン類を合計したものを示す。

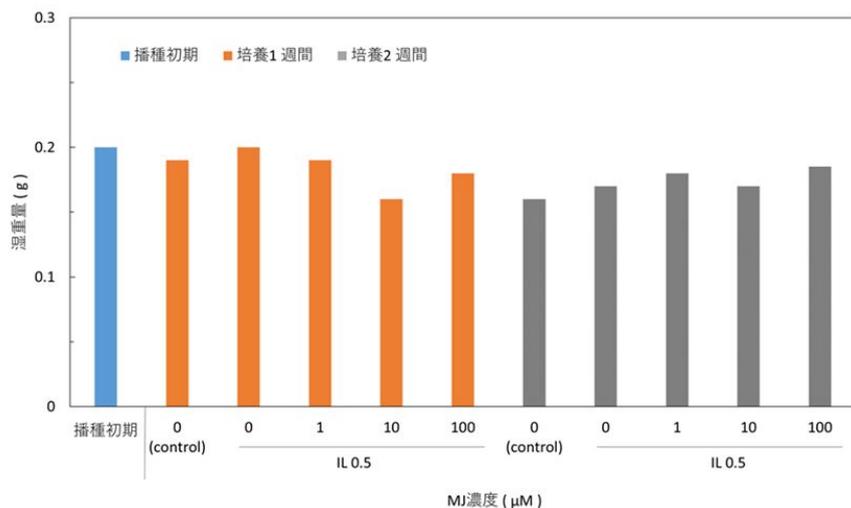


図5 各イオン液体を含む二相系培養における細胞増殖

サン類濃度を調べたところ、二相系培養においてはコントロールと比べて CM のみ細胞内濃度が小さいことがわかり(図 8) これが細胞増殖を回復させたと考えられる。

イオン液体を適宜交換して長期にわたる培養を試みるのが重要な課題ではあったが、検討すべき今後の課題として残された。

(5) 遺伝子発現プロファイルの検討

今回の研究では、細胞内からトータル RNA を精製することができず、遺伝子発現を確認することが出来なかった。細胞内のポリフェノールが多量であったために RNA を精製できなかったためである。しかしタキサン類の生産量から酵素の活性化を判断出来る。イオン液体を添加すると、何れもタキサン類も生産性が向上することがわかった、とりわけ 10-DAB が顕著に増加することが認められた。イオン液体によって PTX への代謝が活性化されたことが考えられるが、10-DAB 濃度の顕著の増加は、これ以降の酵素活性が他の酵素に比べて活性化されなかったために、10-DAB が蓄積したと考えられる。

MJ 添加によってタキサン類の生産性がさらに向上することを観察できた。これは、MJ が PTX への代謝活性化を高めたからであり、これまでに報告された研究と同様な傾向となった。10-DAB の蓄積量が大きいことから、この酵素の活性化が抗がん剤 PTX の律速段階であり、この活性化が PTX の工業生産に必須である。

(7) イオン液体を利用する効率的なバイオプロセスの提案

イオン液体の添加によって植物細胞のタキサン類生産が向上することが明らかとなった。生産されたタキサン類がイオン液体に効率的に抽出・回収されたが、細胞内や細胞中にタキサン類が低い濃度でも蓄積してフィードバック阻害を生じるため、細胞増殖量を顕著に増加させることが叶わなかった。二段階の培養を行ってタキサン類を生産させることが有効と思われる。第一段階では、タキサン類をあまり生産しない培養条件で細胞量を増やし、第二段階としては増殖した細胞をイオン液体やエリシターを含む二相系培養を行うことによって、タキサン類の効率的生産が期待できる。さらに、イオン液体を適宜交換することによって、長期にわたってタキサン類の生産できると考えられる。本研究でもイオン液体からのタキサン類の逆抽出を検討したが、適当な有機溶媒が見つからなかったため、今後は逆抽出が可能な有機溶媒または他の媒体を開発できれば、イオン液体の再利用が可能となり、安全安価なタキサン類生産が可能なバイオプロセスが構築できると思われる。

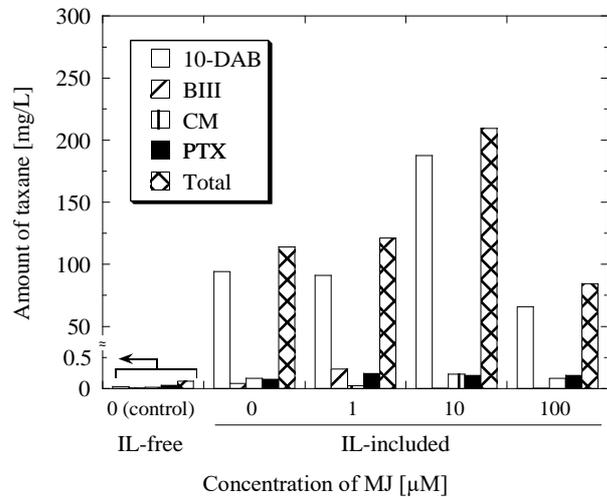


図 6 イオン液体を 2.5vol%含む二相系の培養 14 日後のタキサン類の生産量 Total はタキサン類の合計量を示す。

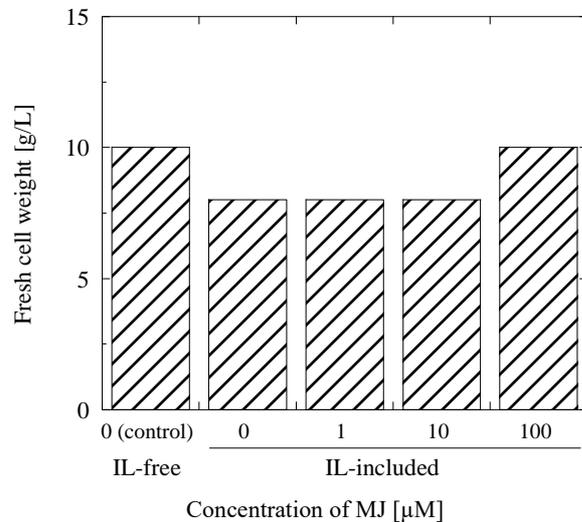


図 7 イオン液体 2.5%を含む二相系培養 14 日後の細胞増殖に及ぼす MJ 添加の影響

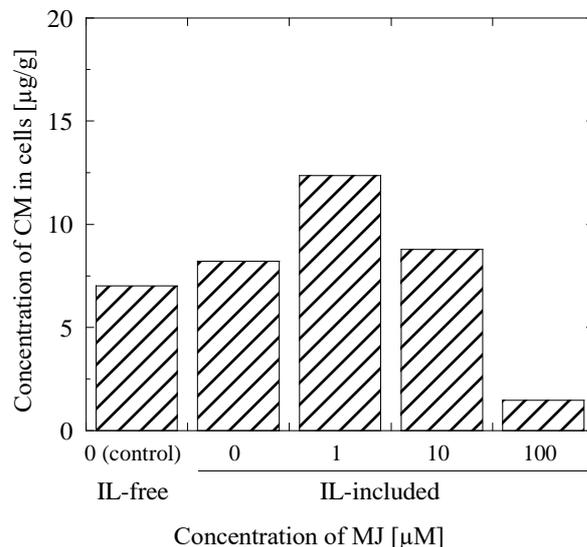


図 8 イオン液体 2.5%を含む二相系培養 14 日後の細胞内 CM 濃度と MJ 濃度の関係

<引用文献>

S. Yamamoto, T. Morisaki, K. Takayama, Y. Kuriyama, S. Hayashi, H. Miyasaka, Ionic Liquids for Effective Extraction of Hydrophobic Taxanes from an Aqueous Medium, *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.*, **22**, 103-107, 2015

Y. Yukimune, H. Tabata, Y. Higashi Y. Hara, Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnol.*, **14**, 1129-1132, 1996

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Shinjiro YAMAMOTO, Ryo NOGUCHI, Azumi HAYASHI, Yumiko KURIYAMA, Shuhei HAYASHI, Hitoshi MIYASAKA, Production of taxanes in an ionic liquid-medium two phase culture system, *Solv. Extr. Res. Develop. Jpn.*, **23**(2)、2016、pp.187-192

Shinjiro YAMAMOTO, Yuka SONODA, Takato KATAOKA, Shuhei HAYASHI, Hitoshi MIYASAKA, Aliphatic Amine-based Ionic Liquids for Effective Production of Paclitaxel and Related Taxanes in Plant Cell Culture, *Proceedings of ISEC2017*, 2017、pp.176-180

Shinjiro YAMAMOTO, Yuka SONODA, Takato KATAOKA, Shuhei HAYASHI, Hitoshi MIYASAKA, Enhanced Productivity of Paclitaxel and Related Taxanes in Plant Cell Culture Including Aliphatic Ionic Liquids, *Solv. Extr. Res. Develop. Jpn.*, **25**(2)、2018、pp.125-130

Shinjiro YAMAMOTO, Fumiya TABUCHI, Rena TANAKA, Shuhei HAYASHI, Hitoshi MIYASAKA, Effect of Methyl Jasmonate on Production of Paclitaxel and Related Taxanes in a Hydrophobic Ionic Liquid-Medium Two Phase Culture System, *Solv. Extr. Res. Develop. Jpn.*, **26**(2)、2019、pp.105-109

〔学会発表〕(計 5 件)

園田由佳、片岡孝斗、山本進二郎、林 修平、宮坂 均、タキサン類培養生産における疎水性イオン液体の添加効果、第 23 回日本生物工学会九州支部飯塚大会、2016

片岡孝斗、山本進二郎、林 修平、宮坂 均、イオン液体を利用するタキサン類培養生産の効率化、2016 年度生物工学若手研究者の集い夏のセミナー、2016

山口竜弥、山本進二郎、林 修平、宮坂 均、疎水性イオン液体を利用するタキサン類培養生産の効率化、2017 年度生物工学若手研究者の集い夏のセミナー、2017

山本進二郎、片岡孝斗、園田由佳、林 修平、宮坂 均、Hydrophobic ionic liquids for effective production of paclitaxel in plant cell culture、ISEC 2017 - The 21st International Solvent Extraction Conference、2017

山本進二郎、田淵詞也、田中伶奈、林 修平、宮坂 均、疎水性イオン液体添加培養によるタキサン類の効率的生産、第 37 回溶媒抽出討論会、2018

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.life.sojo-u.ac.jp/cell/miyasaka/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮坂 均

ローマ字氏名：MIYASAKA Hitoshi

所属研究機関名：崇城大学

部局名：生物生命学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60451283

研究分担者氏名：林 修平

ローマ字氏名：HAYASHI Shuhei

所属研究機関名：崇城大学

部局名：生物生命学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：30389522

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。