

活性酸素ストレスによる細胞生理の制御に基づいた  
機能性バイオプロダクト生産技術の開発

神戸大学 勝田知尚

金沢大学 荻野千秋

## 活性酸素ストレスによる細胞生理の制御に基づいた 機能性バイオプロダクト生産技術の開発

神戸大学 勝田知尚

金沢大学 荻野千秋

近年、生活習慣病のほとんどに活性酸素が深く関与していることが明らかとなるにつれ、カロテノイドやポリフェノールといった天然の抗酸化物質が、サプリメントや健康食品、あるいは医薬品として注目されるようになった。カロテノイドやポリフェノール、具体的には $\beta$ カロチン、アスタキサンチン、アントシアニンといった二次代謝産物は、元来、植物や藻類といった光合成を行う生物に豊富に含まれている。こうした生物では、強光にさらされると、それによって生じる活性酸素から自身を保護するための生理的な変化が生じ、これら二次代謝産物を産生する。このような細胞の生理状態は、通常、細胞増殖とは異なっており、上述の二次代謝産物である機能性バイオプロダクトの生産のためには、所望の生理的変化を細胞に促すための誘導操作が必要である。実験室的には、細胞を強光に暴露する、あるいは活性酸素誘発剤（例えば、パラコートなど）を培養液に添加するといった、このような生理的変化を引き起こす直接的要因を利用できる。しかし、工業的には設備や安全性の問題からこうした手法を取り難く、代わりに栄養供給の停止、生育温度の変化といった間接的な手法がとられているが、こうした間接的手法では、誘導効果が十分でなく、また細胞の生育環境が大幅に変化するため、所望の生合成経路の代謝を相当抑制している。したがって、生産性向上のためには、直接細胞の生理的変化を促す手法が望ましく、細胞に対する活性酸素ストレスの負荷をコントロールできる工業的規模のバイオ生産に適した方法が確立されれば、こうした二次代謝産物等、機能性バイオプロダクトの生産性が飛躍的に向上すると期待される。

そこで本研究では、細胞に活性酸素ストレスを負荷する方法として、金沢大学の清水らが新たに見出した、二酸化チタン・超音波照射法による活性酸素生成法を用いて、活性酸素ストレスで誘導した生理的変化に基づく機能性バイオプロダクト生産技術の開発を目指す。そして、藻類の一種ヘマトコッカス プルビアリスによるアスタキサンチン生産を例に取り上げ、活性酸素ストレスによる細胞生理の制御に基づいた効率的バイオプロダクト生産技術の開発を目指す。この研究ストラテジーをシンポジウムでは御紹介し、皆さんの御意見を伺いたく思います。

金沢大学バイオサイエンスシンポジウム

## 活性酸素ストレスによる細胞生理の制御に基づいた 機能性バイオプロダクト生産技術の開発

(神戸大・工)勝田知尚  
(金沢大・自)荻野千秋  
(金沢大・自)清水宣明  
(金沢大・自)並木則和

1/22

## 研究概要

強光や活性酸素ストレス下で誘導される細胞の生理的変化に伴い産生される、機能性バイオプロダクトの工業的スケールにおける効率的生産に向けて、適切、簡便に活性酸素ストレスを細胞へ負荷して細胞生理を制御する技術を開発する。

この新技術は、細胞生理の遷移過程をすみやかに完了させ生産所要時間の短縮を図るとともに、生理的変化を誘発する生育環境の変化が、一方では所望の生合成経路を抑制するといった、既往の手法における問題を解決することによって、生産効率の大幅な向上を図る。

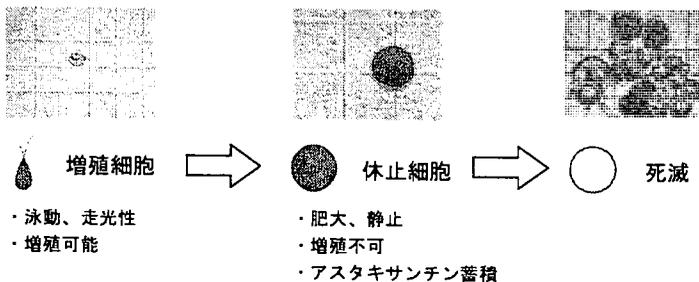
これによって、現在、地理的、経済的ファクターのために外国企業の独占を許している、天然抗酸化物質等の機能性バイオプロダクト生産へ、国内企業の積極的参画を促すことができると期待される。

2/22

# 細胞の生理的変化に伴って産生される有用物質

…カロテノイド、ポリフェノール等の二次代謝産物(機能性バイオプロダクト)

## 細胞生理の変化 (ヘマトコッカス プルビアリスの場合)



## 活性酸素ストレスレベル



積極的に細胞の生理的変化を促して、効率的生産を目指そう!



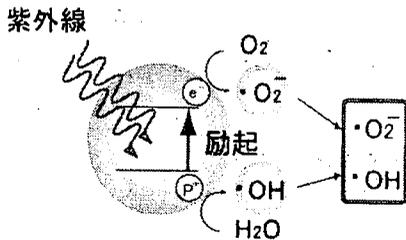
制御の容易な活性酸素ストレス負荷法が必要

## 二酸化チタン・超音波照射法

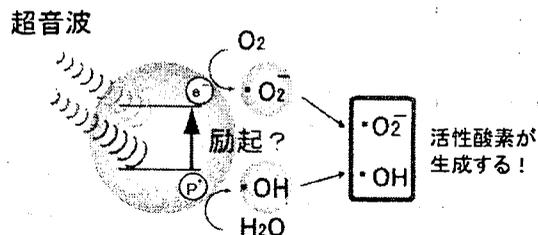
3/22

# 二酸化チタン・超音波照射法

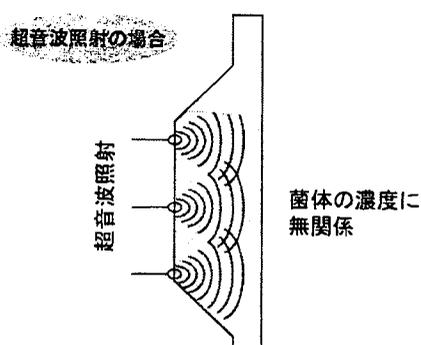
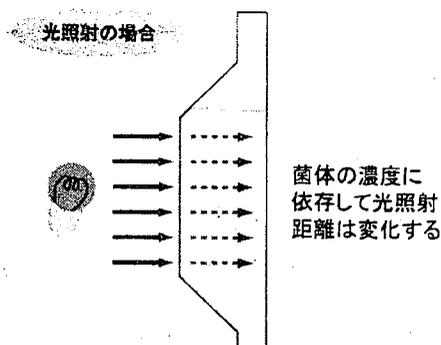
## 二酸化チタンの“光触媒”効果



## 二酸化チタンからの新しいラジカル発生方法

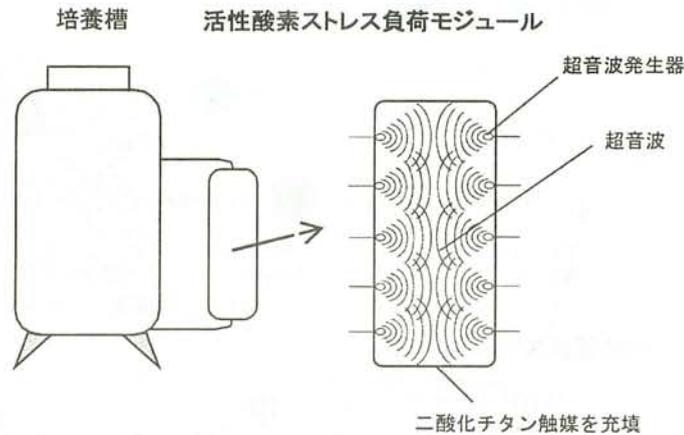


二酸化チタン・超音波照射法は不透明な懸濁液へ応用しやすい利点を有する。



# 活性酸素ストレス負荷型バイオ生産設備

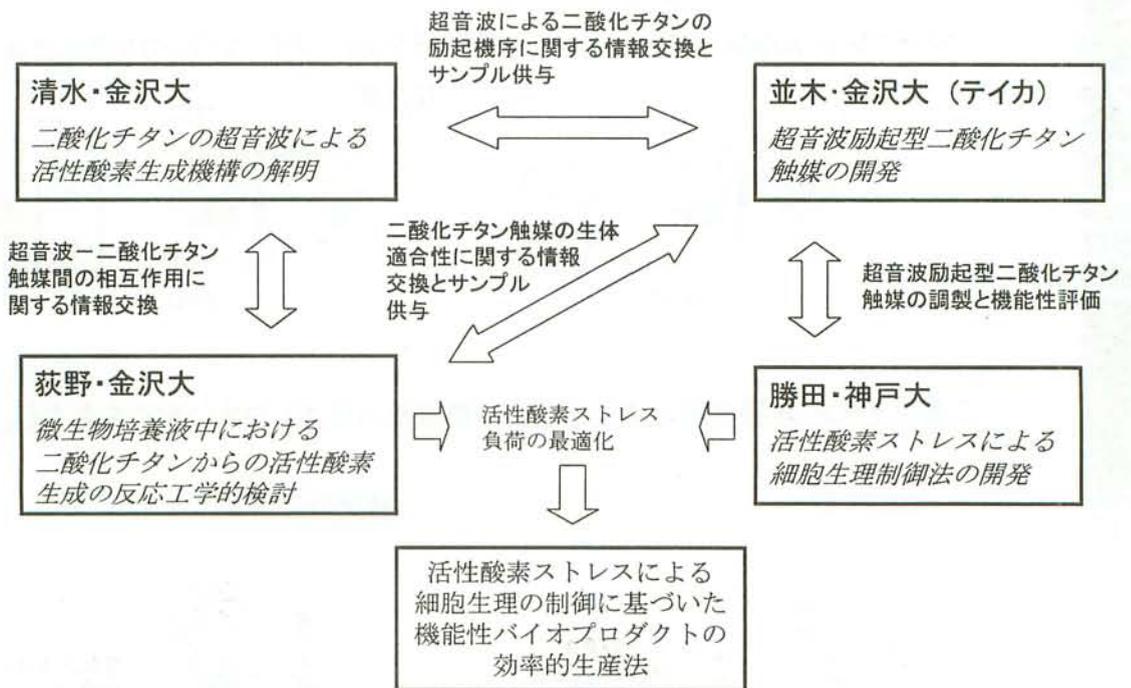
…培養槽に併設した活性酸素ストレス負荷モジュールへ培養液を流通する



- ・活性酸素ストレスを負荷する程度は？
- ・超音波励起に適した二酸化チタン触媒とは？
- ・活性酸素ストレス負荷型培養器の設計指針は？

活性酸素ストレスによる細胞生理の制御に基づいた  
機能性バイオプロダクト生産技術

# 研究実施体制



チームメンバーの各研究内容とチーム内協力関係の概略図

□ バイオプロセス工学的研究 □ 光触媒反応工学的研究 □ 超音波化学的研究

# 発光ダイオードを用いた 緑藻 *Haematococcus pluvialis* による アスタキサンチン生産



神戸大学工学部応用化学科  
生物プロセス工学研究室  
勝田知尚

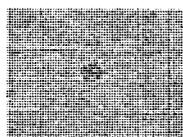


Bioprocess Engineering Lab.

Graduate School of Science and Technology  
Kobe University

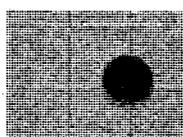
## ヘマトコッカス・プルビアリスの 形態変化とアスタキサンチン産生

ヘマトコッカス・プルビアリスは、下の写真にあるように形態変化をします。生育に適した環境下では、細胞は緑色の涙滴形をしており、鞭毛を使って遊泳しています。この細胞は盛んに増殖することができますが、アスタキサンチンを生合成していません。一方、栄養源が不足する、あるいは受ける光が強すぎるといった、生育に不適な環境下では、細胞は休止期へ移行し、球形の細胞に変化します。この休止細胞は遊泳も増殖もしませんが、アスタキサンチンの生合成を開始し、やがて細胞全体が真赤になるほどアスタキサンチンを蓄積します。



増殖細胞

- ・ 泳動、走光性
- ・ 増殖可能



休止細胞

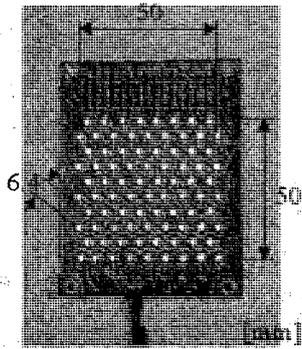
- ・ 肥大、静止
- ・ 増殖不可
- ・ アスタキサンチン蓄積

### メモ

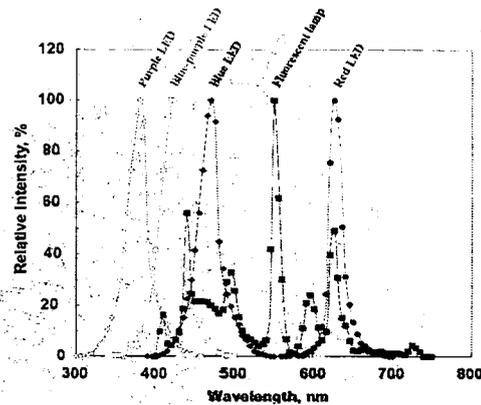
ヘマトコッカス・プルビアリスは光を受けて生育しますが、光が強すぎると休止期へ移行します。すると、細胞は強い光に暴露され続けることとなります。強光はそのものが生物にとって有害なばかりではなく、水中に鉄が含まれると活性酸素を生じ、細胞にダメージを与えます。アスタキサンチンはこうした強光や活性酸素から自身を保護するために産生されるものとも考えられています。

# 発光ダイオード(LED)について

発光ダイオード(Light Emitting Diode: LED)は、狭い波長範囲の光を選択的に放射するので、種々の色の光を照射したいときには便利な光源です。また、電気-光変換効率が高く、長寿命で、点滅に対する耐久性が高いといった特徴があります。青色LEDの登場で、白色光を構成する青、緑、赤の各単色光の効果を容易に調べられるようになりました。



使用したLEDランプの概形

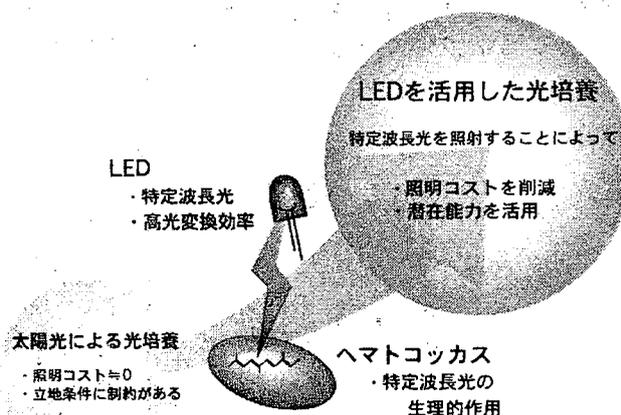


使用したLEDと蛍光灯の放射光スペクトル

9/22

# 発光ダイオードを用いた ヘマトコッカス・フルビアリスの光培養

ヘマトコッカス・フルビアリスを用いるアスタキサンチン生産プロセスでは、細胞の生理的変化をうまく誘起することが最も重要なポイントです。これまでの研究では、生理的作用を有する特定波長の光のみを選択的に照射することにより、消費電力を削減しつつヘマトコッカスの能力を最大限に引き出すことを狙い、発光ダイオードを用いたアスタキサンチンの光培養生産を検討してきました。

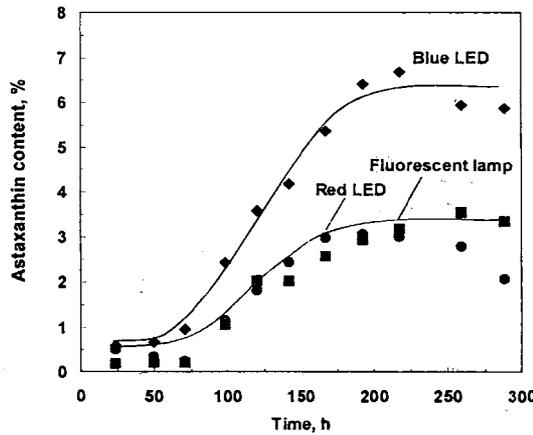


ヘマトコッカスによるアスタキサンチン生産

10/22

# アスタキサンチン含有率におよぼす 青色LED光の影響

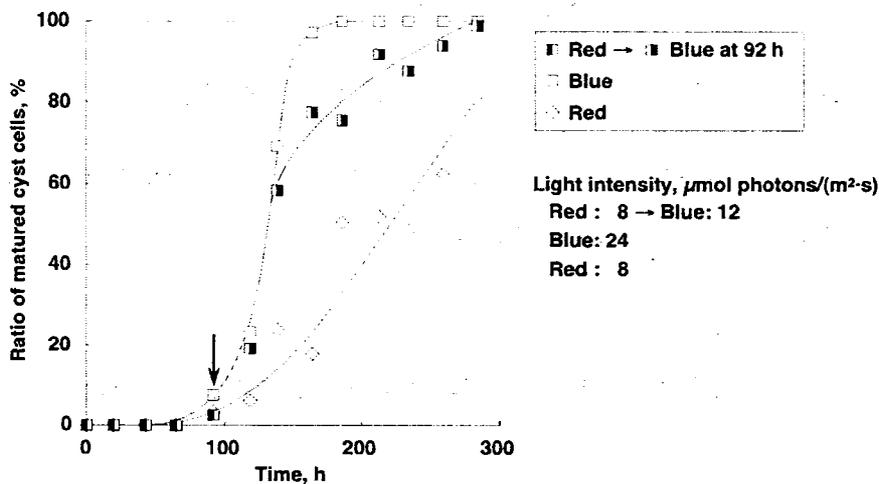
入射光強度を $12 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ としたときのアスタキサンチン含有率(単位乾燥細胞重量に含まれるアスタキサンチン量の百分率)を下図に示しました。青色LED光の照射は、アスタキサンチン含有率を2倍程度増大させることが分かりました。



各光源からの入射光強度を $12 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ として培養した際の  
アスタキサンチン含有率の経時変化

# 細胞の成熟化におよぼす 青色LED光の影響

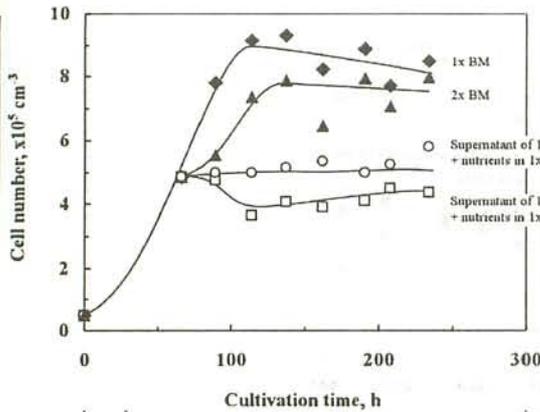
青色LEDによる光照射は、ヘマトコッカス細胞の成熟を促進することが示されました。



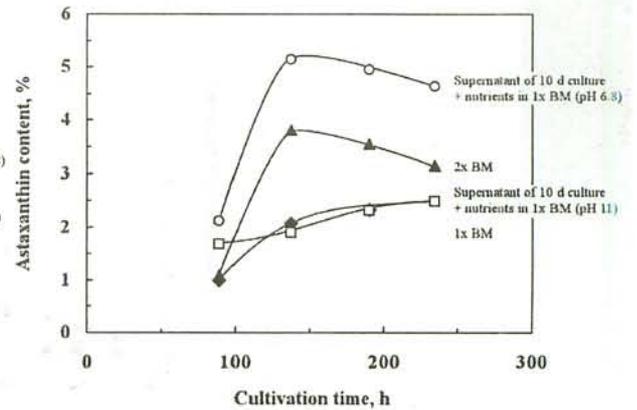
対数増殖期に赤色LEDから青色LEDへ光源を切り換えた際の成熟細胞率

# 細胞の成熟時における生育環境が アスタキサンチン蓄積におよぼす影響

ヘマトコッカス細胞が増殖細胞から休止細胞へ移行する際の、培養液pHの影響を調べました。休止細胞化は、10日間培養を行った後の培養上清を回収し、そこに栄養源を添加して作成した培地へ増殖途中の細胞を再懸濁することによって行いました。その結果、アスタキサンチンを顕著に蓄積させるためには、pHが生育に適した条件(6.8)付近にあることが必要と分かりました。



細胞増殖(培養液単位体積あたり細胞数)  
の経時変化



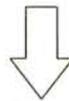
アスタキサンチン含有率の経時変化

13/22

## 結論

- 青色 LED による光照射は、ヘマトコッカス細胞のアスタキサンチン含有率を、赤色 LED や蛍光灯下と比べ、2 倍程度増加することが示された。
- 青色 LED による光照射は、ヘマトコッカス細胞の成熟を促進することが示された。
- アスタキサンチンを顕著に蓄積させるためには、休止細胞へ移行した際の培養液 pH が、生育に適した条件(6.8)であることが望ましい。

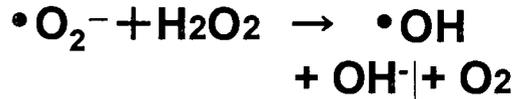
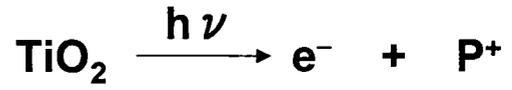
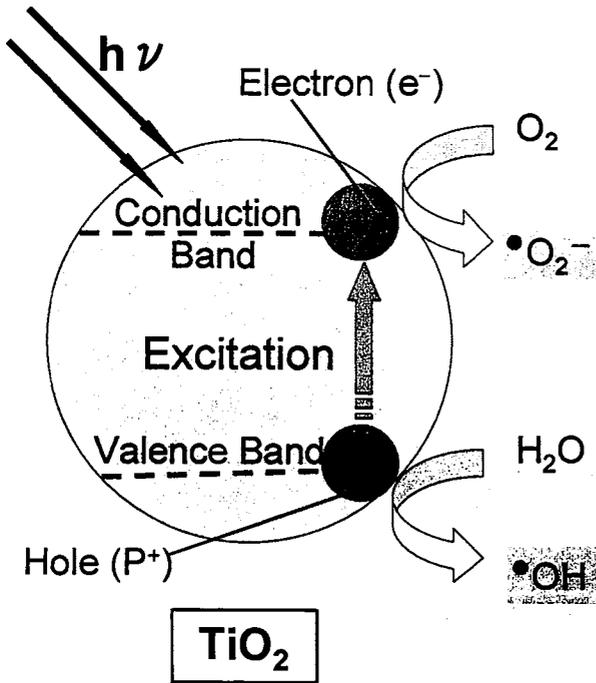
生育に適した環境条件下で休止細胞化しなければならない？



細胞生理の制御

14/22

# 光触媒反応

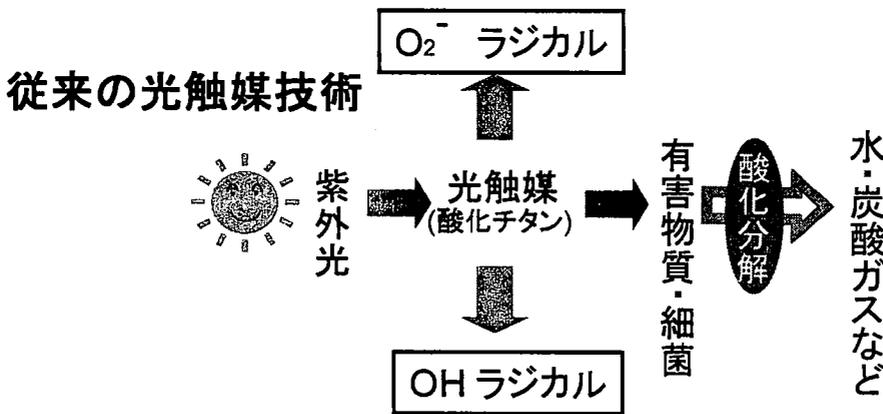


強酸化作用

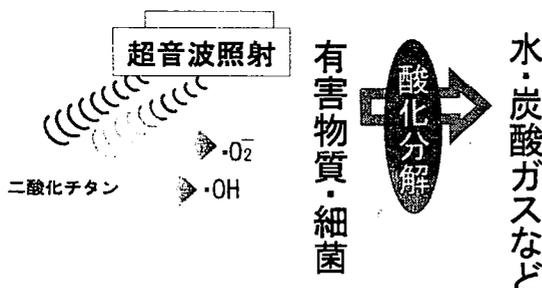


15/22

# 光触媒による環境浄化



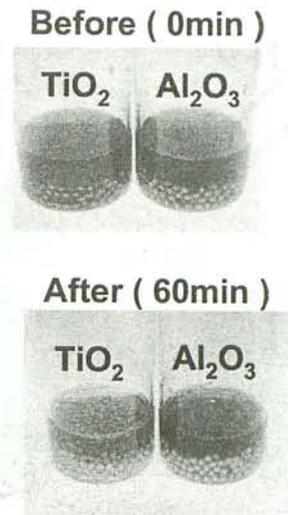
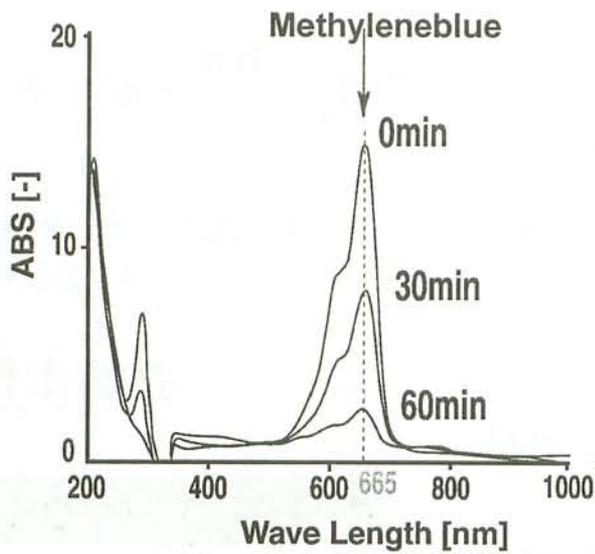
## 新規の発見 (超音波照射によってもラジカルが生成する)



- 環境浄化
  - 有害物質の分解処理
  - 農業用水の浄化
  - 有害微生物の殺菌
- 医療分野
  - 超音波化学療法による新規がん治療

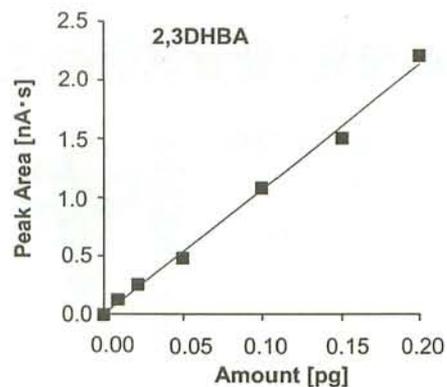
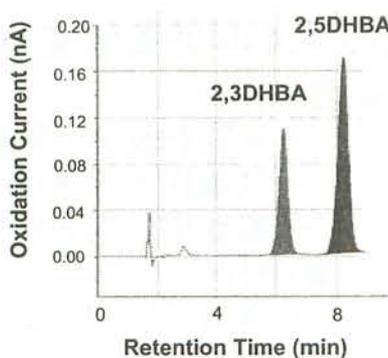
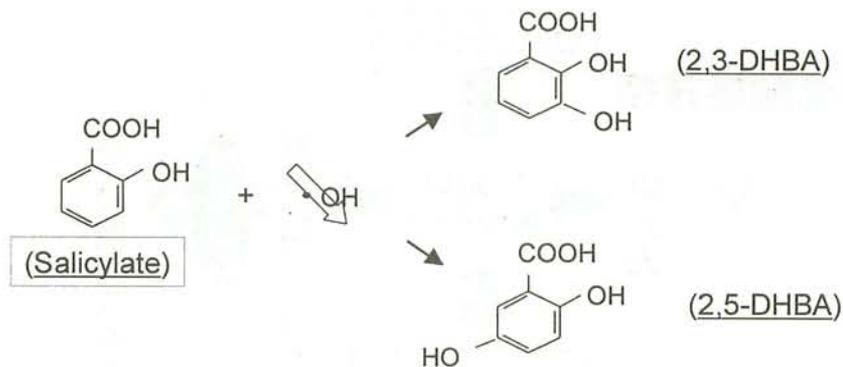
16/22

# Decoloration of Methyleneblue with US/TiO<sub>2</sub>

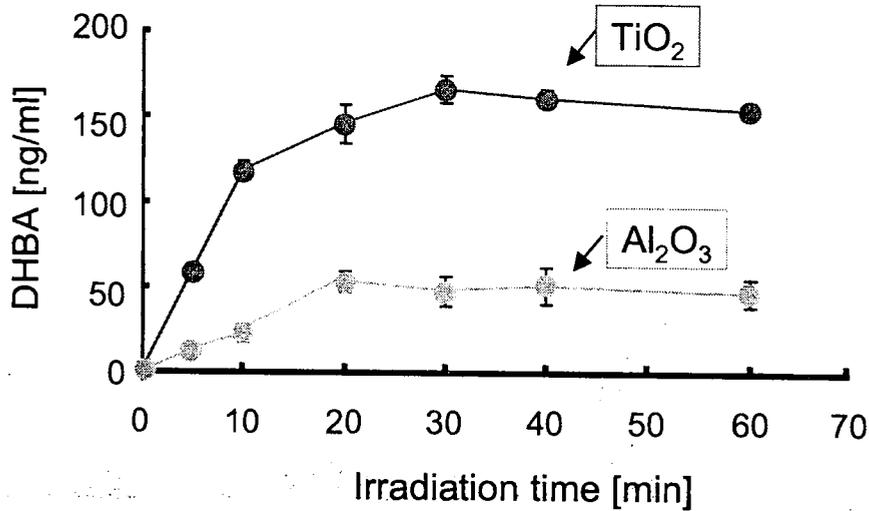


Irradiation of Ultrasonics with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10mM)

# サリチル酸への·OH 付加反応

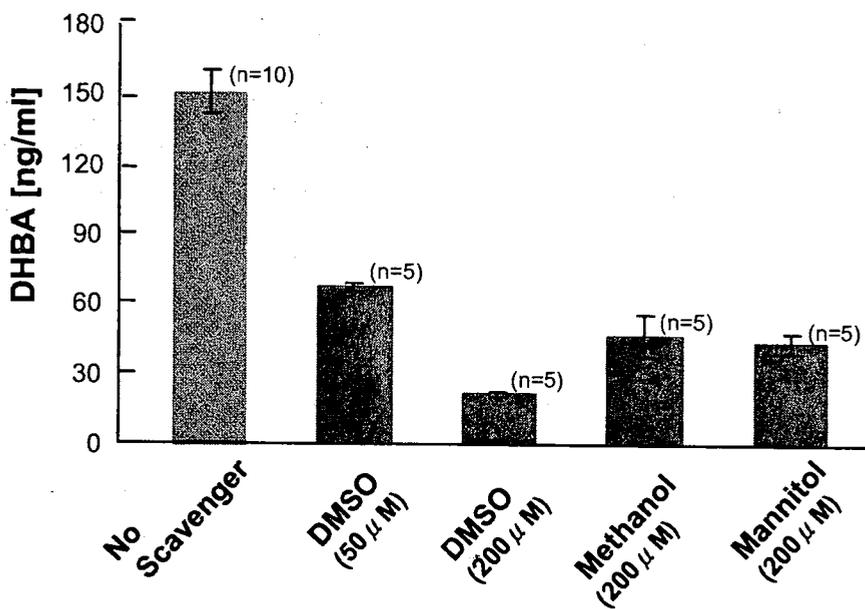


### Time course of DHBA generation by ultrasonic irradiation on $\text{Al}_2\text{O}_3$ and $\text{TiO}_2$ pellets

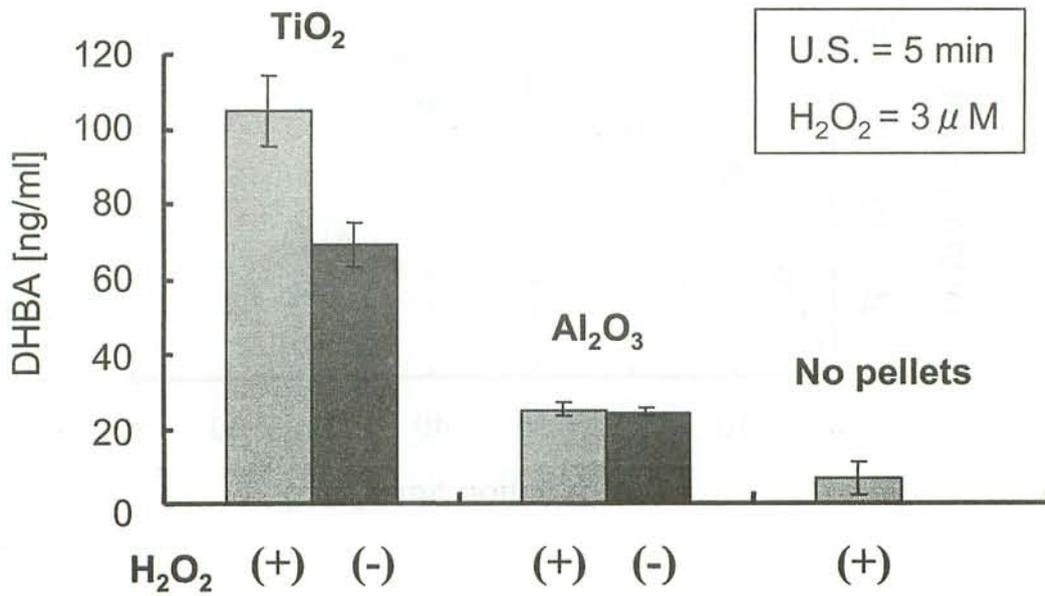


19/22

### Inhibition of $\cdot\text{OH}$ generation by radical scavengers



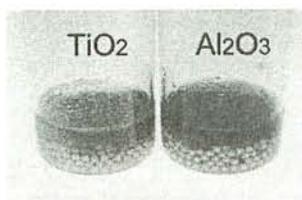
## Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on DHBA production with ultrasonic irradiation on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> pellets



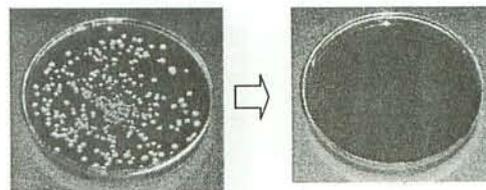
21/22

## 光触媒・超音波照射法の 環境浄化・医療応用

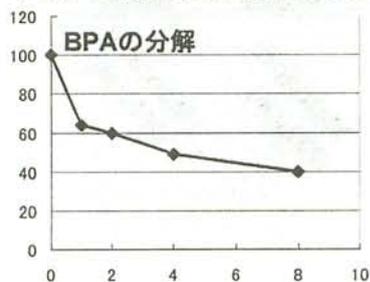
色素の脱色



有害微生物の殺菌



内分泌攪乱物質の分解



医療への応用 (がん治療)

