

## ジャーファーマンターによるメキシコイトスギ細胞 培養とヒノキチオール生産

山田, 順子  
九州大学大学院農学研究院

藤田, 弘毅  
九州大学大学院農学研究院

坂井, 克己  
九州大学大学院農学研究院

<https://doi.org/10.15017/14839>

---

出版情報：九州大学農学部演習林報告. 83, pp.79-83, 2002-03-27. 九州大学農学部附属演習林  
バージョン：  
権利関係：



論 文

## ジャーファーメンターによるメキシコイトスギ細胞培養と ヒノキチオール生産\*

山田 順子\*\*,\*\*\*, 藤田 弘毅\*\*, 坂井 克己\*\*

### 抄 録

メキシコイトスギ (*Cupressus lusitanica*) の培養細胞は酵母抽出物などのエリシターの刺激によって高い生産性で細胞内外にヒノキチオールを生産することが報告されている。培養細胞を用いた植物二次代謝成分生産の実用化に適した液体懸濁培養条件を検討し、大規模化・自動化の可能性を検討するためにジャーファーメンターによる細胞培養とヒノキチオール生産を試みた。

三角フラスコを用いた小規模な液体懸濁培養系では、GamborgのB5培地を基本にした培地で良好な細胞成長とヒノキチオール生産がみられた。スケールアップのため同じ培地組成で攪拌式ジャーファーメンターとエアリフト式ジャーファーメンターを用いて培養を行った。エアリフト式では良好な成長率が得られたが、攪拌式では成長率は低かった。ヒノキチオール生産量もエアリフト式ジャーファーメンターではフラスコ振とう培養による系と同等であったが、攪拌式ジャーファーメンターでは低かった。細胞培養では機械的ストレスの量と質が細胞成長と二次代謝物生産の両方に影響しているものと思われる。

キーワード：ジャーファーメンター、細胞培養、メキシコイトスギ、*Cupressus lusitanica*、ヒノキチオール、植物二次代謝物

### 1. はじめに

ヒノキチオールは $\beta$ -thujaplicinとも呼ばれ、いくつかのヒノキ科植物の特徴的な心材成分として強い抗菌性をもち、ヒノキ科木材の耐久性に寄与しているとされる (DeBell *et al.*, 1997; Dev, 1989)。この物質は、整髪料や歯磨き剤等へ利用されており、近年は食品

---

\* Junko YAMADA\*\*, \*\*\*, Koki FUJITA\*\*, Kokki SAKAI\*\*: Cell Growth and  $\beta$ -thujaplicin Production with a *Cupressus lusitanica* Culture in Jar Fermentors

\*\* 九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門森林機能開発学講座

Division of Forest Bioscience, Department of Forest and Forest Products Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

\*\*\* 現 帝人株式会社

Present address: Teijin Ltd

添加物としての認可も得られ、他の用途への注目も集めている。現在の主な供給源は青森地方に産するヒバ (*Thujaopsis dolabrata*) の鋸屑であるが、その含量は心材木粉重量あたり0.02%と低い (岡部ら, 1990)。よって、ヒノキチオール需要が増大した場合のため、森林保護と安定供給を目的としていくつかの生産方法が研究されており、その一つに、植物培養細胞を用いた生産が挙げられる (Sakai *et al.*, 1994, Fujii *et al.*, 1995; Ono *et al.*, 1998; Sanada *et al.*, 2000)。植物培養細胞を用いた有用物質の生産はすでに化粧品素材としてのシコニンなど化学合成が難しい化合物についてはいくつかの成功例がある他、色素や食品原料の生産が研究されている (駒峰, 1990)。

我々はメキシコイトスギ (*Cupressus lusitanica*) の培養細胞がエリシターの添加によって効率よくヒノキチオールを生産することを小スケールの実験系ですでに示している (Inada *et al.*, 1993, Sakai *et al.*, 1994, Yamada *et al.*, 1999)。また、その培養物の酢酸エチル粗抽出物は従来より知られていた抗菌性に加えてチロシナーゼ阻害活性、抗酸化性があることを示した (Yamaguchi *et al.*, 1999)。そこで、いわゆるバイオテクノロジー利用によるヒノキチオール生産のために生合成経路の解明も行われているが (Fujita *et al.*, 2000)、今回は実用的な大量生産方法の一つとして細胞培養とヒノキチオール生産の自動化・大型化が可能であることを示すために、ベンチトップスケールのジャーファーメンターを用いてメキシコイトスギ細胞の培養とヒノキチオール生産を試みた。

## 2. 実験方法

### 2.1 細胞系列の維持と液体けん濁培養の開始

*C. lusitanica* のカルス細胞を4週毎に植え継いで維持した。培地としてpH 5.5に調整した20 g/lのショ糖、0.01  $\mu$ MのBAP、10  $\mu$ MのNAA、2.7 g/lのGel-riteを含むGamborg B5培地 (Gamborg *et al.*, 1968) を用いた。カルスをけん濁培養へ移行させるために、鉄成分を10分の1に減らし、Gel-riteを含まない液体改変Gamborg B5培地 (IS-1培地, Itose *et al.*, 1997) にカルスを移し、25 $^{\circ}$ C、暗所、振とう速度70rpmでインキュベートした。種々の条件検討にはこのけん濁培養法を用いた。

### 2.2 ジャーファーメンターによる細胞培養とヒノキチオール生産

最大培地量2 $\ell$ の羽攪拌式ジャーファーメンター (東京理化器械(株)製MBF-250PE型) と最大培地量2 $\ell$ のエアリフト式ジャーファーメンター (東京理化器械(株)製MBRP-181J型) を用いて、それぞれ成長試験とヒノキチオール生産試験を行った。それぞれの培養器に所定の液体培地を入れ、オートクレーブを用いて121 $^{\circ}$ Cで60分間滅菌を行った。培養は室温、暗所で行った。培養中はエアポンプから滅菌フィルターを通して常時空気を送り込んだ。

### 2.3 細胞成長率・ヒノキチオール生産量の測定

細胞生重量は培養液をMiracloth (Calbiochem-Novabiochem Corporation CA, USA) でろ過して細胞を回収することで測定した。成長率はW/W<sub>0</sub> (W<sub>0</sub>; 培養開始時の生重量, W; 培養後の生重量) で示した。

ヒノキチオール生産を開始させるには、鉄成分を0.25 mM、多量無機成分を10分の1と

した改変B5培地 (IS-2培地, Itose *et al.*, 1997) に細胞を移し, 粗精製した市販酵母抽出物をエリシターとして加えた. 所定期間培養後, 細胞を乳鉢で破碎し培養液とともに酢酸エチルで抽出した. 酢酸エチル層を脱水乾固後, バニリンを内部標準として遠藤らの方法 (Endo *et al.*, 1988) に従って定量した.

### 3. 結果と考察

予備検討として, 培地中のりん酸塩, 硝酸態窒素, アンモニア態窒素濃度の細胞成長とヒノキチオール生産に及ぼす影響について, 50ml容三角フラスコに培地10mlのスケールで検討を行った. 最もよい成長速度が得られた組成は, B5培地に組成が近いIS-1培地であった. この細胞系はカルスの状態でB5培地を用いて10年以上継代されてきたものなので, B5培地に適した細胞の選抜や馴化が行われてきたものと思われる. また, ヒノキチオール生産に対してアンモニア態窒素が阻害的に働くことが示されたが (data not shown), 今回のジャーファーメンターの検討は過去の小スケールでの結果と比較するために, 以前と同じ生育培地IS-1と生産培地IS-2を用いて試みた.

この培地組成を用いて羽攪拌式ジャーファーメンターとエアリフト式ジャーファーメンターで細胞培養を行った. 羽攪拌式では, 培養開始時の細胞密度100g/培地ℓ, 培地量1.5ℓ, 攪拌速度約75 rpm, 通気量200ml/min, 消泡剤としてジメチルポリシロキサン100ppmの培養条件で28日間培養を行ったところ, 生重量比で2倍の成長を示した (表1). これに対し, エアリフト式のジャーファーメンターでは培養開始時の細胞密度100g/ℓ, 生育培地1.5ℓと消泡剤 (ジメチルポリシロキサン) 100ppm, 25℃・暗所・通気量100ml/minで25日間培養した結果, 11倍の成長率を示した (表1). 攪拌型培養槽は強い剪断ストレスがかかると思われている (駒嶺, 1990; p. 15). エアリフト式での成長率が羽攪拌式よりも高かったのは, この機械的なストレスの違いが主な原因と考えられる. 一方, 50ml容三角フラスコを用いた振とう培養での成長率は25日で25倍であり, エアリフト式もこれより低い成長率を示した. 振とう培養では培養25日目には対数増殖期を終え, 培地中の糖も殆ど消費されていたが, 表1に示すようにエアリフト式バイオリクターでは糖消費量がフラスコ振とう培養よりも少なく, かなりの糖が培地中に残存していた. このことから今回のサンプリング時点においてはバイオリクターでは細胞は対数増殖期の途中にあると考えられる. すなわち, フラスコ振とう培養とバイオリクターでは成長曲線が異なるのかもしれない.

ヒノキチオール生産実験はIS-2培地を用いて行った. 羽攪拌式では, 培地量2ℓ, 攪拌速度70~80rpmの条件で培養を開始し, エリシター添加後1週間で10mg/培地ℓを蓄積し

表1 各種培養法での*C. lusitanica*培養細胞の生長率と糖消費量  
Table 1 Cell growth and sugar consumption rates of *C. lusitanica* cultured cell on fermentors.

培養器形式	培養日数(日)	細胞成長率(W/W0)	糖消費量
羽攪拌式ジャーファーメンター	28	2	n.d.*
エアリフト式ジャーファーメンター	25	11	6.1
フラスコ振とう培養	25	25	20.0

\*n.d.: 未測定

表2 各種培養法での*C. lusitanica*培養細胞のヒノキチオール生産量  
Table 2  $\beta$ -thujaplicin production of *C. lusitanica* cultured cell on fermentors.

培養器形式	ヒノキチオール生産量(mg/l)
羽攪拌式ジャーファーマンター	10.0
エアリフト式ジャーファーマンター	94.3
フラスコしんとう培養	96.1

たのに対して、エアリフト型では94mg/培地lであった。この生産量はフラスコ振とう培養を行った小スケールでの実験結果と同等であった(表2)。ヒノキチオールの生産は酵母抽出物エリクターの存在下で行われており、いわゆるprogrammed cell deathの過程が進んでいると思われる(Zhao *et al.*, 2001)。また、ヒノキチオール生産に必要なインキュベーション時間も最大1週間程度と短い(Itose *et al.*, 1997)。これらの理由から、外的要因である機械的ストレスの影響を比較的受けにくいのかかもしれない。

以上のことから、メキシコイトスギ培養細胞の成長とヒノキチオール生産というプロセスがジャーファーマンターを用いて可能であることが示され、そのときに培養器の形式が重要な影響を及ぼすことが示された。特に、今回の検討では不適当な形式(羽攪拌式)のバイオリアクターでは細胞の成長が著しく阻害され、ヒノキチオール生産量も10倍程度の違いがみられた。実用上の視点から、必要な細胞量を確保するよう大規模化・自動化のために大型ジャーファーマンターを導入する場合には、攪拌方式、通気方法等についてより詳細な条件最適化が必要と思われる。ヒノキチオール生産についてはエアリフト式バイオリアクターにおいてフラスコ振とう培養による小スケール系と同等の生産性を示したが、さらなるの向上のためには、細胞固定化技術の適用が考えられる。

## 引用文献

- DEBELL, J. D., MORRELL, J. J. and GARTNER, B. L. (1997) : Tropolone content of increment cores as an indicator of decay resistance in western red cedar. *Wood Fiber Sci.*, **29**:364-369.
- Dev, S. (1989) : Tropolones in Natural products of woody plants Vol. II., : ROWE, J. W. (ed) Springer-Verlag, Berlin, p 711.
- ENDO, M., MIZUTANI, T., MATSUMURA, M., MORIYASU, M., ICHIMARU, M., KATO, A. and HASHIMOTO, Y. (1988) : High-performance liquid chromatographic determination of hinokitiol in cosmetics by the formation of difluoroborane compounds. *J. Chromatography*, **455**:430-433.
- FUJII, R., OZAKI, K., INO, M. and WATANABE, H. (1995) : Hinokitiol production in suspension cells of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* Makio. *Plant. Tiss. Cult. Lett.*, **12**(1):55-61.
- FUJITA, K., YAMAGUCHI, T., ITOSE, R. and SAKAI, K. (2000) : Biosynthetic pathway of  $\beta$ -thujaplicin in the *Cupressus lusitanica* cell culture. *J. Plant. Physiol.*, **156**:462-467.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. D. and OJIMA, K. (1968) : Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, **50**: 151-156.
- INADA, S., TSUTSUMI, Y. and SAKAI, K. (1993) : Elicitor of the  $\beta$ -thujaplicin accumulation in callus cultures of *Cupressus lusitanica*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **38**:119-126.
- Itose, R. and Sakai, K. (1997) : Improved culture conditions for the production of  $\beta$ -thujaplicin by suspen-

- sion cell cultures of *Cupressus lusitanica*. Plant Biotechnol. **14**(3):163-167.
- 駒嶺 穆 (1990) : 植物細胞培養と有用物質, CMC出版, 東京.
- 岡部 敏弘・斉藤 幸司・大友 良光・工藤 幸夫 (1990) : 青森ヒバの不思議, 青森ヒバ研究会出版, 弘前, pp. 71-101.
- ONO, M., ASAI, T. and WATANABE, H. (1998) : Hinokitiol production in a suspension culture of *Calocedrus formosana* Florin. Biosci. Biotechnol. Biochem., **62**(9):1653-1659.
- SAKAI, K., KUSABA, K., TSUTSUMI, Y., SHIRAIISHI, T. (1994) : Secondary metabolites in cell-culture of woody-plants. 3, Formation of  $\beta$ -thujaplicin in *Cupressus lusitanica* callus cultures treated with fungal elicitors. Mokuzai Gakkaishi, **40**:1-5.
- SANADA, K., KAWAGUCHI, A., FURUYA, T., ISHIHARA, K., NAKAJIMA, N. and HAMADA, H. (2000) : High production of  $\beta$ -thujaplicin with *Thuja dolabrata* var. *hondai* cells in a semi-continuous culture system. J. Mol. Catal. B: Enzym., **11**:59-61.
- YAMADA, J., FUJITA, K. and SAKAI, K. (1999) : Suspension culture of *Cupressus lusitanica* for  $\beta$ -thujaplicin biosynthesis. Proceedings of 10<sup>th</sup> International Symposium on Wood and Pulp Chemistry (Yokohama, Japan), **3**:10-13.
- YAMAGUCHI, T., FUJITA, K. and SAKAI, K. (1999) : Biological activity of extracts from *Cupressus lusitanica* cell culture. J. Wood Sci., **45**:170-173.
- ZHAO, J., FUJITA, K., YAMADA, J. and SAKAI, K. (2001) : Improved  $\beta$ -thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyljasmonate. Appl. Microbiol. Biotechnol., **55**(3), 301-305.

(2001年12月5日受付; 2002年2月6日受理)

## Summary

Suspension cultures of *Cupressus lusitanica* cells on two kinds of jar fermentors were studied. The types of jar fermentors significantly affected cell growth rates. The growth rates of cells on the wing-stirring type fermentor and the airlifted type fermentor slowed down to one tenth and a half of the rate in flask-cultured cells, respectively.  $\beta$ -Thujaplicin production on the airlifted type fermentor showed the same level of flask-cultured, but it was inhibited on the wing-stirring type fermentor. Mechanical stress would be the most possible factor to be considered for the optimal growth and high  $\beta$ -thujaplicin production in large-scale cultivation of *C. lusitanica* cells.

**Key words** : jar fermentor, cell culture, Mexican cypress, *Cupressus lusitanica*,  $\beta$ -thujaplicin, plant secondary metabolites