

《様式B》

研究テーマ 「植物工場を利用した抗がん剤生産型冬虫夏草の人工栽培技術の確立」

研究責任者 所属機関名 中部大学

官職又は役職 教授

氏名 石田康行 メールアドレス yishida@isc.chubu.ac.jp

共同研究者 所属機関名 (株)コルジセ

官職又は役職 代表取締役

氏名 近藤幸盛

(平成 29 年度募集) 第 30 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

本申請研究では、「コルジセピン生産能に優れた冬虫夏草の迅速選抜 (スクリーニング) 法の開発」と「植物工場でのパイロット栽培実験」を融合して、抗がん剤生産型の冬虫夏草を人工的に栽培する技術確立を目指した。前者のスクリーニング法開発では、冬虫夏草中のコルジセピンを迅速かつ簡便に迅速定量できる、実用分析法の開発を試みた。また、後者のパイロット栽培実験では、任意の温度および湿度条件に加えて、光の波長や強度などの様々な照射条件を自在に制御できる栽培プラントを利用して、多様な条件下で冬虫夏草の栽培を検討した。

まず、スクリーニング法の開発では、化学反応場と高分解能ガスクロマトグラフ法を連結させて、冬虫夏草中のコルジセピンを迅速定量する新規分析法の開発を試みた。その結果、反応試薬として有機アルカリの一種である水酸化テトラメチルアンモニウムを選択し、反応温度および試薬添加量をそれぞれ 400 °C および 4 μL に設定したときに、固体状態の冬虫夏草に含まれるコルジセピンを最も効率よく検出できる化学反応場を構築することができた。こうして開発した反応場を GC 装置と連結し、さらに、精密分析の向上を目指して「マトリックス成分の存在を加味した標準試料」の採用を新たに試みた。その結果、煩雑な試料前処理操作を用いずに、30 分以内でコルジセピン量の分析を可能にする新規分析法を開発することができた。

次に、冬虫夏草の人口栽培については、栽培時の温度、湿度や光の照射条件 (波

長域、照度及び照射サイクルなど)を自在にコントロールできるパイロット栽培施設を活用した。この人工施設での冬虫夏草の栽培と上述の新規分析法を組み合わせることにより、コルジセピンを高効率に生産しうる、冬虫夏草の栽培条件の探索を試みた。その結果、栽培期間と照射光の波長域)を決定することができた。今後、栽培温度や湿度等のさらなる栽培条件の適正化が必要であるが、それらを決定できればコルジセピンを高効率に生産する冬虫夏草の栽培技術を確立し、当該成分を利用した機能性食品や医薬品原料の安定供給に発展する可能性が十分にある。

## 2. 実施内容および成果の説明

### 2.1. 序論

冬虫夏草とはキノコ(孢子)が昆虫に寄生し、その体内で、菌糸の固まりである菌核を増殖させ、時期が来ると昆虫の頭部や関節部から棒状の子実体(キノコ)を伸ばし成長する菌類の総称である。冬虫夏草の中には、抗生物質であるコルジセピンを生産する種が存在する。このコルジセピンは、DNAやRNA合成阻害作用をもつことを知られており、悪性細胞の増殖を抑制する効果やアポトーシスを誘発する働きがあると考えられている [1]。そのため、がん細胞の増殖抑制作用があるとされ、がんの治療や再発予防に効果を発揮することが期待されている [2]。このコルジセピンを医薬品として利用するために、当該成分を多く含む冬虫夏草の人工栽培技術の開発が渴望されている。そこで、本申請研究では、「コルジセピン生産能に優れた冬虫夏草の迅速選抜(スクリーニング)法の開発」と「植物工場でのパイロット栽培実験」を融合して、抗がん剤生産型の冬虫夏草を人工的に栽培する技術確立を目指した。

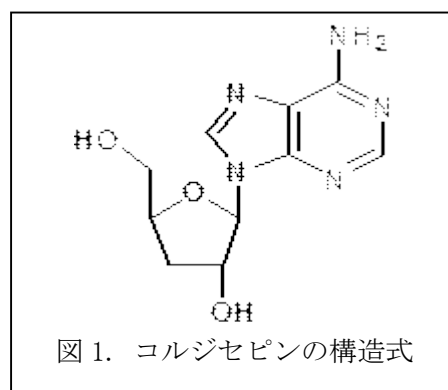


図1. コルジセピンの構造式

### 2.2. 実験

#### 2.2.1. 材料

冬虫夏草として、サナギタケ (*Cordyceps militaris*) を使用した。ガの蛹に人為的に孢子を摂取した後、25℃下で10~30日間人工栽培を行った。また、反応熱分解用の試薬として、Aldrichより購入した水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) のメタノール溶液 (25 wt%) を用いた。



さらに、定量用の標準試料としてコルジセピン (Wako) を購入し、そのメタノール溶液を測定に使用した。

### 2.2.2 反応熱分解ガスクロマトグラフ/質量分析計測定

反応熱分解ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GCMS) 測定は、GC/MS 本体 (Agilent, 5973 network) に縦型加熱炉型の熱分解装置 (Frontier Lab, PY-3030iD) を直結したシステムを用いて行った。試料カップに微細粉末状の冬虫夏草試料を 200  $\mu\text{g}$  はかりとり、これに 3  $\mu\text{L}$  の TMAH 溶液を添加した。次に、この試料と試薬の入った試料カップを 400  $^{\circ}\text{C}$  に設定した熱分解装置の炉心へと自由落下により導入し、He キャリヤーガス気流中で瞬間的な反応熱分解反応を行った。分離カラムには、Frontire Lab 社製の 5% フェニル基ポリジメチルシロキサン固定相の溶融シリカキャピラリーカラム (Ultra alloy-5 (MS/HT), 30 m  $\times$  0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  膜厚) を用いた。カラム温度は、初期温度 50  $^{\circ}\text{C}$  から、毎分 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  の速度で 300  $^{\circ}\text{C}$  まで昇温操作した。熱分解装置内での反応熱分解により生成した分解物を、He キャリヤーガス (約 50 mL  $\text{min}^{-1}$ ) とともにスプリッターに移送・分割し、分離カラムに対する適正流量 (約 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ) をカラムに導入した。MS 部については、イオン化温度と四重極温度はそれぞれ 230 $^{\circ}\text{C}$  および 150 $^{\circ}\text{C}$  に設定し、イオン化方法として電子イオン化法 (70 eV) を採用した。

### 2.3. コルジセピン生産能に優れた冬虫夏草の迅速選抜 (スクリーニング) 法の開発

図 2 に、(a) コルジセピン標準試料、および (b) サナギタケ試料を TMAH 共存下で反応熱分解 GC/MS 測定して得られた総イオンクロマトグラムを示す。まず、(a) のコルジセピンのクロマトグラム上には、①と②を付した 2 本のピークが明瞭に観測された。図 3 に、①および②のピークの質量スペクトルを示す。まず、①のスペクトル上には、 $m/z$  177 の分子イオンピークに加え、メチル基が脱離して生じた  $m/z$  162 などのフラグメントイオンが観測され、このピークはトリメチルアデニンであると同定できた。次に、②の質量スペクトル上には、コルジセピンの全メチル化体の分子イオンに相当する  $m/z$  307 のピークに加え、そこからメチル基

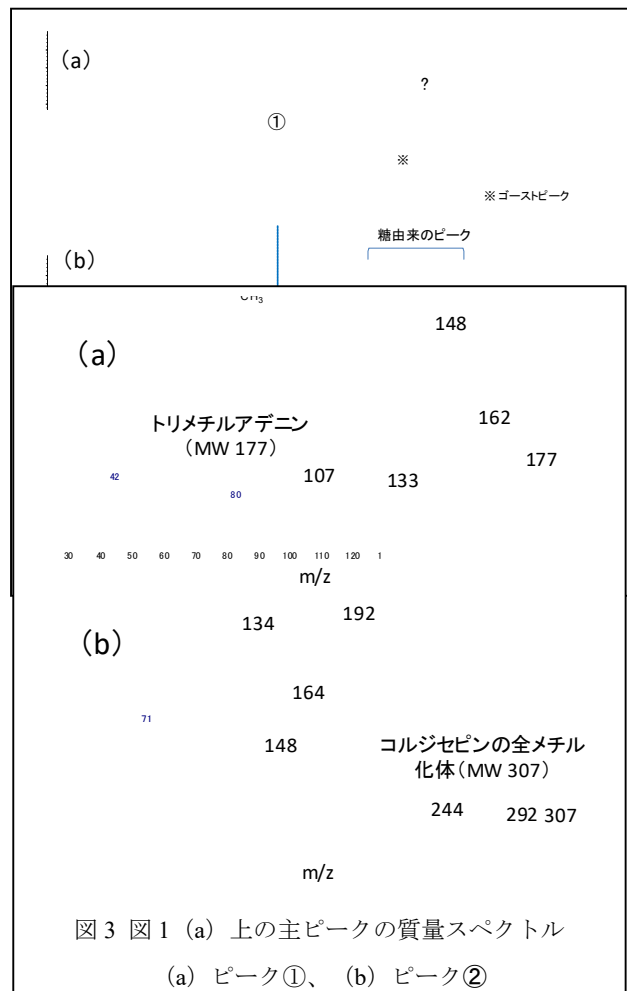


図3 図1 (a) 上の主ピークの質量スペクトル  
(a) ピーク①、(b) ピーク②

が脱離して生じた  $m/z$  292 などのフラグメントイオンが観測された。よって、このピークはコルジセピンの全メチル化体であると同定できた。

上記の同定結果を基に考察した、コルジセピンの TMAH によるメチル化のメカニズムを図 4 に示す。コルジセピン分子中のアミノ基およびヒドロキシル基が TMAH の作用によって全てメチル化されれば、その結果、②のコルジセピンの全メチル化体が生じる。

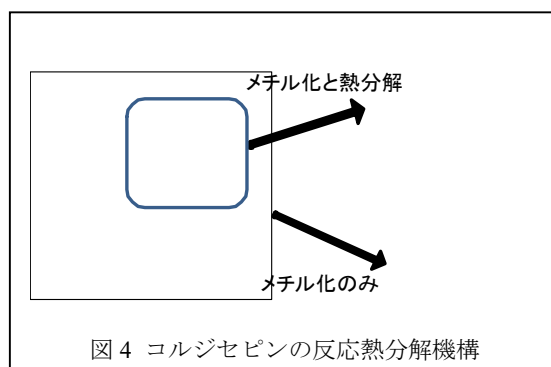


図 4 コルジセピンの反応熱分解機構

さらに、その反応と競争的にコルジセピン中の N-C 結合の開裂とそれに引き続くメチル化が進行すれば、①のトリメチルアデニンが生成することになる。これらのうち、①のトリメチルアデニンは、冬虫夏草中にもともと存在している可能性があるため、コルジセピンの定量には②のコルジセピンの全メチル化体の使用が必要である。一方で、図 2 (b) のサナギタケ試料のクロマトグラム上には、アミノ酸、脂肪酸および糖などのマトリクス成分由来のピーク群に加えて、①のトリメチルアデニンが検出された。しかしながら、②のコルジセピンの全メチル化体のピークは、その含有量が少ないことに加えて、マトリクス成分との分離が不十分であったため、該当するピークが全く観測されなかった。

そこで、コルジセピンの質量スペクトル上にベースピークとして観測された  $m/z$  192 のイオンを使って (a) コルジセピン標準試料、および (b) サナギタケ試料のマスクロマトグラムを獲得した。その結果を図 5 の (a) および (b) にそれぞれ示す。いずれのマスクロマトグラム上にも、コルジセピンの全メチル化体のピークのみがはっきりと観測された。このように、

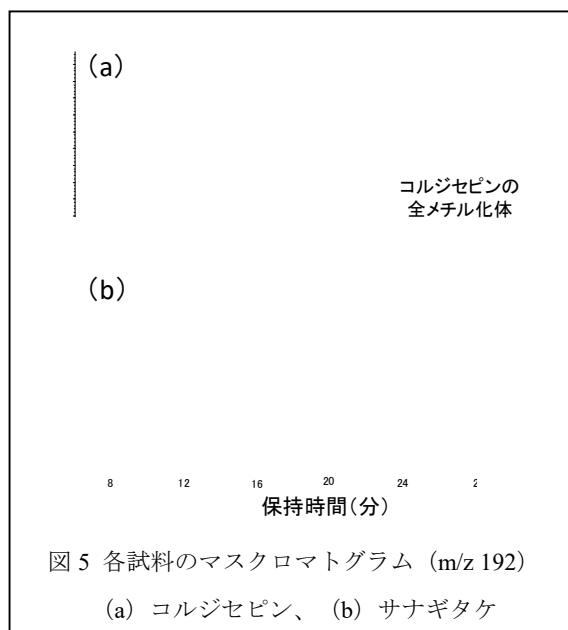


図 5 各試料のマスクロマトグラム ( $m/z$  192)

(a) コルジセピン、(b) サナギタケ

$m/z$  192 におけるマスクロマトグラムを得ることにより、冬虫夏草中のコルジセピンをマトリクス成分の妨害をまったく受けることなく、選択的かつ高感度に検出できることがわかった。

最後に、当該ピークの面積を基にして、コルジセピン標準溶液を用いた検量線法によりサナギタケ中のコルジセピンの定量を試みた。しかしながら、測定値の相対標準偏差は 20%以上と極めて高い値を示し、精密な分析を行うことができなかった。この理由として、コルジセピン標準溶液の反応熱分解では熱エネルギーが試料カップ中のコルジセピンに直接伝わるため、前述した 2 種類の競争反応（コルジセピンの全メチル化と、アデニン部の開裂およびメチル化）がそれぞれ進行する割合が測定ごとに大きく変動してしまうことを考えた。そこで、過剰な熱エネルギーを緩和し、さらに試料成分に対して熱エネルギーを均一に加えるために、「マトリクス成分の存在を加味した標準試料」を調製し、それを使って検量線を作成することにした。具体的な手順としては、マトリッ

クス成分を模したろ紙に既知濃度のコルジセピン溶液を含浸させ、乾燥後、そのろ紙を凍結粉碎して粉末状の標準試料を調製した。この粉末試料を反応熱分解 GC/MS 測定に供して検量線を作成した結果、高い相関係数 ( $R^2 = 0.997$ ) に加えて、十分な再現性 ( $RSD = 5.8\%$ ) が得られ、サナギタケ中のコルジセピンの定量を迅速かつ精密に行うことが可能になった。

## 2. 4. コルジセピン生産能に優れた冬虫夏草の栽培条件の確立

### 2. 4. 1. コルジセピン生産量の経日変化の追跡

サナギタケの成長に伴い、そこに含有されているコルジセピンの量も変化することが予想される。そこで、ここでは、マトリックス成分の存在を加味した検量線法を用いて、冬虫夏草の成長段階におけるコルジセピン含有量の変化を追跡した。試料としては、10-30 日間人工栽培して得られたサナギタケの子実部を仕様した。まず、図 6 に (a) 10 日、(b) 15 日、および (c) 30 日間栽培したサナギタケ試料について得られたマスキロマトグラム ( $m/z$  192) を示す。この図に示すように、サナギタケが成長するにつれてコルジセピンのピーク強度が増加するが、30 日では若干減少していることがわかる。

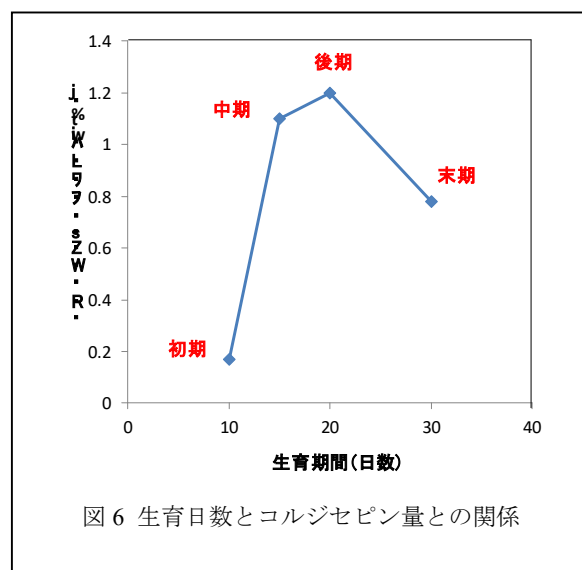


図 6 生育日数とコルジセピン量との関係

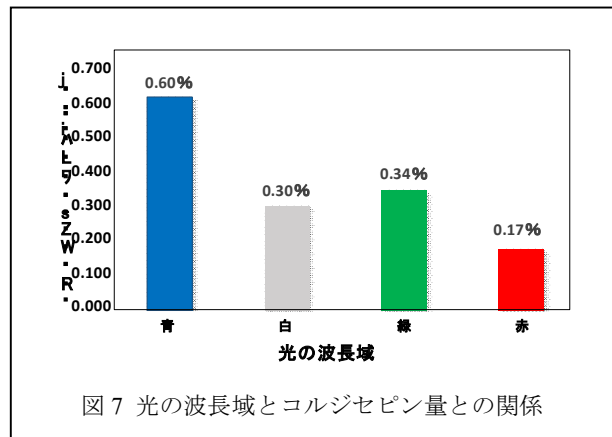
次に、これらのコルジセピンの試料量あたりのピーク面積と図 12(b)の検量線を使って求めたコルジセピンの含有量を表 4 に示す。この表に示すように、生育期間が約半月のサナギタケにおいてコルジセピン含有量は最も高くなり、その後、胞子を放出する 1 ヶ月を経過するとコルジセピン量が減少している。このことから、コルジセピンの含有量が高いサナギタケを収穫できる時期は、生育後、約半月であることが分かった。

### 2. 4. 2. コルジセピン生産に適した照射光波長の決定

一般に、光合成を行わないキノコ類の生育にも光は必要であり、その波長域が成長速度や成分組成に関与していることが報告されている [3]。特に、近紫外から青色の波長域の数十～数百 lx の照度の光に成長促進の効果があることが明らかにされており、当該光を含む擬似太陽光の下でマンネンタケを栽培した際、その中の鉄、カルシウムや亜鉛などの有効成分の含有率の上昇が認められた [3]。こうした光の影響は同じキノコ類である冬虫夏草についても同様に見られるはずであるが、その効果を実証した論文は報告されていない。そこで、ここでは、照射光の波長域が冬虫夏草におけるコルジセピン生産に及ぼす影響を成長段階の違いも考慮して調べた。

図 5 に、青、緑、赤、あるいは白色光を照射して 29 日間人工栽培したサナギタケ中のコルジセピン量を示す。なお、これらの試料はいずれの波長域においても照度を 190 Lux に統一して栽培を行った。この図に示すように、青色光を照射したサナギタケにおいてコルジセピン含有量は約 0.60

wt%と最も高くなった。次いで、白色光と緑色光であり、赤色光は今回の実験で最も低いコルジセピン含有量を示した。上述したように、一般に、近紫外から青色の波長域の光の下でキノコの成長やその構成成分の生産能が促進されることが知られており、上記の結果から冬虫夏草中のコルジセピン生産についても青色光による促進効果が見られることが分かった。



## 2.5. まとめ

有機アルカリ共存下での反応熱分解ガスクロマトグラフィーにより、冬虫夏草（サナギタケ）中に含まれるコルジセピンの分析を、固体状態の試料を用いて迅速かつ簡便に行う分析法を開発できた。特に、定量の際に「マトリックス成分の存在を加味した標準試料」を用いることにより、コルジセピン生産能に優れた冬虫夏草の迅速選抜（スクリーニング）を行うのに十分な精密さを得ることに成功した。さらに、このスクリーニング法を活用して、コルジセピンを最も効率よく生産するための、サナギタケの栽培条件（栽培期間と照射光の波長域）を決定することができた。今後、栽培温度や湿度等のさらなる栽培条件の適正化が必要であるが、それらを決定できればコルジセピンを高効率に生産する冬虫夏草の栽培技術を確立し、当該成分を利用した機能性食品や医薬品原料の安定供給に発展する可能性が十分にある。

## 2.6. 引用文献

- [1] 青木襄児, 改定昆虫病原菌の検索, 全国農村教育協会, 2003.
- [2] K. Nakamura, K. Shinozuka, N. Yoshikawa, *J. Pharamacol. Sci.*, **127**, 53-56, 2015.
- [3] 貝塚隆則, 秋濱友也, *農業施設*, **24**, 161-166, 1993.