

# 微細藻類が生産するアスタキサンチンを水溶化する タンパク質の化粧品素材としての開発

東京農業大学生命科学部分子微生物学科  
東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科

川崎 信治

Under extreme environmental conditions such as desiccation and high salinity combined with high light irradiation, it is difficult for higher plants to survive because light energy, in combination with oxygen, leads to the generation of reactive oxygen species (ROS) under water stress conditions. However, microalgae are found to thrive under such conditions. A microalga, strain Ki-4 was previously isolated from asphalt in midsummer, and a novel water-soluble astaxanthin binding protein, named AstaP, was identified from this microalga. This protein is heat-stable and possesses singlet oxygen-quenching activity in water. AstaP is thought to enable the microalga to survive under the extreme photooxidative stress conditions. Our aim is to develop AstaP as a novel functional molecule, which can be produced at high yields, to enable lipid-soluble organic astaxanthin to function in water. In this study, we have been working on developing a system to obtain large amounts of the highly purified AstaP by engineering the cultivation systems of strain Ki-4. In addition, we are determining the possibility of using AstaP as a cosmetic product to protect human cells from the toxic effects of sun light and ROS.

## 1. 緒言

植物は強光が付随する環境ストレス下では、活性酸素の生成を伴う光酸化ストレスを発生し枯死にいたる。申請者らは一般の植物が生存しえない砂漠環境などの極限環境から微細藻類の探索を行い、70株ほどの真核微細藻類を単離・保有している。これら極限環境から単離した藻類は、淡水性でありながら強い乾燥耐性や耐塩性を示し、強光照射下でかつ水分が0%の環境でも数ヶ月間生存するなど強い環境ストレス抵抗性を示すことから、シングルセルを強光毒性から防御するための優れた生命代謝系の存在が推定された。

強光下の真夏のアスファルトから単離した微細藻類Ki-4株は、強光が付随する環境ストレス（強光+乾燥や塩ストレス）に遭遇すると細胞液を赤く変色して生存する（図1）。この赤色に着目して研究をすすめた結果、植物界で初めての発見となるアスタキサンチンを結合する水溶性タンパク質の精製に成功し、AstaPと命名した<sup>1)</sup>（図2）。アスタキサンチンはカロテノイドの中でも特に優れた抗酸化力をもつ脂溶性のカロテノイドであり、エビやカニの甲羅、フラミンゴの羽などに含まれる脂溶性のカロテノイドで、化粧品や機能性食品に広く利用されている。また植物界におけるアスタキサンチンは、真核の微細藻類ヘマトコッカス藻などが細胞内に油滴として蓄積することが知られるのみで

あった。微細藻類Ki-4株はヘマトコッカス藻と同じ緑藻綱に属する微細藻類で、AstaPは本藻類が光酸化ストレスを感知した際に細胞内で大量に生産される（図2）。AstaP

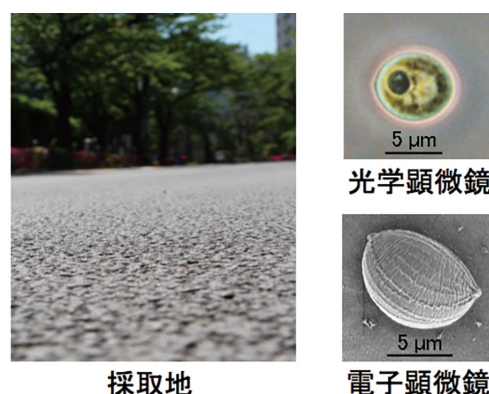


図1 大学前の真夏のアスファルトから単離したKi-4株の顕微鏡写真

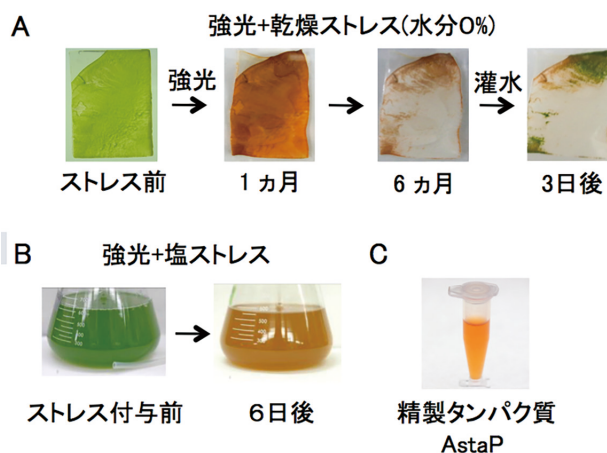


図2

- Ki-4株を寒天培地上で培養し、強光+乾燥ストレスを付与した際の形態変化
- Ki-4株の液体による大量培養とストレス付与後の色彩変化
- 精製後に純水に溶けたアスタキサンチン結合タンパク質(AstaP)



Development of a novel microalgal aqueous astaxanthin binding protein for use in cosmetic products

Shinji Kawasaki  
Tokyo University of Agriculture

はアスタキサンチンを純水に溶かす水溶化能力があり、その水溶特性と1重項酸素除去活性は100℃・1時間の処理後も安定であった。そこで本研究ではAstaPを脂溶性アスタキサンチンの効力を水溶液中で発揮し、かつ大量生産が可能な新奇な機能性素材として認識し、化粧品分野での有効的な利用法の可能性を探ることを目的とする。

## 2. 実験

### 2.1. 大量生産法の確立

水溶性のアスタキサンチン結合タンパク質(AstaP)の商業利用には、まず本品の大量生産系の確立が前提条件となる。そこで微細藻類の大量培養系の確立に着手した。まずは大量培養に向けた培地成分の確立を行った。培地には糖源など有機物を含まない無機塩類をベースとした安価な無機培地を採用し、完全な独立栄養(CO<sub>2</sub>と光のみの供給で生育)にて良好な生育を可能とする培地組成を検討した。次に光酸化ストレス付与に応じて発現するAstaPの最適な誘導条件を決定するために、光強度やCO<sub>2</sub>濃度、塩濃度、培養温度などの光酸化ストレス付与条件と、さらなる発現量の向上を目指して鉄濃度の影響を調査した。また上記で確立した培養条件を用いて、非閉鎖系での屋外培養槽による大量培養試験を実施した(図3)。

### 2.2. 大量精製法の確立

AstaPの商業利用には、AstaPを容易に、かつ高純度に精製する技術が必要となる。AstaPは細胞内で最も高い等電点(pI=10.5)をもつことから、本性質を上手く利用することにより他の細胞内タンパク質との容易な分別精製が可能になることが推定された。そこで前項2.1.で実施した屋外大量培養法で生産した微細藻類から、AstaPの大量精製法の確立を試みた。まず安価でかつ容易な精製系の確立を目的として、イオン交換樹脂の検討と、効率的な精製法

の開発に着手した。

### 2.3. 細胞アッセイ系の確立

AstaPは脂溶性のアスタキサンチンの効力を水溶液中で発揮することが可能な抗酸化物質としてのユニークな機能が期待される。そこで水溶液中での活性酸素除去能力の評価、ならびに1重項酸素除去剤としての能力の評価と安定性に関する試験を行った。AstaPは新規な機能性素材であることから、化粧品素材への応用は各種の安全性試験をクリアする必要がある。その第一歩として、培養細胞を用いた試験を実施した。細胞を用いた毒性試験はアスタキサンチンの抗酸化能力を評価した過去の論文を参考にして実施した。専門家の指導の下で細胞培養系の立ち上げを行い、その後にアスタキサンチンの機能性評価に関する論文を参考にして、マウス胎児由来の線維芽細胞であるNIH3T3細胞を用いて評価を行った。

## 3. 結果

### 3.1. AstaPの大量生産法の確立

培地成分に関する正確な情報を得るために、無菌環境下でKi-4藻の培養を行い、CO<sub>2</sub>の濃度、ならびに光条件の検討を行った。その結果、培養開始後4日目で3×10<sup>6</sup>個/ml(培地)の増殖を可能とする藻細胞培養系の確立に成功した。アスタキサンチン生産用に培養されている微細藻類へマトコッカス藻で報告されている細胞増殖速度は10<sup>5</sup>個/mlのオーダーであることから<sup>2, 3)</sup>、細胞の数として評価すると約10倍の増殖速度に相当する結果を得た。確立した大量培養系にてAstaPの生産効率の向上を試験した。その結果、AstaPは光酸化ストレス下(強光+塩ストレスや乾燥ストレス下)で速やかに遺伝子発現を開始し、ストレス開始後2日目には、細胞内で最も大量に蓄積するタンパク質になることがプロテオーム解析の結果から判明した

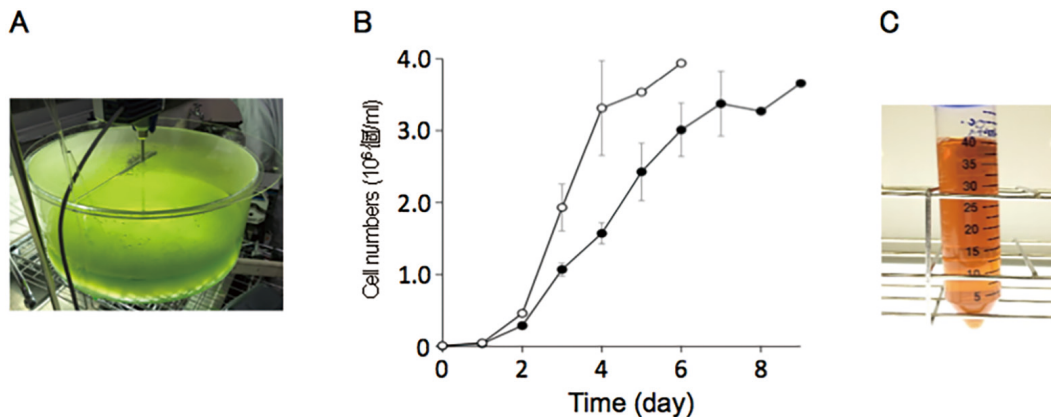


図3

- A. 非閉鎖系培養の様子  
 B. 本研究で最適化した培養法によるKi-4株の生育。○：CO<sub>2</sub>通気培養。●：Air通気培養  
 C. 光酸化ストレスを付与後の藻体から抽出した水溶性画分

(図4)。そこでCO<sub>2</sub>濃度や光の強度、さらにはFeイオンの濃度を変化させ、AstaP発現との相関性に関して解析を行った。その結果、最適な通気CO<sub>2</sub>濃度の条件を決定した(図3)。またヘマトコッカス藻においてFe添加によるアスタキサンチン合成量の上昇が報告されていたことから同様に添加したところ、AstaP発現量の向上が観察された。しかしFe未添加のものに比べて生産量が1.2倍程度高いのみであり、その後の生産プロセスにおけるFeの混入リスクもあることから、以後の実験は全てFe未添加条件で行うこととした。次に、上述で開発した大量培養系を用いて生産したAstaPの効率的な精製法の開発を行った。AstaPは高い等電点を有することから、陽イオン吸着カラムに使用するバッファー組成について検討した。その結果、他のタンパク質が吸着しない高アルカリのバッファーを使用した場合でも陽イオン交換カラムに吸着することが判明したため、カラム1本の使用のみでAstaP溶出画分をほぼ完全に精製できる系の確率に成功した(図5)。現在はAstaPの質量より高分子領域に存在する微量の夾雑タンパク質を完全に除去するための溶出塩濃度のグラジェントの条件を検討している。また本精製は安価なイオン交換樹脂を用いた場合でも可能であったことから、精製法の低コスト化と簡便化に目途が立った。

### 3. 2. 抗酸化活性の評価法の確立

過去の研究において、AstaPは1重項酸素を水溶液中で消去する活性に優れ、AstaP 0.2μM(アスタキサンチン換算)は標準化合物であるNaN<sub>3</sub>(アジ化ナトリウム) 1mMに相当する強い活性を示すことを報告した<sup>1)</sup>。本活性は100℃で1時間のボイル後も失活しない耐熱性がある。現在は精製したAstaPを用いて、1重項酸素消去活性と共に、様々な酸化基質に対する抗酸化活性について解析を行っている。能力の比較に関しては可溶性の抗酸化剤であるアントシアニンやフラボノイド類、ビタミン類、グルタチオンなどの水溶性化合物を用いて、抗酸化活性や各種安定性(光熱、放置)について比較した。その結果、興味深い結果が得られたことから、現在は商業利用に向けた総合的な観点からの評価を継続し、論文化を目指してデータを精査している。

AstaPは新規な機能性素材であることから、細胞や生体への影響は不明である。上記の解析において*in vitro*の系で得られたAstaPの活性を応用的に評価するためにも、細胞培養系の確立と、AstaP共存下における細胞への影響を解析する必要がある。そこで細胞培養系の確立を行った。過去にアスタキサンチンの細胞への機能性を評価した論文<sup>4)</sup>を参考にして、ラット胎児由来の線維芽細胞(NIH3T3

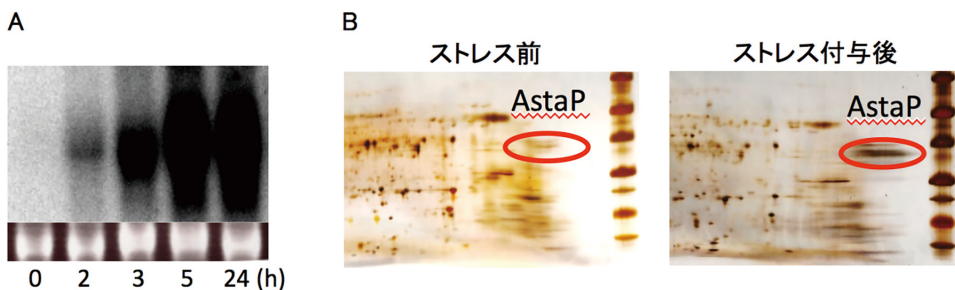


図4

A. AstaP遺伝子の発現。光酸化ストレス付与から2時間後に発現誘導が観察された  
 B. AstaPタンパク質の発現。光酸化ストレス付与48h後(右)に大量発現が観察された

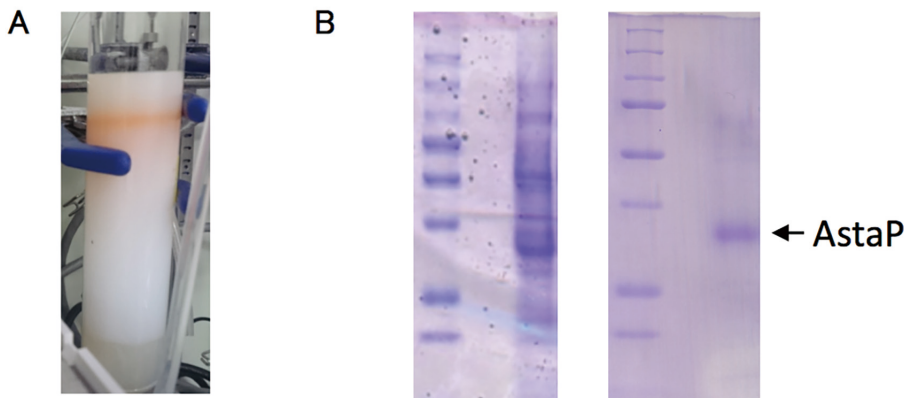


図5

A. AstaPタンパク質精製の様子  
 B. 精製タンパク質のSDS-PAGE。カラムクロマトグラフィー前(細胞粗抽出液、左)と後(右)。カラム1本で高純度の精製が可能となった

細胞)の培養系の確立を行った。NIH3T3細胞は理化学研究所のストック株を使用し、DMEM培地に細胞を接種し、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベータで数日間培養したところ、良好に生育した。純水に溶けた濃縮 AstaP を添加して NIH3T3 細胞の生育への影響を観察したところ、これまでに終濃度 15 $\mu$ M までの AstaP (OD484nm=1.5 に相当、濃いオレンジ色になる) を添加した条件下で細胞生育への負の影響は観察されなかった。本研究で細胞培養系と添加実験に関する評価系を確立できたことから、今後は AstaP 共存下で細胞への紫外線照射の影響や活性酸素発生剤の影響などを観察し、細胞保護効果の有無を観察し、さらなる応用研究を進める方針である。

#### 4. 考 察

本研究では微細藻類由来の水溶性アスタキサンチン結合タンパク質の化粧品素材への応用に関して研究を行った。応用研究に着手する際に必要不可欠となる大量生産系の確立を目的として、屋外培養に向けたパイロットスタディを行った。開発した開放培養系での AstaP の生産量を総括すると、パイロットスタディでは約 2 週間の期間でヒトの目で判別される十分なオレンジ色 (OD485nm=0.5) の水溶液 50ml を約 30 本得られる藻体が 10L の培地から得られた。この生産量を基準としてスケールUPが容易な直径 3 m の培養槽で行う場合は約 500 本 (収率 50% として)、やや中規模の直径 10 m の培養槽で行う場合は約 5,000 本 (収率 30% として) の生産が可能と試算した。以上を総括すると、供給面については商業化に必要な諸条件をクリアできる感触を得た。

一方、化粧品素材への利用には、機能性だけでなく安全性を評価する必要がある。細胞への影響を評価したところ、十分なオレンジ色の水溶液では、少なくとも NIH3T3 細胞の増殖に負の影響を与えないことが判明した。今後は、様々な種類の動物細胞を用いてさらに高濃度の AstaP を用

いた安全性評価を実施したい。また AstaP の機能性は、アスタキサンチンの代表的な機能性である 1 重項酸素消去活性の他にも、眼精疲労抑制や免疫賦活、脳梗塞など、新規な効果が続々と報告されている。これらの研究には全て脂溶性のアスタキサンチンが用いられていることから、純水に可溶な AstaP の利用性は未知の可能性を秘めている。今後は培養細胞の評価系を用いて、脂溶性のアスタキサンチンがもつ機能性が水溶液中でも実現可能かどうかを解析し、AstaP がもつ可能性を評価していきたい。

#### 謝 辞

本研究の実施にご助成いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

#### (引用文献)

- 1) S. Kawasaki, K. Mizuguchi, M. Sato, T. Kono and H. Shimizu. A novel astaxanthin binding photooxidative stress inducible aqueous carotenoprotein from a eukaryotic microalga isolated from asphalt in midsummer. *Plant Cell Physiol.* 54, 1027-1040, 2013.
- 2) M. Harker, A.J. Tsavalos, and A.J. Young. Factors Responsible for Astaxanthin Formation in the Chlorophyte *Haematococcus Pluvialis*. *Bioresource Technology* 55, 207-214, 1996.
- 3) I. Suh, H. Joo, C. Lee. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *J. Biotechnol.* 125, 540-546, 2006.
- 4) S. Hama, S. Uenishi, A. Yamada, T. Ohgita, H. Tsuchiya, E. Yamashita, and K. Kogure. Scavenging of Hydroxyl Radicals in Aqueous Solution by Astaxanthin Encapsulated in Liposomes. *Biol. Pharmaceu. Bull.* 35, 2238-2242, 2012.