

醗酵天然物からの医薬品の開発—微生物の能力を引き出した生産技術の開発—

長尾康次,^{*,a} 上田 聡,^a 神田宗和,^b 大畑暢敬,^a 山下道雄,^c 日野資弘^a**Drug Development from Natural Fermentation Products: Establishing a Manufacturing Process Which Maximizes the Potential of Microorganisms**Koji NAGAO,^{*,a} Satoshi UEDA,^a Munekazu KANDA,^bNobutaka OOHATA,^a Michio YAMASHITA,^c and Motohiro HINO^a^aAstellas Pharma Inc., Fermentation and Biotechnology Labs., ^bAstellas Toyama Inc., Fermentation Technology Research Center, 156 Nakagawara, Kiyosu, Aichi 452-0915, Japan, and^cAstellas Foundation for Research on Metabolic Disorders, 3-11 Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-8411, Japan

(Received July 17, 2010)

Natural fermentation products have long been studied as attractive targets for drug discovery due to their amazing diverse, complex chemical structures and biological activities. As such, a number of revolutionary drugs developed from natural fermentation products have contributed to global human health. To commercialize a drug derived from natural fermentation products, an effective chemical entity must be identified and thoroughly researched, and an effective manufacturing process to prepare a commercial supply must be developed. To construct such a manufacturing process for tacrolimus and micafungin, the following studies were conducted: first, we focused on controlling the production of the tacrolimus-related compound FR900525, a fermentation by-product of tacrolimus which was critical for quality assurance of the drug substance. FR900525 production was reduced by using a mutant strain which produced more pipercolic acid, the biosynthesis material of tacrolimus, than the original strain. Then, to optimize the fermentation process of FR901379, an intermediate of micafungin, a fed-batch culture was adopted to increase FR901379 productivity. Additionally, FULLZONE™ impeller was installed into the scaled-up fermenter, reducing the agitation-induced damage to the mycelium. As a result, the mycelial form changed from filamentous to pellet-shaped, and the air uptake rate during fermentation was drastically improved. Finally, we conducted screening for FR901379 acylase-producing microorganisms, as FR901379 acylase is necessary to manufacture micafungin. We were able to easily discover FR901379 acylase-producing microorganisms in soil samples using our novel, convenient screening method, which involves comparing the difference in antibiotic activity between FR901379 and its deacylated product.

Key words—fermentation; natural product; manufacturing; process development**1. はじめに**

微生物は、生態環境の中で生き残る過程で、様々な二次代謝産物（醗酵天然物）を進化させてきた。それらの醗酵天然物の中には、特異な生理活性を有するものが存在し、その生理活性を利用し、医薬品へと応用開発するための研究が古くから進められてきた。そして、今日までには、抗生剤、高脂血症

剤、抗がん剤、免疫抑制剤など、様々な医療領域において、多くの醗酵天然物が医薬品として開発、製品化され、人々の健康な生活のために貢献してきている。

醗酵天然物は、微生物が進化の過程で獲得してきたゲノム遺伝子上の情報に従って生合成されるが、ときに微生物によって、およそ人知の想像を超えた複雑な構造を有する化合物や、化学合成の手法では創造し得ないユニークな構造を有する化合物が生産されていることがある。その複雑な構造を有し多様性に富んだ化合物の持つ特異的な生理活性の可能性は、醗酵天然物を医薬品として開発する魅力の1つである。

^aアステラス製薬(株)生物学研究所, ^bアステラス富山(株)技術センター (〒452-0915 愛知県清須市中河原 156 番地), ^c公益財団法人アステラス病態代謝研究会 (〒103-8411 東京都中央区日本橋本町 2-3-11)

*e-mail: koji.nagao@jp.astellas.com

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S55 で発表したものを中心に記述したものである。

また、遺伝子解析技術が進んだ今日の知見では、これまでに分離され、培養が可能な微生物は、世の中に生存する微生物の1%にも満たないと言われている。さらに、分離培養された微生物のうち、二次代謝産物を生産しないとみなされているものの中にも、二次代謝の生合成遺伝子は有しているが休止状態にあり、未知の醗酵天然物を産生する能力を潜在的に有するものが多く存在することが分かってきている。これらの知見は、創薬ターゲットとしての醗酵天然物の領域には、まだまだ魅力的な未開発の宝の山が存在しており、その中から、将来の人々の健康に貢献できる医薬品につながる有用な醗酵天然物が発見できることのへ期待を示すものである。

しかし一方で、醗酵天然物からの創薬研究においては、自然界から分離した野生株では、ターゲット化合物の生産性が低い上に培養が不安定で再現性が悪く、かつ、夾雑物を多く含む醗酵液の中から、ターゲットとなる化合物を分離し、特定することの困難さなど、創薬研究推進の難しさの課題がある。実際に、これまで醗酵天然物を創薬ターゲットとしてきた製薬企業の多くが、その課題の難しさが故であろうか、近年醗酵天然物からの創薬研究を縮小、あるいは撤退している現実があるが、その課題の山をいかに越え、新規物質発見の頻度を上げ、費用対効果の面でも採算性を取って推進するかが重要なポイントとなる。

また、醗酵天然物の医薬品開発においては、創薬研究でターゲット化合物を宝の山から発掘し、毒性試験や臨床評価を重ね、医薬品としての有効性と安全性を証明することもさることながら、その発掘した原石を、商業生産レベルで供給するための製造技術を開発することもまた、重要かつ必須な要件である。その研究課題は、菌株育種や培養条件の開発による醗酵生産性の向上や、医薬品として高い品質を保証するための精製技術や分析技術、商業生産に対応するためのスケールアップ技術、また、製造過程に発生する廃棄物を低減し、環境負荷を最小限とするための技術など多岐に渡り、それら個々の技術を開発、最適化したものを統合し、医薬品として世の中に安定して供給することが可能な製造プロセスとして完成させることが求められる。

2. タクロリムスの製造技術：構造類縁体低減変異株の取得

タクロリムスは、茨城県つくば市の土壌から分離された *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993 の培養液中に発見されたマクロライド骨格を持つ化合物 (Fig. 1) で、強力な免疫抑制作用を有し、臓器移植後の拒絶反応の抑制を始め、リュウマチ、乾癬などの自己免疫疾患やアトピー性皮膚炎など、その特徴的な生理活性作用から、幅広い適応症に対する医薬品として世界の人々の健康に貢献している。¹⁻³⁾

タクロリムスは、Fig. 2の推定生合成経路に示すように、ポリケチド合成系として一般的に知られる生合成遺伝子により、その基本骨格が生合成されている。また、シキミ酸やピペコリン酸など、一次代謝に関連する分子が材料として分子骨格に取り込まれ、さらに、取り込まれた後に、生合成に関連する合成酵素により修飾を受けて、生合成されると推測されている。そして、生合成の過程においては、酵素の基質特異性が低いことに起因する材料分子と類似構造を有する化合物の取り込みや、生合成関連酵素による修飾反応の多様性、あるいは、化学的な分解等の副反応のため、目的化合物と構造が類似した複数の構造類縁体が副生成し、その製造技術を開発する上での品質上の課題となった。生産菌は、培養液中にいくつかの構造類縁体を副生成したが、その中でも、推定生合成経路に示したピペコリン酸の部分がプロリンに置き換わった構造類縁体である

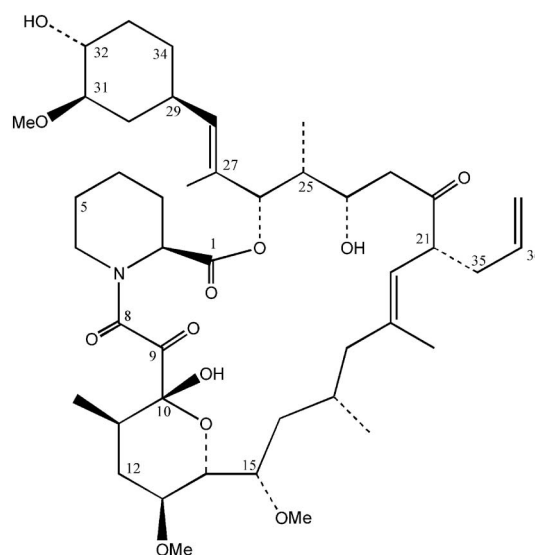


Fig. 1. Structure of Tacrolimus

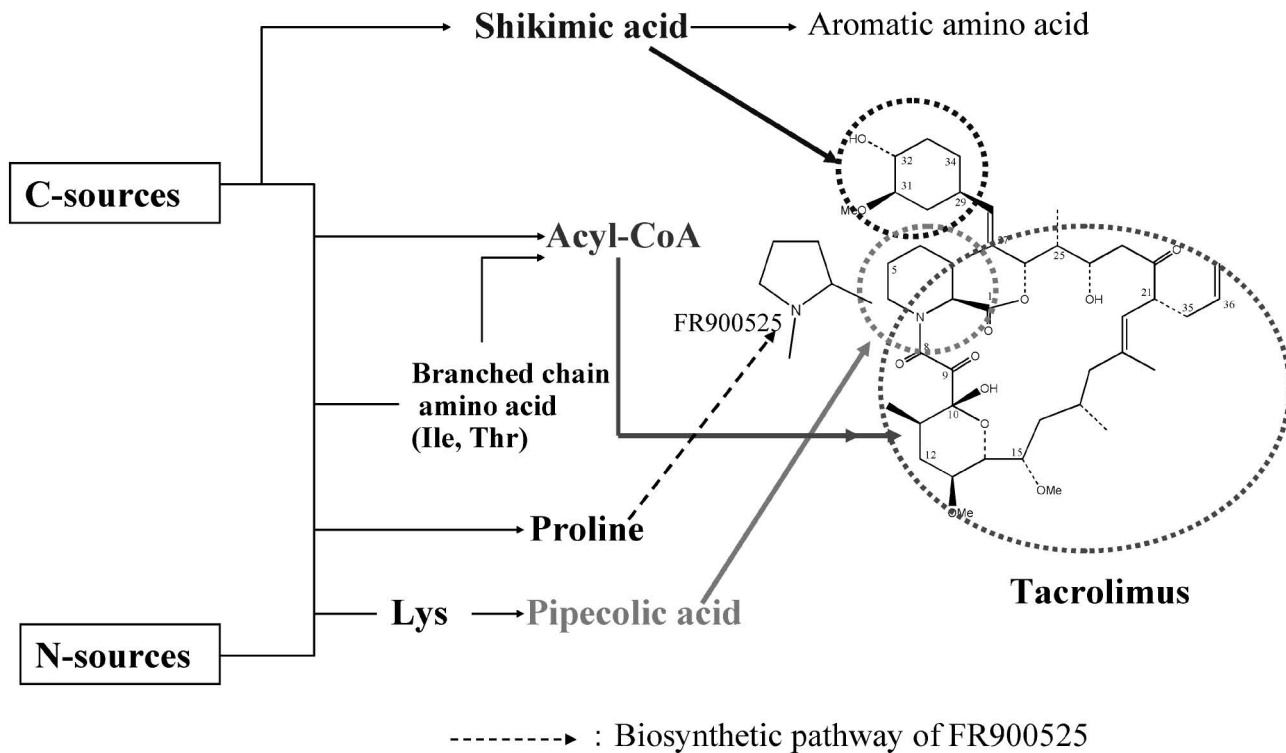


Fig. 2. Speculative Biosynthetic Pathway of Tacrolimus and FR900525

Table 1. Effect of Additives on FR900525 By-production

Additive	FR900525 (%)*
none	100
L-Lysine	16
Pipecolic acid	23
AEC**	300

The productivity of non added condition was 100%. * relative value to none. ** 2-(S-aminoethyl) L-Cysteine (L-Lysine analog).

FR900525 が多く生成し、この類縁体はダウンストリームの精製工程での除去効果も低かったことから、特に品質上の課題となった。

FR900525 の生成について調査したところ、培養液中に、ピペコリン酸、あるいは、ピペコリン酸合成の前駆体であるリジンを添加することにより、その生成量が減少する一方で、リジンのアナログである S-aminoethyl L-cysteine (AEC) 添加により顕著な増加が認められた (Table 1)。また、複数の培養例で、培養液中のピペコリン酸濃度と FR900525 の生成量との間に負の相関が認められたことから (Fig. 3)、培養液中のピペコリン酸が不足した場合に、生産菌が誤ってプロリンを分子骨格に取り込んで FR900525 が副生成されるものと推測された。

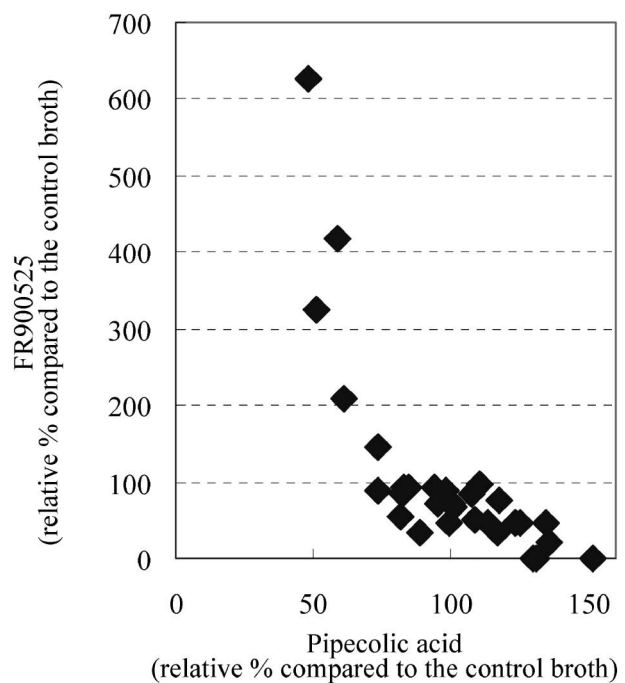


Fig. 3. Effect of Pipecolic Acid Concentration in Fermentation Broth on By-production of FR900525

そこで、生産菌のピペコリン酸の生成量を増加させれば、FR900525 の生成量を低減できると考え、AEC 耐性を指標に、ピペコリン酸の前駆体である

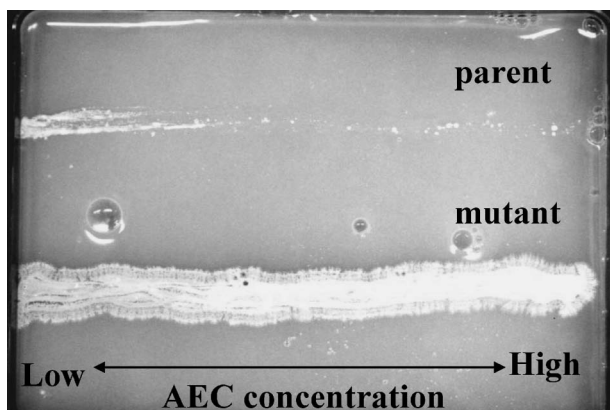


Fig. 4. Comparison of Growth on the AEC Concentration Gradient Agar Plate in Parent Strain and AEC Resistant Mutant

Table 2. Comparison of Productivity of Tacrolimus, FR900525 and Pipecolic Acid in Parent Strain and AEC Resistant Mutant

Strain	Productivity (%) [*]		
	FK506	FR900525	Pipecolic acid
Parent	100	100	100
AEC Resistant Mutant	111	11	315

The productivity of parent strain was 100%. ^{*} relative value to parental strain.

リジンの生合成に関してフィードバック阻害が解除され、リジン生成量が増加した変異株の取得を試みた。その結果、取得した変異株では、目的通りにリジン生合成のフィードバックが解除され、培養液中のピペコリン酸の濃度が約3倍に増加し、FR900525の副生成量が1/10に減少した。同時に、FR900525の生成量が減少した分だけ、タクロリムスに置き換わって生産量が増加し、品質の改善とともに、生産性も向上した (Fig. 4 and Table 2)。

3. ミカファンギン中間体の製造技術：FR901379 醜酵技術の開発

ミカファンギンは、真菌の細胞壁成分の1つである1,3-β-グルカン合成酵素を強く阻害することにより殺菌的な抗真菌活性を示す深在性真菌症の治療薬である。ミカファンギンは、いわき市の土壌から分離された *Coleophoma empetri* F-11899 の培養液中より発見された環状リポペプチド構造のFR901379を原体として、そのアシル側鎖 (パルミトイル基) をアシラーゼで脱離した後、新たに合成した側鎖を導入することで合成される (Fig. 5)。^{4,5)}

本剤の製造技術の開発に際しては、いくつかの技術課題があったが、その中の原体であるFR901379醜酵においては、培養中に大量の酸素を要求し、酸素供給が不足すると培養液の粘性が向上し、生産性が低下するという問題があった。

種々の培地成分や培養条件を調べたところ、培養液の粘性低下には、無機窒素源の利用に効果があることを見出した。また、培養液中の炭素源濃度とFR901379の生成速度には、負の相関があることが分かった。すなわち、培養液中の炭素源濃度が高い状態では、生産菌の一次代謝が旺盛となり、呼吸活性が高く、FR901379の生成量は低かったが、培養液中の炭素源消費が進み、濃度が低下すると、今度は二次代謝が活性化し、FR901379の生成速度も速くなった (Fig. 6)。そこで、培養液の低粘度化とFR901379生産性の向上を目的に培養条件を検討し、培養途中に何回かに分割して炭素源を添加するフェドバッチ法を見出し、粘度低減に効果のある無機窒素源の希アンモニア水をpH制御を兼ねて添加する方法を確立した。このフェドバッチ培養法では、想定通り、炭素源添加直後の一時的な一次代謝の活発化フェーズと、炭素源濃度の低下後、二次代謝が活性化し、FR901379が生成されるフェーズを交互に繰り返す。最終的には、バッチ培養法の約2倍の生産性を達成することができた。同時に無機窒素源の添加効果により、課題であった培養液の粘度もかなり改善することができた (Fig. 7)。

しかし、フェドバッチ培養をスケールアップした場合、培養ロットによって培養液の粘度が高くなり、低生産性の醜酵になるというケースがときおり発生し、問題となった。そこで、さらなる低粘度化・安定化を目標に挙げて検討し、高粘度流体に対して優れた混合特性を有するフルゾーン翼 (神鋼環境ソリューション社製) を導入した。フルゾーン翼は、培養液量の変化に対して混合効率の変化が少ないことから、途中で培地成分を添加するフェドバッチ培養に対しても、適した攪拌翼と言える (Fig. 8)。フルゾーン翼を導入した結果、槽内の完全混合時間が短縮され、栄養分・酸素が短時間で十分に供給されることにより菌糸が伸張せず、菌体の生育形態がペレット化して粘度が低く推移し、スケールアップした培養条件でも安定した醜酵が可能となった (Figs. 8 and 9)。^{6,7)}

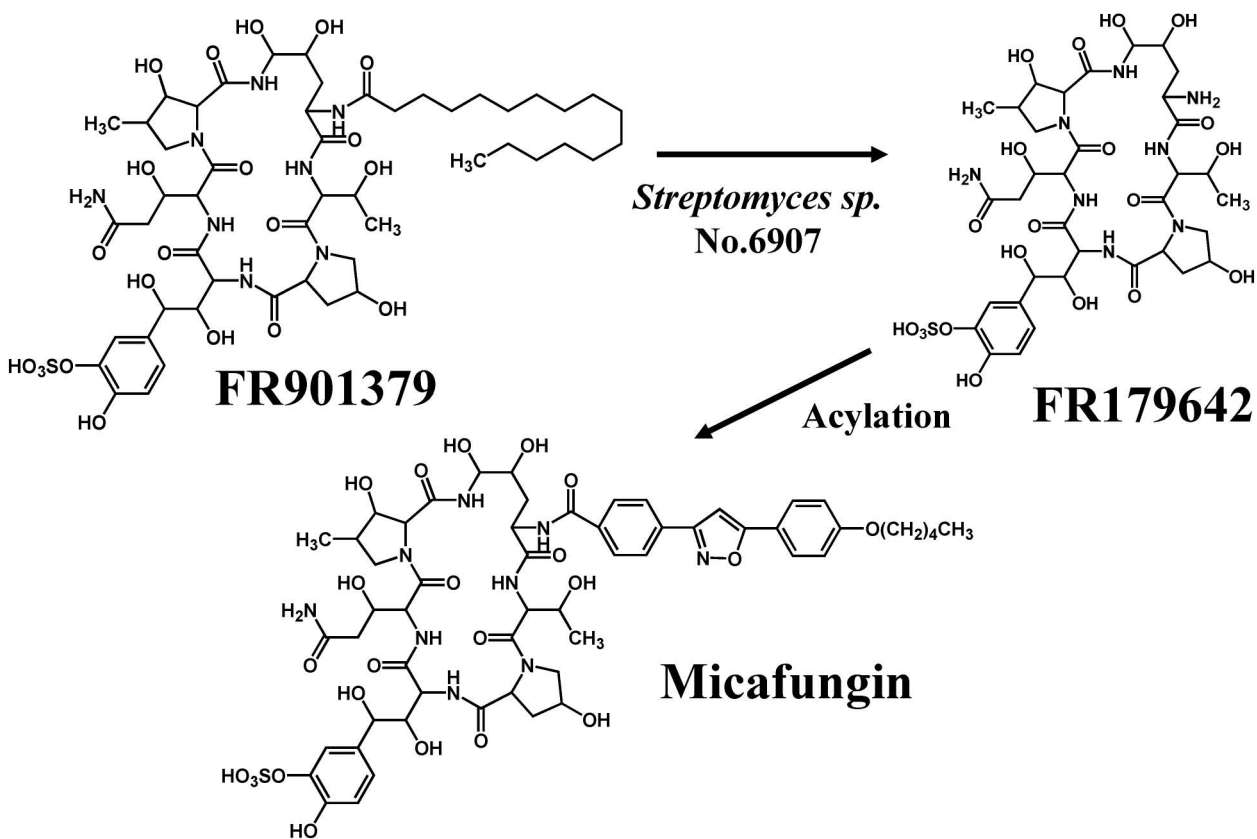


Fig. 5. Synthetic Scheme of Micafungin

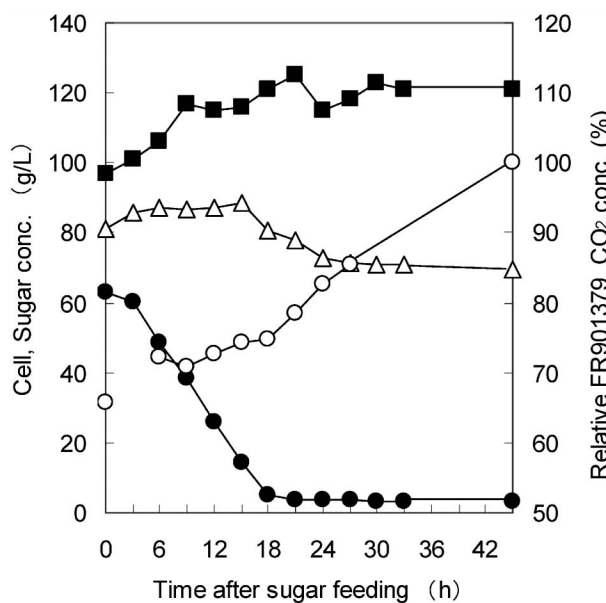


Fig. 6. Time Course of Intermittent Sugar Feeding Culture after Sugar Feeding

The FR901379 concentration at 45 h was 100% and CO₂ content of outlet gas was 100%. Closed squares, cell; closed circles, sugar; open circles, FR901379; open triangles, CO₂.

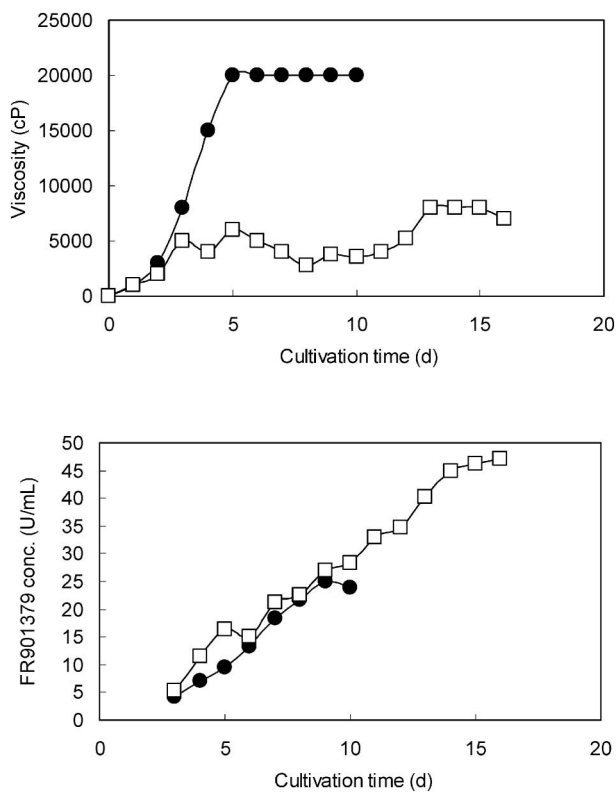


Fig. 7. Comparison of FR901379 Production and Viscosity in Batch (closed circles) and Fed-batch (open squares) Fermentation

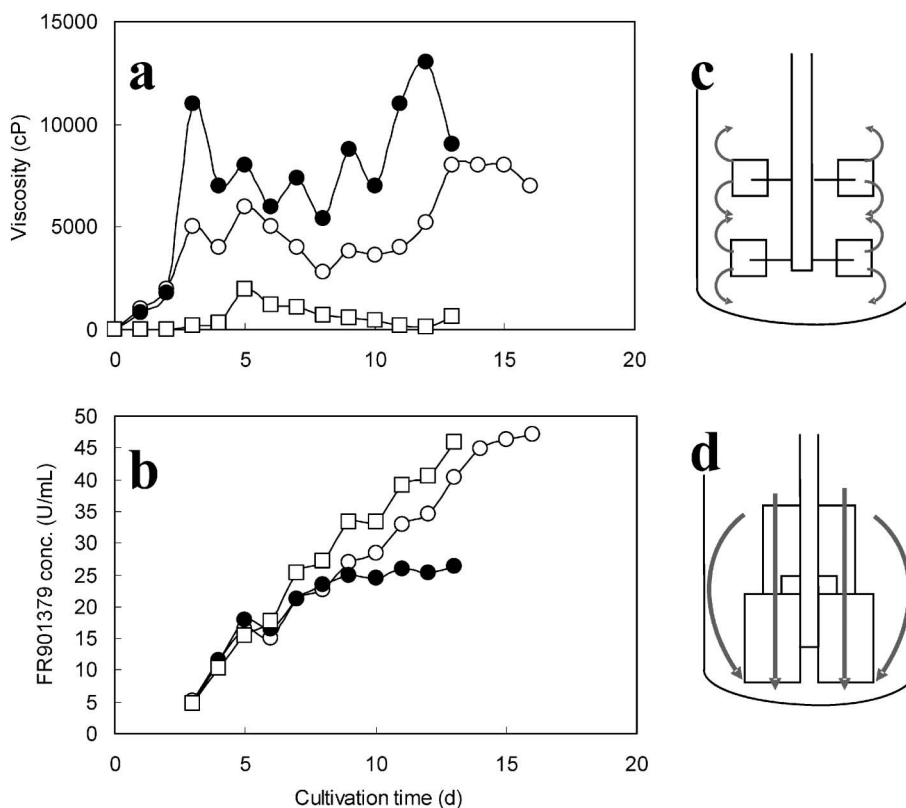


Fig. 8. Comparison of Viscosity (a) and FR901379 Production (b) in the Turbine Impeller (c) and the FULLZONE™ Impeller (d) in a 4 m³ Scale Tank

Open circles, turbine impeller lot 1; closed circles, turbine impeller lot 2; open squares, FULLZONE™ impeller.

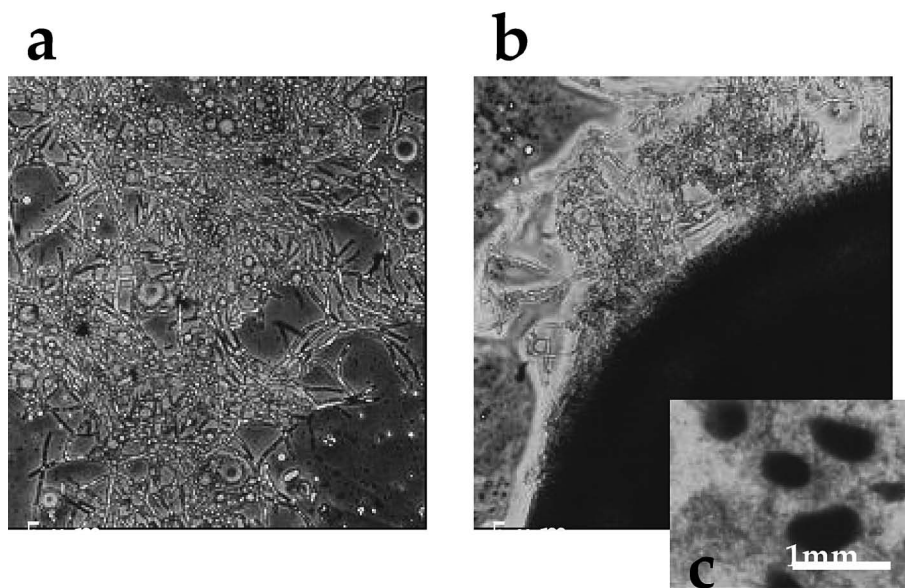


Fig. 9. Photographs of Cells at End of Fermentation

Filamentous and pulpy cells were observed in the case of turbine impeller (a), while many pellets of cells were observed in the case of FULLZONE™ impeller (b and c).

4. ミカファンギン中間体の製造技術：FR901379 アシラーゼのスクリーニング

醜酵天然物である原体の FR901379 は、抗真菌活

性と同時に溶血活性も有していたため、原体をそのまま医薬品として開発することが不可能であった。そこで、パルミトイル側鎖の部分置換する誘導体

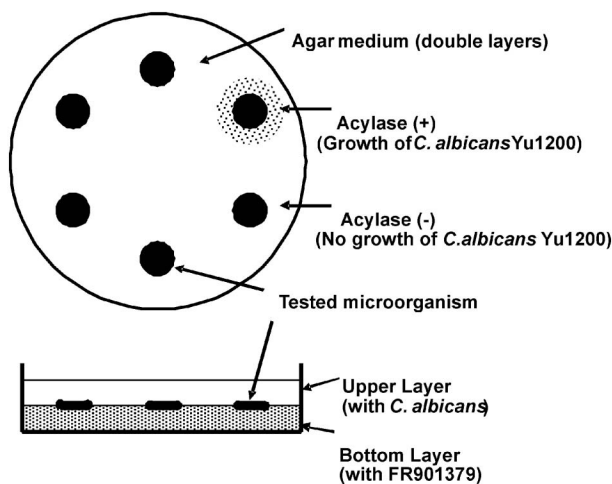


Fig. 10. Pre-screening Method of FR901379 Acylase

のスクリーニング検討を実施し、抗真菌活性を残したまま、安全性にも優れたミカファンギンを見出した。^{8,9)}

誘導体の合成には、FR901379のPALミトイル側鎖の脱離反応を触媒するFR901379アシラーゼが必要となる。そこで、FR9001379アシラーゼを生産する生産菌のスクリーニングを効率的かつ簡便に実施するため、FR901379とPALミトイル基脱離後の生成物であるFR179642の*Candida albicans*に対する抗菌活性の違いを利用したプレート上でのスクリーニング法を確立した (Fig. 10)。

まず、シャーレ中のFR901379の入った寒天培地を用意し、その上にスクリーニングに供する放線菌やカビなどを培養した。そして、試供菌が生えたところで今度は、*Candida albicans*の入った寒天培地を重層した。スクリーニングに供した菌がFR901379アシラーゼを生産すれば、培地に埋め込まれたFR901379の側鎖が切断されることにより、抗菌活性の低いFR179642に変換されるため、その周辺に*Candida albicans*の生育ゾーンが観察される。この方法によって、約3500の放線菌と約500種のカビについて一次評価を行った。そして、*Candida albicans*の生育ゾーンをもたらした候補菌株について、二次スクリーニングとして、その培養液を実際にFR901379に作用させて、FR179642の生成をHPLCで確認した。

その結果、3種の放線菌と2種のカビをFR901379アシラーゼの生産菌として選別することができた。

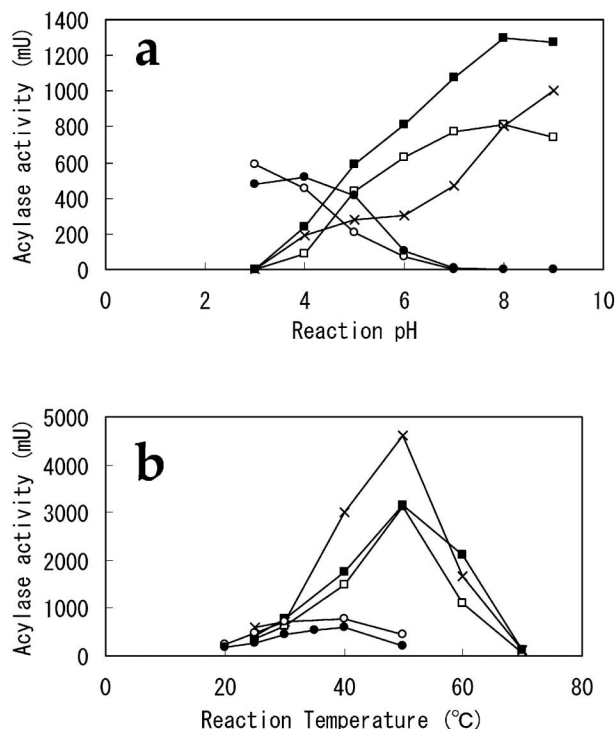


Fig. 11. Characterization of FR901379 Acylases

Optimum pH at 30°C (a) and optimum temperature at pH 4 (b). Open squares, *Streptomyces* strain A; closed squares, *Streptomyces* strain B; cross mark, *Streptomyces* strain C; open circles, Fungi strain A; closed circles, Fungi strain B.

放線菌とカビが生産するアシラーゼでは、それぞれ指摘な温度、pHなど異なったプロファイルを示したが (Fig. 11)、より高活性でありかつ、酵素が菌体画分に局在し、培養液からの酵素の回収が容易な*Streptomyces* sp. No. 6907を選択した。ミカファンギンの工業的な生産においては、ここでスクリーニングされた酵素生産菌が使用されている。¹⁰⁾

5. おわりに

上述の通り、醗酵天然物の製造技術の開発では、生産菌におけるターゲット化合物の生合成の経路をよく理解し、解析可能な一次代謝に関する情報や、培養中の外的な因子に対する応答の観察を通して、ターゲット化合物の生産性や培養のスケールアップ、構造類縁体の副生成などの課題に影響するキープクターを見出し、それらを制御することによって、微生物の持つ潜在能力を最大限に引き出すことのできる製造プロセスを構築することが求められる。

医薬品の開発は、常にグローバルの激しい競争に曝されており、激しい競争に勝ち抜き、いち早く医

薬品を市場に送り出すためには、各国の厳しい規制要件にも対応しながら、スピード感のある技術開発の達成が不可欠である。

昨今、データベースや解析ソフトと連動したオミクス研究や、ハイスループットの評価を可能とする自動化技術、機器分析技術など、目覚ましい技術革新が進展してきている。また、酵素を用いた合成技術など、醗酵天然物を母核化合物とした誘導体化合物の医薬品としての開発への展開もその可能性も広げつつある。醗酵天然物の医薬品の開発を将来的にも発展させていくためには、これらの革新的な技術と、これまでに培ってきた既存の技術力を融合させ、創薬研究の分野、製造技術研究の分野ともに、より効率的に進めていくことが、重要なポイントとなってくる。

謝辞 本研究は、タクロリムス及び、ミカファンギンを医薬品として開発する中で生物工学研究所の担当メンバーが実施した研究結果の一部をまとめたものです。今回の発表に当たり、これらのプロジェクトに携わってきた生物工学研究所のメンバーはもちろんのこと、創薬研究に始まり、医薬品としての開発や工場での生産まで、すべての開発業務の過程に関係してきたアステラス社員の皆様に心より感謝を申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kino T., Hatanaka H., Hashimoto M., Nishiyama M., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H., *J. Antibiot.*, **40**, 1249–1255 (1987).
- 2) Kino T., Hatanaka H., Miyata S., Inamura N., Nishiyama M., Yajima T., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., Ochiai T., *J. Antibiot.*, **40**, 1256–1265 (1987).
- 3) Tanaka H., Nakahara K., Hatanaka H., Inamura N., Kuroda A., *Yakugaku Zasshi*, **117**, 542–554 (1997).
- 4) Iwamoto T., Fujie A., Sakamoto K., Tsurumi Y., Shigematsu N., Yamashita M., Hashimoto S., Okuhara M., Kohsaka M., *J. Antibiot.*, **47**, 1084–1091 (1994).
- 5) Yamashita M., Matsuda M., Oohata N., Kanda M., Higaki T., *Seibutsu-kogaku Kaishi*, **83**, 123–131 (2005).
- 6) Kanda M., Tsuboi M., Sakamoto K., Shimizu S., Yamashita M., Honda H., *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 530–534 (2009).
- 7) Kanda M., Yamamoto E., Hayashi A., Yabutani T., Yamashita M., Honda H., *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 138–144 (2010).
- 8) Ikeda F., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **122**, 339–344 (2003).
- 9) Tawara S., Ikeda F., Maki K., Morishita Y., Otomo K., Teratani N., Goto T., Tomishima M., Ohki H., Yamada A., Kawabata K., Takasugi H., Sakane K., Tanaka H., Matsumoto F., Kuwahara S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 57–62 (2000).
- 10) Ueda S., Sakamoto M., Oohata N., Tsuboi M., Yamashita M., Hino M., Yamada M., Hashimoto S., *J. Antibiot.*, **63**, 65–70 (2009).