

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 藪谷 哲也

論 文 題 目

シクロスポリン類縁体 FR901459 の放線菌 *Lentzea* sp. 78  
87 による水酸化反応の効率化

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	中野 秀雄
委員	名古屋大学教授	吉村 徹
委員	名古屋大学教授	北島 健
委員	名古屋大学准教授	岩崎 雄吾
委員	名古屋大学講師	兒島 孝明

## 論文審査の結果の要旨

藪谷哲也は、抗C型肝炎ウイルス剤の候補化合物の重要な中間体を製造するための菌体反応の効率化に関する研究に取り組み、放線菌によるシクロスポリン類縁体の水酸化反応のパイロットスケールへのスケールアップ、基質分散剤としてのキナコの利用による反応に用いる基質濃度の向上、菌株育種によるさらなる単位容量あたりの収量向上を行った。以下にその要旨を記載する。

C型肝炎ウイルス(HCV)は輸血など血液を介して感染し、感染者の約20%~30%が肝硬変および肝細胞癌を発症する危険を伴う。またHCV感染者は世界中で約1億人と推定される。近年HCVに対しシクロスポリンA(CyA)類縁体を用いた薬剤(アリスポリビル、NIM811、SCY-635)の開発が臨床段階にある。これらCyA類縁体は宿主細胞由来のシクロフィリンを標的とした新規作用機作を有するため抗HCV剤として有望視されており、他にも様々なCyA類縁体が抗HCV剤の候補として研究段階にある。

放線菌 *Lentzea* sp. 7887 の培養液を用いた反応により得られた、CyA類縁体FR901459の9位水酸化体AS1837812(変換率28%)は、新規抗HCV剤の候補化合物の重要中間体になることが報告されている。AS1837812を用いた抗HCV剤の開発のためにはkg単位のAS1837812生成が必要となるが、報告された*Lentzea* sp. 7887を用いた反応を実用化するためには以下の3つの課題があった。(i)菌体反応のスケールアップを行うこと。これまでFR901459の9位水酸化反応はラボスケールでしか行われておらず、培養および反応の最適化を行いパイロットスケールでの菌体反応が必要であった。(ii)基質濃度が0.410 mMであり高濃度化が必要であること。本反応の基質FR901459は疎水性であるため、水系の菌体反応への基質の効率的な供給の制限が推測される。(iii)*Lentzea* sp. 7887の菌体反応に副反応が存在し、このためAS1837812の変換率が抑制されていること。水酸化体はAS1837812(9位水酸化体)以外に6種類が報告しており、そのうちcompound 1(1位水酸化体)、compound 6(1,9位水酸化体)が副生産物の多くを占める。上に挙げた(ii)と(iii)の課題は本反応の単位容量あたりの収量を制限しており、AS1837812の効率的な生産を目指す際に問題となる。

本研究の第一章では、*Lentzea* sp. 7887菌体反応のパイロットスケール(1m<sup>3</sup>)へのスケールアップについて記述した。まず試験管を用いた*Lentzea* sp. 7887菌体反応系を構築し反応条件の最適化を行った。また最適化検討を通じて種々の反応条件下において生成されたAS1837812(9位水酸化体)とcompound 1(1位水酸化体)の濃度の間に高い相関性が見いだされたため、1位と9位の水酸化に関する酵素は同一である可能性が示唆された。続いて試験管から3L反応槽へのスケールアップを行い同等の変換率が得られることを確認した。

菌体培養の培地条件については既知の条件から変更せず、100 mL フラスコから 30

L 培養槽、1 m<sup>3</sup> 培養槽で培養のスケールアップを行った。こののち菌体反応の 1 m<sup>3</sup> 反応槽へのスケールアップを行ったところ AS1837812 の変換率は 25.9%であったが、通気条件の最適化を行うことで最終的に変換率 34.6%を達成した。このときの compound 1 および compound 6 の変換率はそれぞれ 10.7%と 12.6%であった。この検討で生成した AS1837812 はアセトンにより抽出され、クロマトグラフィー工程を経て精製された後、抗 HCV 薬の候補化合物合成のために供与された。

第二章ではキナコの使用により高基質濃度での反応が可能であることを記述した。第一章においては高濃度基質の利用を目指し、1.12 mM FR901459 での菌体反応を 3 L 反応槽を用いて行った結果を述べたが、基本条件 0.615 mM では 28 時間で 33.8% の AS1837812 変換率が得られたのに対し 1.12 mM では 32 時間でも 22.1%にとどまった。これは FR901459 が疎水性であるため、水系の反応液中への分散が効率よく行われないことが原因と考えられた。このため 0.615 mM を越える FR901459 を反応液中に効率的に分散しうる物質の探索を目的として、試験管での菌体反応を用いたスクリーニングを行った。その結果、キナコを用いた条件で最も高い変換率が得られたため、3 L 反応槽へのスケールアップを行った。1.23、1.85 および 2.46 mM の FR901459 および適量のキナコを用いた 48 時間の菌体反応後、1.23 および 1.85 mM の基質濃度条件ではそれぞれ 37.2% (AS1837812 濃度 : 0.458 mM) および 33.5% (AS1837812 濃度 : 0.620 mM) の変換率を示した。一方、2.46 mM FR901459 濃度条件では、最高変換率 11.3% (AS1837812 濃度 : 0.278 mM、24 時間の時点)と低下しており、菌体内の変換酵素の基質阻害によるものと推測した。

菌体反応に与えるキナコの効果がどの成分に由来するのか調べるために、キナコ上清を 1.23 mM FR901459 条件の菌体反応に使用した。その結果、キナコ上清だけでも変換率の低下を招くことなく 1.23 mM の FR901459 を菌体反応することができた。このことからキナコの効果はキナコ上清に存在するダイズタンパク質に由来すると考えた。また顕微鏡を用いて FR901459 とキナコ上清との混合物を FR901459 と水との混合物と比較したところ、FR901459 とキナコ上清との混合物は、多数のコロイド粒子と少数の FR901459 凝集体を含んでいた。このためこれらコロイド粒子が FR901459 およびダイズタンパク質からなると考えた。またこの粒子はそのサイズが小さいことで体積当たりの表面積を拡大し、疎水性である FR901459 の水相反応液への分散を改善すると考えられ、菌体反応におけるキナコは基質分散剤として機能していると推測した。

キナコおよび *Lentzea* sp. 7887 培養液を用いた 1.23 mM FR901459 条件のパイロットスケール(1 m<sup>3</sup>) 菌体反応を行なったところ、AS1837812 の濃度および変換率はそれぞれ 0.424 mM および 34.5%であり、反応液中の AS1837812 は 419 g に相当した。Compound 1 および compound 6 の変換率はそれぞれ 11.6%と 12.4%であった。

第三章では *Lentzea* sp. 7887 の菌株育種と新菌株 M-1 の取得について述べた。第二章では基質分散剤(キナコ)を用いても、2.46 mM FR901459 条件では変換率が著しく低下したことを記述した。これについて水酸化酵素であるシトクロム P450 では基質阻害が報告されており、FR901459 水酸化に関与する酵素も同様な基質阻害が起きていると予想した。また AS1837812 変換率についてはここまでの検討を通じて 40%未満の状態が続いており、その一因として compound 1、compound 6 といった副産物の生成を想定した。これらを改善するため *Lentzea* sp. 7887 のプロトプラストに UV 変異を行い、変異株をスクリーニングした結果 M-1 が取得された。M-1 株は FR901459 0.615 mM(キナコなし)、1.23 mM(キナコあり)、2.04 mM(キナコあり)の条件で、それぞれ野生株に対し、1.13 倍、1.19 倍、1.54 倍の変換率を示しより高い基質濃度の菌体反応において有効な株であることを示した。また水酸化経路の検討により、M-1 は野生株に比べ AS1837812/compound 1 比率が高く、また一水酸化体(AS1837812 または compound 1)から二水酸化体(compound 6)への変換速度が低いことが示された。このことから M-1 は compound 1 や compound 6 といった副産物に対し AS1837812 の生成比率が高い性質があることが分かった。M-1 によるキナコを用いた 1.23 mM FR901459 のパイロットスケール(1 m<sup>3</sup>) 菌体反応を行ったところ、AS1837812 の濃度および変換率はそれぞれ 0.491 mM および 39.9%であり、野生株よりも 1.16 倍高かった。

3 L 反応槽においてキナコを使用した 3.69 mM までの FR901459 を M-1 による菌体反応に使用したところすべての条件において約 40%の変換率が得られた。M-1 を取得したことにより 3.69 mM FR901459 の菌体反応において AS1837812 の単位容量あたりの収量は 1.47 mM となり、これは野生株(0.589 mM)の 2.5 倍であった。第一章で示した検討以前の単位容量あたりの収量(0.115 mM)と比較すると 13 倍の向上を得たことになる。以上の結果は冒頭に挙げた FR901459 水酸化反応のスケールアップにおける 3 つの課題を解決し、本プロセスの実用化への道筋を開くものである。

本研究によって得られた成果は、抗HCV剤候補化合物の重要中間体の供給を容易にし抗HCV剤開発に貢献するのみならず、疎水性基質を用いる菌体反応の工業化の発展に寄与するところが大きい。よって本委員会は本論文が博士(農学)の学位論文として十分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。

## 試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	藪谷 哲也
試験担当者	主査 中野 秀雄 吉村 徹 北島 健 岩崎 雄吾 児島 孝明			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年7月31日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				