

シクロスボリン類縁体 FR901459 の  
放線菌 *Lentzea* sp. 7887 による  
水酸化反応の効率化

藪谷哲也

2017 年 9 月

## 目次

目次	- 1 -
略語	- 2 -
序章	- 3 -
第一節 抗 C 型肝炎ウイルス剤	- 4 -
第二節 シクロスボリン A 類縁体による抗 HCV 剤の開発	- 7 -
第三節 <i>Lentzea</i> sp. 7887 による FR901459 の水酸化反応	- 17 -
第四節 菌体反応	- 20 -
第五節 研究の目的	- 25 -
第一章 <i>Lentzea</i> sp. 7887 菌体による FR901459 水酸化反応の最適化と バイロットスケール反応	- 26 -
第一節 序	- 27 -
第二節 材料および方法	- 28 -
第三節 結果	- 29 -
第四節 考察	- 32 -
第五節 図表	- 33 -
第二章 FR901459 の <i>Lentzea</i> sp. 7887 菌体を用いた高濃度水酸化反応に おける新規基質分散剤としてのキナコの利用	- 46 -
第一節 序	- 47 -
第二節 材料および方法	- 48 -
第三節 結果	- 50 -
第四節 考察	- 52 -
第五節 図表	- 56 -
第三章 <i>Lentzea</i> sp. 7887 の育種による FR901459 水酸化反応の効率化	- 67 -
第一節 序	- 68 -
第二節 材料および方法	- 69 -
第三節 結果	- 71 -
第四節 考察	- 73 -
第五節 図表	- 75 -
第四章 総合考察	- 88 -
第一節 課題と今後の考察	- 89 -
第二節 今後の展開	- 91 -
引用文献	- 92 -
謝辞	- 104 -

## 略語

Abu	L- $\alpha$ -Aminobutyric acid
BA	Bioavailability
Cy	Cyclosporine
DAA	Direct acting antiviral
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FKBP	FK506 binding protein
Fluc	Luciferase gene
HCV	Hepatitis C virus
HPLC	High performance liquid chromatography
IFN	Interferon
IL-2	Interleukin-2
Me-	Methyl-
MeBmt	(4R)-4[(E)-2-butenyl]-4-[N-di-methyl-L-threonine]
MLR	Mixed lymphocyte reaction
N/A	Not applicable
Neo	Neomycin resistance gene
NFAT	Nuclear factor of activated T-cell
NRPS	Nonribosomal peptide synthetase
Nva	Norvaline
ORF	Open reading frame
PEG-IFN	Pegylated interferon
PMV	Packed Mycelium Volume
PPIase	Peptidylprolylisomerase
R	Correlation coefficient
RSD	Relative standard deviation
Sar	Sarcosine
shRNA	Short hairpin RNA
vvm	Volume per volume per minute

# 序章

## 第一節 抗 C 型肝炎ウイルス剤

### 1) C 型肝炎ウイルス

C 型肝炎ウイルス(HCV)は輸血など血液を介して感染し C 型肝炎は肝硬変を経て肝細胞癌に至る。HCV 保有者の約 20%～30%が肝硬変および肝細胞癌を発症する危険を伴い(Alter, 1997)、感染した血液を輸血した日から C 型肝炎と診断されるまで平均 10 年、肝硬変まで平均 21.2 年、肝細胞癌まで平均 29 年との報告がある (Kiyosawa et al, 1990)。また HCV 感染はアルコール中毒患者における肝疾患の原因となっている(Cuthbert, 1990)。

HCV はラビウイルスと類似の直鎖状一本鎖 RNA ウィルスとして特定されている(After et al, 1989)。クローニングされた HCV は構造領域にコアタンパク質、プレマトリクスタンパク質、マトリクスタンパク質、エンベロープタンパク質をコードする。また非構造領域には 7 種の非構造タンパク質(NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)をコードする(Takamizawa et al, 1991; 図序-1)。

HCV 感染者は世界中で約 1 億人と推定されている(Gower et al, 2014)。また、アメリカ合衆国での抗 HCV 剤の支出は 2009 年の 7,800 万ドルから 2015 年には 180 億ドルに増加している(Suda, 2016)。

### 2) 抗 C 型肝炎ウイルス剤

抗 C 型肝炎ウイルス(HCV)剤として当初インターフェロン(IFN)またはペグインターフェロン(PEG-IFN)と核酸アナログであるリバビリンが併用されたが、低い治癒率と IFN 由来の副作用が多いことが問題点であった (Inoue et al, 2003; Zopf et al, 2016)。

2011 年、直接作用型抗ウイルス剤(DAA)のうちプロテアーゼ阻害剤であるボセプレビルとテラプレビルが承認されたが抗ウイルス効果が低くまたウイルスの耐性獲得が早いため、両薬剤は PEG-IFN  $\alpha$  とリバビリンと組み合わせトリプル療法レジメンとしてのみ使用された。

2014 年以来、さらに複数種の DAA が承認され高い治癒率で IFN を含まない抗ウイルス治療が可能となった。現在承認されている DAA は 3 つのグループで構成されている。(i) プロテアーゼ NS3/4A の阻害剤(名称の末尾が -previr)、ボセプレビル、テラプレビル、シメプレビルおよびアスナプレビル。(ii) RNA ポリメラーゼ NS5B の阻害剤(名称の末尾が -buvir)、ソフオスブビル。(iii) レプリコン複合体 NS5A の形成に関与するウイルスタンパク質の阻害剤(名称の末尾が -asvir)、ダクラタスビルおよびレディパスビル (Zopf et al, 2016; Rupp et al, 2014; 図序-1)である。

これら DAA はウイルスの変異による薬剤耐性および毒性の増加に寄与するという問題点を有する(Yang et al, 2015)。このように DAA であっても抗 HCV 剤

へのニーズを完全に満たすことができていないため、新規な作用機序の抗 HCV 剤の開発が要望された。

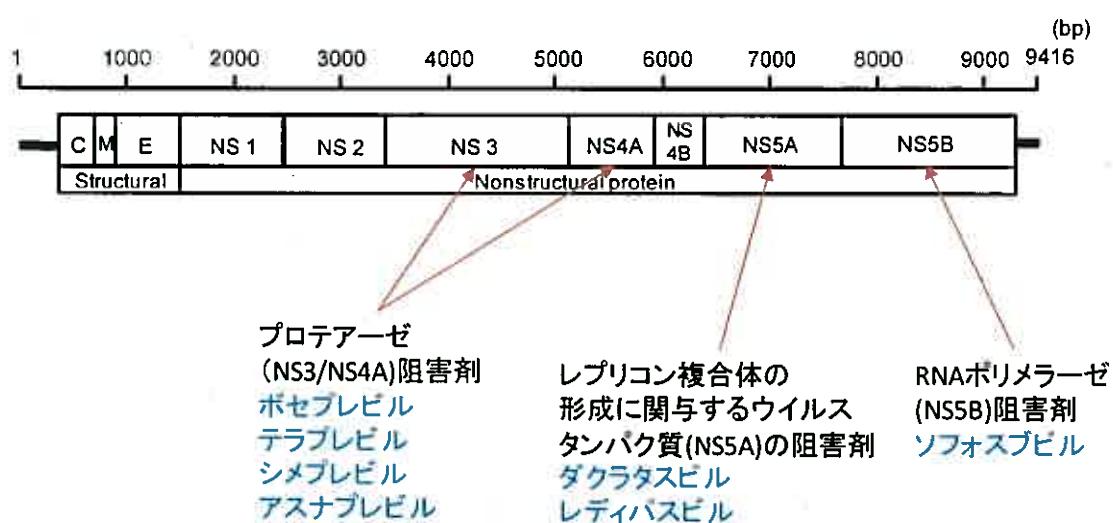


図 序-1 HCV の構造と DAA の作用点

C:コアタンパク質、M:マトリクスタンパク質、E:エンベロープタンパク質  
 NS:非構造タンパク質

(Takamizawa et al, 1991; Zopf et al, 2016; Rupp et al, 2014 の図をもとに改変)

## 第二節 シクロスボリン A 誘導体による抗 HCV 剤の開発

### 1) シクロスボリン A の特徴

シクロスボリン A (CyA)は *Tolypocladium inflatum* などの真菌が二次代謝産物として産生する 11 アミノ酸からなる環状ポリペプチド(構造式  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ 、分子量 1202.6)であり、高い免疫抑制活性を有する(Survase et al, 2011; 図序-2)。1970 年、CyA はサンド社 (1996 年 12 月よりノバルティス社) によって *T. inflatum* から単離され *Neurospora crassa*、*Rhodotorula rubra* ETHZ H1079 への抗真菌活性(Dreyfuss et al, 1976)および混合リンパ球反応 (MLR)による免疫抑制活性が見いだされた(Borel, 1976)。

CyA の構造決定のための X 線解析の際、天然型の CyA は結晶化できなかつたためヨード化した誘導体を用いて結晶化を行った(Petcher et al, 1976)。このとき 1 位アミノ酸の構造が (4R)-4[(E)-2-butenyl]-4-[N-di-methyl-L-threonine] (MeBmt)と決定された。CyA の 1, 3, 4, 6, 9, 10, 11 位アミノ酸は N-メチル化されており、このことが CyA 分子の疎水性に寄与している(Survase, 2011)。CyA は多様な真菌類で産生され各位のアミノ酸の多様性により CyB-I, CyK-Z, Cy26–Cy32 といった類縁化合物が確認されている(von Döhren, 2004; Survase et al, 2011; 表序-1)。また、合成以外にも CyA の有機化学的全合成が確立されている(Wenger, 1983a; Wenger, 1983b; Wenger, 1984)。

CyA の形状は白色個体、融点は 148~151°C(天然)、149~150°C(合成)である(IARC, 1990)。CyA の 25°C の溶解性は水に 0.04 mg/g (0.033 mM)、n-ヘキサンに 1.6 mg/g、メタノール、エタノール、アセトニトリルに >500 mg/g である(Rosenthaler and Keller, 1990)。CyA の水への溶解度は 37°C よりも 5°C の方が 10 倍以上高く、このことは高い温度では分子内水素結合がより強くなることが原因と考えられている(Ismailos et al, 1991)。CyA をより多く水へ溶解させるためシクロデキストリンや界面活性剤の添加が検討された。20%  $\alpha$ -シクロデキストリンの添加は錯体形成により 1.2 mM の CyA 濃度となった。また 20% tween 80 および 20% クレモフォール添加はミセル化によりそれぞれ 1.7 mM、3.5 mM の CyA 濃度となった (Ran et al, 2001)。

細胞内のプロテインホスファターゼの一種であるカルシニューリンは通常の免疫応答の際インターロイキン-2 (IL-2) の転写因子 Nuclear factor of activated T-cell (NFAT) を脱リン酸化し、これにより NFAT は核内に移行し IL-2 産生に寄与する。IL-2 は T 細胞の増殖および活性化、B 細胞の増殖と抗体産生能の亢進を行う(Wiederrecht et al, 1993)。一方、CyA は細胞内に到達するとシクロフィリンと結合し(Handschumacher et al, 1984; Marks, 1996; 図序-3)、CyA-シクロフィリン複合体がカルシニューリンの NFAT 脱リン酸化を阻害する(Fruman et al, 1992)。

CyA の様な疎水性の薬剤は一般的に経口投与時の生物学的利用能(BA)が低い。このような薬剤の BA を上げるための方法としてナノ粒子(Wang et al, 2014)、固体分散剤(Onoue et al, 2010)、シクロデキストリン(Miyake et al, 1999)や吸収促進剤(Sharma et al, 2005)の利用が挙げられる。CyA は経口免疫抑制剤としてサンド社から 1983 年に Sandimmune® (Johnston et al, 1986) の製品名で上市された。Sandimmune® は油脂に CyA を溶解した製剤であり消化管の中でオイルインウォーター型のエマルジョンを形成して吸収される。このためその BA はエマルジョン形成の因子である胆汁などの濃度に依存し不安定であった。1994 年上市された Neoral® (Kovarik et al, 1994) では消化管内での上記の挙動が想定されあらかじめマイクロエマルジョン化された。この剤型のため Neoral® では消化管での吸収が向上され、且つ安定化されている。また 1997 年のノバルティス社の Sandimmune® および Neoral® による収益は 12 億ドルであった (Svarstad et al, 2000)。

## 2) シクロスボリン A の生合成

最初のシクロスボリン A (CyA) 調製のための培養報告(Dreyfuss et al, 1976)では、4.5 m<sup>3</sup> 容培養槽(培地 3,000 L)を用いた 12 日間の培養で 180 mg/L (0.15 mM) の生産性であった。それ以降、CyA 培養について様々な検討がなされた。検討項目は主に生産菌の選別、培地条件(炭素源、窒素源、ミネラル)、培養条件(pH、通気条件)、菌株育種等である(Survase et al, 2011)。

*T. inflatum* から非リボゾーム性ペプチド合成酵素(NRPS)に属するシクロスボリン合成酵素をコードする遺伝子がクローニングされている (Weber et al, 1994)。この NRPS 遺伝子は 45.8 kb のオープンリーディングフレーム(ORF)からなり、コードされるペプチドの分子量は 1,689,243 Da と計算された。この遺伝子は 11 のアミノ酸活性化ドメインを有しそれぞれは類似しておりこのうち 7 つは N-メチル転化酵素活性機能を有していた。また *T. inflatum* の遺伝子破壊実験を行いこの ORF 内の遺伝子が CyA 生合成に関与していることが確認された (Weber and Leitne, 1994)。

CyA の生合成は少なくとも 40 工程の酵素反応からなる。8 位 D-アラニンから開始され 9 位方向へ 1 アミノ酸ずつ伸長されることで一本の 11 アミノ酸のペプチド鎖が合成され、最後に 7 位アラニンと 8 位 D-アラニン間で閉環される (Dittmann et al, 1994)。また粗精製されたシクロスボリン合成酵素を用いることで CyA の *in vitro* 合成が確認され、さらにアミノ酸の添加により環を構成するアミノ酸の置換が起こり CyB、CyC、CyD、CyG および[D-Ser8]CyA が合成されている (Billich and Zocher, 1987)。なお、こうしたアミノ酸添加による類縁体の產生は通常の菌体培養時にも生じており、CyA の母核が遊離のアミノ酸を材料としていること、シクロスボリン合成酵素の基質特異性が低いことが推測で

きる (Traber et al, 1989)。

### 3) シクロスボリン A 誘導体による抗 HCV 剤の開発状況

抗 HCV 活性を有する化合物を探索するために、HCV サブゲノムレプリコン細胞培養系 (Lohmann et al, 1999; 図序-4) を用いて HCV 複製に及ぼす様々な化合物の効果が調査された。その結果シクロスボリン A (CyA)はこれらの細胞における HCV レプリコン RNA レベルおよび HCV タンパク質発現に対する抑制効果を有することが見出された。CyA はまた HCV 陽性血漿を用いて HCV に感染した培養ヒト肝細胞株における HCV ゲノムの増殖を阻害した(Watashi et al, 2003; Naoumov et al, 2014)。

上記を踏まえ臨床試験として慢性 C 型肝炎患者 120 人に IFN 単剤と CyA 併用が行われた。IFN 単剤は INF $\alpha$  2b の標準用量を 24 週間投与し、CyA 併用の場合は INF $\alpha$  2b の標準用量に加え CyA を最初の 4 週間は 200 mg を、続く 20 週間は 100 mg をそれぞれ 1 日 1 回投与した。その結果、IFN と CyA との併用療法は IFN 単独療法より有効であった。この効果は特に高いウイルス量および HCV 遺伝子型 1 を有する患者において顕著に見られた (Inoue et al, 2003)。

HCV 複製に対する CyA の効果についてキメラルシフェラーゼレポータータンパク質を発現する HCV レプリコン系(Tanabe et al, 2004; 図序-4)を用いて分析した。CyA が HCV レプリコン発現の抑制に顕著な効果を示す一方 CyA との作用機序を共有する免疫抑制剤 FK506 (リガンドは FK506 結合タンパク質: FKBP)では効果が見られなかったため CyA のリガンドであるシクロフィリンの関与が示唆された。シクロフィリンは、ペプチジルプロリルイソメラーゼ (PPIase)活性を有し普遍的に存在するタンパク質であり、細胞系において新規タンパク質のフォールディングおよびタンパク質の異性化において重要な役割を果たしている(Flisiak et al, 2007; Naoumov et al, 2014; 図序-5)。シクロフィリン A を標的とした宿主標的抗ウイルス剤の開発はウイルス側を標的とする直接作用型抗ウイルス剤(DAA)と比較してより選択性で安全なアプローチと考えられる(Yang et al, 2015)。Short hairpin RNA (shRNA)発現ベクターによる細胞質シクロフィリン A、B、および C の発現のノックダウンを行ったところ HCV 複製を有意に抑制した。免疫抑制活性は有さないがシクロフィリン結合を示す CyA 類縁体 CyD は HCV 複製を抑制した。このため抗 HCV 活性はその免疫抑制活性と独立していると考えられた(Nakagawa et al, 2005)。

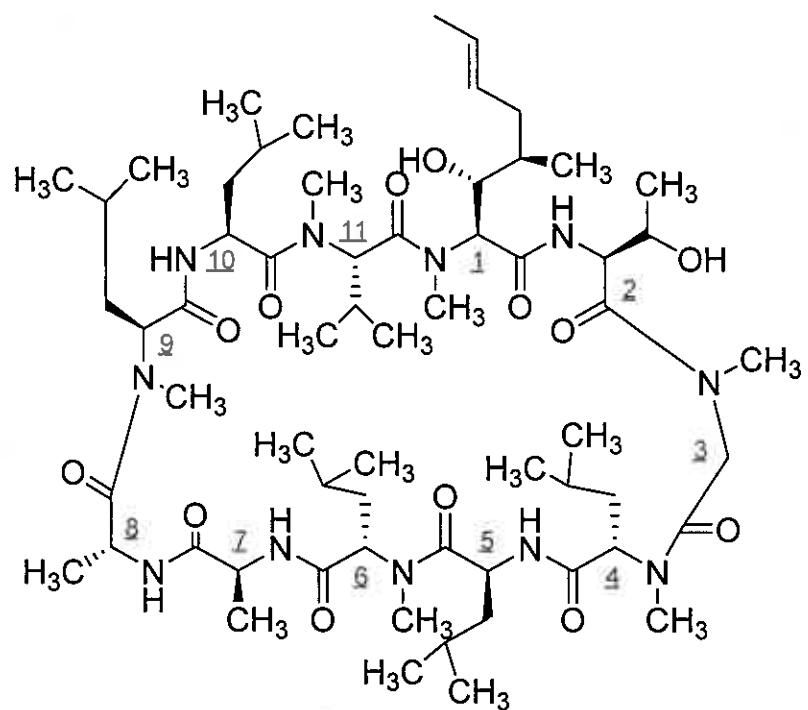
抗 HCV 活性と免疫抑制活性が分離可能であることからより高い抗 HCV 活性とより低い免疫抑制活性を有する分子構造の CyA の類縁体が探索されている(Membreño et al, 2013)。現在アリスピリビル(Debio025)、NIM811(Goto et al, 2006)、SCY- 635(Hopkins et al, 2010; Hopkins et al, 2012) 等が抗 HCV 剤の候補としてそれぞれデビオファーム社、ノバルティス社、サイネクシス社によって臨床開

発中であり、アリスポリビルについては第三相臨床試験段階にある(図 序-6)。アリスポリビルによる Huh5-2 細胞におけるルシフェラーゼアッセイ系での HCV サブゲノムレプリコン複製阻害の 50% 有効濃度は  $0.27 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$  であり一方 CyA は  $2.8 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$  であった(Paeshuyse et al, 2006)。

アリスポリビルは CyA を出発物質とした化学合成が報告されている(Hubler et al, 2000)。この反応は 10 工程を経て 27% の収率でアリスポリビルを合成する。一方 NIM811 は *T. niveum* の培養液から精製される(Rosenwirth et al, 1994)。

一般に CyA 類縁体の調製方法は以下の様に分類できる。また必要に応じてそれぞれの組み合わせも選択される。

- (i) 全合成 (Wenger, 1985)
- (ii) CyA または CyA 類縁体を出発物質とした化学修飾 (Hubler et al, 2000)
- (iii) CyA 類縁体を产生する微生物の培養 (Survase et al, 2011)
- (iv) CyA または CyA 類縁体を产生する微生物の培養中に特性のアミノ酸を添加する方法 (Traber et al, 1989)
- (v) CyA 合成酵素による *in vitro* 反応 (Billich and Zocher, 1987)
- (vi) CyA または CyA 類縁体に対する生物変換反応 (Sasamura et al, 2015)



図序-2 CyA の構造式

下線付きの番号はアミノ酸番号を表す。

表 序-1 CyA 類縁体 (Survase et al, 2011; Sakamoto et al, 1993 をもとに改変)

Compound	Amino acid position										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CyA	C <sub>9</sub>	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CyB	-	Ala	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyB	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyD	-	Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Val
CyF	desoxy-C <sub>9</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyG	-	Nva	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D-MeVal
CyI	-	Val	-	-	-	-	-	-	-	Leu	-
CyK	desoxy-C <sub>9</sub>	Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyL	N-desmethyl-C <sub>9</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyM	-	Nva	-	-	Nva	-	-	-	-	-	-
CyN	-	Nva	-	-	-	-	-	-	-	Leu	-
CyO	MeLeu	Nva	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyP	N-desmethyl-C <sub>9</sub>	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CyQ	-	-	-	Val	-	-	-	-	-	-	-
CyR	-	-	-	-	-	Leu(?)	-	-	-	Leu(?)	-
CyS	-	Thr	-	Val	-	-	-	-	-	-	-
CyT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Leu	-
CyU	-	-	-	-	-	Leu	-	-	-	-	-
CyV	-	-	-	-	-	-	Abu	-	-	-	-
CyW	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	Val
CyX	-	Nva	-	-	-	-	-	-	Leu	-	-
CyY	-	Nva	-	-	-	Leu	-	-	-	-	-
CyZ	Me-Amino octanoic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cy26	-	Nva	-	-	Leu	-	-	-	-	-	-
Cy27	N-desmethyl-C <sub>9</sub>	Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cy28	MeLeu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cy29	-	-	-	MeLu	-	-	-	-	-	-	-
Cy30	MeLeu	Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cy31	-	-	-	ILu	-	-	-	-	-	-	-
Cy32	-	-	Gly	-	-	-	-	-	-	-	-
FR901459	-	Thr	-	-	Leu	-	-	-	-	Leu	-

C<sub>9</sub>: MeBmt

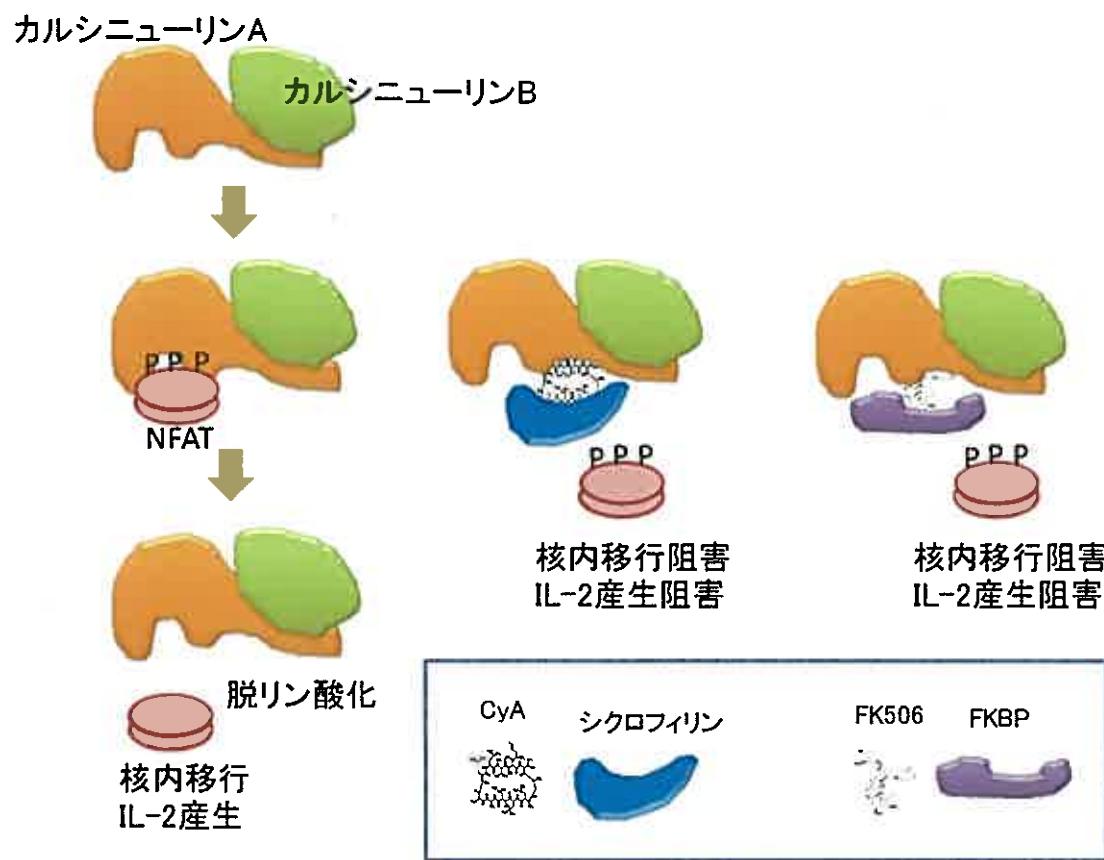
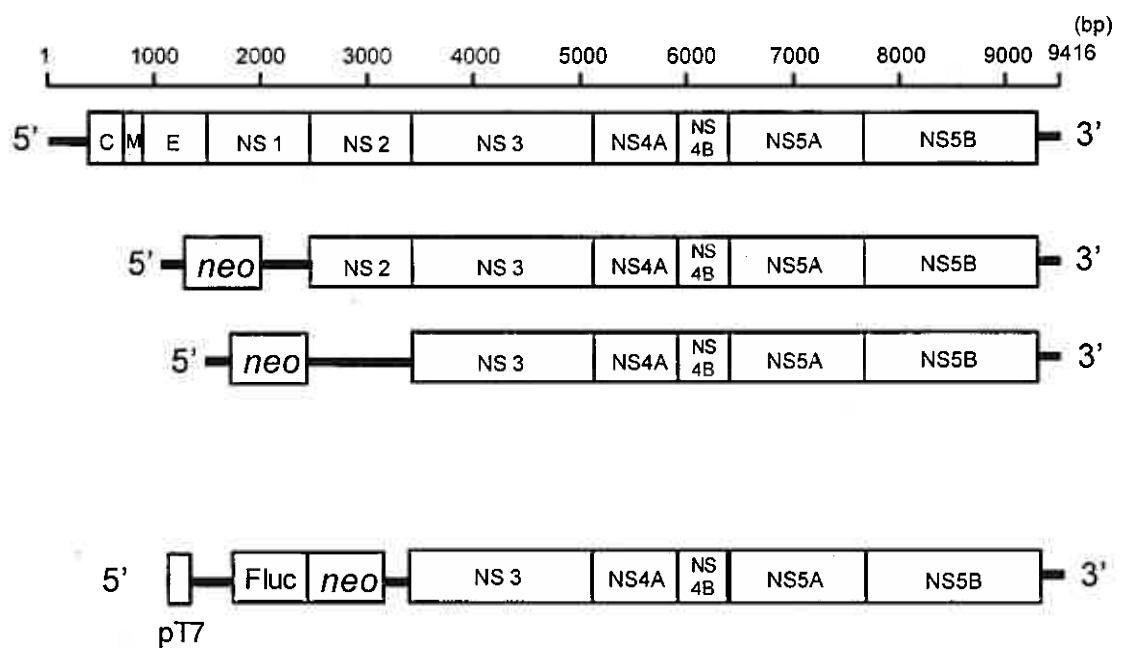


図 序-3 CyA と FK506 の免疫抑制作用機序 (Marks, 1996 の図をもとに改変)



図序-4 HCV サブゲノムの構造

上：HCV サブゲノムレプリコン細胞培養系に用いられる HCV サブゲノムの構造 (Lohmann et al, 1999 の図をもとに改変)。

下：キメラルシフェラーゼレポータータンパク質を発現する HCV サブゲノムの構造 (Tanabe et al, 2004 の図をもとに改変)。

*Neo*: ネオマイシン耐性遺伝子、Fluc: ルシフェラーゼ遺伝子

C:コアタンパク質、M:マトリクスタンパク質、E:エンベロープタンパク質

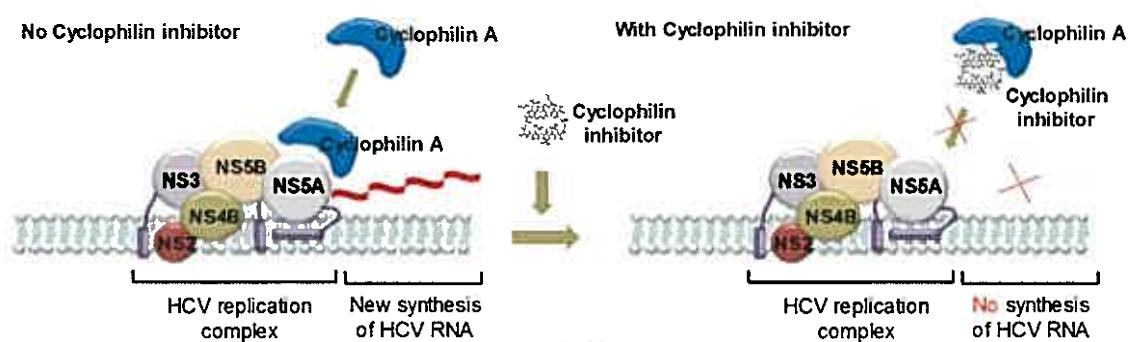
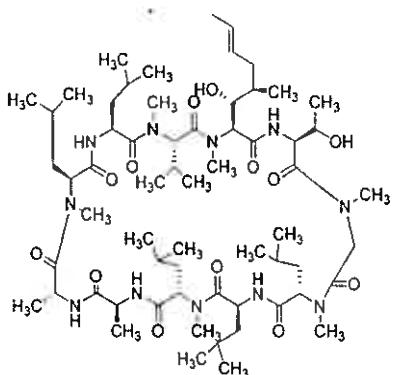
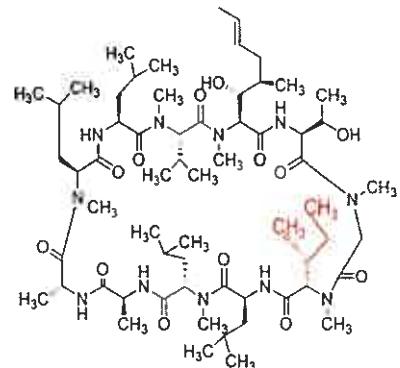


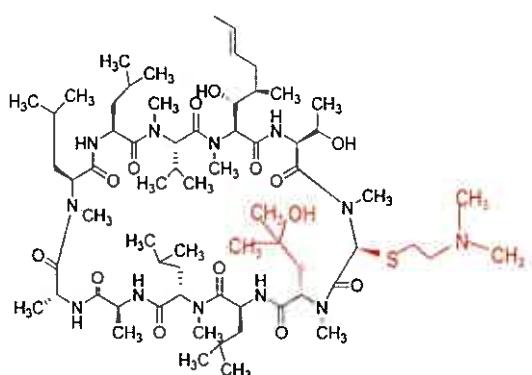
図 序-5 シクロフィリン阻害剤による HCV RNA 合成の阻害  
(Naoumov et al, 2014 の図をもとに改変)



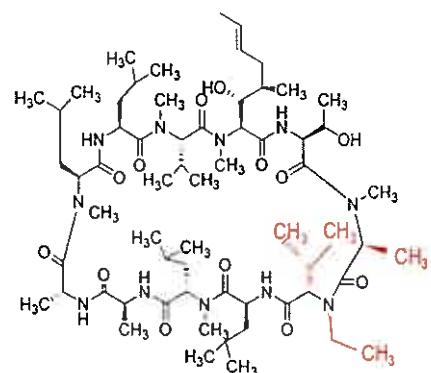
Cyclosporine A



NIM-811



SCY-635



Alisporivir (Debio-025)

図 序-6 臨床試験中の CyA 類縁体の抗 HCV 薬 (Yang et al, 2015 の図をもとに改変)

### 第三節 *Lentzea* sp. 7887 株による FR901459 の水酸化反応

#### 1) FR901459 の特徴

FR901459 は真菌 *Stachybotrys chartarum* No. 19392 により産生される CyA の類縁体として報告された (Sakamoto et al, 1993; 図序-7)。この報告で *S. chartarum* No. 19392 は 200 L 容培養槽で 4 日培養され 148 mg/L (0.121 mM) の FR901459 を產生した。形状は白色粉体、融点は 156~158°C である。メタノール、アセトン、酢酸エチルおよびジエチルエーテルに可溶であり、*n*-ヘキサンおよび水に不溶である。

CyA の分子式は  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ 、分子量は 1202.6 であるのに対し FR901459 は分子式  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}$ 、分子量 1218.6 である。また CyA に対し 2, 5, 10 位のアミノ酸が異なる (図序-2、序-7)。

生理活性は CyA と類似しており抗真菌活性および免疫抑制活性 (Sakamoto et al, 1993)、P 糖タンパク質阻害活性 (Tiberghien et al, 2000)、ヒトホルミルペプチドレセプター阻害活性 (Loor et al, 2002)、シクロフィリン D を介したミトコンドリア透過性移行細孔形成によるミトコンドリア損傷に対する神経保護効果 (Uchino et al, 2006; Muramatsu et al, 2007) の報告がある。なお、FR901459 の免疫抑制活性は CyA の 1/7 である (Muramatsu et al, 2007)。

また FR901459 は CyA および免疫抑制剤 FK506 と同様に真菌 *Aspergillus niger*、*Fusarium oxyporum*、*Geotrichum candidum* の菌糸に形態学上の顕著な変化を与えることが知られる。これはカルシニューリンを介した免疫抑制作用を有する化合物に共通しており、こうした化合物を有する微生物培養液の高感度の検出系として提案されている (Sakamoto et al, 1995)。

#### 2) FR901459 の 9 位水酸化体 AS1837812 (compound 2)

抗 HCV 剤の候補となるシクロフィリン阻害剤を探索するため CyA 類縁体の分子構造的多様性が求められた。FR901459 の母核に化学的な修飾による類縁体を合成しようとしたが FR901459 には化学修飾に必要な活性部位が無い。一方、生物変換反応では合成化学の課題である非活性炭素原子の選択的水酸化を可能とすることが知られる (Mitsukura et al, 2006; Mitsukura et al, 2010; Mitsukura et al, 2012)。このことから菌体反応により水酸基導入が行われた (Sasamura et al, 2015; 図序-7)。30 株の放線菌株のスクリーニングが行われこのうち *Lentzea* sp. 7887 で 7 種の水酸化体 (compound 1-7) が取得された。これら化合物はいずれも 1 位、9 位の片方もしくは両方の水酸化体である。なお *Lentzea* sp. 7887 は以前の検討でヒストンデアセチラーゼ阻害剤 AS1387392 を水酸化体 AS1429716 へ変換することが紹介されている (Sasamura et al, 2010)。

*Lentzea* sp. 7887 による FR901459 の水酸化体のうち 9 位水酸化体 compound 2

の化学合成による誘導体は高い抗 HCV 活性と低い免疫抑制活性を示した (Sasamura et al, 2015)。このため compound 2 は有望な中間体と位置付けられ AS1837812 と命名された(Yabutani et al, 2017a)。分子式 C<sub>62</sub>H<sub>111</sub>N<sub>11</sub>O<sub>14</sub>、分子量 1234.6、形状は白色粉体、融点は 170~173 °C である。クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、DMSO、ピリジンおよびメタノールに可溶、水にわずかに可溶であり、n-ヘキサンに不溶である(Sasamura et al, 2015)。

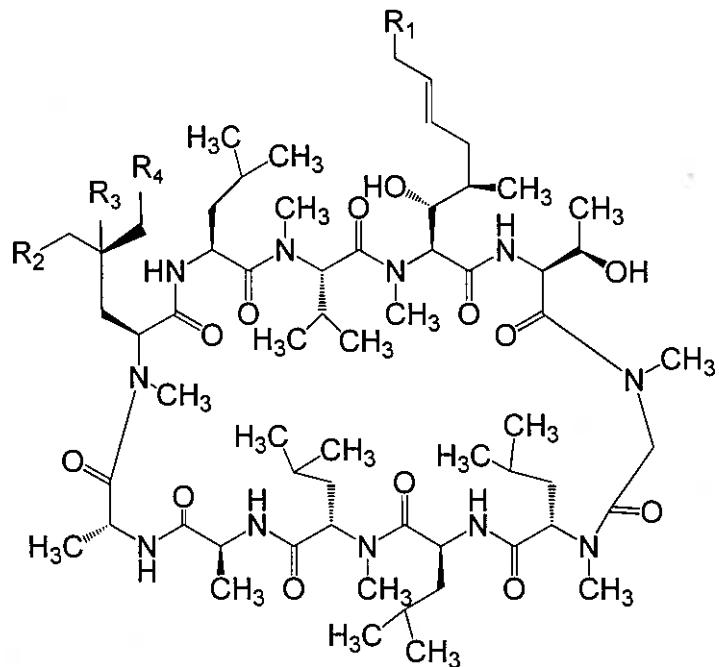
FR901459 を AS1837812 へ変換する菌体反応のため、まず *Lentzea* sp. 7887 が 200 L 容および 300 L 容培養槽で 3 日間培養された。培養後メタノールに溶解した基質を添加し 13 時間反応を行った。このとき基質である FR901459 濃度は 0.410 mM であり AS1837812 へのモル変換率は 28% であった。また他の *Lentzea* 属の株 6 種を用いて小スケール反応を行ったが *Lentzea* sp. 7887 以上に AS1837812 を生成する菌株はなかった。

### 3) *Lentzea* sp. 7887 分類学的特徴

FR901459 を AS1837812 へ変換する *Lentzea* sp. 7887 について分類学的特徴が調査された(Sasamura et al, 2015)。16S リボソーム DNA (rDNA) 配列の比較の結果、*Lentzea* sp. 7887 は他の *Lentzea* 属の株と系統樹上に单一のクラスターを構成し *L. violacea* LM 036T と最も高い類似性を示した(99.2%)。

放線菌の中でも *Lentzea* 属の分類は歴史が浅く 1995 年中温性放線菌の新しい属として初めて *Lentzea* という名称が与えられた (Yassin et al, 1995)。その後 Lee らにより *Saccharothrix albidocapillata* として *Saccharothrix* 属への帰属が提案されたが(Lee, 2000)、Labeda らが復活させた(Labeda et al, 2001)。これに伴い *Actinosynnema* 属、*Sacchurothrix* 属の中からいくつかの種が *Lentzea* 属に再分類された(Labeda, 2001; Xie, 2002)。

*Lentzea* 属の利用については以下の報告が挙げられる。*L. waywayandensis* を用いた生分解性ポリエステル、ポリラクチドの分解 (Nair et al, 2012)。アルゼンチン、サルタ州の高濃度のホウ素で汚染された異なる土壤から採取された *Lentzea* 属によるホウ素汚染の除去を目指した検討 (Moraga et al, 2014)。チリ、アタカマ砂漠で取得された *Lentzea* sp. H45 による新規抗 HIV インテグラーゼ阻害活性を有する化合物 lentzeosides A-F の产生 (Wichner et al, 2016)。



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
FR901459	H	H	H	H
Compound 1	OH	H	H	H
Compound 2	H	OH	H	H
Compound 3	H	H	OH	H
Compound 4	H	H	H	OH
Compound 5	OH	H	OH	H
Compound 6	OH	OH	H	H
Compound 7	OH	H	H	OH

図 序-7 FR90145 と *Lentzea* sp. 7887 による水酸化体の構造  
(Sakamoto et al, 1993; Sasamura et al, 2015 の図をもとに改変)

## 第四節 菌体反応

### 1) 菌体反応の利点と課題

菌体反応(whole-cell bioreaction)と遊離酵素による反応は化学合成反応と比較した場合、高い位置および立体選択性、作業や環境への低い負荷といった共通の長所を有する(de Carvalho, 2011)。さらに菌体反応は遊離酵素による反応に比べ以下の利点を有する(Wachtmeister and Rother, 2016; Schmid et al, 2001; de Carvalho, 2016)。

(i) 低コストであること。いくつかの単離および精製工程を必要とする遊離酵素よりも著しく低コストである。一般に菌体反応は粗酵素反応に対して 1/2、精製酵素に対して 1/10 のコストと報告されている(Tufvesson et al, 2011)。

(ii) 有機溶媒耐性を有する微生物を利用することにより、菌体内の酵素系に保護空間を提供し有機溶媒存在下での反応を可能とする。工業的成功例は *Rhodococcus* 属を用いたアクリルアミドの生産である。本反応の基質は有害な有機溶媒として知られるアクリロニトリルである。*Rhodococcus* sp. N-774 は 1980 年に発見されたアクリルアミドの製造のために工業的に使用された最初の株であったが、のちにより高ニトリルヒドラターゼ活性の *R. rhodochrous* J1 が使用された。この菌株は、三菱レーヨン社によってアクリルアミドを年間 30,000 トンを生産し、またロンザ広州ファインケミカル社によってニコチンアミド 6,000 トンを生産するために使用されている (Nagasawa et al, 1988; de Carvalho, 2016)。

(iii) 同一菌体内で複数の目的反応を容易に行うことができる。主に組換え菌を用いることで複数種類の目的酵素を同一菌体内で発現させ酵素の精製・反応系の再構築といった操作なしに行うことができる。例えば一連の反応を行う酵素を同一菌体内で発現させることで多段階反応を行うことができる (Muschiol et al, 2015; Oroz-Guinea and García-Juneda, 2013)。また、主反応が酸化反応の場合、副反応として還元反応を進行させることにより同一菌体内で容易に補酵素が再生できる(Hummel and Gröger, 2014; Schmid et al, 2015; Kara et al, 2013)。

一方で菌体反応は菌体内に多数の目的以外の酵素を有するため副反応を生じるという課題がある。これを防ぐためには反応条件をコントロールして副反応の影響を最小化する方法 (Bode et al, 2002) や、反応液中の基質濃度を低く制御することによって目的以外の反応に基質が使われることを防ぐといった方法がある(D'Arrigo et al, 1997; Nakamura et al, 2002)。また別の課題として細胞膜による物質移動の制限が挙げられる。これを軽減させる方法は界面活性剤、キレート剤、または有機溶媒などの処理による細胞壁化合物の透過化性の向上である (Rundbäck et al, 2012; Zajkoska et al, 2013)。これらの方法を用いる場合は目的の反応自体に阻害を与えない場合に限られる。

## 2) 疎水性基質を用いた菌体反応

微生物は一般的に水系で生育するが、菌体反応の基質は疎水性を有する場合がある。この課題に対する最もよく知られた解決策は、水に不混和の有機溶媒を用いた水/溶媒二相系で菌体反応を行うことである。また水/溶媒二相系では有機溶媒は疎水性基質の貯留槽としてまた有害生成物の吸収源として機能する (Zajkoska et al, 2013)。水/溶媒二相系での菌体への基質の供給経路については以下の 3 種が挙げられている (Goswami and Singh, 1991; Hori et al, 2002)。(i) 水相にわずかに溶解した基質が菌体に供給される。(ii) 溶媒相と菌体が直接接触して基質が供給される。(iii) 菌体がバイオサーファクタントを生成して可溶化もしくは疑似可溶化して取り込む。これらのうち(ii)は(i)に比べ輸送速度が高いことが報告されている (Watanabe et al, 2008; Jimenez and Bartha, 1996)。

上に挙げた水/溶媒二相系は優れた手法であるが、使用する有機溶媒が酵素菌体を溶菌させるといった毒性を示す場合用いることはできない。有機溶媒に頼らず疎水性基質を反応に用いるため、基質を樹脂に吸着する方法が知られる。基質を吸着した樹脂は菌体反応系に添加されると分配係数にもとづき低い基質濃度を維持し、菌体が基質を生成物に変換するにつれて多くの基質が液相中に拡散される。固体樹脂は疎水性、場合によっては親水性の基質の水相での濃度を低くさせることができ、より高い生産性や高い生成物特異性をもたらす (Kim et al, 2007; Houng and Liau, 2003)。

## 3) CyA を基質とした菌体反応

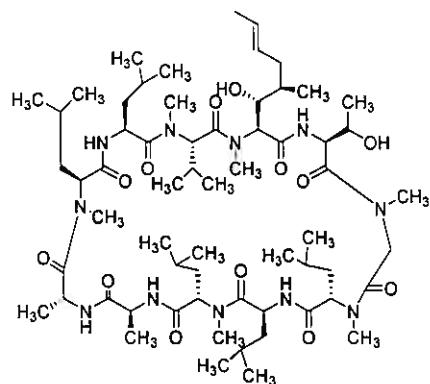
生体内に投与された CyA は様々な修飾を受け代謝される (Rehácek, 1995)。CyA 代謝経路は合計 29 の代謝産物を含む (Lemaire et al, 1986; Christians et al, 1991)。こうした代謝は 1 位または 9 位のいずれかでの水酸化または 4 位での N-脱メチル化によって開始され、さらなる修飾を加えられ多様な代謝産物をもたらす (Christians et al, 1991)。これまでに同定された全ての代謝産物は、CyA の元の環状ペプチド構造を含んでいた。調査した全ての種 (ラット、ウサギ、イヌ、ヒト)において CyA 代謝の主要な経路は同一であり、作用機序は多くの哺乳動物共通とみられるが代謝に関与する酵素活性は系統、性別、年齢、さらには時間帯などの多くの要因に依存し多様である (Schottmann et al, 1991)。

メリシャン社 (2011 年 7 月から日本マイクロバイオファーマ社) ではヒトの CyA 代謝産物の取得を目的に菌体反応の検討を行った。これらの類縁体を生成するために、1,237 株の放線菌を CyA の変換能力を指標にスクリーニングし、89 株 (7.2%) が目的の類縁体を生成した。*Dactylosporangium variesporum* IFO 14104 は 0.083 mM の CyA から 1 位水酸化体を 14.4% のモル変換率で取得した (Ohta et al, 2005; 図序-8)。

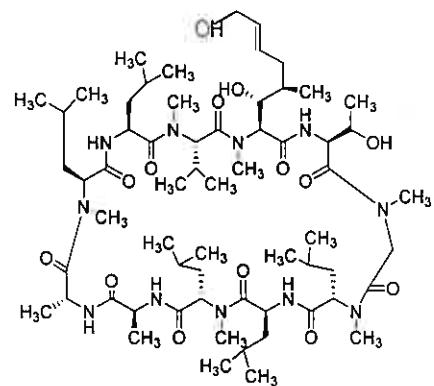
サンド社(1996年12月よりノバルティス社)ではシクロスポリン構造を有する化合物の多様性を得るために菌体反応によるCyA類縁体取得を目指した。28株の細菌および72株の真菌をスクリーニングした結果 *Sebekia benihana* NRRL 11111により CyA の4位水酸化体 4-( $\gamma$ -hydroxy)-CyA がモル変換率 34.5%で取得されることが見いだされた。このとき CyA は 0.125 mM で反応液に添加された。4-( $\gamma$ -hydroxy)-CyA 以外にもヒトの代謝類縁体も多く得られたためヒトでの代謝に関与するものと近似の P-450 が *S. benihana* NRRL 11111 内に存在することが示唆された(Kuhnt et al, 1996; 図序-8)。

4-( $\gamma$ -hydroxy)-CyA は免疫抑制活性が極めて低い一方 CyA の副作用である育毛促進作用が維持されたため育毛剤としての開発が有望視された。このため 4-( $\gamma$ -hydroxy)-CyA 生成に関与する *S. benihana* の水酸化酵素について検討が行われた。*S. benihana* KCTC 9610 のゲノム配列とその *in silico* 解析により 21 種のシトクロム P450 が同定された。さらに遺伝子破壊と相補試験により CYP-sb21 が 4-( $\gamma$ -hydroxy)-CyA 生成能の本体であることが見いだされた (Lee et al, 2013)。また組換え大腸菌で CYP-sb21 をシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来のレドックスパートナーと共に発現させた場合、最も高い 4 位水酸化活性が見られた。メタノール 10%を添加することで 4-( $\gamma$ -hydroxy)-CyA のモル変換率は 52.3%となった。この反応で用いられた CyA 濃度は 0.1 mM であった(Ma et al, 2015)。

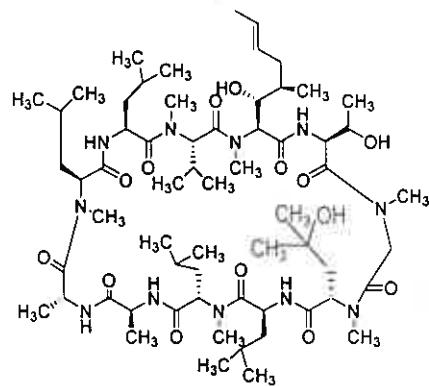
これら CyA の菌体反応ではいずれも基質は 0.083~0.125 mM と低い濃度で用いられている。このことは CyA が疎水性であることが原因と考えられる(表序-2)。基質濃度を向上するためには水/溶媒二相系や基質の樹脂吸着の利用が有効と考えられるが、これまで CyA を基質とした菌体反応においてこうした報告はない。



Cyclosporine A



1-hydroxy-cyclosporine A



4-hydroxy-cyclosporine A

図序-8 CyA 水酸化体の構造

下段左 : *Dactylosporangium variesporum* IFO 14104 による 1 位水酸化体。

(Ohta et al, 2005 の図をもとに改変)

下段右 : *Sebekia benihana* NRRL 11111 による 4 位水酸化体。

(Kuhnt et al, 1996 の図をもとに改変)

表 序-2 CyA および FR901459 の水酸化反応

菌株	基質	基質濃度 (mM)	生成物	変換率 <sup>a</sup> (%)	生成物 濃度 (mM)	参照
<i>Sebekia benihana</i> NRRL1111	CyA	0.125	4-hydroxy-CyA	34.5	0.0431	Kuhnt et al, 1996
<i>Dactylosporangium variesporum</i> IFO 14104	CyA	0.083	1-hydroxy-CyA	14.4	0.0120	Ohta et al, 2005
Recombinant <i>Escherichia coli</i>	CyA	0.1	4-hydroxy-CyA	52.3	0.0535	Ma et al, 2015
<i>Lentzea</i> sp. 7887	FR901459	0.41	AS1837812	28	0.115	Sasamura et al, 2015

a 変換率: (生成物モル数/FR901459 モル数) × 100

## 第五節 研究の目的

C型肝炎ウイルス(HCV)はフラビウイルスと類似の直鎖状一本鎖 RNA ウィルスとして特定されており、血液を介して HCV が感染すると C型肝炎、肝硬変を経て肝細胞癌に至る。HCV 感染者は世界中で約 1 億人と推定されておりこのため治療ニーズが高まっている。抗 HCV 剤は INF、PEG-INF、リバビリンおよび直接作用型抗ウイルス剤(DAA)といったウイルス側を標的としたものが上市されているが、副作用が強い(INF、PEG-INF)、治療効果が低い(INF、PEG-INF、リバビリン)、ウイルスの薬剤に対する耐性を誘発する(DAA)といった課題がある。一方、近年シクロスポリン A(CyA)類縁体を用いた患者側のシクロフィリンを標的とした薬剤(アリスポリビル、NIM811、SCY- 635)の開発が臨床段階にある。これらは治療効果が高くウイルス自体を標的としないため耐性の誘発もなく期待されている。

Sasamura らは放線菌 *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応による CyA 類縁体 FR901459 の 9 位水酸化体 AS1837812 が、新規抗 HCV 剤の候補化合物の重要な中間体になることを見出した(Sasamura et al, 2015)。一方、報告された *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応には以下の 3 つの課題がある。(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となる。(ii) 基質濃度が 0.410 mM であり高濃度化が必要であること。CyA は疎水性であり水系の菌体反応へ基質の効率的な供給を行うためには課題となる。(iii) *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応に副反応が存在しこのため AS1837812 の収量が抑制されていること。主な副反応を低減することで AS1837812 の収量を向上する必要がある。

本研究では上に挙げた 3 つの課題について取り組んだ。パイロットスケールへのスケールアップ(第一章)および、基質の高濃度化(第二章、第三章)と副反応の低減(第三章)による AS1837812 の単位容量あたりの収量の向上を行い、効率的な AS1837812 生成プロセスを構築したのでこれを報告する。

## 第一章

*Lentzea* sp. 7887 菌体による  
FR901459 水酸化反応の最適化と  
パイロットスケール反応

## 第一節 序

AS1837812(図 1-1)は序章に述べたように抗 HCV 薬の開発候補化合物の中間体として重要な構造を有する。AS1837812 は *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応により FR901459 の 9 位水酸化を行うことで反応液中に 28% の変換率([生成された水酸化体のモル数 /FR901459 モル数] × 10)で取得される(Sasamura et al, 2015; 図 1-1)。AS1837812 を中間体として利用した抗 HCV 薬の開発のためには kg 単位の AS1837812 が求められ、そのためにはスケールアップと単位容量あたりの収量向上が必要となるがこれまでの検討では 3 つの課題が存在する。(i) 菌体反応がラボスケールでしか行われておらず、バイロットスケールでの反応のためには培養および反応の最適化が必要であること。(ii) *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応に用いる基質 FR901459 の濃度が 0.410 mM までしか使われておらず、効率的な AS1837812 生成のためにはさらに高濃度の基質の使用が求められること。(iii) *Lentzea* sp. 7887 による FR901459(分子量 1218.6 Da) の水酸化反応には AS1837812 (compound 2, 分子量 1234.6 Da) 以外に 6 種類の水酸化体 (compound 1 および compound 3-7) が知られており、これら副生成物のために AS1837812 の変換率が制限されていること(図 1-1)。特に compound 1(1 位水酸化体, 分子量 1234.6 Da) と compound 6 (1,9 位水酸化体, 分子量 1250.6 Da) は副生成物の中でも大きな割合を占める。

本章では特に上記(i)を解決するため、Sasamura らの反応条件(Sasamura et al, 2015)を参考として試験管(21 mm 径)での 3 mL 菌体反応系を構築し、培養・反応条件の最適化を行った。その際、上記(ii)に関して基質である FR901459 濃度を上げること、また上記(iii)に関する compound 1 と compound 6 の挙動に留意した。また、フラスコ(液量 30 mL)から 30 L 培養槽(液量 20 L)、1 m<sup>3</sup> 培養槽(液量 800 L)への培養のスケールアップおよび、試験管から 3 L 反応槽(液量 1.6 L)、1 m<sup>3</sup> 反応槽(液量 800 L)への反応のスケールアップを行った。

## 第二節 材料および方法

### 1) 菌株

*Lentzea* sp. 7887 は茨城県の土壤から単離された(Sasamura et al, 2015)。

### 2) 材料

*Lentzea* sp. 7887 の培養に用いた材料を以下に示す。コーンミール(株式会社サニーメイズ、静岡・日本)、グルコース(サンエイ糖化株式会社、愛知・日本)、コーンスター<sup>チ</sup> MS#3600(日本食品化工株式会社、静岡・日本)、乾燥酵母(アサヒフードアンドヘルスケア株式会社、東京・日本)、ファーマメディア(イワキ株式会社、東京・日本)、消泡剤シリコン KM-70(信越化学工業株式会社、東京・日本)、Adekanol<sup>TM</sup> LG-109(株式会社 ADEKA、東京・日本)。その他化合物は和光純薬工業株式会社(大阪・日本)から購入した試薬特級を用いた。

*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応に用いた FR901459 は *Stachybotrys chartarum* No. 19392 の培養液から単離した(Sakamoto et al, 1993)。その他化合物は和光純薬工業株式会社(大阪・日本)から購入した試薬特級を用いた。

### 3) *Lentzea* sp. 7887 の培養条件

*Lentzea* sp. 7887 の培地組成については表 1-1 に示した。*Lentzea* sp. 7887 の培養条件については容器別に表 1-2 にまとめた。

### 4) *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応条件

*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応のため上記条件で調製した培養液を表 1-3 に示す割合で用いた。また他の反応液組成についても表 1-3 に示した。*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応の反応条件については容器別に表 1-4 にまとめた。

### 5) 分析条件

反応液を等量のアセトンと混合したのちろ過したものを分析サンプル液とした。FR901459、AS1837812、compound 1 および compound 6 の量的分析は逆相 HPLC (Inertsil C8-3, 4.6 × 150 mm, 3 μm; ジーエルサイエンス株式会社、東京・日本) を用いて行った。溶離液は 62% CH<sub>3</sub>CN : 38% 100 mM NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>。測定条件はカラム温度 75°C、流速 1 mL/min にて 210 nm UV 吸収を検出した。この条件下で FR901459、AS1837812、compound 1 および compound 6 の保持時間はそれぞれ 14.7 分、5.3 分、6.7 分および 3.1 分である。

### 第三節 結果

#### 1) 試験管を用いた *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の最適化

Sasamura らの検討 (Sasamura et al, 2015) を参照し、*Lentzea* sp. 7887 培養条件と試験管反応の初期反応条件を設定した (表 1-1, 1-2, 1-3, 1-4)。試験管での菌体反応を 7 時間行ったところ、初期条件として設定した *Lentzea* sp. 7887 培養液量 0.98 vol. の条件ではほとんど反応が起こらなかった (図 1-2)。培養液量 0.33 vol. の条件で最も高い変換率が得られたため、以後培養液量 0.33 vol. を基本条件とした。

次に *Lentzea* sp. 7887 菌体反応における酢酸溶液・リン酸溶液の効果を調べた (図 1-3)。1 M 酢酸溶液 pH4.0、pH4.5、pH5.0 と 1 M リン酸溶液 pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0 をそれぞれ 0.1 vol. 反応系に加え、7 時間後と 20 時間後の AS1837812、compound 1、compound 6 の変換率を測定した。その結果酢酸溶液を加えた条件では反応が阻害された。AS1837812 についてはこれら溶液を加えない条件では 7 時間から 20 時間にかけて変換率が低下しているのに対し、リン酸溶液 pH 5.0 および pH 6.0 を添加した条件では変換率が逆に向上了していた。このうち、より変換率の高いリン酸溶液 pH 5.0 の添加を以後の基本条件とした。リン酸溶液の pK は  $pK_a=2.15, 7.20, 12.35$  であり、pH 5.0 での緩衝効果は想定されない。Compound 1 については AS1837812 とほぼ同じ傾向を示したが変換率は約 1/3 であった。Compound 6 については 20 時間の時点ではリン酸溶液 pH 5.0 が一番低い結果となった。

また図 1-4 に示したようにメタノール濃度と基質濃度の影響を調べた。その結果、AS1837812 についてはメタノール濃度 3%、基質濃度 0.615 mM で最も高い変換率が得られた。メタノール濃度 3%未満ではメタノール濃度が低いほど低い変換率となった。Compound 1 については酢酸溶液・リン酸溶液の検討の際と同様 AS1837812 とほぼ同じ傾向を示した。また変換率は AS1837812 の約 1/3 であった。Compound 6 については低メタノール濃度の方が高い変換率を得る傾向が見られた。以上より以後の検討ではメタノール濃度 3%、基質濃度 0.615 mM を基本条件とした (表 1-3 最適化条件)。ここで構築した基本条件の反応開始時の pH を測定したところ pH5.69 ( $n=3$ ) であった。

#### 2) 培地検討

他の放線菌培養に用いられる培地によって培養した *Lentzea* sp. 7887 の培養液を試験管での反応に用い現行培地培地によるものと比較した。その結果現行培地による培養液を越える AS1837812 変換率を示す培地は見られなかった。培養終了時の PMV(2000 ×g、10 分間)は 100% ( $n=3$ ) であった。

#### 3) *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の 3 L 反応槽へのスケールアップ

フラスコ培養した *Lentzea* sp. 7887 培養液を用いた FR901459 の AS1837812 への

酸化反応を試験管から 3 L 反応槽へのスケールアップを行った。その結果、図 1-5 に示したように、試験管反応では 20 時間目で変換率 30% を越えた (31.2%; AS1837812: 0.192 mM) のに対し 3 L 反応槽での反応では 24 時間目に 30% を越えた (32.0%; AS1837812: 0.197 mM)。3 L 反応槽では 4 時間の遅れが見られたものの 30% 以上の変換率が得られたことから 3 L 反応槽での菌体反応を構築できたと考えた。

#### 4) 培養の 30 L 培養槽、1 m<sup>3</sup> 培養槽へのスケールアップ

3 L 反応槽での *Lentzea* sp. 7887 菌体反応を用いてフラスコ培養、30 L 培養槽、1 m<sup>3</sup> 培養槽での培養液の反応活性を比較した。表 1-5 に示したように、24 時間目の変換率はフラスコ培養、30 L 培養槽、1 m<sup>3</sup> 培養槽での培養液を用いた反応の変換率はそれぞれ 32.5%、32.3%、30.9% であった。T 検定によって有意差検定したところ有意差は認められなかった。

#### 5) 3 L 反応槽を用いた菌体反応でのメタノール濃度条件検討

図 1-4 に示されるように試験管を用いた 0.615 mM FR901459 条件の菌体反応ではメタノール 3% 以下の場合、変換率はメタノール濃度に比例した。3 L 反応槽を用いてメタノール濃度 3%、3.5%、4% での変換率を比較したところ、AS1837812、compound 1、compound 6 いずれのものも 3% が最も高く 4% が最も低い結果となった (図 1-6)。以上より以後もメタノール濃度 3% を基本条件とした。

#### 6) 3 L 反応槽を用いた菌体反応での基質濃度条件検討

より高濃度の基質を用いて *Lentzea* sp. 7887 菌体反応ができればより効率的に AS1837812 が生成できるため、3 L 反応槽を用いて 1.12 mM FR901459 での菌体反応を行った。その結果、基本条件 0.615 mM では 28 時間で 33.8% の AS1837812 変換率が得られたが 1.12 mM では 32 時間でも 22.1% にとどまった (図 1-7)。

#### 7) *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の 1 m<sup>3</sup> 反応槽へのスケールアップ

ここまで得られた培養条件、反応条件を用いて 1 m<sup>3</sup> 反応槽での *Lentzea* sp. 7887 菌体反応を 26 時間行った。通気条件については図 1-8 の実験 1 から実験 4 に示したように変更した。実験 1 では反応中の通気は培養と同じ 1 vvm としたが大型の気泡が発生し混合を阻害している様子が観察されたため実験 2 において 0.25 vvm に変更した。その結果変換率が 25.9% から 29.4% に向上した (T 検定 P=0.003)。反応中の通気量について 3 L 反応槽を用いた反応 (図 1-9) を行ったところ 0.0625, 0.125, 0.25 vvm 条件の 24 時間目でそれぞれ 28.9, 28.4, 29.5% が得られたが、1 vvm では 28.1% と若干低い値となった。また 0 vvm ではほとんど反応が起こらなかった。

実験 1, 2, 3 では反応液調整時に通気を止めていた。実験 1, 2 では作業時間が約 0.5 時間であったのに対し実験 3 では作業の手順上約 1.5 時間かかっていた。この

結果変換率は 27.1%へと低下した(T 検定  $P=0.006$ )。この結果を受け実験 4 では反応液調整中も通気を行い反応前の酸欠時間を無くしたところ変化率は 34.6%に向上した(T 検定  $P<0.001$ )。また 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。

#### 第四節 考察

本章では Sasamura らが発見した *Lentzea* sp. 7887 による FR901459 から AS1837812 への 9 位水酸化反応(Sasamura et al, 2015)の課題のひとつである、培養および反応の最適化とバイロットスケールへのスケールアップを行った。

まず、試験管反応により反応液成分の最適化を行ったが培養液量について、0.98 vol.の条件ではほとんど反応が起こらず(図 1-2)。0.33 vol.の条件で最も高い変換率が得られた。培養液量 0.98 vol.では培養液の粘度のため混合が不十分であることが観察されたため、酸素や基質といった物質移動が阻害されたことが原因と考えた。

酢酸溶液・リン酸溶液(図 1-3)およびメタノール濃度と基質濃度(図 1-4)の検討に関する AS1837812 (9 位水酸化体)の変換率と compound 1 (1 位水酸化体)の変換率の相関図を作成した(図 1-10 A, B)。R<sup>2</sup>は酢酸溶液・リン酸溶液の検討では 0.9961、メタノール濃度と基質濃度の検討では 0.8852 といずれも高い値を示したため、9 位と 1 位の水酸化反応は同一の酵素が関与すると推測した。

*Lentzea* sp. 7887 による FR901459 の水酸化反応においてメタノール濃度は 3%に最適値が見いだされた。シクロスボリン A (CyA)の組換え大腸菌による水酸化反応において共溶媒としてメタノールを 10%加えることで変換率の向上が得られた報告 (Ma et al, 2015)があるためシクロスボリン類を基質とする反応にはメタノールの添加は有効と考えられる一方、有機溶媒として菌体に与える毒性との兼ね合いから 3%に最適値が得られたと考えた。

より高濃度の基質の利用を目指し、3 L 反応槽を用いて 1.12 mM FR901459 での菌体反応を行った。その結果、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(図 1-7)。これは FR901459 が疎水性であり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。このことについては第二章でより詳しく検討した結果を報告する。

本章の検討により 1 m<sup>3</sup> スケールでの FR901459 の AS1837812 への変換反応条件を構築することができた。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抗 HCV 薬の候補化合物合成のために供与された。

## 第五節 図表

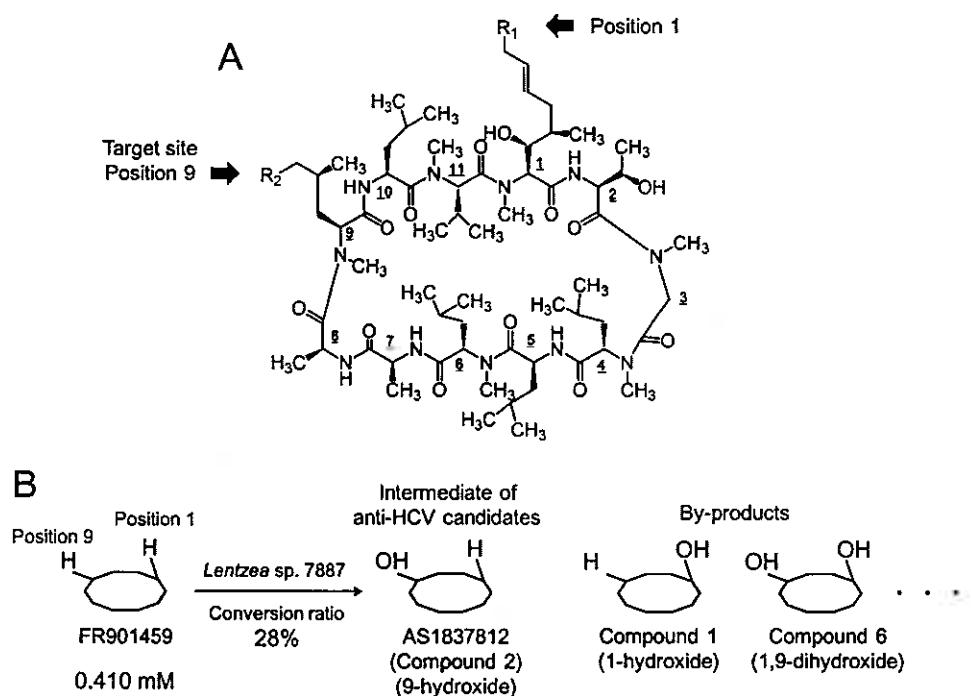


図 1-1 *Lentzea* sp. 7887 の菌体による FR901459 の水酸化反応

(A) 基質 FR901459 とその水酸化体の構造。FR901459 (R1: H, R2: H), AS1837812 (R1: H, R2: OH), compound 1 (R1: OH, R2: H), compound 6 (R1: OH, R2: OH)。下線付きの番号はアミノ酸番号を表す。(B) *Lentzea* sp. 7887 の菌体による FR901459 の水酸化反応の模式図。Conversion ratio (変換率)は次の式で表される。(生成された水酸化体のモル数/FR901459 モル数) × 100

表 1-1 培地組成

培地組成	種培養	本培養
コーンミール	N/A	1.0%
グルコース	0.5%	N/A
MS#3600	2.0%	6.0%
乾燥酵母	0.75%	0.8%
ファーマメディア	1.5%	1.2%
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	N/A	0.3%
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	N/A	0.02%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	N/A	0.3%
CaCO <sub>3</sub>	0.20%	N/A
シリコン KM70 (必要に応じて)	N/A	0.05%
アデカノール LG109 (必要に応じて)	N/A	0.05%
pH 修正 (滅菌前、1 N NaOH 使用)	7.0	6.5
植菌量	スラント 1 片	0.02%

表 1-2 培養条件

培養条件	種培養	本培養		
培養容器	500 mL フラスコ	100 mL フラスコ	30 L 培養槽	1 m <sup>3</sup> 培養槽
液量	100 mL	30 mL	20 L	800 L
滅菌条件	121.5°C 20 min	121.5°C 20 min	123°C 30 min	123°C 30 min
培養温度	30°C	30°C	30°C	30°C
攪拌数	260 rpm	260 rpm	DO ≥ 20%*	DO ≥ 20%*
通気量	N/A	N/A	1 vvm	1 vvm
内圧	N/A	N/A	0.1 MPa	0.1 MPa
培養時間	72 h	72 h	72 h	72 h

\*攪拌数によって制御

表 1-3 菌体反応の反応液組成

反応液組成	初期条件	最適化条件
1 M リン酸溶液 pH 5.0	N/A	0.1 vol.
Lentzea sp. 7887 培養液	0.98 vol.	0.33 vol.
FR901459 20.5 mM メタノール溶液	0.02 vol.	0.03 vol.
水	N/A	0.54 vol.
シリコン KM70 (必要に応じて)	0.05% (最終濃度)	0.05% (最終濃度)
アデカノール LG109 (必要に応じて)	0.05% (最終濃度)	0.05% (最終濃度)

表 1-4 菌体反応条件

反応条件	試験管 (21 mm 径)	3 L 反応槽	1 m <sup>3</sup> 反応槽
液量	3 mL	1.6 L	800 L
反応温度	30°C	30°C	30°C
攪拌数	150 rpm	750 rpm	200 rpm
通気量	N/A	0.125 vvm*	0.25 vvm*
内圧	N/A	N/A	0.1 MPa

\*検討初期は 1 vvm

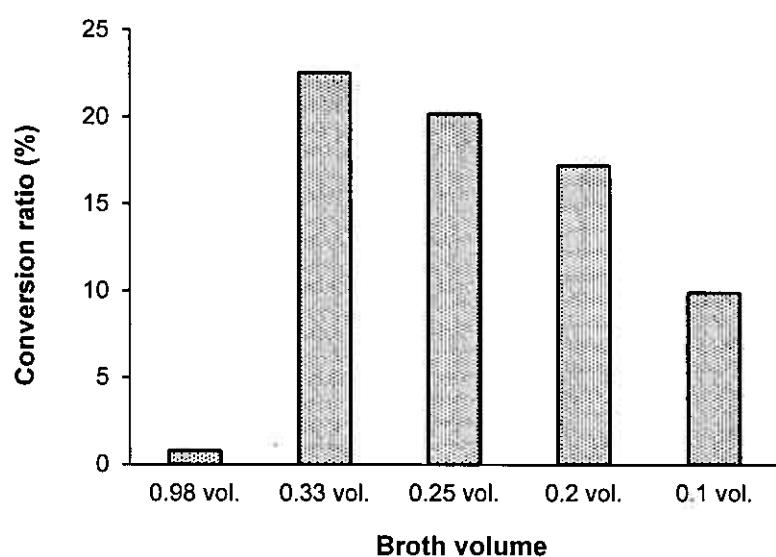


図 1-2 反応液中の *Lentzea* sp. 7887 の培養液量の最適化

*Lentzea* sp. 7887 の培養はフラスコで行い、菌体反応は 7 時間で終了した。

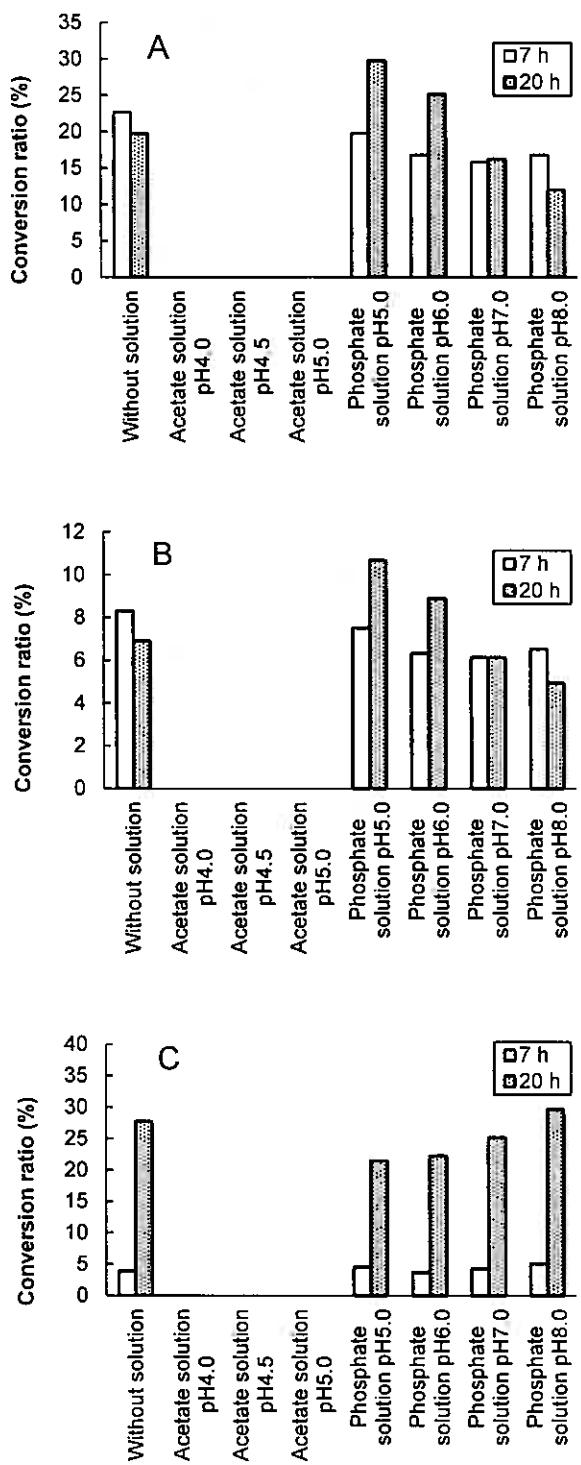


図 1-3 *Lentzea* sp. 7887 菌体反応への酢酸溶液・リン酸溶液の添加効果

*Lentzea* sp. 7887 の培養はフラスコで行い、各溶液は 1M 濃度を 0.1 vol. 反応液中に加えた。

(A) AS1837812 変換率 (B) compound 1 変換率 (C) compound 6 変換率

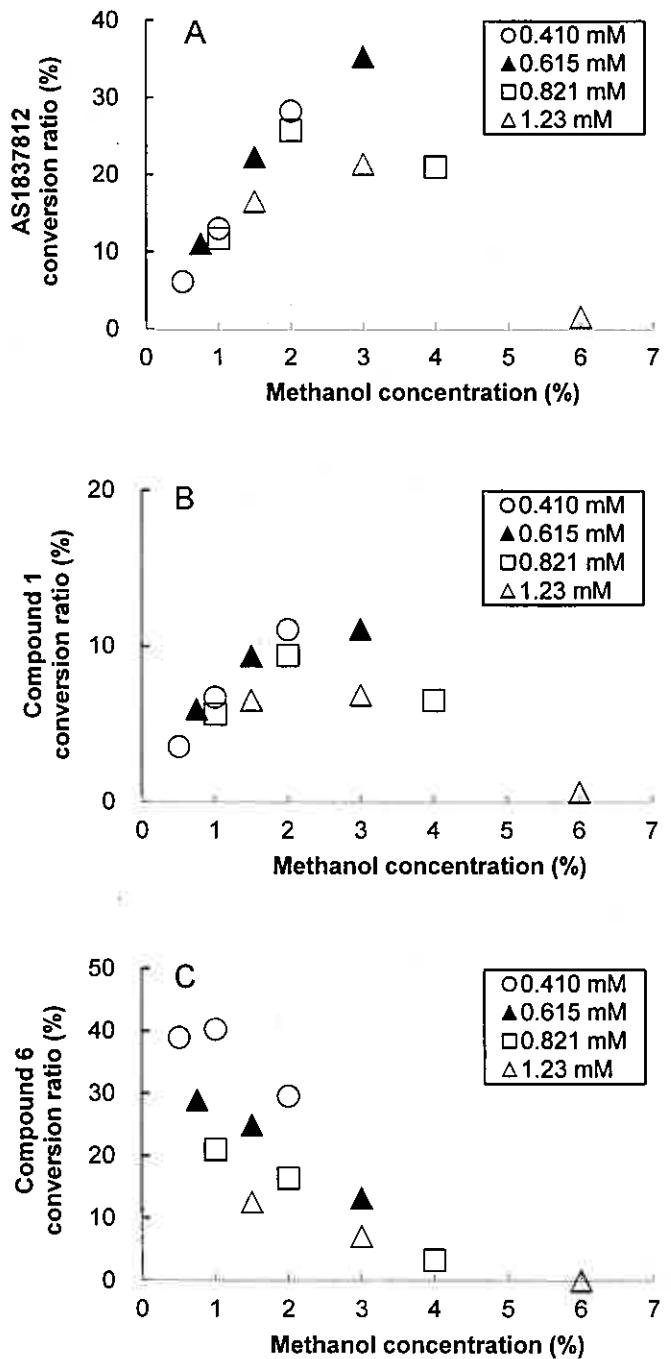


図 1-4 *Lentzea* sp. 7887 菌体反応へのメタノール濃度と基質濃度の影響

*Lentzea* sp. 7887 の培養はフラスコで行い、菌体反応は 20.5 時間で終了した。

(A)AS1837812 変換率 (B) compound 1 変換率 (C) compound 6 変換率

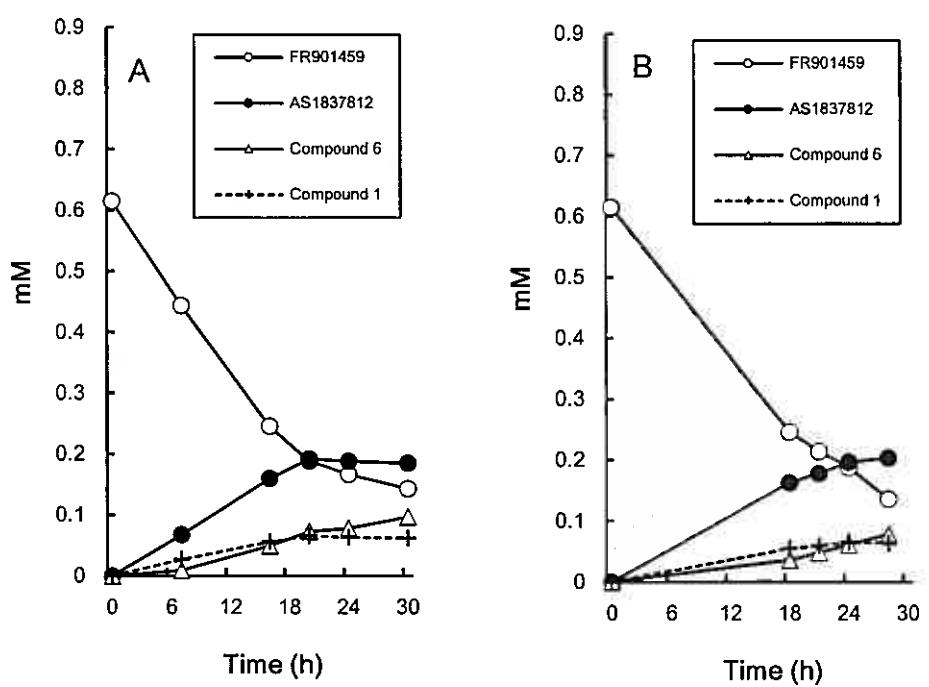


図 1-5 *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の 3 L 反応槽へのスケールアップ

*Lentzea* sp. 7887 の培養はフラスコで行った。

(A)試験管での反応推移 (B) 3 L 反応槽での反応推移

表 1-5 *Lentzea* sp. 7887 培養液の培養容器の比較

各培養容器で培養した *Lentzea* sp. 7887 培養液を用いて FR901459 の AS1837812 への 3 L 反応槽での変換率を比較した。反応時間は 24 時間。

培養容器	液量	3 L 反応槽での		P 値 <sup>b</sup>
		変換率 <sup>a</sup>		
100 mL フラスコ (n=4)	30 mL	32.5% (0.074) <sup>c</sup>		N/A <sup>d</sup>
30 L 培養槽 (n=5)	20 L	32.3% (0.044)		0.447
1 m <sup>3</sup> 培養槽 (n=5)	800 L	30.9% (0.049)		0.385

a 変換率: (生成された水酸化体のモル数/FR901459 モル数)×100

b T 検定 (100 mL フラスコ培養に対する試験)

c 相対標準偏差 (RSD: relative standard deviation)

d N/A: Not applicable

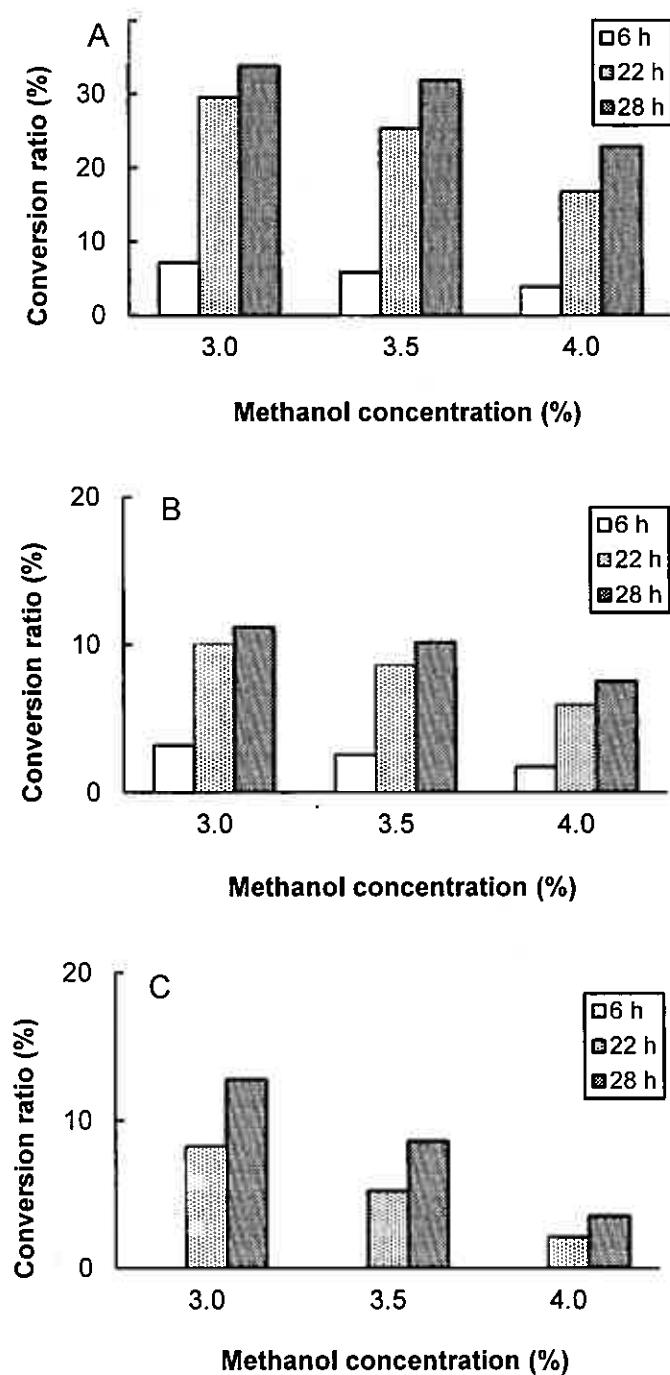


図 1-6 *Lentzea* sp. 7887 菌体反応へのメタノール濃度の影響

*Lentzea* sp. 7887 の培養は 1 m<sup>3</sup> 培養槽で行い、菌体反応は 3 L 反応槽を用いた。

(A) AS1837812 変換率 (B) compound 1 変換率 (C) compound 6 変換率

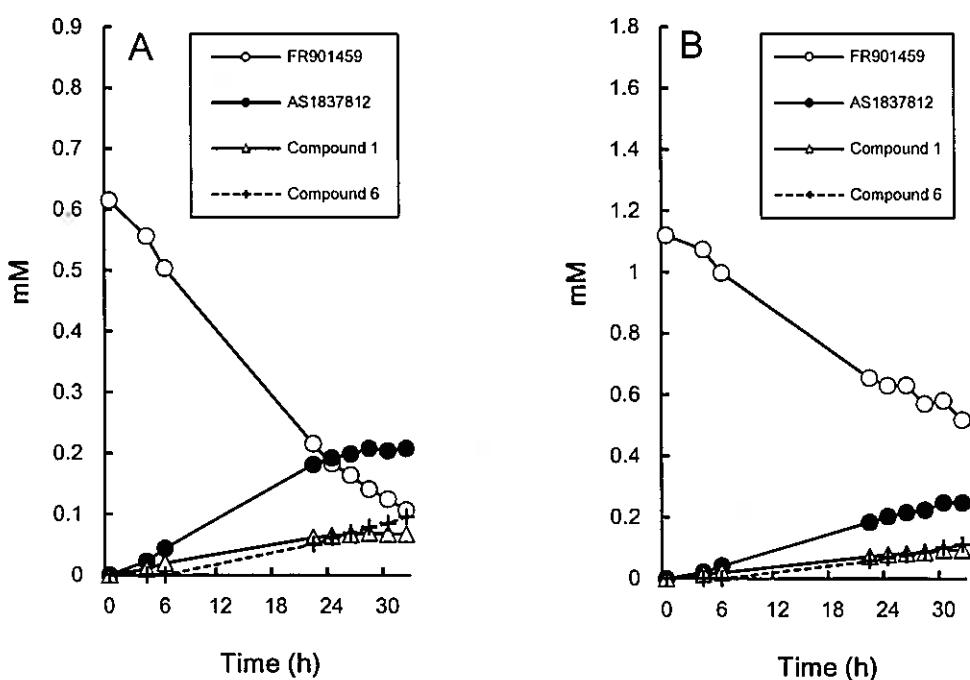


図 1-7 3L 反応槽を用いた *Lentzea* sp. 7887 菌体反応  
*Lentzea* sp. 7887 の培養は 1 m<sup>3</sup> 培養槽で行った。  
(A) 基質: 0.615 mM FR901459 (B) 基質: 1.12 mM FR901459

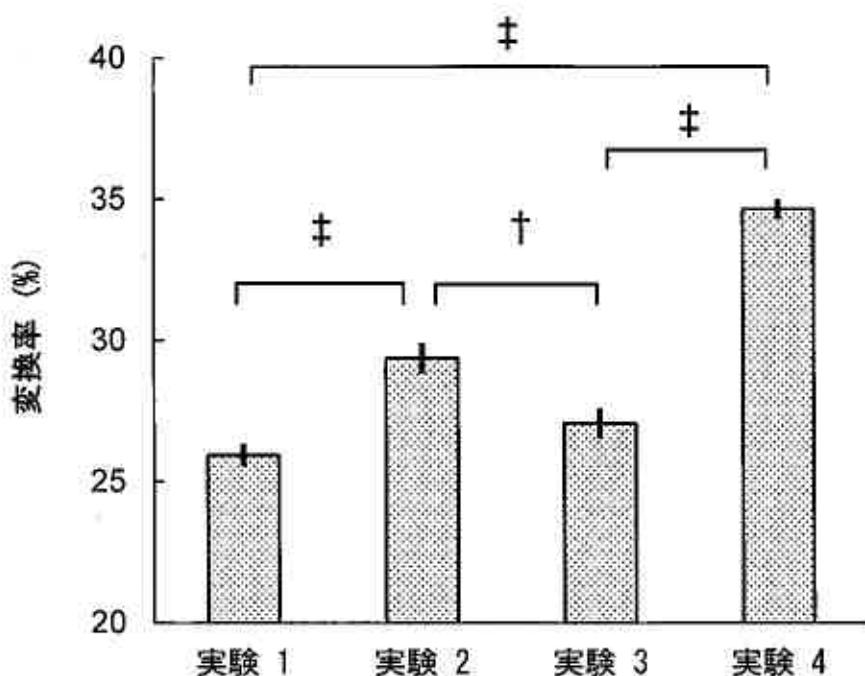


図 1-8  $1\text{ m}^3$  反応槽を用いた *Lentzea* sp. 7887 菌体反応( $0.615\text{ mM}$  FR901459)  
*Lentzea* sp. 7887 の培養は  $1\text{ m}^3$  培養槽で行った。エラーバーは標準誤差  
 を表す。T 検定: †,  $P < 0.01$ ; ‡,  $P < 0.005$

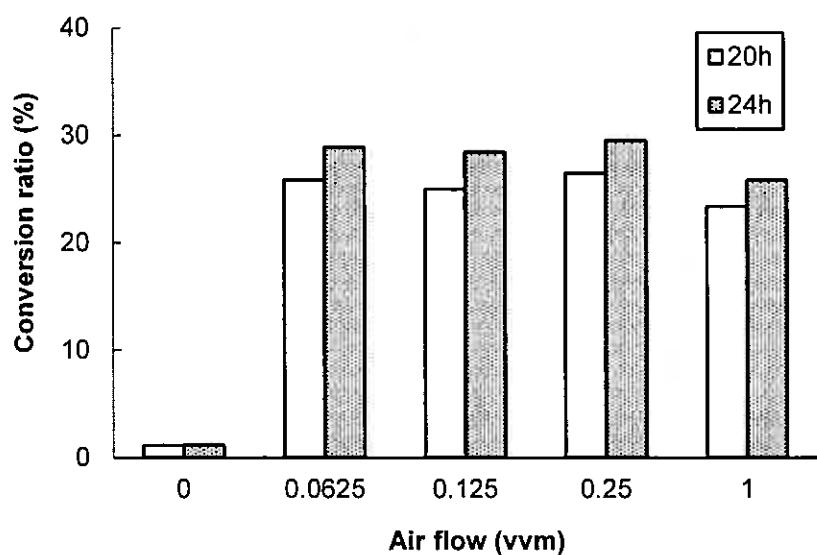


図 1-9 3 L 反応槽を用いた *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の通気量の影響

*Lentzea* sp. 7887 の培養はフラスコを用いて行った。基質は 0.615 mM FR901459 を用いた。

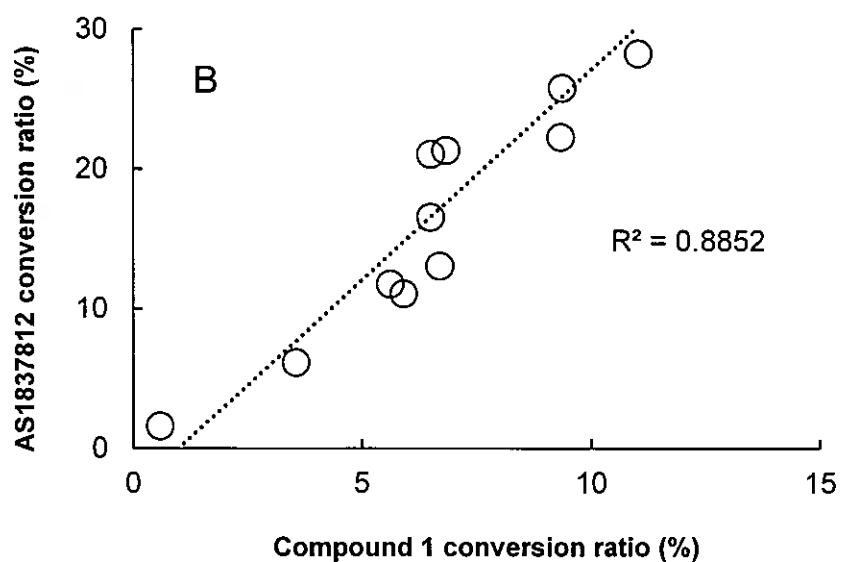
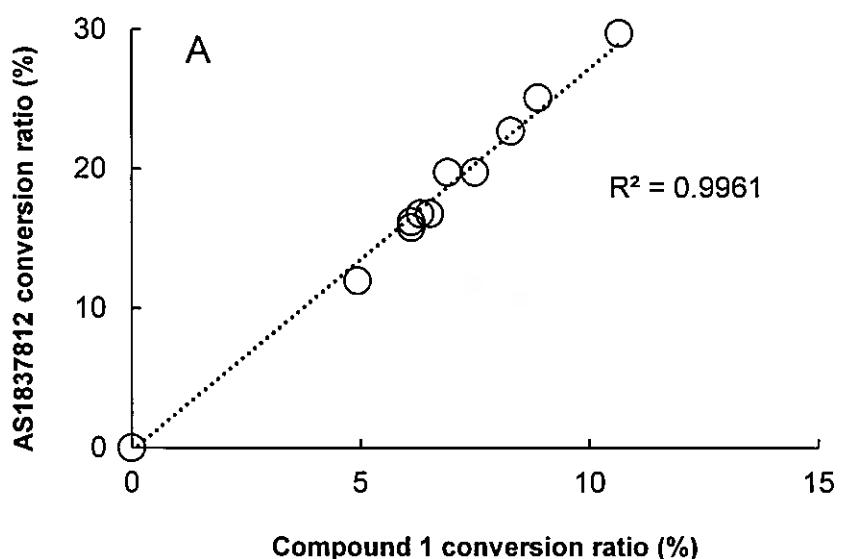


図 1-10 *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の AS1837812 と compound 1 の相関図

*Lentzea* sp. 7887 の培養はフラスコを用いて行い、菌体反応は試験管を用いて行った。R は相関係数。(A) 酢酸溶液・リン酸溶液添加条件に関して図 1-3 の値をプロットした。(B)メタノール濃度と基質濃度濃度に関して図 1-4 の値をプロットした

第二章

FR901459 の *Lentzea* sp. 7887 菌体を用いた  
高濃度水酸化反応における  
新規基質分散剤としてのキナコの利用

## 第一節 序

第一章に述べたように *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応による FR901459 (分子量 1218.6 Da)の AS1837812 (分子量 1234.6 Da)への 9 位水酸化反応には 3 つの課題がある。 (i) バイロットスケールでの反応のための培養および反応の最適化。 (ii) 基質 FR901459 の高濃度化。 (iii) Compound 1 (1 位水酸化体, 分子量 1234.6 Da) および compound 6 (1,9 位水酸化体, 分子量 1250.6 Da) を代表とする副産物の存在。

第一章では上記(i)について培養および反応の最適化を行い 1 m<sup>3</sup> 反応槽 (液量 800 L) スケールの 0.615 mM FR901459 反応で変換率 34.6%を達成した(図 1-8)。一方、(ii)についてはより高濃度の基質条件を目指して 3 L 反応槽を用いて 1.12 mM FR901459 での菌体反応を行ったが、32 時間でも 22.1%にとどまった(図 1-7)。このとき基本条件の 0.615 mM では 28 時間で変換率 33.8%であった。これは FR901459 が疎水性であるため水系の反応液中への分散状態が十分でないことが原因と考えた。本反応を行う際、FR901459 のメタノール溶液を反応液に添加すると即座に FR901459 の凝集体が生成される。基質はこの凝集体の状態で反応液中に分散され菌体反応に用いられるため、基質供給速度が律速となり 0.615 mM 以上の基質濃度での変換速度と変換率の低下を引き起こすと推測された。

FR901459 と同様に疎水性のシクロスボリン A (CyA)の水への可溶化のため界面活性剤の添加の報告がある(Ran et al, 2001)が一般的に界面活性剤は菌体を用いた反応に対し阻害的に働く。また水/溶媒二相系での菌体反応(Zajkoska et al, 2013)を用いるためには菌体自身の有機溶媒耐性が必要であるが一般的に有機溶媒は菌体に対し毒性を有する(Desimone et al, 2003)。そこで本章では FR901459 を溶解するのではなく、反応液中により効率よく分散させることで基質供給速度を向上することを検討した。まず各種粉体と FR901459 を混合し、試験管での 1.23 mM FR901459 条件の反応を行い変換率の高い粉体を選別し、1 m<sup>3</sup> 反応槽までのスケールアップを行った。また選択した分散剤の FR901459 の反応液中への分散に関する作用機作の解析を行った。

## 第二節 材料および方法

### 1) 材料

*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応に用いた材料を以下に示す。キナコ(株式会社河田商店、愛知・日本)、脱脂大豆粉(昭和産業株式会社、東京・日本)、たん白粉末、大豆由来(和光純薬、大阪・日本)、ダイヤイオン™ HP-20、セバビーズ™ SP-207、SP-850(三菱化学株式会社、東京・日本)、シリカゲル(関東化学株式会社、東京・日本)、活性炭(日本エンバイロケミカルズ株式会社、大阪・日本)、Eupergit®C(シグマ-アルドリッヂ、ミズーリ州・米国)、クリムーバー®(栗田工業株式会社、東京・日本)、グルテンミール(日本食品化工株式会社、静岡・日本)、小麦胚芽(日清ファルマ株式会社、東京・日本)、その他化合物は和光純薬工業株式会社(大阪・日本)から購入した試薬特級を用いた。

### 2) *Lentzea* sp. 7887 の培養条件

*Lentzea* sp. 7887 の培地組成については表 1-1 に示した。*Lentzea* sp. 7887 の培養条件については容器別に表 1-2 にまとめた。

### 3) *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応条件

*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応のため上記条件で調製した培養液を表 2-1 に示す割合で用いた。また他の反応液組成についても表 2-1 に示した。基質分散剤(キナコ)を用いた菌体反応のための基質混合液の組成について表 2-2 にまとめた。*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応の反応条件については容器別に表 1-4 にまとめた。

### 4) 基質分散剤のスクリーニング

試験管に各材料の粉体約 0.1 mL を加え、次に 41.0 mM の FR901459 メタノール溶液 0.09 mL を加えた。混合物を乾燥させた後、0.3 mL の 1 M リン酸溶液(pH 5.0)、*Lentzea* sp. 7887 のフラスコ培養液 1 mL、水 1.6 mL およびメタノール 0.09 mL を混合物に添加した。1.23 mM FR901459 の菌体反応は、振とう 150 rpm、30°C にて 20 時間行った。

### 5) キナコの上清を用いた菌体反応

62 g のキナコを 400 mL の水に懸濁させた懸濁液を 50 mL フラスチックチューブに注ぎ、2000 ×g で 10 分間遠心分離した。次に 200 mL のキナコ上清へ 48 mL の 41.0 mM FR901459 メタノール溶液を加えた。この基質混合物を 3 L 反応槽中の反応液に添加し菌体反応を行った。反応に用いた *Lentzea* sp. 7887 培養液はフラスコを用いて培養された。キナコ上清のタンパク質濃度測定は Bio-Rad タンパク質アッセイ(Bio-Rad Laboratories, Inc.、カリフォルニア州・米国)を用いた。このとき標準

としてウシ血清アルブミンを用いた。

6) 分析条件

分析条件は第一章 第二節 5) に記載した。

### 第三節 結果

#### 1) 基質分散剤のスクリーニング

0.615 mM を越える FR901459 濃度において FR901459 を反応液中に効率的に分散しうる物質の取得を目的としてスクリーニングを行った。この試験には以下の物質が用いられた。合成吸着剤 (Diaion<sup>TM</sup>HP-20、Sepabeads<sup>TM</sup>SP-207、Sepabeads<sup>TM</sup>SP-850)、シリカゲル、活性炭、固定化担体 (Eupergit<sup>®</sup>C)、凝集剤(クリムーバー<sup>®</sup>)、グルテンミール、小麦胚芽およびキナコ(図 2-1)。キナコおよびシリカゲルは対照と比較してそれぞれ、1.4 倍および 1.3 倍高い変換率を示した。このうちキナコは低コスト、環境負荷の低さ、高い作業性ため以降の試験に使用した。

#### 2) 3L 反応槽でのキナコを用いた菌体反応

キナコを用いた菌体反応を 3 L 反応槽にて行った (図 2-2)。本反応ではフラスコで培養した *Lentzea* sp. 7887 を用いた。この実験では 1.23、1.85 および 2.46 mM の FR901459 および適量のキナコ (表 2-2) を使用した。またキナコを含まない 0.615 mM FR901459 基質条件を培養液の反応活性確認に用いた。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、キナコ不使用の条件では変換率 30.3% であり (AS1837812 濃度 : 0.186 mM)、培養液の反応活性に問題の無いことが確認された。また 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) であった。1.23 および 1.85 mM の FR901459 を用いた菌体反応の再現性をさらに検証し表 2-3 にまとめた。なお、キナコを使用した 0.615 mM FR901459 基質条件での菌体反応を別途 3L 反応槽で行ったところ 24 時間で 29.1% の変換率であった (AS1837812 濃度 : 0.179 mM)。

#### 3) 菌体反応へのキナコの効果の作用機作

キナコの菌体反応への影響を調べるためにキナコを、グルテンミール、小麦胚芽、綿実粉、脱脂大豆粉、脱脂粉乳、乾燥酵母および大豆タンパク質粉などの他のタンパク質粉体と比較した。その結果、キナコ、脱脂大豆粉、大豆タンパク質粉などのダイズから得られたタンパク質粉体は、他のものよりも高い変換率を示した (図 2-3)。

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 3 L 反応槽での 1.23 mM FR901459 条件の菌体反応に使用した(図 2-4)。この反応にはフラスコ培養した *Lentzea* sp. 7887 を使用し、対照としてキナコ全体を用いた菌体反応を行った。その結果、キナコ上清を用いた菌体反応でも 1.23 mM の FR901459 を AS1837812 に変換することができた。44 時間時点におけるキナコとキナコ上清の菌体反応変換率はそれぞれ 31.8% と 28.0% であった。

1.23 mM FR901459 とキナコ上清の混合物と、1.23 mM の FR901459 と水の混合物とを光学顕微鏡下で比較した(図 2-5)。その結果、FR901459 とキナコ上清の混合物中に多数のコロイド粒子および少数の FR901459 凝集体が存在すること(図 2-5A)、また FR901459 と水の混合物中に多数の大きな FR901459 凝集体が存在することが分かった(図 2-5B)。これらの 2 つの混合物を 5  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過し、ろ液中の FR901459 濃度を測定したところ FR901459 とキナコ上清との混合物の濾液中には FR901459 と水との混合物よりも 17 倍多い FR901459 が検出された。

キナコ上清中のタンパク質濃度は 0.79 mg/mL であった。次に 10  $\mu\text{L}$  の上清を SDS-PAGE (12.5%) で分析した(図 2-6)。SDS-PAGE 分析によりキナコ上清中のタンパク質の大部分が 30 kDa 未満であることが分かった。

#### 4) キナコを用いたパイロットスケールの菌体反応

キナコを用いた 1.23 mM FR901459 のパイロットスケール( $1 \text{ m}^3$ ) 菌体反応を実施するにあたり、 $1 \text{ m}^3$  培養液の酵素活性を調べるために  $1 \text{ m}^3$  培養槽由来の培養液を用いてキナコを用いた 3 L 反応槽での 1.23 mM FR901459 の菌体反応を行った。その結果 24 時間では変換率が 23.4% (AS1837812 濃度 : 0.288 mM) しか得られず、フラスコ由来の *Lentzea* sp. 7887 培養液での菌体反応よりも長い 72 時間後に 30.3% の変換率がえられた。

この低活性を補うため培養液を 0.33 vol. から 0.67 vol. に増加したところ反応時間は短縮され 24 時間で 33.6% の変換率を得ることができた。キナコおよび 0.67 vol. の *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( $1 \text{ m}^3$ ) 菌体反応の結果を表 2-4 にまとめた。

#### 第四節 考察

一般に微生物細胞は水を含む培地中で増殖し、自然界におけるにおけるほとんどの生化学反応は水相で起こる。従って水溶性の基質は工業的な菌体反応での使用に適している。例えば、水可溶性のコンパクチンナトリウム (ML-236B Na) は、プラバスタチン工業的製造の水酸化工程中の基質として使用される(Hosobuchi et al, 1993a; Hosobuchi et al, 1993b)。一方、本研究において基質として使用されたFR901459 は疎水性であるため菌体反応の基質濃度を上げることは大きな課題となる。FR901459 と同様に疎水性を有する CyA 水酸化物の製造に関しこれまでの報告はいずれも基質は 0.083~0.125 mM と低い濃度で用いられている (表 序-2)。

本章ではキナコの使用により高基質濃度で反応速度を向上させることが可能であることを見出した (図 2-7)。図 1-7B に示すようにキナコ不使用の場合 0.615 mM を越える基質濃度では変換率は大きく低下するが、キナコを使用した場合 1.85 mM 基質条件まで変換率は減少しなかった。一方、0.615 mM 基質条件でキナコの有無を比較したところ変換率がほぼ同等であったことから、0.615 mM まではキナコ不使用の条件でも基質濃度が律速になっていないことが示された。

キナコ以外のタンパク質粉体についても高基質濃度で反応速度を向上する能力の有無を調査した。その結果、ダイズに由来するタンパク質粉体は他のものよりも 1.23 mM FR901459 条件の菌体反応においてより高い変換率を示した (図 2-3)。ダイズ油脂は CyA のエマルジョン担体として知られており (Tibell et al, 1995)、ダイズ由来のタンパク質粉体による効果がダイズ油脂によって誘発される可能性を示唆した。しかし、脱脂大豆粉は 1.23 mM FR901459 条件の菌体反応において変換率が高く (図 2-3)、ダイズ油脂がこの効果の原因ではないことが示された。

樹脂の粉体は疎水性分子の基質担体として使用されているため(D'Arrigo, 1997; Kim et al, 2007; Hwang and Liau, 2003)、キナコに含まれるダイズの顆粒 (直径 10 μm 以上) (Uhm and Yoon, 2011; Ousmane et al, 2013) が高基質濃度での反応速度向上に寄与したと仮定した。しかし、キナコ上清のみでも高基質濃度での反応速度の向上効果を示し (図 2-4)、また、キナコ上清は 10 μm 以上の顆粒を含まずその代わりに可溶性タンパク質を有した。このため、高基質濃度での反応速度向上効果はキナコ上清中に存在するダイズ由来の可溶性タンパク質によって引き起こされたと考えた。ダイズのタンパク質は主に  $\beta$ -コングリシニンおよびグリシニンであり、そのサブユニットは約 20~71 kDa (Nishinari et al, 2014; Cui et al, 2013; Shutov et al, 1996)

である。しかしながら、図 2-6 に示すタンパク質の SDS-PAGE の結果は、上清中のタンパク質の大部分が 30 kDa 未満であることを示し、キナコの製造工程中にダイズタンパク質が断片化されたことを示唆している。

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(図 2-5A, B)。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 凝集体を含んでおり、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 FR901459 とキナコ上清との混合物を 5  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過したろ液中に、水に懸濁した FR901459 のろ液中より 17 倍高い濃度の FR901459 を検出した。このためキナコタンパク質に結合した FR901459 の粒子サイズは 5  $\mu\text{m}$  より小さく、水中の FR901459 凝集体は 5  $\mu\text{m}$  より大きいことが示された。キナコ由来のダイズタンパク質と FR901459 が形成する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た(図 2-5A, B)。この様に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。

菌体反応液中の酵素菌体への基質移行に関して 2 つの経路を推測した。(i) *Lentzea* sp. 7887 は水相に溶解した FR901459 を菌体内に取り込んでいる可能性。He ら(He et al, 2013) はダイズタンパク質に、疎水性化合物の水相への溶解速度を向上する性質があることを報告した。(ii) *Lentzea* sp. 7887 は分散した基質との直接接触によって FR901459 を菌体内に取り込んでいる可能性。同様の事例が水/溶媒二相系を用いた菌体反応で観察された(Marcoux et al, 2000; Köhler et al, 1994; Ascon-Cabrera and Lebeault, 1995)。これらの報告では、微生物は水/溶媒界面および水相に溶解した基質で疎水性基質を取り込んでいる。(i)、(ii)いずれの経路でもここに挙げた過去の報告では基質の体積当たりの表面積を増加させることで物質移動が改善されることが示されている(He et al, 2013; Marcoux et al, 2000; Köhler et al, 1994; Ascon-Cabrera and Lebeault, 1995)。

本研究では基質分散剤としてのキナコを使用することで 1.23 mM から 1.85 mM までの高 FR901459 濃度において反応速度を増加させることを見出した(図 2-7)。この効果はキナコの可溶性タンパク質に由来しており、このタンパク質は FR901459 と小さな粒子を形成し、菌体反応液中に基質を効率的に分散させた(図 2-8)。分散された FR901459 は上に挙げた経路(i)および/または(ii)を介して生体触媒細胞に移されると推測した。これらの経路の詳細については今後の検討が待たれる。また、キナコを用いても 2.46 mM FR901459 条件では変換率、変換速度ともに著しく

低下した(図2-2; 図2-7)。これらの菌体反応時の排気中の二酸化炭素濃度を測定したところ、いずれも0.7%(0.25 vvm)であり差がみられなかつたため菌体自身の阻害ではないと考えた。また、種々の放線菌において水酸化酵素シトクロムP450が基質阻害の性質を有することが報告されているため(Lin et al, 2001)、FR901459水酸化に関与する酵素も同様な基質阻害の性質を有すると推測した。

1.23 mM FR901459条件のパイロットスケール( $1\text{ m}^3$ )菌体反応においてcompound1およびcompound6の変換率はそれぞれ11.6%と12.4%であった(表2-4)。反応終了後の反応液は精製工程に供され数段階のクロマトグラフィーを介し約70%の収率でAS1837812を製造した。精製されたAS1837812は抗HCV薬の候補化合物を合成するために使用された。

FR901459を効果的に分散させるための材料をスクリーニングした際、キナコのほかにシリカゲルでも1.23 mM FR901459条件において高い変換率を得た(図2-1)。しかし食品や培養の窒素源として一般的に使用されるキナコに比べシリカゲルはコストおよび環境負荷において劣る。さらにパイロットスケール以上の反応に用いた場合、反応槽の攪拌翼の軸受けを削るという課題が想定されるため検討に適切でないと判断した。

第一章で培養スケールにおける培養液の酵素活性の差異について確認した(表1-5)。フラスコ、30 L培養槽および $1\text{ m}^3$ 培養槽からの培養液の酵素活性についてキナコ不使用の0.615 mM FR901459条件で3 L反応槽を用いて試験し、フラスコおよび $1\text{ m}^3$ 培養槽から得られた培養液の酵素活性には差異の無いことを確認した。しかし、キナコを用いた1.23 mM FR901459条件の場合 $1\text{ m}^3$ 培養槽由来の培養液の活性はフラスコ由来の培養液よりも低く、 $1\text{ m}^3$ 培養槽およびフラスコからの培養液を用いた菌体反応の24時間におけるAS1837812の濃度はそれぞれ0.288 mMおよび0.347 mMであった。これらの結果はキナコの存在下での菌体反応は、培養液の活性によって制限され、基質の反応液中への分散によって制限されないことを示唆している。ここで見られた酵素活性のスケールアップギャップは、培養条件のさらなる検討による解決が待たれる。

本章において1.23 mM FR901459条件のパイロットスケール( $1\text{ m}^3$ )菌体反応を確立した。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。パイロットスケールの製造における菌体反応の基質分散剤としてのキナコの使用はこれまで報告がない。キナコは、低コスト、入手のしやすさ、および低環境負荷などのいくつかの利点を有するため、

本章で確立された方法は他の工業的菌体反応プロセスに適用することができると  
考えた。

## 第五節 図表

表 2-1 菌体反応の反応液組成

反応液組成	キナコ不使用	キナコ使用
1 M リン酸溶液 pH 5.0	0.1 vol.	0.1 vol.
Lentzea sp. 7887 培養液	0.33 vol.	0.33 vol.
20.5 mM FR901459 メタノール溶液	0.03 vol.	—
基質混合液	—	表 2-2 に記載
水	0.54 vol.	反応液量に メスアップ
シリコン KM70	0.05% (最終濃度)	0.05% (最終濃度)
アデカノール LG109	0.05% (最終濃度)	0.05% (最終濃度)

表 2-2 基質混合液組成

反応槽	液量 (L)	基質濃度 (mM)	FR901459		
			メタノール溶液 濃度 (mM)	液量 (mL)	キナコ
					水 (mL)
3 L	1.6	0.615	20.5	48	32
		1.23	41.0	48	32
		1.85	61.5	48	48
		2.46	82.1	48	64
1 m <sup>3</sup>	800	1.23	41.0	24×10 <sup>3</sup>	16×10 <sup>3</sup>
					120×10 <sup>3</sup>

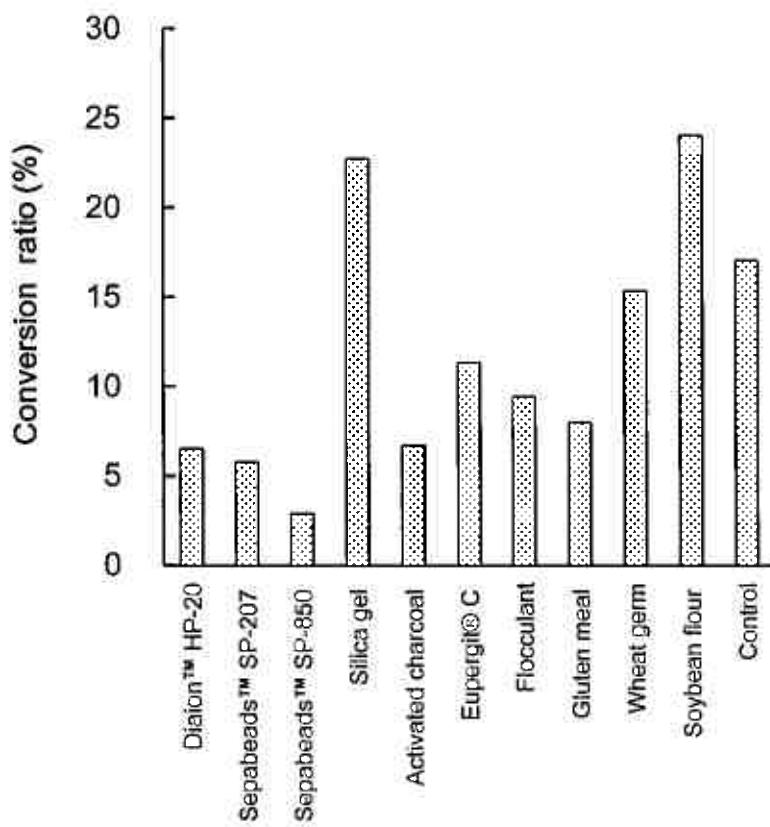


図 2-1 FR901459 を反応液中に効果的に分散する物質のスクリーニング  
各粉体と混合した 1.23 mM FR901459 を *Lentzea* sp. 7887 の培養液を用いて試験管（液量: 3 mL）で反応した。使用した *Lentzea* sp. 7887 の培養は 100 mL フラスコで行った。各データは n=2 で取得し平均の値を用いた。

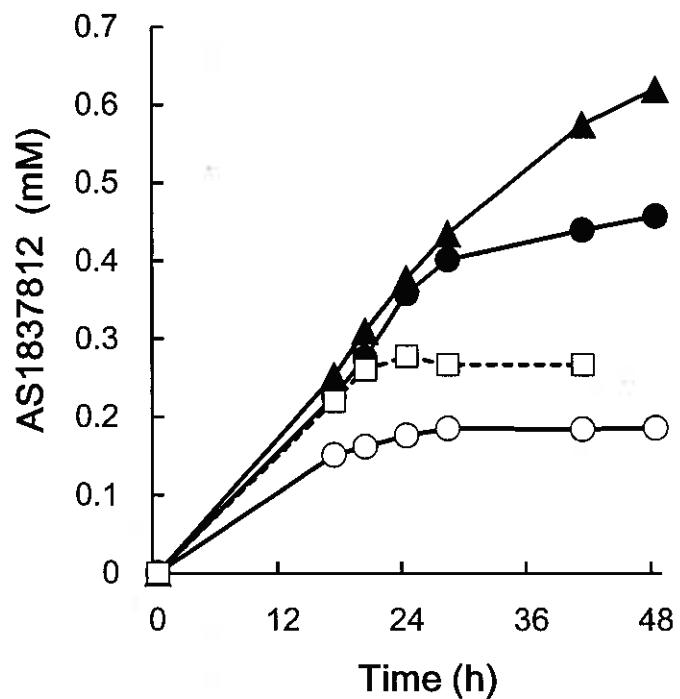


図 2-2 3 L 反応槽でのキナコを用いた *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の推移

菌体反応に用いた *Lentzea* sp. 7887 の培養は 100 mL フラスコを行った。○：キナコ不使用、0.615 mM FR901459; ●：キナコ使用、1.23 mM FR901459; ▲：キナコ使用、1.85 mM FR901459; □：キナコ使用、2.46 mM FR901459

表 2-3 3 L 反応槽でのキナコを用いた *Lentzea* sp. 7887 菌体反応

キナコ	基質 濃度 (mM)	反応 時間 (h)	AS1837812 濃度 (mM)	変換率 <sup>a</sup> (%)		
				AS1837812	Compound 1	Compound 6
不使用 (n=4)	0.615	24	0.197 (0.074) <sup>b</sup>	32.1 (0.074) <sup>b</sup>	10.1 (0.048) <sup>b</sup>	9.00 (0.221) <sup>b</sup>
		48	0.190 (0.059)	30.9 (0.059)	8.63† (0.062)	17.0 (0.473)
	1.23 (n=11)	24	0.347 (0.090)	28.2 (0.090)	9.10 (0.092)	9.27 (0.391)
		48	0.407 (0.105)	33.1 (0.105)	9.34 (0.156)	17.5 (0.351)
使用 (n=10)	1.85	24	0.446 (0.144)	24.1 (0.144)	7.88 (0.142)	5.25 (0.271)
		48	0.589 (0.068)	31.8 (0.068)	9.05 (0.088)	13.7 (0.241)

a 変換率: (生成された水酸化体のモル数/FR901459 モル数)×100

b 相対標準偏差 (RSD: relative standard deviation)

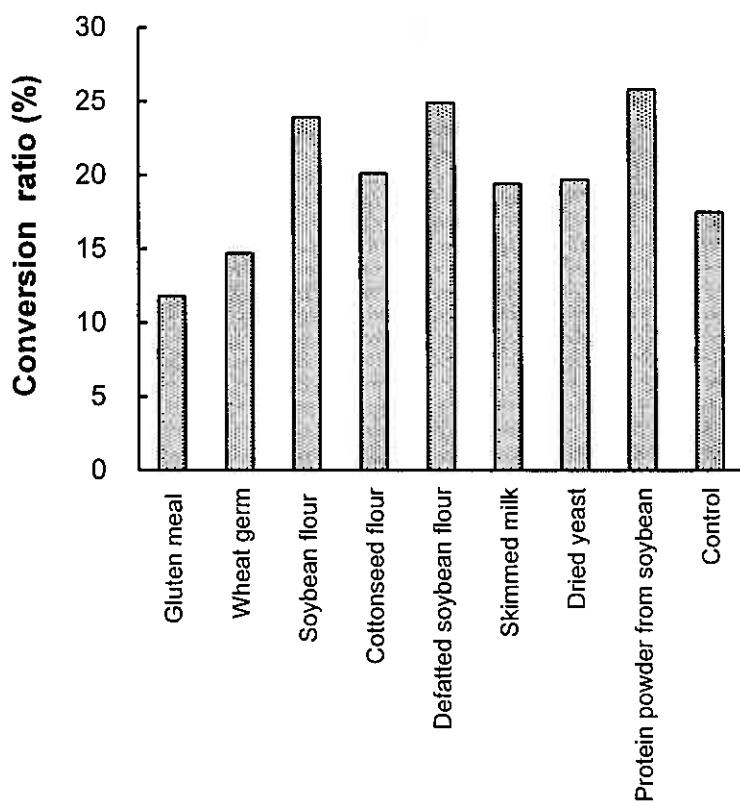


図 2-3 *Lentzea* sp. 7887 菌体反応へのタンパク質粉体添加効果の比較

各タンパク質粉体と混合した 1.23 mM FR901459 を *Lentzea* sp. 7887 の培養液を用いて試験管(液量: 3 mL)で反応した。使用した *Lentzea* sp. 7887 の培養は 100 mL フラスコで行った。各データは n=2 で取得し平均の値を用いた。

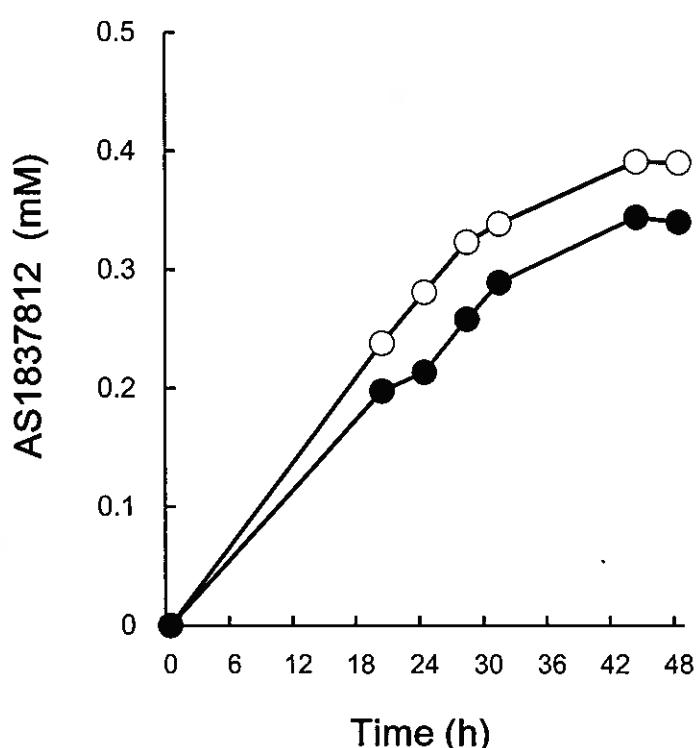


図 2-4 3 L 反応槽でのキナコ上清を用いた *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の推移  
菌体反応に用いた *Lentzea* sp. 7887 の培養は 100 mL フラスコを用いて行った。 ○ : キナコ全体、1.23 mM FR901459; ● : キナコ上清、1.23 mM FR901459

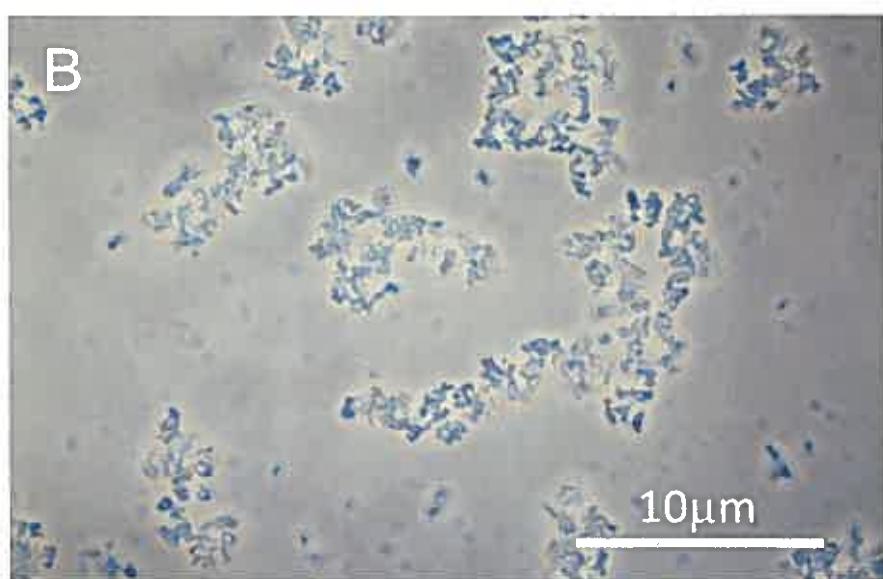
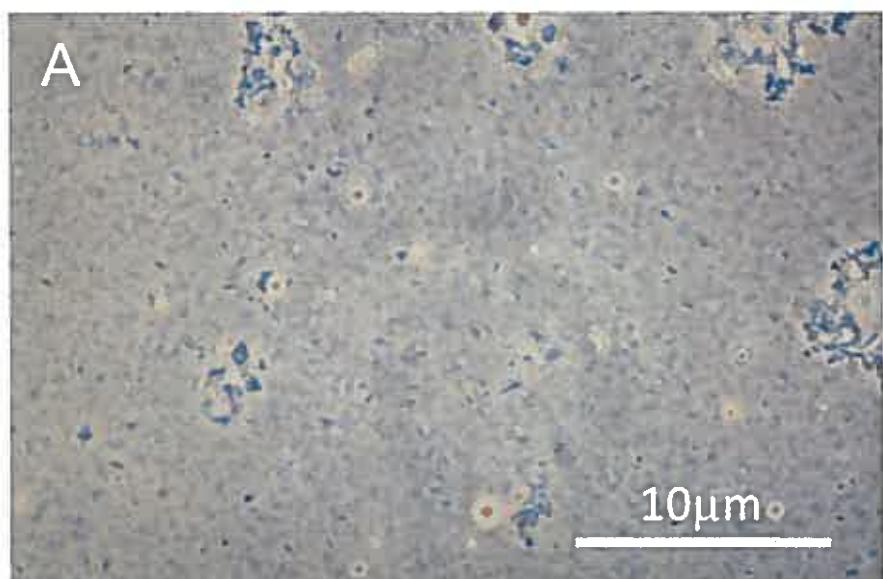


図 2-5 基質混合物の顕微鏡分析

(A) 1.23 mM FR901459 とキナコ上清の混合物; (B) 1.23 mM FR901459 と水との混合物

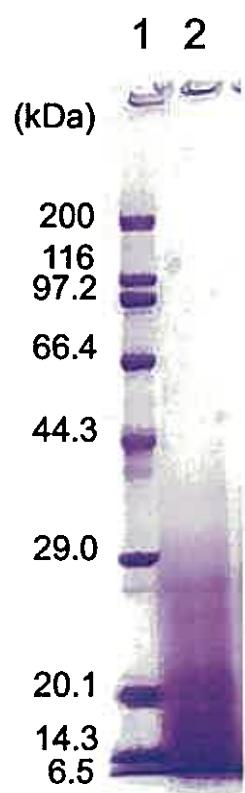


図 2-6 キナコ上清中タンパク質の SDS-PAGE (12.5%)  
レーン 1: 標準タンパク質、レーン 2: キナコ上清中タンパク質

表 2-4 1 m<sup>3</sup> 反応槽でのキナコを用いた *Lentzea sp.* 7887 菌体反応 (液量: 800 L)

基質 キナコ	濃度 (mM)	培養液 (vol.)	反応 時間 (h)	AS1837812 濃度 (mM)	変換率 <sup>a</sup> (%)		
					AS1837812	Compound 1	Compound 6
不使用 (n=10)	0.615	0.33	26	0.213 (0.030) <sup>b</sup>	34.6 (0.030) <sup>b</sup>	10.7 (0.037) <sup>b</sup>	12.6 (0.137) <sup>b</sup>
使用 (n=1)	1.23	0.67	28	0.424	34.5	11.6	12.4

a 変換率: (生成物モル数/FR901459 モル数) × 100

b 相対標準偏差 (RSD: relative standard deviation)

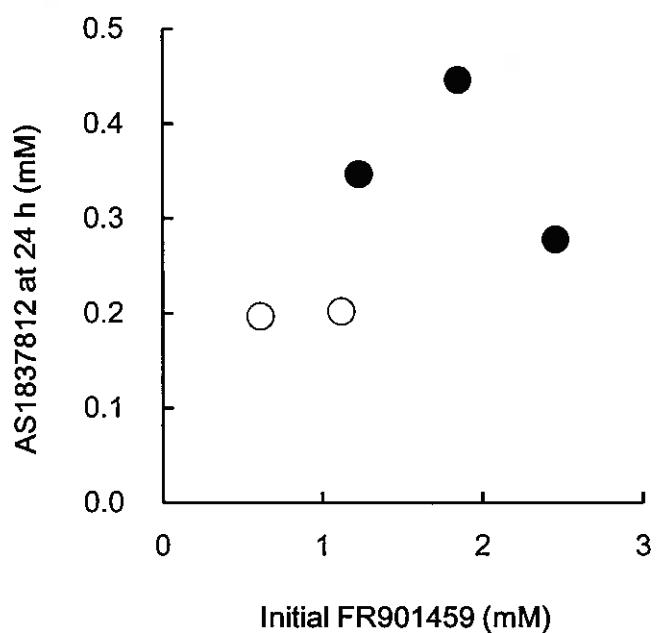


図 2-7 3 L 反応槽を使用した *Lentzea* sp. 7887 菌体反応での基質濃度と 24 時間目の AS1837812 濃度のプロット  
○：キナコ不使用； ●：キナコ使用

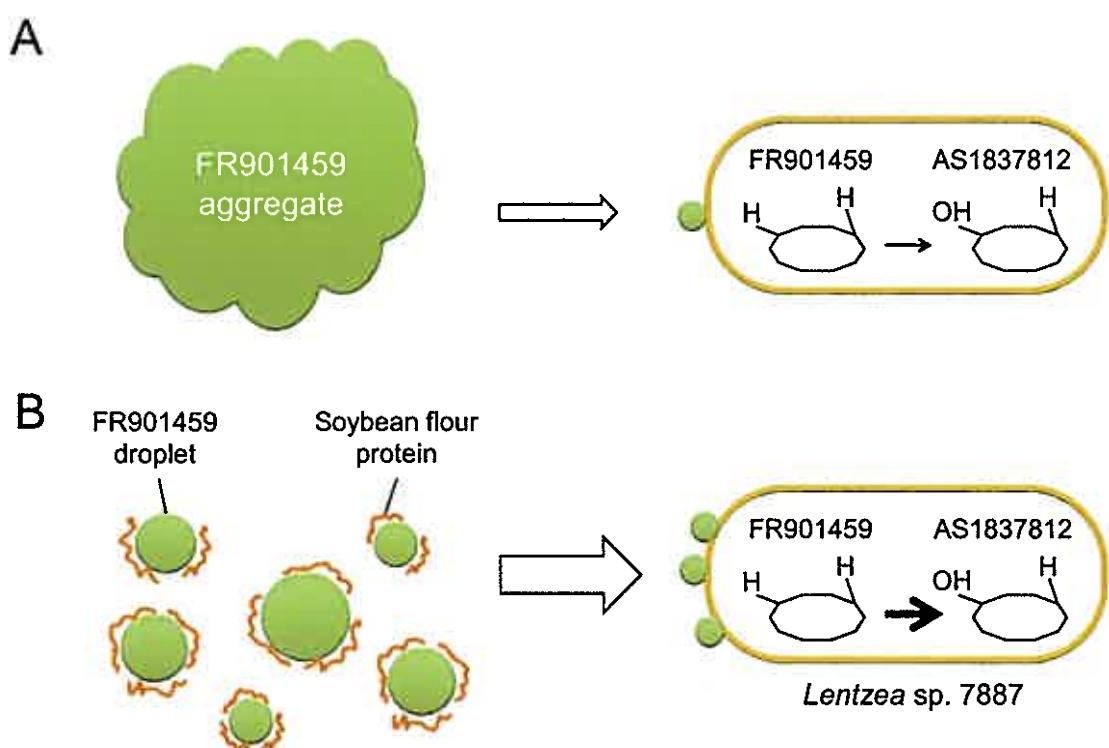


図 2-8 *Lentzea* sp. 7887 菌体反応に関するキナコの効果の模式図

(A)キナコを使用しない菌体反応：FR901459 凝集体からの *Lentzea* sp. 7887 への FR901459 移行速度は低い。 (B) キナコを使用した菌体反応：ダイズタンパク質に吸着した FR901459 の *Lentzea* sp. 7887 への移行速度は高い。白い矢印は基質の移動を示す。黒い矢印は *Lentzea* sp. 7887 内での FR901459 の AS1837812 への水酸化を示す。

### 第三章

*Lentzea* sp. 7887 の育種による

FR901459 水酸化反応の効率化

## 第一節 序

*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応による FR901459 の AS1837812 へ 9 位水酸化反応 (図 1-1)について第一章では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 0.615 mM FR901459 条件の反応を行った。また第二章では新規基質分散剤としてキナコを見出しパイロットスケールでの 1.23 mM FR901459 条件の反応を行い、3 L 反応槽では 1.85 mM FR901459 条件の反応が可能となった (図 2-2 ; 表 2-3)。

またこの菌体反応における AS1837812 の単位容量あたりの収量は Sasamura らの検討では 0.115 mM (Sasamura et al, 2015; 表 序-2) であったが、第一章および第二章の検討の結果、3 L 反応槽を用い基質分散剤(キナコ)を加えた 1.85 mM FR901459 条件で 0.589 mM (表 2-3)と 5.1 倍の向上を得た。一方、基質分散剤を用いても 2.46 mM FR901459 条件では変換率、変換速度ともに著しく低下した (図 2-2; 図 2-7)。これらの菌体反応時の排気中の二酸化炭素濃度を確認したところいずれも 0.7% (0.25 vvm)であり差がみられなかったため菌体そのものが阻害を受けていると考えにくかった。一方、種々の放線菌で水酸化酵素シトクロム P450 の基質阻害が報告されており (Lin et al, 2001)、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推測した。また AS1837812 変換率についてはここまで検討を通じて 40%未満の状態が続いている、その原因は compound 1、compound 6 といった副産物の存在にあると考えた。

本章では *Lentzea* sp. 7887 菌株育種を行い上記 2 つの点を改善し AS1837812 の単位容量あたりの収量を向上することで、より効率的な *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応のプロセス開発を目指した。その際 *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応の酵素本体は単離されていないため、古典的な UV 照射による遺伝子変異を用いた。

## 第二節 材料および方法

### 1) 菌株

*Lentzea* sp. 7887 の UV 変異株 M-1 は本章の検討にて取得した。

### 2) 材料

*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応に用いた FR901459 は *Stachybotrys chartarum* No. 19392 の培養液から単離した (Sakamoto et al, 1993)。AS1837812 および compound 1 は *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応液から単離した (Sasamura et al, 2015)。酵母エキス Bacto pepton、tripptic soy broth およびカザミノ酸は Becton, Dickinson and Company (ニュージャージー州・米国) から購入した。malt extract は Oxoid Limited (ハンプシャー州・英国) から購入した。その他化合物は和光純薬工業株式会社 (大阪・日本) から購入した試薬特級を用いた。

### 3) *Lentzea* sp. 7887 の培養条件

*Lentzea* sp. 7887 の培地組成については表 1-1 に示した。*Lentzea* sp. 7887 菌体の培養条件については容器別に表 1-2 にまとめた。FR901459 水酸化活性の誘導検討のためには最終濃度 1.6  $\mu\text{M}$  FR901459 を反応開始から 18 時間前のフラスコ培養液に加えた。*Lentzea* sp. 7887 の培養終了後、培養液を菌体反応に用いた。

### 4) *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応条件

*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応のため上記条件で調製した培養液を表 2-1 に示す割合で用いた。また他の反応液組成についても表 2-1 に示した。基質分散剤(キナコ)を用いた菌体反応のための基質混合液の組成について表 3-1 にまとめた。3 L 反応槽のスケールでは、FR901459 メタノール溶液とキナコを混合したのち乾燥し 48 mL のメタノールを添加した。*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応の反応条件については容器別に表 1-4 にまとめた。

### 5) *Lentzea* sp. 7887 の変異

*Lentzea* sp. 7887 のプロトプラストは、*Streptomyces clavuligerus* の手順 (Illing et al, 1989) に改変を加えて調製した。まず *Lentzea* sp. 7887 を以下の培地を用いて 100 mL の Erlenmeyer フラスコでシェーカー (260 rpm) 上、30°C、72 時間培養した。20% マルトース 0.63 mL、0.1 M MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.8 mL、20% グリシン 1.5 mL、YEME 培地 (表 3-2) 7.5 mL および TSB 培地 (表 3-3) 8 mL。培養液を 50 mL プラスチックチューブに注ぎ、2000×g で 10 分間遠心分離し、回収した細胞を 20% シュークロースで 2、3 回洗浄した。最終濃度 2 mg/mL のリゾチームを含む P 培地 (表 3-4) に細胞を懸濁し、30°C で 2 時間静置した。2000×g、10 分間の遠心分離にてプロトプラ

ストを回収し P 培地で洗浄した。

プロトプラストを UV 照射し (254 nm、 0.2 mW/cm<sup>2</sup> で 1~3 分間)、再生培地 R5 (表 3-6)を用いてプレート上に広げ、30°C で 1 週間培養した。再生培地上のコロニーを培養プレート(表 3-7)に移し 2 週間後、培養プレート上のコロニーを変異株として選択した。

#### 6) 高変換率および低基質阻害の変異株の選別

図 3-1 に示すように、*Lentzea* sp. 7887 のプロトプラストへの UV 照射によって得られた変異株を 100 mL 容フラスコで培養し、1 次スクリーニングとして試験管を用いた菌体反応を行った。野生株よりも 1.1 倍以上の変換率を示した変異株を用いて、3 L 反応槽での評価を 2 次スクリーニングとして行った。

#### 7) 分析条件

分析条件は第一章 第二節 5) に記載した。

### 第三節 結果

#### 1) *Lentzea* sp. 7887 の変異と変異株 M-1 の取得

FR901459 の菌体反応の単位容量あたりの収量を向上することで、抗 HCV 候補化合物への効率的な AS1837812 供給を目指し *Lentzea* sp. 7887 を変異と得られた株の選別を行いった。その際、菌体反応での高い変換率および高い基質濃度での変換率の維持を指標として用いた(Yabutani et al, 2017b)。

*Lentzea* sp. 7887 のプロトプラスト ( $10^7/\text{mL}$ ; 図 3-2) を UV 照射によって変異させ、培養プレート上で変異株を得た。1 次スクリーニングとして約 900 株のコロニーを採取し、フラスコ培養の後  $0.615 \text{ mM}$  FR901459 の菌体反応を試験管で行い変換率を測定した。次に 1 次スクリーニングにおいて野生株よりも 1.1 倍以上の変換率を示した 7 株の変異株を選別し、2 次スクリーニングとして 3 L 反応槽での反応に使用した。2 次スクリーニングにおいて最も高い変換率を示した変異株を M-1 と命名し以後の検討に用いた。M-1 の培養終了時の PMV( $2000 \times g$ 、10 分間)を測定したところ 100% であった( $n=2$ )。

表 3-8 に示すように基質分散剤(キナコ)を使用しない場合、使用した場合の種々の基質濃度での菌体反応を行った。ここで M-1 は野生株に対し実験 1、2、3 において、それぞれ 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。

#### 2) FR901459 水酸化経路の解析

副生成物である compound 1 および compound 6 が生成されることとは、AS1837812 の変換率が 40% 未満と低く抑えられる一因である(図 1-7A)。そのため FR901459、AS1837812 と 2 つの副生成物の関係について解析することを試みた。野生株(図 3-3、黒抜きの記号)を用いた試験管中の  $0.615 \text{ mM}$  の FR901459 による菌体反応は 24 時間で compound 1 の濃度より 2.7 倍高い AS1837812 濃度をもたらした。次に  $20.1 \text{ mM}$  AS1837812 または  $23.2 \text{ mM}$  compound 1 を基質として試験管での菌体反応に使用した(図 3-4)。その結果 compound 1 から変換された compound 6 の濃度は AS1837812 を用いて得られた濃度より 3.7 倍高かった。AS1837812 および compound 1 の両方が compound 6 に変換されたことから図 3-5 に示す水酸化経路が推測された。

#### 3) 野生株と M-1 の比較

野生株の代わりに M-1 を用いて、基質として FR901459(図 3-3、白抜きの記号)、AS1837812 または compound 1(図 3-4)を使用した菌体反応を行った。M-1 は 24 時間で compound 1 よりも 3.1 倍高い AS1837812 濃度を示した(図 3-3、白抜きの記号)。また野生株より M-1 の方が AS1837812 および compound 1 をゆるやかに

compound 6 に変換したため、M-1 は一水酸化体から二水酸化体への変換速度が低いことが分かった。

#### 4) M-1 による 1.23 mM FR901459 パイロットスケール ( $1\text{ m}^3$ ) 菌体反応

基質分散剤を用いた M-1 による 1.23 mM FR901459 のパイロットスケール( $1\text{ m}^3$ )菌体反応を行った。本検討は使用した菌株を除いて第二章に記載の条件下で実施した。その結果、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 (表 3-9)。

#### 5) 3.69 mM までの FR901459 を基質とした菌体反応

3 L 反応槽において基質分散剤(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(図 3-6)。この結果すべての条件において約 40% の変換率が得られた。低濃度の基質が放線菌の水酸化活性を誘導することが報告されているため(Matsuoka et al, 1989; Romesser and O'Keefe, 1986)、この検討では菌体反応の 18 時間前に M-1 培養液に低濃度の FR901459 (1.6  $\mu\text{M}$ )を添加し菌体反応にかかる時間の短縮を試みた。2.46 mM FR901459 条件での誘導の有無で菌体反応を比較すると、誘導を伴う菌体反応は誘導を伴わないものより約 8 時間早く AS1837812 を生成すること示した(図 3-6)。

#### 第四節 考察

一般的に UV 変異を行う際に変異株を単離する必要があるため、細胞が連なる菌糸を用いることができず、胞子やプロトプラストが用いられる。*Lentzea* sp. 7887 の場合、胞子形成能がないためプロトプラストを用いて変異処理を行った(図 3-2)。プロトプラスト化およびその再生処理は遺伝子導入の際にも用いられる技術であり、今回これが確立したため将来の遺伝子導入検討への応用が期待される。

表 3-8 では M-1 と野生株の 3 L 反応槽での種々の基質濃度での菌体反応の結果が示された。第二章で報告したように野生株による 1.85 mM を越えた FR901459 の菌体反応では基質分散剤が存在しても、基質阻害が原因と考えられる低い変換率を示した(Yabutani et al, 2017a)。実験 3 は 1.85 mM を越える基質条件(2.04 mM)についての試験であったが、M-1 は AS1837812 変換率を保持した。この結果は高い基質濃度に対する酵素の感受性の変化によって引き起こされると推測した。

AS1837812 または compound 1 を基質として野生株を用いた試験管での菌体反応に使用した結果(図 3-4)、AS1837812 および compound 1 の両方が compound 6 に変換されたことから図 3-5 に示す水酸化経路を推測した。FR901459 からは compound 1 より AS1837812 の生成が速く(図 3-3、黒抜きの記号)、compound 6 生成は AS1837812 からより compound 1 からの方が速かった(図 3-4)。このことから 9 位水酸化経路(図 3-5 の a および d) が 1 位水酸化経路(図 3-5 の b および c)よりも速いことが示唆された。

M-1 は 24 時間で compound 1 よりも 3.1 倍高い AS1837812 濃度を示した(図 3-3、白抜きの記号)。これは野生株の同条件での 2.7 倍よりさらに高い値であり、図 3-5 の a/b の比が野生株より高いことを示唆した。M-1 の方が野生株より一水酸化体から二水酸化体への変換速度が低かったため(図 3-4)、M-1 の水酸化経路 c および d(図 3-5)が野生株より遅いことが示された。菌株間のこれらの差異は、菌体反応に関与する酵素の反応特異性の変化に起因すると推測した。

M-1 による 1.23 mM FR901459 のバイロットスケール( $1 \text{ m}^3$ ) 菌体反応の際(表 3-9)、M-1 と野生株の AS1837812/compound 1 の比は、それぞれ 3.5 と 3.0 であり M-1 の方が高かった。さらに compound 1 の変換率において野生株 (11.6%) と M-1 (11.5%)との間にはほとんど差はなかったが、compound 6 の変換率は野生株 (12.4%)に対し M-1 (9.40%) は低かった。これらの結果は、試験管(図 3-3) および 3 L 反応槽(表 3-8、実験 1、2) における検討のものと一致したため、菌株の有する本質的な特徴と考えた。生成された AS1837812 は数種のクロマトグラフィーによる精製の後、結晶化(図 3-7)され抗 HCV 候補化合物の合成に用いられた。

図 3-8 は *Lentzea* sp. 7887 菌体反応の初発 FR901459 濃度と 24 時間時点での AS1837812 のプロットである。基質分散剤であるキナコと UV 変異株 M-1 を用いることで反応速度が基質濃度に比例して増加することが示された。

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 となった(表 3-10)。これは野生株(0.589 mM)の 2.5 倍に相当する。またシクロスボリン A (CyA)水酸化のための菌体反応の単位容量あたりの収量は 0.0120~0.0535 mM として知られており(Kuhnt et al, 1996; Ohta et al, 2005; Ma et al, 2015)、これらと比べ本検討で得た AS1837812 の単位容量あたりの収量が顕著に高いことがわかる。この結果は M-1 の 2 つの特徴によるものと考えた。  
(i) compound 1 や compound 6 といった副産物に対し AS1837812 の生成比率が高いこと。(ii) 高い基質濃度に対し変換率を維持すること。

*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応は現在の条件下では菌体系でしか機能しない。レドックスパートナーを追加しても無細胞反応系での再現ができないためである。したがって、この菌体反応に関与するタンパク質および遺伝子を同定できていない。将来 2 つの菌株間のゲノム比較解析をすることでこの反応の生化学的情報がもたらされることが期待される。

## 第五節 図表

表 3-1 基質混合液組成

反応槽	液量 (L)	基質 濃度 (mM)	FR901459		キナコ (g)	乾燥後 メタノール添加 (mL)	水 (mL)
			メタノール溶液 濃度 (mM)	液量 (mL)			
3 L	1.6	1.23	41.0	48	32	48	240
		1.85	41.0	72	48	48	240
		1.85	61.5	48	48	48	240
		2.04	45.1	72	48	48	240
		2.46	41.0	96	48	48	240
		3.08	61.5	80	48	48	240
		3.69	61.5	96	48	48	240
1 m <sup>3</sup>	800	1.23	41.0	24×10 <sup>3</sup>	16×10 <sup>3</sup>	N/A	120×10 <sup>3</sup>

表 3-2 YEME 培地組成 (1 L 中)

シュークロース	340 g
グルコース	10 g
酵母エキス	3 g
Bacto peptone	5 g
Malt extract	3 g

滅菌: 121.5°C 20 分

表 3-3 TSB 培地組成 (1 L 中)

Triptic soy broth	40 g
-------------------	------

滅菌: 121.5°C 20 分

表 3-4 P 培地組成 (1 L 中)

シュークロース	103 g
MgCl <sub>2</sub>	2.03 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
微量元素 (表 3-5)	2 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.005 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (別滅菌添加)	4.9 g
TES (別滅菌添加)	25 mM

滅菌: 121.5°C 20 分

表 3-5 微量元素組成 (1 L 中)

ZnCl <sub>2</sub>	0.04 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.2 g
CuSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.01 g
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0.01 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.01 g

表 3-6 再生培地 R5 組成 (1 L 中)

シュークロース	100 g
可溶性デンプン	10 g
MgCl <sub>2</sub>	5.1 g
カザミノ酸	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g
アルギニン塩酸塩	2.5 g
微量元素 (表 3-5)	1 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 g
アガロース	20 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (別滅菌添加)	3.7 g
0.25 M TES (別滅菌添加)	100 mL

滅菌: 121.5°C 20 分

表 3-7 培養プレート組成 (1 L 中)

可溶性デンプン	10 g
酵母エキス	2 g
アガロース	16 g
pH	7.0 NaOH にて調整

滅菌: 121.5°C 20 分

- (1) プロトプラスト調製
- (2) UV 照射による変異 (254 nm、0.2 mW/cm<sup>2</sup>で1~3分間)
- (3) プロトプラスト再生 (1週間)
- (4) 培養プレートへの植え継ぎ (2週間)
- (5) 約900株を変異株として選択
- (6) 1次スクリーニング：試験管を用いた菌体反応
- (7) 野生株よりも1.1倍以上の変換率を示した変異株を選択 (7株)
- (8) 2次スクリーニング：3L反応槽での菌体反応
- (9) 最も高い変換率を示した変異株を選択(1株、M-1と命名)

図 3-1 *Lentzea* sp. 7887 株の菌株育種手順

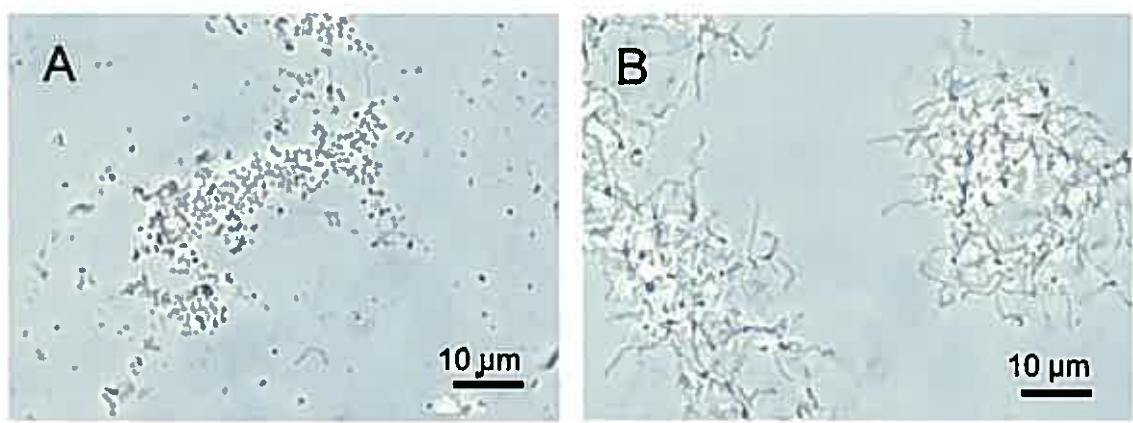


図 3-2 *Lentzea* sp. 7887 のプロトプラスト

(A) プロトプラスト化処理後 (B) プロトプラスト化処理なし

表 3-8 3 L 反応槽での野生株と M-1 の菌体反応の比較

実験 キ ナ コ	基質 濃度 (mM)	反応 時間 (h)	菌株	AS1837812		変換率 <sup>a</sup> (%)	
				AS1837812		Compound 1	Compound 6
				濃度 (mM)			
1 不 使 用	0.615	24	野生株 (n=9)	0.197 (0.059) <sup>b</sup>	32.0 (0.059) <sup>b</sup>	9.44 (0.079) <sup>b</sup>	8.52 (0.164) <sup>b</sup>
			M-1 (n=2)	0.224 <sup>†</sup> (0.011)	36.3 <sup>†</sup> (0.011)	9.84 (0.004)	6.08 <sup>*</sup> (0.059)
2 使 用	1.23	48	野生株 (n=11)	0.407 (0.105)	33.1 (0.105)	9.34 (0.156)	17.5 (0.351)
			M-1 (n=4)	0.486 <sup>‡</sup> (0.041)	39.5 <sup>‡</sup> (0.041)	10.9 <sup>‡</sup> (0.023)	11.5 <sup>†</sup> (0.080)
3 使 用	2.04	72	野生株 (n=1)	0.491 ( - )	24.1 ( - )	8.14 ( - )	3.53 ( - )
			M-1 (n=1)	0.757 ( - )	37.1 ( - )	10.2 ( - )	15.5 ( - )

a 変換率: (生成された水酸化体のモル数/FR901459 モル数)×100

b 相対標準偏差 (RSD: relative standard deviation)

T 検定 (0.615 mM FR901459 条件 24 時間目に対する試験): \*, P <0.05; †, P <0.01; ‡  
P <0.005

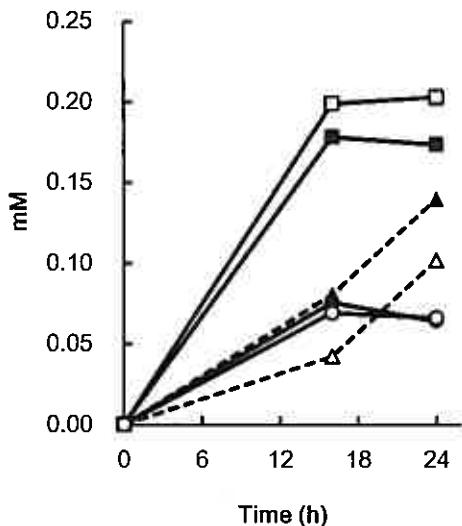


図 3-3 野生株および M-1 の試験管 (液量 3 mL) での 0.615 mM FR901459 条件の  
菌体反応。各データは  $n=2$  で取得し平均の値を用いた。*Lentzea* sp. 7887 は  
100 mL フラスコで培養した。黒抜き記号: 野生株; 白抜き記号: M-1; ■  
□: AS1837812; ●○: compound 1; ▲△ : compound 6

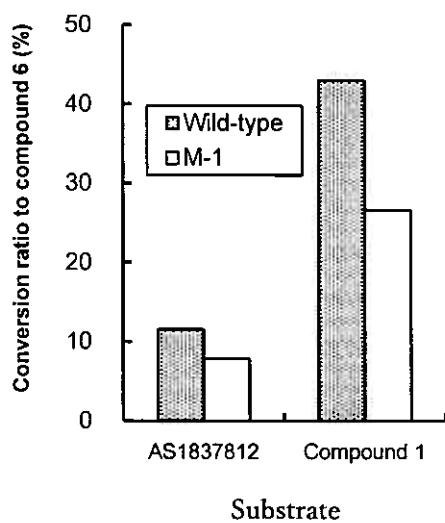


図 3-4 野生株および M-1 の試験管 (液量 3 mL) での 0.604 mM AS1837812 もしくは  
0.695 mM compound 1 を基質とした菌体反応による compound 6 の生成。各  
データは  $n=2$  で取得し平均の値を用いた。*Lentzea* sp. 7887 の培養は 100 mL  
フラスコで行った。反応時間は 16 時間。

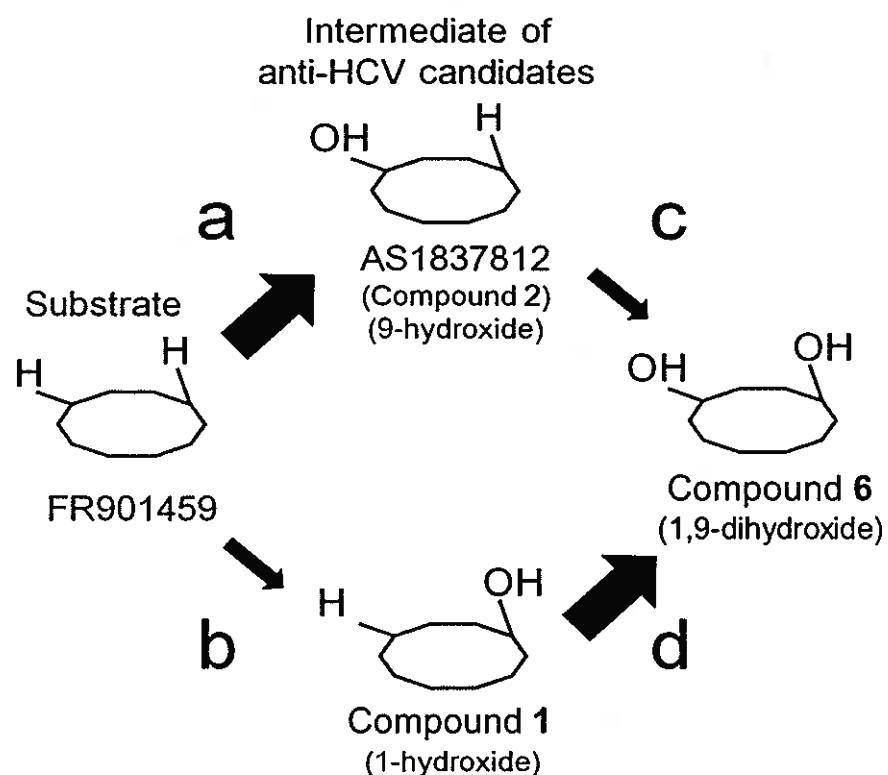


図 3-5 推測された FR901459 の水酸化経路

表 3-9 1 m<sup>3</sup> 反応槽でのキナコを用いた *Lentzea sp.* 7887 菌体反応  
液量 : 800 L、基質 : 1.23 mM FR901459、反応時間 : 28 時間

菌株	n	濃度 (mM)	変換率 <sup>a</sup> (%)		
			AS1837812	Compound 1	Compound 6
野生株	1	0.424	34.5	11.6	12.4
M-1	3	0.491 (0.021) <sup>b</sup>	39.9 (0.021) <sup>b</sup>	11.5 (0.028) <sup>b</sup>	9.40 (0.207) <sup>b</sup>

a 変換率: (生成物モル数/FR901459 モル数) × 100

b 相対標準偏差 (RSD: relative standard deviation)

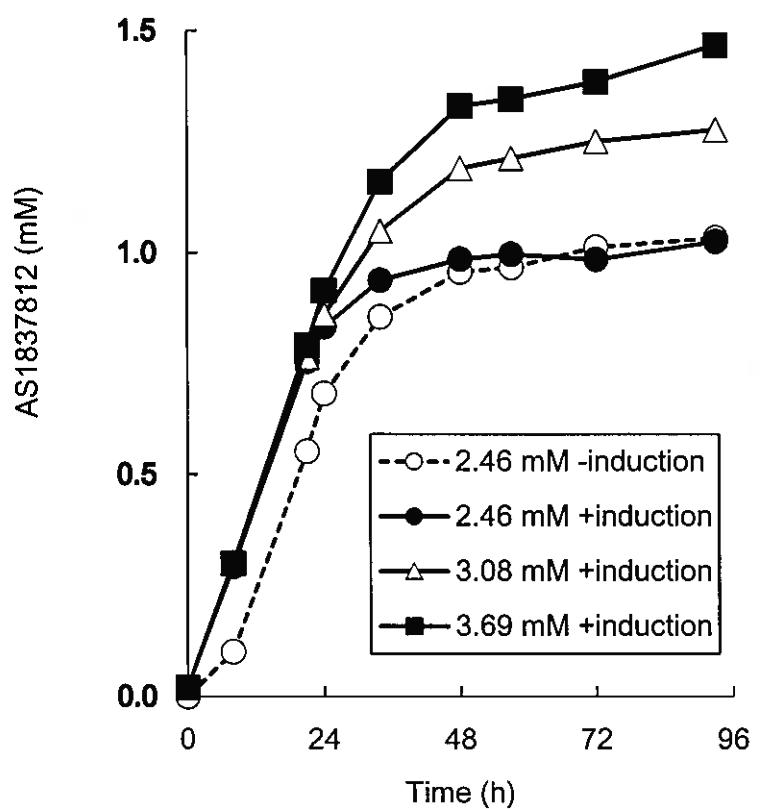


図 3-6 M-1 を用いた 3.69 mM FR901459 濃度までの菌体反応

反応は 3 L 反応槽で行い、基質分散剤（キナコ）を使用した。酵素活性の誘導剤として反応開始 18 時間前に  $1.6 \mu\text{M}$  FR901459 を 100 mL フラスコ中の M-1 培養液に添加した。

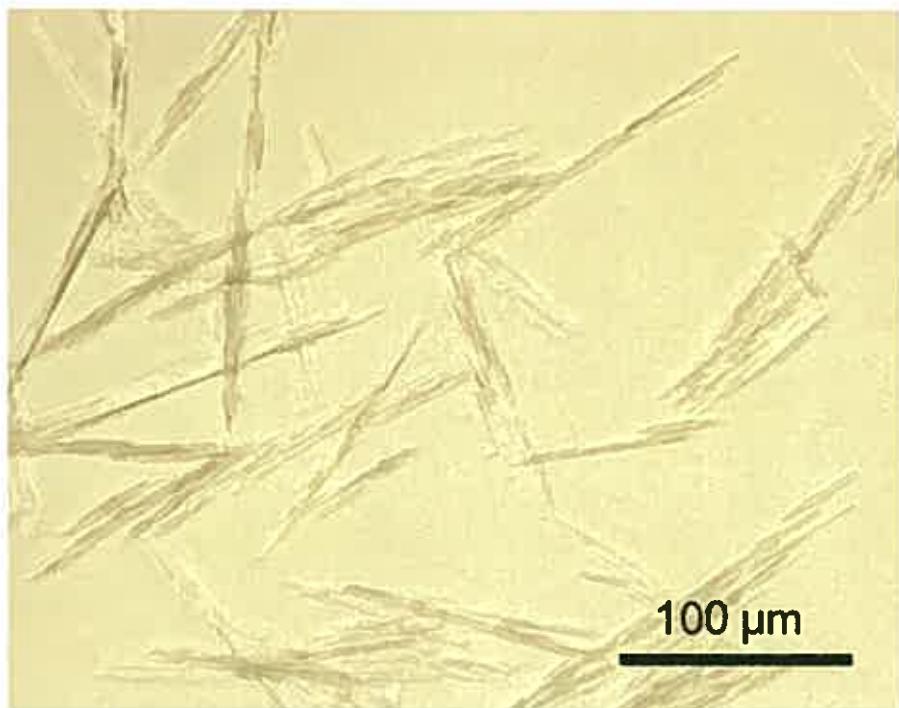


図 3-7 1 m<sup>3</sup> 反応槽を用いた菌体反応で得られた AS1837812 を、精製処理して得られた結晶

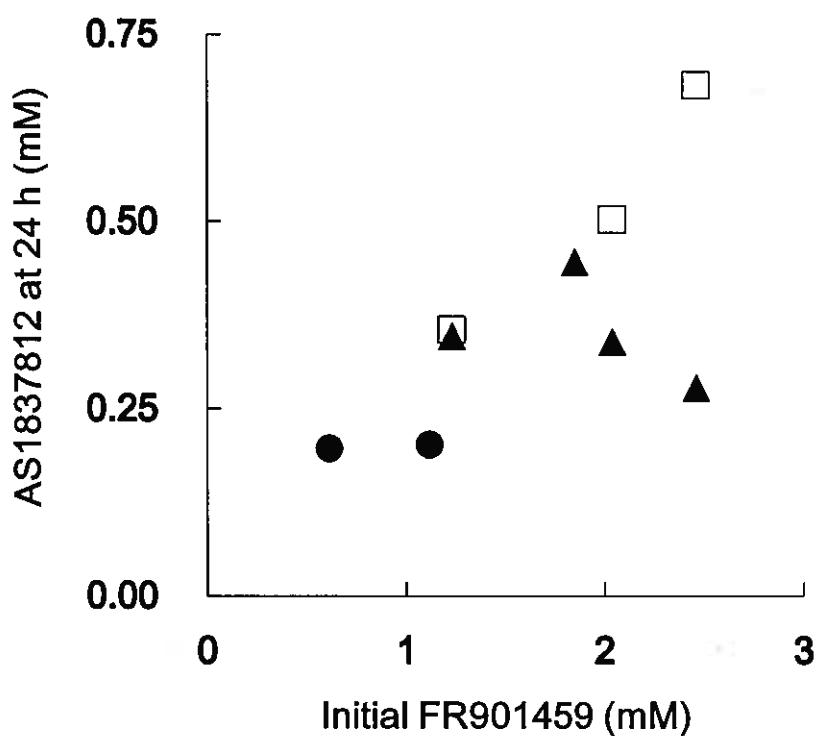


図 3-8 菌体反応の初発 FR901459 濃度と 24 時間時点での AS1837812 のプロット  
 反応は 3 L 反応槽で行い、培養液は酵素活性の誘導を用いない条件のものを  
 使用した。●：野生株による基質分散剤(キナコ)を用いない反応、▲：野生株  
 による基質分散剤を用いた反応、□：M-1 による基質分散剤を用いた反応

表 3-10 CyA および FR901459 の水酸化反応

菌株	基質	基質濃度 (mM)	生成物	変換率 <sup>a</sup> (%)	生成物 濃度 (mM)	参照
<i>Sebekia benihana</i> NRRL1111	CyA	0.125	4-hydroxy-CyA	34.5	0.0431	Kuhnt et al, 1996
<i>Dactylosporangium</i> <i>variesporum</i> IFO 14104	CyA	0.083	1-hydroxy-CyA	14.4	0.0120	Ohta et al, 2005
Recombinant <i>Escherichia coli</i>	CyA	0.1	4-hydroxy-CyA	52.3	0.0535	Ma et al, 2015
<i>Lentzea</i> sp. 7887 野生株	FR901459	0.41	AS1837812	28	0.115	Sasamura et al, 2015
<i>Lentzea</i> sp. 7887 野生株	FR901459	0.615	AS1837812	32.5	0.200	Yabutani et al, 2017a (第一章)
<i>Lentzea</i> sp. 7887 野生株	FR901459	1.85	AS1837812	31.8	0.589	Yabutani et al, 2017a (第二章)
<i>Lentzea</i> sp. 7887 M-1	FR901459	3.69	AS1837812	39.8	1.47	Yabutani et al, 2017b (第三章)

a 変換率: (生成物モル数/FR901459 モル数) × 100

## 第四章

### 総合考察

## 第一節 今後の課題

シクロスボリン A (CyA)類縁体である FR901459 (図 1-1)の 9 位水酸化体 AS1837812(図 1-1)は抗 C 型肝炎ウイルス(HCV)剤の開発候補化合物の中間体として重要な構造を有する。本研究では *Lentzea* sp. 7887 の菌体反応により AS1837812 を効率的に供給するため、単位容量あたりの収量の向上およびスケールアップを行った。

第一章ではパイロットスケールでの菌体反応を目指し、培養条件・反応条件を最適化した。その際酢酸溶液・リン酸溶液(図 1-3)およびメタノール濃度と基質濃度(図 1-4)の検討に関して、AS1837812 (9 位水酸化体)の変換率と compound 1 (1 位水酸化体)の変換率が高い相関を示した。このことから、9 位と 1 位の水酸化反応は同一の酵素が関与すると推測した。しかしこの菌体反応に関与する酵素および遺伝子を同定できていない。*Lentzea* sp. 7887 の菌体反応は現在の条件下では菌体系でしか機能せず、レドックスパートナーを追加しても無細胞反応系での再現ができないためである。今後このタンパク質および遺伝子の同定を行い 9 位と 1 位の水酸化反応が同一の酵素によってなされる直接的な証明が期待される。

第二章では基質の濃度向上のため疎水性である FR901459 を反応系に効率よく分散させる分散剤を探索した。検討の結果キナコが高濃度基質条件において反応速度を向上させることを見出し、3 L 反応槽において 1.85 mM までの反応を可能とした(表 2-3)。この分散剤としてのキナコの効果についてはキナコ中のダイズタンパク質が FR901459 と結合し FR901459 の粒子サイズを小さくし体積当たりの表面積を増大することに起因すると考えた。一方、*Lentzea* sp. 7887 菌体が水層に溶解した FR901459 を取り込んでいるのか、直接接触した FR901459 を取り込んでいるのかについては結論が出ていない。*Lentzea* sp. 7887 菌体の FR901459 取り込み経路については今後の研究が待たれる。

また、1 m<sup>3</sup> 培養槽で培養した培養液の酵素活性がフラスコによる培養液のものよりも低いことが分かった。これは分散剤(キナコ)を用いることにより、反応の律速が基質輸送速度から酵素活性に変わったために明らかになったと考えた。本研究では培養液量を増やすことで対応したが酵素活性のスケールアップギャップは今後の検討により解消されるべき課題である。

第三章では UV 変異による菌株改良により M-1 株を取得した。M-1 株は野生株に比べ FR901459 菌体反応の変換率が約 1.2 倍に向上し(表 3-8; 表 3-9)、また野生株の 2 倍(3.69 mM)での基質濃度の酵素反応が可能となった(図 3-6)。これらの結果から 3 L 反応槽での反応において野生株の 2.5 倍の単位容量あたりの収量を実現した(表 3-10)。一方で M-1 株を用いたパイロットスケール(1 m<sup>3</sup>)での反応では 1.23 mM までの基質濃度しか行っておらず(表 3-9)、高濃度基質反応のスケールアップは今後の課題として残った。

UV 変異の場合、変異が遺伝子のどこに導入されたか調べるために菌株間のゲノム比較解析といった検討が必要となり現時点では十分な解析がなされていない。このため今後の分子生物学的手法を用いた考察が期待される。

## 第二節 今後の展開

菌体反応を利用した製造プロセス開発では培養槽・反応槽といった設備が反応スケールを決める要因になる場合が多い。特に開発初期の段階では既存の設備を使う方が、プロセスに合わせた設備を新設するより一般的だからである。設備により反応スケールが規定された場合、生成量を向上させるためには単位容量あたりの収量を上げることが重要となる。単位容量あたりの収量を上げずにロット数を増やすことで最終的な生成量を向上させるという選択肢もあるが、ロットが増えるとそれぞれのロットの品質管理、製品の安定性の試験が発生し多大な労力が必要となる。本研究では単位容量あたりの収量の向上を目指し、検討を始める前と比較し 12.8 倍高い単位容量あたりの収量を得ることができた(表 3-10)。

本研究で単位容量あたりの収量の向上に貢献した要因のひとつに、新規分散剤として見いだされたキナコの利用による高い基質濃度での菌体反応が挙げられる。キナコは安価で入手が容易であり安全性も確保されているため FR901459 のような CyA 類縁体である FR901459 だけでなく、それ以外の疎水性基質の反応液中への分散に利用が可能と考えられる。

本研究において最終的な FR901459 の AS1837812 への変換率は約 40% であった(表 3-10)。変異株 M-I の取得などにより向上したといえより高い変換率が求められる。その場合ひとつの可能性としては反応後に残った基質の再利用が挙げられる。FR901459 は水酸化体に対しクロマトグラムの保持時間が大きく異なる。例えば分析に用いた HPLC の系では FR901459、AS1837812、compound 1 および compound 6 の保持時間はそれぞれ 14.7 分、5.3 分、6.7 分、3.1 分である。この違いを用いて精製工程の比較的初期の段階で FR901459 を回収し次回のロットに基質の一部として用いることで、見かけの変換率を向上することが可能である。これは AS1837812 の単位容量あたりの収量の向上において、有望な手法であり将来の検討が待たれる。

## 引用文献

- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. (1989) Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med.* 321(22):1494–1500.
- Alter MJ. (1997) Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology.* 26:62S–65S.
- Ascon-Cabrera M, Lebeault JM (1995) Interfacial area effects of a biphasic aqueous/organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43:1136–1141.
- Billich A, Zocher R. (1987) Enzymatic synthesis of cyclosporin A. *J Biol Chem.* 262:17258–17259.
- Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. (2002) Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem.* 3:619–627.
- Borel JF. (1976) Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 31:631–641.
- Christians U, Strohmeyer S, Kownatzki R, Schiebel HM, Bleck J, Kohlhaw K, Schottmann R, Sewing KF. (1991) Investigations on the metabolic pathways of cyclosporine: II. Elucidation of the metabolic pathways in vitro by human liver microsomes. *Xenobiotica.* 21:1199–1210.
- Cui C, Zhao M, Yuan B, Zhang Y, Ren J. (2013) Effect of pH and pepsin limited hydrolysis on the structure and functional properties of soybean protein hydrolysates. *J Food Sci.* 78: C1871–C1877.
- Cuthbert JA. (1990) Hepatitis C. *Am J Med Sci.* 299:346–355.
- D'Arrigo P, Fuganti C, Fantoni GP, Servi S. (1997) The effect of absorbing resins on substrate concentration and enantiomeric excess in yeast reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* 8: 2375–2379.
- de Carvalho CC. (2011) Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. *Biotechnol Adv.* 29:75–83.

de Carvalho CC. (2017) Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microb Biotechnol.* 10:250–263

Desimone MF, Degrossi J, D'Aquino M, Diaz LE. (2003) Sol-gel immobilisation of *Saccharomyces cerevisiae* enhances viability in organic media. *Biotechnol Lett* 25:671–674

Dittmann J, Wenger RM, Kleinkauf H, Lawen A. (1994) Mechanism of cyclosporin A biosynthesis. Evidence for synthesis via a single linear undecapeptide precursor. *J Biol Chem* 269:2841–2846.

Dreyfuss M, Harri E, Hofmann H. (1976) Cyclosporin A and C: new metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *Eur J Appl Microbiol.* 3:125–133.

Flisiak R, Dumont JM, Crabbé R. (2007) Cyclophilin inhibitors in hepatitis C viral infection. *Expert Opin Investig Drugs.* 16:1345–1354.

Fruiman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:3686–3690.

Goswami P, Singh HD. (1991) Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol Bioeng.* 37:1–11.

Goto K, Watashi K, Murata T, Hishiki T, Hijikata M, Shimotohno K. (2006) Evaluation of the anti-hepatitis C virus effects of cyclophilin inhibitors, cyclosporin A, and NIM811. *Biochem Biophys Res Commun.* 343:879–884.

Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. (2014) Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 61:S45–S57.

He W, Lu Y, Qi J, Chen L, Hu F, Wu W. (2013) Food proteins as novel nanosuspension stabilizers for poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm.* 441:269–278.

Handschoen RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226:544–547.

Hopkins S, Scorneaux B, Huang Z, Murray MG, Wring S, Smitley C, Harris R, Erdmann F, Fischer G, Ribeill Y. (2010) SCY-635, a novel nonimmunosuppressive analog of cyclosporine that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:660–672.

Hopkins S, DiMassimo B, Rusnak P, Heuman D, Lalezari J, Sluder A, Scorneaux B, Mosier S, Kowalczyk P, Ribeill Y, Baugh J, Gallay P. (2012) The cyclophilin inhibitor SCY-635 suppresses viral replication and induces endogenous interferons in patients with chronic HCV genotype 1 infection. *J Hepatol.* 57:47–54.

Hori K, Matsuzaki Y, Tanji Y, Unno H. (2002) Effect of dispersing oil phase on the biodegradability of a solid alkane dissolved in non-biodegradable oil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59:574–579.

Hosobuchi M, Kurosawa K, Yoshikawa H. (1993a) Application of computer to monitoring and control of fermentation process: Microbial conversion of ML-236B Na to pravastatin, *Biotechnol Bioeng.* 42:815–820.

Hosobuchi M, Shiori T, Ohyama J, Arai M, Iwado S, Yoshikawa H. (1993b) Production of ML-236B, and Inhibitor of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reductase. *Biosci Biotech Biochem.,* 57:1414–1419.

Houng JY, Liau JS. (2003) Applying slow-release biocatalysis to the asymmetric reduction of ethyl 4-chloroacetoacetate. *Biotechnol Lett.* 25:17–21.

Hubler F, Rückle T, Patiny L, Muamba T, Guichou JF, Mutter M, Wenger R. (2000) Synthetic routes to NEtXaa<sup>4</sup>-cyclosporin A derivates as potential anti-HIV I drugs. *Tetrahedron Letters.* 41:7193–7196.

Hummel W and Gröger H. (2014) Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed loop recycling systems. *J Biotechnol.* 191:22–31.

IARC. (1990) Pharmaceutical drugs. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 50:77–114.

Illing GT, Normansell ID, Peberdy JF. (1989) Protoplast isolation and regeneration in *Streptomyces clavuligerus*. *J Gen Microbiol.* 135:2289–2297.

Inoue K, Sekiyama K, Yamada M, Watanabe T, Yasuda H, Yoshioka M. (2003) Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. *J Gastroenterol.* 38:567–572.

Ismailos G, Repas C, Dressman JB, Macheras P. (1991) Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media. *J Pharm Pharmacol.* 43:287–289.

Jimenez IY, Bartha R. (1996) Solvent-Augmented Mineralization of Pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol.* 62:2311–2316.

Johnston A, Marsden JT, Hla KK, Henry JA, Holt DW. (1986) The effect of vehicle on the oral absorption of cyclosporin. *Br J Clin Pharmacol.* 21:331–333.

Kara S, Spickermann D, Schrittwieser JH, Leggewie C, van Berkel WJH, Arends IWCE, Hollmann F. (2013) More efficient redox biocatalysis by utilising 1,4-butanediol as a “smart cosubstrate”. *Green Chem.* 15:330–335.

Kim PY, Pollard DJ, Woodley JM. (2007) Substrate supply for effective biocatalysis. *Biotechnol Prog.* 23:74–82.

Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH, Alter HJ. (1990) Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology.* 12:671–675.

Köhler A, Schüttoff M, Bryniok D, Knackmuß HJ. (1994) Enhanced biodegradation of phenanthrene in a biphasic culture system, *Biodegradation.* 5:93–103.

Kovarik JM, Mueller EA, van Bree JB, Tetzloff W, Kutz K. (1994) Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *J Pharm Sci.* 83:444–446.

Kuhnt M, Bitsch F, France J, Hofmann H, Sanglier JJ, Traber R. (1996) Microbial biotransformation products of cyclosporin A. *J Antibiot (Tokyo).* 49:781–787.

Labeda DP, Hatano K, Kroppenstedt RM, Tamura T. (2001) Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 51:1045–1050.

Lee MJ, Kim HB, Yoon YJ, Han K, Kim ES. (2013) Identification of a cyclosporine-specific P450 hydroxylase gene through targeted cytochrome P450 complement (CYPome) disruption in *Sebekia benihana*. Appl Environ Microbiol 79:2253–2262.

Lee SD, Kim ES, Roe JH, Kim J, Kang SO, Hah YC. (2000) *Saccharothrix violacea* sp. nov., isolated from a gold mine cave, and *Saccharothrix albidocapillata* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 50:1315–1323.

Lemaire M, Maurer G, Wood AJ. (1986) Cyclosporin. Pharmacokinetics and metabolism. Prog Allergy. 38:93–107.

Lin Y, Lu P, Tang C, Mei Q, Sandig G, Rodrigues AD, Rushmore TH, Shou M. (2001) Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions. Drug Metab Dispos. 229:368–74.

Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science. 285:110–113.

Loor F, Tiberghien F, Wenandy T, Didier A, Traber R. (2002) Cyclosporins: structure-activity relationships for the inhibition of the human FPR1 formylpeptide receptor. J Med Chem. 45:4613–4628.

Ma L, Du L, Chen H, Sun Y, Huang S, Zheng X, Kim ES, Li S. (2015) Reconstitution of the *In Vitro* Activity of the Cyclosporine-Specific P450 Hydroxylase from *Sebekia benihana* and Development of a Heterologous Whole-Cell Biotransformation System. Appl Environ Microbiol. 81:6268–6275.

Marcoux J, Déziel E, Villemur R, Lépine F, Bisaillyon JG, Beaudet R. (2000) Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation in a two-liquid-phase bioreactor. J Appl Microbiol. 88:655–662.

Marks AR. (1996) Cellular functions of immunophilins. Physiol Rev 76:631–649.

Matsuoka T, Miyakoshi S, Tanzawa K, Nakahara K, Hosobuchi M, Serizawa N. (1989) Purification and characterization of cytochrome P-450sca from *Streptomyces carbophilus*. ML-236B (compactin) induces a cytochrome P-450sca in *Streptomyces carbophilus* that hydroxylates ML-236B to pravastatin sodium (CS-514), a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase. Eur J Biochem. 184:707–713.

Membreño FE, Espinales JC, Lawitz EJ. (2013) Cyclophilin inhibitors for hepatitis C therapy. Clin Liver Dis. 17:129–139.

Miyake K, Arima H, Irie T, Hirayama F, Uekama K. (1999) Enhanced absorption of cyclosporin A by complexation with dimethyl-beta-cyclodextrin in bile duct-cannulated and -noncannulated rats. Biol Pharm Bull. 22:66–72.

Moraga NB, Poma HR, Amoroso MJ, Rajal VB. (2014) Isolation and characterization of indigenous *Streptomyces* and *Lentzea* strains from soils containing boron compounds in Argentina. J Basic Microbiol. 54:568–577.

Muramatsu Y, Furuichi Y, Tojo N, Moriguchi A, Maemoto T, Nakada H, Hino M, Matsuoka N. (2007) Neuroprotective efficacy of FR901459, a novel derivative of cyclosporin A, in vitro mitochondrial damage and in vivo transient cerebral ischemia models. Brain Res. 1149:181–190.

Muschiol J, Peters C, Oberleitner N, Mihovilovic MD, Bornscheuer UT, Rudroff F. (2015) Cascade catalysis--strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. 51:5798–5811.

Nagasawa T, Mathew CD, Mauger J, Yamada H. (1988) Nitrile Hydratase-Catalyzed Production of Nicotinamide from 3-Cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1. Appl Environ Microbiol. 54:1766–1769.

Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, Koyama T, Itsui Y, Takeda Y, Chen CH, Kakinuma S, Oooka S, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. (2005) Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. Gastroenterology. 129:1031–1041.

Nakamura K, Matsuda T, Harada T. (2002) Chiral synthesis of secondary alcohols using *Geotrichum candidum*. Chirality. 14:703–708.

Nair NR, Nampoothiri KM, Pandey A. (2012) Preparation of poly(L-lactide) blends and biodegradation by *Lentzea waywayandensis*. *Biotechnol Lett.* 34:2031–2035.

Naoumov NV. (2014) Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases. *J Hepatol.* 61:1166–1174.

Nishinari K, Fang Y, Guo S, Phillips GO. (2014) Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids.* 39:301–318.

Ohta K, Agematu H, Yamada T, Kaneko K, Tsuchida T. (2005) Production of human metabolites of cyclosporin A, AM1, AM4N and AM 9, by microbial conversion. *J Biosci Bioeng.* 99:390–395.

Onoue S, Sato H, Ogawa K, Kawabata Y, Mizumoto T, Yuminoki K, Hashimoto N, Yamada S. (2010) Improved dissolution and pharmacokinetic behavior of cyclosporine A using high-energy amorphous solid dispersion approach. *Int J Pharm.* 399:94–101.

Oroz-Guinea I, García-Junceda E. (2013) Enzyme catalysed tandem reactions. *Curr Opin Chem Biol.* 17:236–249.

Ousmane S, Seddik K, Pierre S. (2013) Dispersibility and morphology of spray-dried soy powders depending on the spraying system. *Dairy Sci & Technol.* 93:431–442

Paeshuyse J, Kaul A, De Clercq E, Rosenwirth B, Dumont JM, Scalfaro P, Bartenschlager R, Neyts J. (2006) The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology.* 43:761–770.

Petcher TJ, Weber H, Rüegger A. (1976) Crystal and molecular structure of an iodo-derivative of the cyclic undecapeptide cyclosporin A. *Helv Chim Acta.* 59:1480–1489.

Ran Y, Zhao L, Xu Q, Yalkowsky SH. (2001) Solubilization of cyclosporin A. *AAPS PharmSciTech.* 18:E2.

Rehácek. (1995) The cyclosporins. *Folia Microbiol (Praha).* 40:68–88.

Romesser JA, O'Keefe DP. (1986) Induction of cytochrome P-450-dependent sulfonylurea metabolism in *Streptomyces griseolus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 140: 650–659.

Rosenthaler J, Keller HP. (1990) Comment on cyclosporine assay techniques: an attempt for recommendations. *Transplant Proc.* 22:1160–1165.

Rosenwirth B, Billich A, Datema R, Donatsch P, Hammerschmid F, Harrison R, Hiestand P, Jaksche H, Mayer P, Peichl P, Quesniaux V, Schatz F, Schuurman H, Traber R, Wenger R, Wolff B, Zenke G, Zurin M. (1994) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:1763–1772.

Rundbäck F, Fidanoska M, Adlercreutz P. (2012) Coupling of permeabilized cells of *Gluconobacter oxydans* and *Ralstonia eutropha* for asymmetric ketone reduction using H<sub>2</sub> as reductant. *J Biotechnol.* 157:154–158.

Rupp D, Bartenschlager R. (2014) Targets for antiviral therapy of hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 34:9–21.

Sakamoto K, Tsujii E, Miyauchi M, Nakanishi T, Yamashita M, Shigematsu N, Tada T, Izumi S, Okuhara M. (1993) FR901459, a novel immunosuppressant isolated from *Stachybotrys chartarum* No. 19392. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities, *J Antibiot (Tokyo)*. 46:1788–1798.

Sakamoto K, Izumi S, Miyauchi M, Okuhara M. (1995) A new assay method for immunosuppressants with a tacrolimus (FK506)-like mode of action. *J Antibiot (Tokyo)*. 48:727–729.

Sasamura S, Muramatsu H, Takase S, Fujie A, Fujii T, Hino M, Sakamoto K, Hashimoto M. (2010) Bioconversion of AS1387392: screening and characterization of actinomycetes that convert AS1387392 to AS1429716. *J Antibiot (Tokyo)*. 63:637–642.

Sasamura S, Kobayashi M, Muramatsu H, Yoshimura S, Kinoshita T, Ohki H, Okada K, Deai Y, Yamagishi Y, Hashimoto M. (2015) Bioconversion of FR901459, a novel derivative of cyclosporin A, by *Lentzea* sp. 7887. *J Antibiot (Tokyo)*. 68:511–520.

Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409:258–268.

Schmidt S, Scherkus C, Muschiol J, Menyes U, Winkler T, Hummel W, Gröger H, Liese A,

Herz HG, Bornscheuer UT. (2015) An enzyme cascade synthesis of ε-caprolactone and its oligomers. *Angew Chem Int Ed Engl.* 54:2784–2787.

Sharma P, Varma MV, Chawla HP, Panchagnula R. (2005) Absorption enhancement, mechanistic and toxicity studies of medium chain fatty acids, cyclodextrins and bile salts as peroral absorption enhancers. *Farmaco.* 60:884–893.

Shutov AD, Kakhovskaya IA, Bastrygina AS, Bulmaga VP, Horstmann C, Müntz K. (1996) Limited proteolysis of β-conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean [*Glycinemax* (L.) Merr.]: Structural and evolutionary implications. *Eur J Biochem.* 241:221–228.

Suda KJ, Halbur DJ, Hunkler RJ, Matusiak LM, Schumock GT. (2017) Spending on Hepatitis C Antivirals in the United States, 2009–2015. *Pharmacotherapy.* 37:65–70.

Survase SA, Kagliwal LD, Annapure US, Singhal RS. (2011) Cyclosporin A--a review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnol Adv.* 29:418–435.

Svarstad H, Bugge HC, Dhillion SS. (2000) From Norway to Novartis: Cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime. *Biodiversity and Conservation* 9:1521–1541.

Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H. (1991) Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol.* 65:1105–1113.

Tanabe Y, Sakamoto N, Enomoto N, Kuroski M, Ueda E, Maekawa S, Yamashiro T, Nakagawa M, Chen CH, Kanazawa N, Kakinuma S, Watanabe M. (2004) Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J Infect Dis.* 189:1129–1139.

Tibell A, Lindholm A, Säwe J, Chen G, Norrlind B. (1995) Cyclosporin A in fat emulsion carriers: experimental studies on pharmacokinetics and tissue distribution. *Pharmacol Toxicol.* 76:115–121.

Tiberghien F, Wenandy T, Loor F. (2000) The potent immunosuppressive cyclosporin FR901459 inhibits the human P-glycoprotein and formyl peptide receptor functions. *J*

Antibiot (Tokyo). 53:509–515.

Traber R, Hofmann H, Kobel H. (1989) Cyclosporins--new analogues by precursor directed biosynthesis. J Antibiot (Tokyo). 42:591–597.

Tufvesson P, Lima-Ramos J, Nordblad M, Woodley JM. (2011) Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. Org Process Res Dev. 15:266–274.

Uchino H, Morota S, Takahashi T, Ikeda Y, Kudo Y, Ishii N, Siesjö BK, Shibasaki F. (2006) A novel neuroprotective compound FR901459 with dual inhibition of calcineurin and cyclophilins. Acta Neurochir Suppl. 96:157–162.

Uhm JT, Yoon WB. (2011) Effects of high-pressure process on kinetics of leaching oil from soybean powder using hexane in batch systems. J Food Sci. 76:E444–E449

von Döhren. (2004) Biochemistry and general genetics of nonribosomal peptide synthetases in fungi. Adv Biochem Eng Biotechnol. 88:217–264.

Wachtmeister J, Rother D. (2016) Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. Curr Opin Biotechnol. 42:169–177.

Wang K, Qi J, Weng T, Tian Z, Lu Y, Hu K, Yin Z, Wu W. (2014) Enhancement of oral bioavailability of cyclosporine A: comparison of various nanoscale drug-delivery systems. Int J Nanomedicine. 9:4991–4999.

Watanabe H, Tanji Y, Unno H, Hori K. (2008) Rapid conversion of toluene by an acinetobacter sp. Tol 5 mutant showing monolayer adsorption to water-oil interface. J Biosci Bioeng. 106:226–230.

Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. (2003) Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. Hepatology. 38:1282–1288.

Weber G, Leitner E. (1994) Disruption of the cyclosporin synthetase gene of *Tolypocladium niveum*. Curr Genet. 26:461–467.

Weber G, Schörgendorfer K, Schneider-Scherzer E, Leitner E. (1994) The peptide

synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet.* 26:120–125.

Wenger, RM. (1983a) Synthesis of Cyclosporine. I. Synthesis of Enantiomerically Pure (2S,3R,4R,6E)-3-Hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octeno Acid Starting from Tartaric Acid. *Helv Chim Acta.* 66:2308–2321.

Wenger, RM. (1983b) Synthesis of Cyclosporine. part II Synthesis of Boc-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-OH, a Part of the Peptide Sequence of Cyclosporine, by Different Strategic Ways and Synthesis of its Isomers Boc-D-Ala-MeLeu-D-MeLeu-MeVal-OH, Boc-D-Ala-MeLeu-D-MeLeu-DMeVal-OH, and BOC-D-Ala-MeLeu-MeLeu-D-MeVal-OH as Reference Compounds. *Helv Chim Acta.* 66:2672–2702.

Wenger, RM. (1984) Synthesis of Cyclosporine. Total Syntheses of ‘Cyclosporin A’ and ‘Cyclosporin H’, Two Fungal Metabolites Isolated from the Species *Tolypocladium inflatum* GAMS. *Helv Chim Acta.* 67:502–525.

Wenger RM. (1985) Synthesis of Cyclosporine and Analogues : Structural Requirements for Immunosuppressive Activity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 24:77–85.

Wichner D, Idris H, Houssen WE, McEwan AR, Bull AT, Asenjo JA, Goodfellow M, Jaspars M, Ebel R, Rateb ME. (2017) Isolation and anti-HIV-1 integrase activity of lentzeosides A-F from extremotolerant *lentzea* sp. H45, a strain isolated from a high-altitude Atacama Desert soil. *J Antibiot (Tokyo).* 70:448–453.

Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. (1993) The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci.* 696:9–19.

Xie Q, Wang Y, Huang Y, Wu Y, Ba F, Liu Z. (2002) Description of *Lentzea flaviverrucosa* sp. nov. and transfer of the type strain of *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *staurosporea* to *Lentzea albida*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52:1815–1820.

Yabutani T, Shimizu S, Nakano H. (2017a) Pilot-scale whole-cell biocatalysis for the hydroxylation of cyclosporine derivative, FR901459, at higher concentrations by *Lentzea* sp. 7887 using soybean flour as a novel substrate dispersant. *J Biosci Bioeng.* 123:56–62.

Yabutani T, Tsujimoto M, Ohira S, Shimizu S, Nakano H. (2017b) Strain improvement of *Lentzea* sp. 7887 for higher yield per unit volume on hydroxylation of cyclosporine

derivative FR901459. *Biosci Biotech Biochem.* 81:1456–1459.

Yang S, KR J, Lim S, Choi TG, Kim JH, Akter S, Jang M, Ahn HJ, Kim HY, Windisch MP, Khadka DB, Zhao C, Jin Y, Kang I, Ha J, Oh BC, Kim M, Kim SS, Cho WJ. (2015) Structure-Based Discovery of Novel Cyclophilin A Inhibitors for the Treatment of Hepatitis C Virus Infections. *J Med Chem.* 58:9546–9561.

Yassin AF, Rainey FA, Brzezinka H, Jahnke KD, Weissbrodt H, Budzikiewicz H, Stackebrandt E, Schaal KP. (1995) *Lentzea* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int J Syst Bacteriol.* 45:357–363.

Zajkoska P, Rebroš M, Rosenberg M. (2013) Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:1441–1455.

Zopf S, Kremer AE, Neurath MF, Siebler J. (2016) Advances in hepatitis C therapy: What is the current state - what come's next? *World J Hepatol.* 8:139–147.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、大鵬製薬工業株式会社の笹村智司氏より常に建設的なご助言をいただきましたことに深く感謝いたします。また検討方針についてご指導いただいたアステラスファーマテック株式会社の神田宗和氏、清水志保氏、加えて共同研究者として共に実験を行ったアステラス製薬株式会社の辻本真美氏、大平俊介氏、当時アステラス製薬に在籍された綿本容子氏にお礼申し上げます。