

報告番号	甲 第 12495号
------	------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Research for control of related
 compounds for industrial production
 of fermentation pharmaceuticals
 (発酵医薬品の工業生産のための
 類縁化合物制御に関する研究)

氏 名 清水 志保

論 文 内 容 の 要 旨

1928年フレミングによるペニシリンの発見以来、かび、細菌などの微生物が生産する抗菌作用をもつ化合物（抗生物質）が数多く医薬品として開発され、感染症から多くの人々を救ってきた。中でも、放線菌は、生産菌の代表格で、抗結核剤ストレプトマイシン、抗MRSA剤バンコマイシン、抗寄生虫薬のエバーメクチンなど、産業利用されてきた。

放線菌は、原核生物であるが、かびのように菌糸上に生育し、寒天平板上では、気中に菌糸を伸ばし、先端に胞子を形成、時には色素や抗菌物質を産生するなど、複雑で多様な表現型を示す。後に、その生産化合物の中には、生理活性作用を有する可能性もわかり、免疫抑制剤、抗がん剤、生活習慣病などをターゲットにしたスクリーニングもさかんに行われた。そのような中で、1984年、FK506（タクロリムス）は、混

合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction (MLR)) 法で免疫抑制作用をもつ新規化合物としてスクリーニングされ、1993年に移植後の拒絶反応を抑制する医薬品として承認された。

FK506の工業生産には、土壌から新規に分離された放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993 から、生産性を向上させた育種株を用いている。たいていの発酵医薬品の場合、自然界から単離した時には生産性は低く、培地培養条件の最適化、スケールアップ、生産菌育種という手法を組み合わせ、産業ベースの生産性まで高める。しかし、しばしば、分子構造の類似性から、生産性向上に伴い、類縁化合物の生成量も増加しやすく、品質の低下の一因となる。本研究は、FK506とその類縁化合物を題材に、目的化合物 (FK506) の生産性を高めるとともに類縁化合物を低減させ、安定的な工業生産を達成することを目的とした。第1章には緒言を、第2、3章で研究結果を、第4章に総括を記述した。

第2章では、アナログ耐性株育種によって、類縁化合物を低減した結果について述べた。対象とした類縁化合物 FR900525 は、FK506のピペコリン酸部位に、プロリンが取り込まれた構造である。目的化合物であるFK506と分離できる工業レベルの精製手段がなく、発酵でのわずかな増加が、医薬品への類縁体混入につながるため、育種によってFR900525を低減することを目指した。紫外線を変異源に、ランダムに変異を誘発した変異株の中から、目的の性質を示す変異株を選択する手法をとった。育種に先立って、まず、FR900525レベルが異なる培養液を培養液量や培養日数を変えて作成し、アミノ酸、有機酸などの代謝パラメータを分析、FR900525と関連するパラメータを探索した。その結果、培養液中のピペコリン酸濃度が、FR900525生成量と強く負の相関を示すことが明らかになった。その他、アスパラギン酸ファミリーであるリジン、アスパラギン酸、トレオニン、イソロイシン、およびグルタミン酸ファミリーであるグルタミン酸、アルギニンはFR900525と負の相関を示した。プロリンも負の相関を示した。2-オキシグルタル酸は唯一正の相関を示した。強い負の相関を示したピペコリン酸は、リジン経由で合成される。*Corynebacterium glutamicum*を代表に多くのリジン生産菌ではリジンアナログであるアミノエチルシステイン耐性付与によって、

リジン生産量を高めた成功事例を参考に、*S. tsukubaensis*にも同じ育種手法を適用した。結果、取得したアミノエチルシステイン耐性株4株中3株で、顕著にピペコリン酸濃度が増加するとともにFR900525が低減しており、アミノエチルシステイン耐性が本放線菌のFR900525低減に有効であることを示した。また、より多くのピペコリン酸濃度と、FR900525レベルの測定データから、ピペコリン酸濃度が0.3mMより低下すると、急激にFR900525が増加すること、即ち、工業生産でFR900525濃度を低く維持するためには、ピペコリン酸をモニタリングし、常に0.3mM以上を維持させることも有効であることがわかった。

第3章では、アミノエチル耐性株の変異点を特定した。第一章で取得した耐性株のうち、工業用生産株として用いた1株と、親株の遺伝子を次世代シーケンサーで網羅的に分析した。変異株と親株と遺伝子の比較から、クエン酸シンターゼ、DNAヘリカーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼに変異が確認され、また、それぞれ1つのアミノ酸に変異が誘発されていることを明らかにした。リジン生合成上のキーエンザイムであり、リジンで強く抑制されることが知られているアスパルトキナーゼだけでなく、リジン生合成のどの酵素にも変異が、認められなかったことは想定外であった。TCAサイクルの酵素であるクエン酸シンターゼについても、リジン生産量に関する報告事例がある。そこで、同酵素の阻害剤であるクエン酸を添加したときの、影響を調査したところ、酵素阻害条件下では、ピペコリン酸が増加し、FR900525が減少することが確認でき、クエン酸シンターゼ上に誘発された変異がピペコリン酸生合成に関与していることを示した。つまり、クエン酸シンターゼ上の変異によって、TCAサイクルとリジン生合成経路へのカーボンフローがリジン生合成へ傾き、ピペコリン酸生合成を増加させたと考察した。クエン酸シンターゼ以外の2つの変異の関与は、本研究では明確にできていない。

第4章に、本研究の成果として、FK506の類縁体FR900525レベルはピペコリン酸濃度と強く負の相関を示すこと、リジンアナログ耐性株の取得がFR900525低減に効果的であること、また、クエン酸シンターゼ上の変異が関与していることを明らかにし、

また、工業生産で安定的にピペコリン酸レベルを高く維持する複数の可能性を示すことを総括した。

ピペコリン酸は、FK506 以外にも、様々な医薬品の中間体となる環状アミノ酸であり、本研究を通じて得られた知見は、FK506 の工業生産だけでなく、ピペコリン酸を構造にもつ化合物の生産性向上や品質向上にも応用が期待できる。