

最先端・次世代研究開発支援プログラム

事後評価書

研究課題名	生合成工学を駆使した抗インフルエンザウイルス活性物質と抗結核菌活性物質の生産
研究機関・部局・職名	東京大学・生物生産工学研究センター・准教授
氏名	葛山 智久

【研究目的】

【抗インフルエンザウイルス活性物質】

現在日本で認可されているインフルエンザ治療薬は、M2 チャネル阻害剤であるアマンタジン塩酸塩（シンメトレル）と、ノイラミニダーゼ阻害剤であるリン酸オセルタミビル（タミフル）およびザナミビル（リレンザ）の3化合物である。しかしながら、アマンタジン塩酸塩はその耐性ウイルスの出現頻度の高さから現在米国では使用が中止されている。また最も利用されているタミフルについても、その耐性ウイルスの出現が報告され始め、同様な作用機構であるリレンザも耐性ウイルスの出現が危ぶまれている。また最近の高病原性トリインフルエンザの発生や2009年の新型インフルエンザ A/H1N1 の世界的流行から見て、作用機構の異なる何種類かの新たな治療薬を開発することは急務である。現在のインフルエンザ治療薬開発は、タミフルのようなノイラミニダーゼ阻害をターゲットとしたものが主流である。しかし、ノイラミニダーゼ阻害剤についても耐性ウイルスが出現している以上、新たな作用機構を持った治療薬が望ましいことは明らかである。

このような状況下、wickerol は真菌である *Trichoderma atroviride* FKI-3737 の生産する抗インフルエンザウイルス活性物質として単離構造決定された。wickerol は、これまでに類を見ない 6-5-6-6 員環構造を持つ新しいジテルペン骨格を持ち、優れた抗インフルエンザウイルス活性を示すことが報告されている。しかしながら、wickerol は低極性で水への溶解性が低く動物活性評価（特にマウスへの経鼻投与）が困難である。そのためより高極性の誘導体が必要であるが、wickerol は構造が複雑なうえ官能基が少ないため有機合成による誘導体創製には限界がある。また生産菌 FKI-3737 の wickerol 生産性も高いものではない。したがって、有機合成とは異なる方法論による wickerol の大量取得や水溶性の向上した誘導体創製が求められている。

【抗結核菌活性物質】

細菌感染症の化学療法において、感染症の原因となる細菌が薬剤耐性になることは重大な問題である。特に抗酸菌の感染症の化学療法において用いられるリファンピシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、バイオマイシン、カプレオマイシン、サイクロセリン等に対して、耐性を有する抗酸菌が出現して社会的問題となっている。そのため、従来使用されている既知の抗菌性抗生物質とは異なり、新規な化学構造を有し且つ高い抗菌作用などの優れた性質を示す新規な合成化合物および新規な抗生物質の発見または創製をすることが強く望まれている。

このような状況下、caprazamycin は放線菌である *Streptomyces* sp MK730-62F2 の生産する抗結核菌活性物質として単離構造決定された。caprazamycin の属するヌクレオシド

系抗生物質は、ウラシルを共通の構造に持ち、Nアセチルグルコサミン、様々な鎖長の脂肪酸、7員環ジアゼパノン、リン酸基、5-アミノリボース、2-アミノジアルドース、2,3-ジアミノ酪酸、アミノ酸などで構成される構造多様な化合物群である。これまでに3種のスクレオンド系化合物の生合成遺伝子クラスターが昨年より相次いで報告されたが、共通構造を持つにも拘らず共通の生合成酵素は見出されていない。このことは、本化合物群のための生合成酵素そのものが多様性に富んでいることを示している。caprazamycinの分解物である caprazol または caprazen の 1' ' ' -アミド誘導体またはエステル誘導体は高い抗結核菌活性を示すことが報告されている。しかし、現在 caprazol や caprazen を得るためには、煩雑な方法で精製した caprazamycin を化学的に加水分解する方法または多段階からなる化学合成しかない。

本研究課題では、wickerol 類と caprazamycin 類が微生物の中でどのように生合成されるのかを分子レベルで明らかにし、次に、その仕組みを人為的に改変することで、新しい wickerol 誘導体と caprazamycin 誘導体を生産する手法の開発を目的としている。また、微生物由来の新たな生理活性物質の開拓も目的としている。そのために、以下の4項目を実施する。

項目（1）wickerol の生合成遺伝子クラスターをクローニングし、個々の生合成酵素反応を検討することで、複雑な炭素骨格を一挙に構築するテルペン環化酵素の反応機構を解明する。取り扱いがより容易な放線菌や麹菌で wickerol の生合成遺伝子クラスターを再構築して wickerol の安定供給を目指す。

項目（2）caprazamycin 生合成遺伝子クラスターは取得済みであるので、個々の生合成酵素反応を検討することで、caprazamycin 生合成経路を確定する。次いで、生合成酵素遺伝子の論理的改変や遺伝子の欠失や導入によって caprazol または caprazen の *in vivo* 生産系（発酵生産）を構築する。生産される caprazol または caprazen の誘導体については容易な化学合成法が確立しており、これらの誘導体は、抗結核剤のリード化合物となりうる。

項目（3）放線菌はシトクロム P450 などの酸化酵素や構造多様性に関与する酵素遺伝子の宝庫である。日本はこれまで多くの微生物資源を開拓し世界の中でその優位性を保ってきた。この強みを生かし、これまでの微生物資源を遺伝子資源に昇華して蓄積し、30種程度の微生物ゲノムのドラフトシーケンスとアノテーションを完了する。ゲノム配列から予測される二次代謝産物の精製と構造決定についても可能な限り行う。また、これまでゲノム解析が行われた例のない新規な好熱菌についても、ゲノムの解析のみならず、これらの好熱菌の生産する二次代謝産物の精製と構造解析を行う。二次代謝産物の構造を正確に解析することで、遺伝子の機能推定のアノテーションがより正確なデータとなる。

項目（4）本研究課題で生産される wickerol 誘導体と caprazamycin 誘導体の活性評価を行う。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】
① 総合所見
<p>本研究課題は、wickerol 類と caprazamycin 類の微生物での生合成経路の遺伝子群を明らかにし、その仕組みを人為的に改変することでより優れた活性を示す新しい誘導体を生産する手法の開発を目的としている。研究課題自体については、おおむね計画に沿って進捗し、成果も、二つのサブテーマのうち caprazol については計画以上の成果を達成したことは高く評価できる。一方、より産業面での重要性が高い wickerol に関しては難航し、当初の目的を達成できていない。本研究に関しては方法論や技術論は既存の組み合わせを用いる点で、プロセスよりもいかに新たなもの（物質や生合成系）を見つけるかという結果のみが評価を受けるということから、「あらゆる手段を駆使してタンパク質を可溶化する」という研究代表者の熱意により、少しでも目的の達成に近づくことを期待したが、今後の課題として残された。</p> <p>本研究課題では、新規合成経路の発見など、将来の事業化に向けた知財成果の権利化確保並びに活用もより強く意識した戦略性が望まれる。成果の社会実装に関しても企業との連携の話が進み始めているとのことであるが、早期から特定企業と連携をすることも必要であるし、特許出願後の学会発表などを通じて、より多くの企業との連携を深めることに努めることも望まれる。</p>

② 目的の達成状況
<p>・所期の目的が <input type="checkbox"/>全て達成された ・ <input checked="" type="checkbox"/>一部達成された ・ <input type="checkbox"/>達成されなかった</p>
<p>微生物代謝工学による抗インフルエンザウイルス活性物質 wickerol と抗結核菌活性物質 caprazamycin の誘導体の創製を研究目的に掲げている。このうち、caprazamycin については、生合成に関与するエステル化酵素の遺伝子を破壊し、目的とする caprazol の発酵生産を可能とした。さらに、他の生合成遺伝子破壊株を作出し、新規 caprazamycin 誘導体の創製にも成功した。これらの生理活性を評価し、抗結核剤候補化合物を見出した。一方、より産業面での重要性が高い wickerol に関しては、wickerol 生産菌の <i>Trichoderma atroviride</i> FKI-3737 から wickerol 生産に必須な wickerol 合成テルペン環化酵素遺伝子の候補を複数得ることができたが、予期せず可溶タンパク質として精製することができず、結果的に wickerol 合成テルペン環化酵素遺伝子の同定は達成できなかった。本提案では、当初の計画が達成されることが重要であり、Wickerol の生合成に関わると予想される遺伝子の機能解析が最大の問題であり、異種微生物で発現させた可溶化タンパク質を調製し in vitro で酵素活性を確認するため「あらゆる手段を駆使」するとの研究代表者の決意と熱意が本補助事業期間内に実を結ぶことを期待したが、今後の課題となった。</p> <p>さらなる研究目的に掲げられた微生物ゲノム解析は順調に進んでいるが、むしろメタボロミクスデータを活用した比較ゲノムとノックダウンなどの組み合わせを絨毯爆撃的にやるようなまとまった体制やそのような研究機関との連携などで突破力のある取り組み策が必要かもしれない。高く掲げている目標と比べると、現在の進捗状況を順調とは判断しきれないが、その達成に向けて真摯にチャレンジを続ける姿勢は評価したい。</p>

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

研究代表者は、独自の方法論を持っており、得られた成果には先進性、優位性が充分にある。多数の微生物ゲノムのドラフトシーケンスは、将来にわたり、新たな代謝系の探索に活用できる研究資源である。

代謝工学により創製した caprazol 誘導体のうち、生理活性の点から新規抗結核剤として有望な化合物が見出されたことは、応用に直結した特筆すべき成果と評価できる。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が
(見込まれる ・ 見込まれない)

同様の方法論が様々な生理活性物質の誘導体の創製に応用できることから、微生物の生産する有用物質の生合成に関わる遺伝子を解析し代謝工学の手法を用いて代謝物プロフィールを人為的に変えて有用物質開発に導いた本研究の意義は大きい。本研究課題の研究対象に対しては同じアプローチの研究は無く、研究課題の成果は、関連分野の進展に寄与できると考えられる。

製薬企業が興味を示していることから、本研究の成果は新たな抗結核剤の開発につながり、社会的な課題の解決に貢献する可能性を有している。またそれゆえに、本研究は得られた新規物質の生理活性や有用性、合成経路の産業上の有用性が大きな評価対象になることから、成果として達成することが必要である。また、本研究課題で得られた基盤となる菌体ゲノムシーケンスや代謝経路に関しては将来の基盤として産学連携に生かすことが望まれる。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

研究開発マネジメントは適切である。微生物ゲノム情報の知財としての価値を理解し、その価値を損なわないような対応を心掛けていることは評価される。アカデミアでの就職が厳しさを増している時代に、研究チームに所属していた若手研究者が大学助教の職を得たことについて、人材育成という視点からマネジメントを評価したい。

雑誌論文 12 件、会議発表 70 件と積極的に学会で知見を発表している。知財に関しては前向きに進める必要があり、特に、遺伝子資源由来の知財等は、学術成果発表との競合はあるが、慎重かつ戦略的に検討すべきである。

アウトリーチ活動では、対話、講演に加えて、高校生を対象として実習を行っている。実習にかかる労力は対話、講演の比ではないため、研究代表者の熱意を評価したい。インフルエンザ治療薬は一般向けとしても、大変関心高い生活に密接な領域なので、臨床医学系の講演者とのセッションなど、より効果的な内容を工夫した企画をして一般市民を対象により広く「対話としての双方向性を重視して」実施してほしい。