

深在性真菌症治療剤ミカファンギン製造における 脱アシル化酵素の工業化研究

上田 聡*・木下 昌恵・田中 文裕・大畑 暢敬・日野 資弘

深在性真菌症とは *Aspergillus* 属, *Candida* 属などの真菌の感染が体内の深部 (肺, 腎臓, 腎臓, 脳など) まで進行した状態のことを指す. 特にがん患者や臓器移植患者など, 免疫力が低下した患者に対する日和見感染としての罹患リスクが高く, 重篤な症状に至るケースも少なくないことから, 副作用が少なく, 有効性の高い抗生剤の開発が求められている.

そのような中, 近年では深在性真菌症に対する薬剤として, 真菌特有の細胞壁主要構成成分 1,3-β-D-glucan の生合成を特異的に阻害するキャンディン系抗生物質が着目されている. キャンディン系抗生物質とはリポペプチド様の構造を有する天然化合物であるエキノキャンディン, ニューモキャンディンや FR901379 などを母核に用いた誘導体研究の結果創出された化合物の総称である. 他の抗真菌抗生物質と比べて副作用が少ない抗生剤として, 日欧米をはじめとする全世界ではキアスポファンギン, ミカファンギンなどが販売されている.

ミカファンギン (日本名ファンガード®, 海外名 Mycamine®) は, 1989年に福島県いわき市の土壌から分離された *Coleophoma empetri* F-11899 の培養液中より発見された FR901379¹⁾ を原体として FR901379 アシラーゼでアシル側鎖 (パルミトイル基) を脱離後, 合成側鎖を導入することで創生された化合物である (図1). FR901379 は強力な抗真菌活性を示したが溶血活性などの副作用を有したため, そのままでの開発は不可能であったが, アシル側鎖構造の最適化検討の結果, 抗真菌

活性を増強し, かつ副作用を大幅に低減したミカファンギンが見いだされた.

本稿は, ミカファンギンの製造工程で使用する FR901379 アシラーゼ生産菌のスクリーニング, 工業生産の実現に向けた菌株育種による酵素生産性 (活性) 向上, 大型発酵槽で培養を安定的に行えるスケールアップパラメーターの設定についての研究成果を紹介する.

FR901379 アシラーゼ生産菌のスクリーニング

自社で保有する多種多様なリソースから分離した微生物ライブラリーから FR901379 アシラーゼ生産菌を効率的に選別する方法を開発しスクリーニングを実施した²⁾. まず, FR901379 を添加した寒天培地上に, スクリーニングの対象菌 (放線菌・カビ) を植菌して培養する. 対象菌の生育後, *Candida albicans* を植菌した寒天培地を重層する. 対象株がアシラーゼを生産していた場合, 対象株周囲の FR901379 は脱アシル化され, FR179642 に変換されるために抗菌活性が100分の1以下に著しく低下し, 対象株周囲に *Candida* の生育ゾーンが観察される (図2). こうして対象株のコロニー周囲に *Candida* が生育した菌株を集め, 2次スクリーニングを行った. 2次スクリーニングは, 1次スクリーニングで得られた候補株の液体培養液を用い, FR901379 を添加し脱アシル体である FR179642 の生成を HPLC で確認する方法によって行った. その結果, 比較的高効率で微生物ライブラリーから酵素生産菌が選別でき, 放線菌22株, カビ2株の

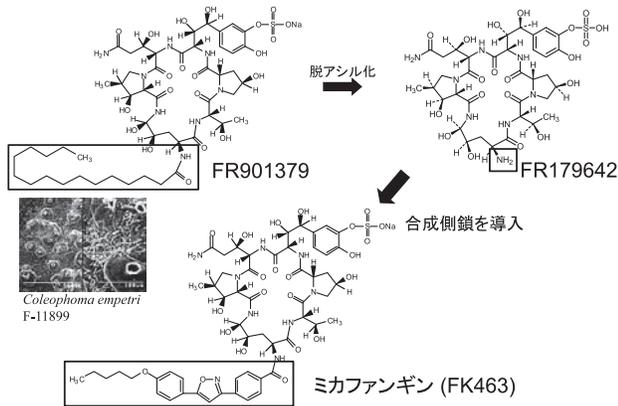


図1. ミカファンギンの製造工程

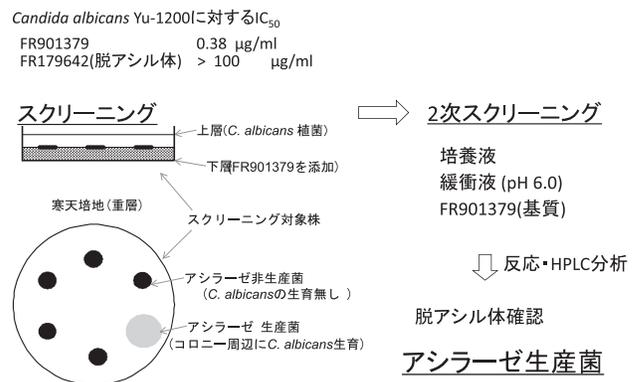


図2. アシラーゼ生産菌のスクリーニング法

* 著者紹介 アステラス製薬 (株) 生物学研究所醱酵生産技術研究室 (主管研究員) E-mail: satoshi-ueda@jp.astellas.com

表1. スクリーニング結果

	放線菌	カビ
スクリーニング評価株	3624	466
一次スクリーニング (<i>C. albicans</i> 生育)	106	39
二次スクリーニング (FR179642生成)	22	2

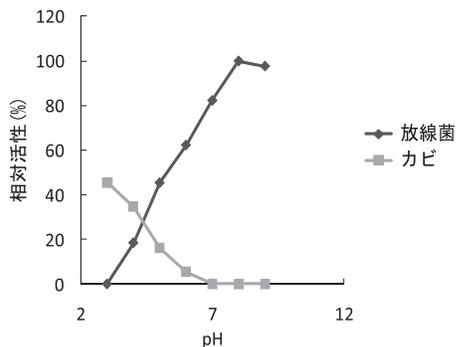


図3. 放線菌とカビのアシラーゼ活性比較

表2. アシラーゼの性質比較

性質	至適温度	相対活性 (放線菌=100)
放線菌 構成酵素	50°C	100
カビ 誘導酵素	40°C	16

アシラーゼ生産菌を取得した。このうち、カビが生産する酵素はいずれもFR901379存在下で生成が誘導される酵素であった(表1)。

放線菌とカビからそれぞれ最もアシラーゼ活性の強かった菌株を選択し、培養液のアシラーゼの反応pHおよび反応温度に対する性質を比較した(図3)。その結果、放線菌由来の酵素は高pH域で高い活性を示す一方、カビ由来の酵素は低pH域で高い活性を示し、放線菌由来の酵素の反応至適温度は、カビ由来の酵素より比較的高温であった(表2)。この性質は、他に選別された放線菌、カビ由来酵素においても同様に観察され、微生物種によって酵素の構造や基質との反応機構が異なることが示唆された。筆者らは生産プロセス開発の観点から、*Streptomyces* sp. No. 6097 を選択し、引き続き工業化に向けた検討を行った。

FR901379アシラーゼの工業化検討 (投稿中)

菌株育種による酵素活性向上 酵素活性の向上は、コンパクトな工程設計が可能になり、培養槽や反応槽などの装置の小型化、作業の省力化につながるだけでなく、

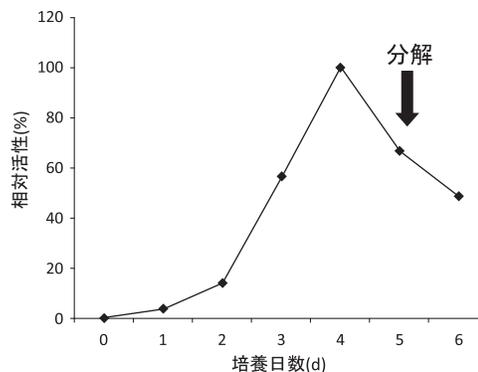


図4. 液体培養時のアシラーゼ活性推移

工程に必要なエネルギーや生じる廃棄物の削減も可能となることから、環境負荷の軽減にもつながる点で非常に重要である。筆者らは紫外線による変異処理を施した *Streptomyces* sp. No.6907 から数世代にわたる活性向上株の取得を行った。その代表的な方法を以下に紹介する。
(1) 抗菌活性による選別 この選別法はスクリーニングの方法を応用したものである。脱アシル化されたFR179642の抗菌活性がFR901379と比較して著しく低下する性質を利用したもので、*Candida*の生育ゾーンが大きくなった菌株を酵素活性向上株の候補として選別し、次いで液体培養で酵素活性を確認した。育種による生産菌の酵素活性向上に伴い、下層に添加したFR901379の大部分が脱アシル化をうけ、寒天培地全面に *Candida* が生育してしまい活性向上株の選別が困難となったが、下層培地に添加するFR901379濃度の最適化や、酵素生産を抑制するような下層培地組成の検討、上層培地の *Candida* 植菌量の最適化など、生産菌の生育や酵素生産に応じて条件を改変することで抗菌活性によるスクリーニングを継続的に活用できた。

(2) タンパク質分解活性を指標とした選別 液体培養において培養後半で著しい酵素活性の低下が認められ、安定なプロセス開発上の課題となっていた(図4)。一方、スキムミルクを添加した寒天(スキムミルク寒天培地)にアシラーゼ生産菌を植菌し培養するとコロニー周辺にハ口が認められた(図5)、そのハ口の大きさ(ハ口径)とアシラーゼ活性に逆相関が認められた。ハ口径の大小はスキムミルク分解能、すなわちタンパク分解活性を示しており、培養後半の酵素活性低下は生産菌由来のタンパク分解酵素によるアシラーゼの分解によるものと考えた。そこで、スキムミルク寒天培地のハ口径縮小株では、培養中のFR901379アシラーゼの分解が抑制されるため活性が向上し、さらに培養後半のアシラーゼが分解しない安定な培養が可能となるのではないかと考えた。実際にスキムミルク寒天培地上のハ口径を指標に菌株選別を実施し、想定通り活性が向上し、かつ培養後半

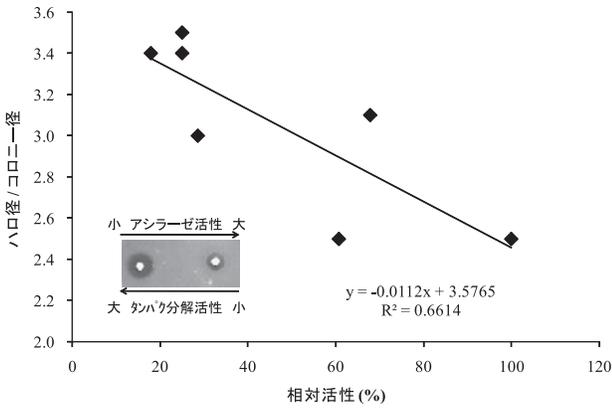


図5. ハロ径とアシラーゼ活性の相関図. 相対活性は各菌株の培養途中の最大活性を100%とした.

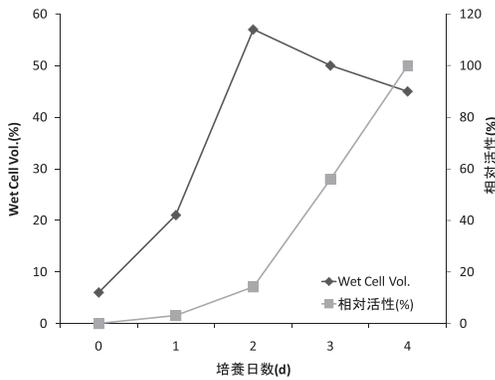


図6. 菌体増加と活性推移

の酵素活性が低下しない安定培養が可能となる菌株を取得することができた.

(3) 寒天培地上の形態的特徴による選別 液体培養において、酵素生産は菌体増殖と連動せず、あたかも二次代謝産物のように増殖期後半から活性が認められた(図6). つまり、培養液中の菌糸は増殖期には伸長しているが、酵素生産が始まると菌糸が分断する傾向が認められた(図7). さらに育種の過程で取得された酵素非生産株は、酵素生産株と比較して寒天培地上の気中菌糸形成や胞子着生が著しく低下しており、液体培養では菌糸分断化を示さなかった. 以上の特徴から、酵素生産が二次代謝と同様の制御を受けているという仮説をたて、寒天培地上での二次代謝(胞子形成や色素形成)を指標に菌株選別を行い、酵素活性向上株を試みた.

上記(1)から(3)の指標を活用した活性向上株の選別結果を表3に示したが、多くの菌株から効率的に目的株を取得することができた.

菌株育種による活性向上に並行して、工業化を考慮した培地の最適化検討を実施した. 検討の詳細については

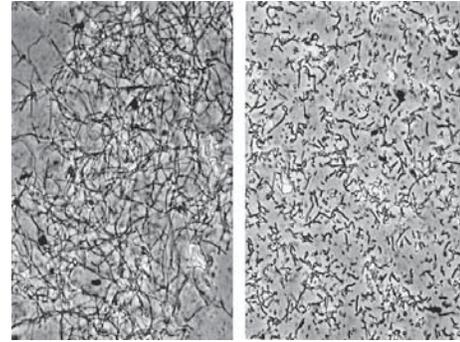


図7. 菌糸の状態(左, 培養1日目; 右, 培養3日目)

表3. 菌株育種のとまとめ

指標	寒天培地 評価株数	液体培養 評価株数	高活性 株数	取得率 (%)
抗菌活性	9826	677	17	2.5
ハロ径縮小	1291	104	3	2.9
胞子着生	-	671	13	1.9

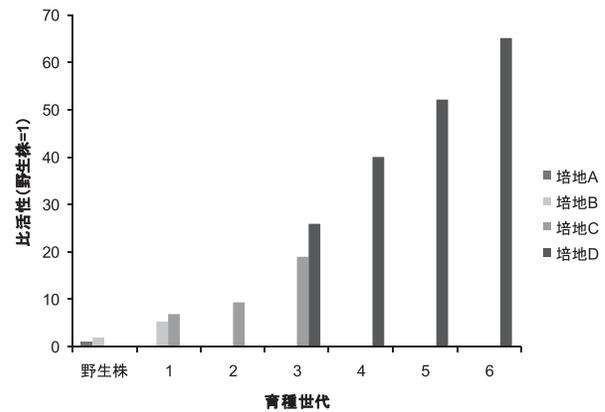


図8. 育種と培地検討による活性向上

割愛するが、野生株から6世代の育種と、育種した菌株に適した工業生産用培地の組み合わせにより、野生株と比較して活性が65倍向上した株を取得した(図8).

スケールアップパラメーター設定 アシラーゼ生産菌のスケールアップ培養では通気攪拌培養時に生じる著しい発泡が大きな課題であった. 発泡に対する一般的な対処法として消泡剤の添加が考えられるが、本培養では消泡剤を増量すると一次代謝が過剰に活性化され、著量のアンモニア蓄積に伴う生育停止および酵素活性低下が認められたため、消泡剤以外の対処方法を検討する必要があった. このため、30 lスケールで発泡・消泡に関与する各種パラメーターを調査したところ、培養時の攪拌

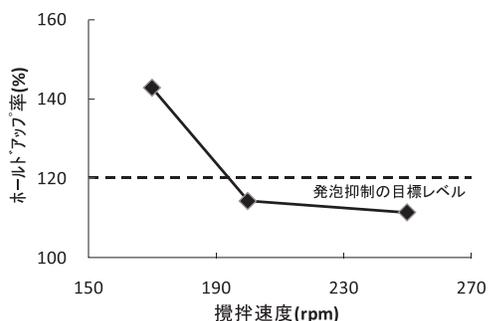


図9. 培養液ホールドアップ率に対する攪拌数の影響

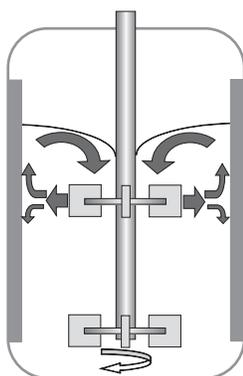


図10. ボルテックス効果による発泡のイメージ

数の増減が発泡の増加または抑制に影響を及ぼすことを見いだした。そこで、攪拌条件と発泡のコントロールについてパイロットスケールでさらに検討した。

パイロットスケール（液量 700 l で実施）における攪拌速度とアシラーゼ培養液のホールドアップ率（泡の発生による液面の変化率 = 培養中のホールドアップも含めた見かけ上の培養液容量 ÷ 仕込み液量 × 100）の関係を図9に示す。その結果、攪拌速度 170 rpm で泡の形成が認められたが 200 rpm 以上では泡形成が抑制された。

筆者らはこの実験の観察結果から、培養液量 700 l で発生した泡は最適な混合状態にすることにより、培養液に巻き込まれて（ボルテックス効果）比較的速やかに消泡されると推察した。このボルテックス効果は上段ペラからの吐出流量に比例すると考え、式1^{注)}を用いてスケールアップのための消泡パラメーターの設定を行った。その結果、ボルテックス効果に最適な上段のペラ位置を液の上面から 25～30% と設定した。

注) 式1. 消泡パラメーターの算出式
 消泡パラメーター = 吐出流量* / 通気量 = n(翼回転数) × d(翼径)³ / 通気量
 *Q(吐出流量) = Nq(吐出流量係数) × n(翼回転数) × d(翼径)³
 各タンクで吐出流量係数は同等と近似して算出

表4. パイロットスケールにおける消泡パラメーターとホールドアップ・発泡の関係

消泡パラメーター (吐出流量/通気量)	最高 ホールドアップ率 (%)	発泡性
100	113	
91	115	無
81	116	
60	150	有

表5. 生産スケールにおける消泡パラメーターの検証

相対液量 (%)*	消泡パラメーター (吐出流量/通気量)	最高 ホールドアップ率 (%)
90 (最低液量)	82	107
100 (標準液量)	77	111
110	77	113

*実生産培養における標準的な培養液量を 100 とした。

パイロットスケールにおいて、消泡パラメーターと液面レベルの上昇を示すホールドアップ率の関係を検討した結果、消泡パラメーター値が 80 以上で泡の制御効果が確認できた(表4)。

そこでさらに大きなサイズの実生産スケールで消泡パラメーターがおおよそ 80 となるように攪拌翼系と攪拌速度を決定して培養を行った結果、発泡を抑制した状態で安定した培養が可能であり(表5)、完成度の高い工業化の製法を確立することができた。

おわりに

ミカファンギンを原薬とする製品ファンガード®（海外製品名 Mycamine®）は、2002年に日本で販売が開始されたのをはじめとして、2005年に米国、2008年に欧州で販売が開始され、現在30以上の国々で販売されている。筆者らは、1995年からFR901379アシラーゼの開発に着手し、短期間で安定した製造法を完成させることができたが、これは創薬、プロセス技術開発、工業生産に関わる各部門のメンバーが、それぞれの高い専門性を活かし、互いに強いチームワークで開発に取り組んだ結果であることを記しておく。

文 献

- 1) Iwamoto, T. et al.: *J. Antibiot.*, **47**, 1084 (1994).
- 2) Ueda, S. et al.: *J. Antibiot.*, **63**, 65 (2010).