

「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発／
有用天然化合物の安定的な生産技術開発」

事業原簿【公開】

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部
-----	--

—目次—

概要 プロジェクト用語集

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性…………… I-1
 - 1.1 NEDOが関与することの意義…………… I-1
 - 1.2 実施の効果(費用対効果)…………… I-1
2. 事業の背景・目的・位置づけ…………… I-1

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標…………… II-1
2. 事業の計画内容…………… II-1
 - 2.1 研究開発の内容…………… II-1
 - 2.2 研究開発の実施体制…………… II-2
 - 2.3 研究の運営管理…………… II-2
 - 2.4 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性…………… II-4
3. 情勢変化への対応…………… II-4
4. 中間評価結果への対応…………… II-4
5. 評価に関する事項…………… II-4

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果…………… III-1
2. 研究開発項目毎の成果…………… III-2

IV. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

1. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて…………… IV-1

(添付資料)

- ・イノベーションプログラム基本計画
- ・プロジェクト基本計画
- ・技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)
- ・事前評価関連資料(事前評価書)
- ・特許論文リスト

概要

		最終更新日	平成 25 年 12 月 11 日
プログラム（又は施策）名	健康安心イノベーションプログラム		
プロジェクト名	ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発／有用天然化合物の安定的な生産技術開発	プロジェクト番号	P11002
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術部 主査 武井良之：平成 23 年 5 月～平成 24 年 10 月（主担当）、平成 24 年 11 月～事後評価（副担当） 主査 坂本俊一：平成 24 年 4 月～平成 24 年 10 月（副担当）、平成 24 年 11 月～事後評価（主担当）		
0. 事業の概要	<p>（1）生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築 放線菌が生産する広範な天然化合物リソースから、大きく複数に分類される化合物群の代表的な化合物を選抜するとともに、製薬企業が興味を持つ構造及び活性がユニークな天然物由来の化合物候補を選抜し、これらの天然化合物の生合成遺伝子クラスターの情報を取得する。 この情報を基に、生合成遺伝子クラスターのライブラリーを作製する。また、これらの生合成遺伝子クラスターの正確なシーケンス情報を解読すると共に、化合物と生合成遺伝子を対応づけるデータベースを構築し、類縁化合物の生合成遺伝子を探索するツールの開発につなげる。</p> <p>（2）安定生産技術の開発 天然物を生産する別の宿主放線菌株を用いて、これら多種多様な天然化合物の生合成遺伝子クラスターを導入し、実際のスクリーニングに適用可能な生産性を目標に生産させる技術を開発する。安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善に取り組むことにより、安定生産技術としての汎用性を見極める。</p>		
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>① 事業の位置付け 本事業は、健康寿命を延伸し、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指す「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施するものであり、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」を加速し、創薬効率の向上に資する創薬基盤技術の構築を目的とするものである。 これまで、創薬標的として重要な膜タンパク質及びその複合体の細胞表層上における立体構造解析及び相互作用解析技術の開発及び得られる構造・機能情報と計算科学を組み合わせることによって創薬候補化合物の効率的な探索と、更に実用性の高いリード化合物への展開等の創薬基盤技術の開発を実施してきたところである。一方、創薬ヒット化合物の探索については必ずしも期待された成果が出ておらず、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。 このため、基本計画を改訂し、新規の医薬品開発につながる有望な天然化合物の安定生産に必要な技術の開発に、平成 23 年度から新規に着手すべく研究開発項目の整理・追加を行い、ゲノム創薬を加速する創薬基盤技術構築の一層の充実を図るべく実施するものである。</p> <p>② 必要性 近年、製薬企業の研究開発費は増大の一途であるものの、承認される薬剤の数は増えていない。研究開発費の増大分は、主として臨床開発費に充てられ、探索研究に回せるリソースは相対的に減少している状況にあることもその理由の一つであるが、創薬ヒット化合物の発見につながる新たなスクリーニング手法の技術革新と技術実証の不足により、新規医薬品候補化合物の探索効率が大幅に低下している可能性も指摘されている。製薬産業にとって最も重要な医薬品のもととなるリード化合物を効率的に取得する技術が極めて重要であり、ニーズも高い。このため、最先端の知識と分析技術を組み合わせ、創薬開発のより早い段階から適切な医薬品候補物質の取得を可能とする、標的蛋白質の立体構造をベースとした in silico スクリーニング技術の構築を平成 20 年度から行ってきたところである。 一方で、創薬ヒット化合物の探索については、コンビナトリアルケミストリーによる化合物合成とそのライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングが盛んに行われたが、必ずしも期待された成果が出ておらず、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。しかし、微生物は、天然化合物のリソースとして最も有望なものの一つであるが、培養抽出物として安定的かつ大量に取得できないなど、そのままではスクリーニングの効率化に様々な問題点がある。そこで、これまでに無い新しい骨格を持った化合物も含め、微生物の持つ天然化合物の生合成遺伝子を取り出して別の宿主菌株で発現させるなど、目的とする天然化合物を安定的かつ効率よく発現させる手法を開発することが重要である。 このため、創薬効率をより一層向上させるためには、これまで行ってきた構造ベースの創薬技術に加え、創薬リード化合物候補となりうる広いケミカルスペースを持った天然化合物を生産する技術の開発により、化合物空間の拡大を可能とする技術の開発は極めて重要である。基礎研究の進展により幾つかの生産実例が報告されていること、生産菌を含む 3 つの放線菌のゲノム解析の完了により比較ゲノム解析のアプローチが可能となったこと、次世代シーケンス技術の進展などを背景とし、技術の汎用性を見極めることが可能な状況に至っており、本タイミングで開発計画に追加して実施する必要性は高く、妥当である。</p>		

II. 研究開発マネジメントについて

事業の目標	有用天然物の合成に必要な40個の生合成遺伝子クラスターを取得し、その生産物を対応づけたデータベースを構築する。これら40個の生合成遺伝子クラスター全てについて、化合物生産株となる別の宿主放線菌へ導入し、目的の天然物を5 mg/Lレベルで安定的に生産する技術を開発する。さらにこれら40個について、安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善を図る。				
事業の計画内容	主な実施事項	H23fy	H24fy		
	生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築	—————▶			
	安定生産技術の開発	—————▶			
開発予算 (会計・勘定別に事業費の実績額を記載) (単位：百万円)	会計・勘定	H23fy	H24fy		総額
	一般会計	289	291		580
	特別会計 (電源・需給の別)				
	開発成果促進財源		98		98
	総予算額	289	389		678
契約種類： ○をつける (委託(○) 助成() 共同研究(負担率()))	(委託)				678
	(助成) : 助成率△/□				
	(共同研究) : 負担率△/□				
開発体制	経産省担当原課	製造産業局生物化学産業課			
	プロジェクトリーダー	独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル研究センター 新家 一男 主任研究員			
	委託先(*委託先が管理法人の場合は参加企業数及び参加企業名も記載)	<p>研究開発責任者： 新家 一男 独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディシナル研究センター 主任研究員</p> <p>次世代天然物化学技術研究組合 研究開発テーマ①：生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築 研究開発テーマ②：安定生産技術の開発</p> <p>組合員</p> <ul style="list-style-type: none"> ・独立行政法人産業技術総合研究所 (①、②) ・一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム (①、②) ・アステラス製薬株式会社 (①、②) ・オーピーバイオファクトリー株式会社 (①、②) ・塩野義製薬株式会社 (①、②) ・合同酒精株式会社 (①、②) ・Meiji Seika ファルマ株式会社 (①、②) ・日本マイクロバイオファーマ株式会社 (①、②) <p>共同実施</p> <ul style="list-style-type: none"> 北里大学 (①、②) 沖縄科学技術大学院大学 (①) 東京大学 (①) 理化学研究所 (①、②) 東北大学 (②) 			

情勢変化への対応	特になし	
中間評価結果への対応	中間評価実施せず	
評価に関する事項	事前評価	平成 22 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術部
	事後評価	平成 25 年度 事後評価実施

<p>Ⅲ. 研究開発成果について</p>	<p>事業全体の成果</p> <p>(1) 生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築 40個程度の生合成遺伝子クラスターを取得する目標に対し、目標を大幅に上回る64個の生合成遺伝子クラスターを取得した。</p> <p>(2) 安定生産技術の開発 目的の天然物40個を5 mg/L レベルで安定的に生産する技術を開発する目標に対し、 > 5 mg/L: 32化合物 (50%) < 5 mg/L: 12化合物 (19%) 生産無し: 20化合物 (31%) となり、異種発現生産の成功率が、10%と言われている中、本開発研究では、69%と突出した成功率であった。 また、異種発現生産が誘導されなかった化合物や低生産性の化合物に関しては、短期間と言う事もあり、全ての化合物に対して遺伝子改変などを行うことが出来なかったが、選抜した化合物については、8割以上の成功率で、異種発現誘導及び力価向上を達成出来た。 このように、遺伝子改変を行う事により、高確率で異種発現誘導および生産性向上を行えることを示すことが出来たが、巨大生合成遺伝子に関しては、遺伝子改変を容易に行えない。この辺りに関しては、当研究開発のみでは解決出来るものではなく、将来のさらなる遺伝子技術の進歩が望まれる。</p> <p>個別開発項目毎の成果</p> <p>(1) 生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築</p> <p>(1)-1 異種発現生産の標的とする化合物の生合成遺伝子クラスターの同定 放線菌ゲノムは、GC 含量の高い配列を持ち、繰り返し配列も多く存在する。そのため、放線菌のゲノム解析は極めて困難であり、現在のようにシークエンス技術が進歩していても、思うような結果が得られていないのが現実である。そこで、我々はサンゴのゲノム解読など、ギガシークエンサーを用いた de novo シークエンス解析で多くの実績を有する OIST (Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University、沖縄科学技術大学院大学) にて、放線菌に特化したドラフトゲノム解析法の開発を行った。二年間の精力的な改良により、現在では年に 100 菌株以上のドラフトゲノム解析を可能にしている。 上記ドラフトゲノム情報より、化合物構造の特徴に基づく目的生合成遺伝子クラスターを同定する手法の開発を行った。ベースとして用いたソフトは、北里大学、池田教授等が開発した「Genome Viewer」であるが、本ソフトに antiSMASH の様な、生合成遺伝子予測が可能なソフトのモジュールを自由に組み込めるように、ソフトの改良を行い、より高精度に生合成遺伝子をアノテーションすることを可能にした。 放線菌の I 型 PKS では、他の生物種には無い生合成メカニズムであるメチルマロニル CoA (プロピオン酸ユニット) の直接取り込み機構を持つのが特徴であり、これらユニットが縮合され主構造(マクロライド化合物のアグリコン) が構築される。これらのユニットは AT (acyl transferase) ドメインにより運ばれてくるが、そのゲノム配列の微妙な違いにより区別されることが知られている。我々は、この微妙な違いを精度良く区別するシステムを開発した。 また、非リボソーム型ペプチド生合成遺伝子 (Non-Ribosomal Peptide Synthetase, NRPS) クラスターについては、常法通り、NRPS 系化合物については、A ドメインの配列の解析によって目的生合成遺伝子クラスターの同定を行った。 上記のようなゲノム情報に基づいた生合成遺伝子クラスター同定法により、40 株の放線菌より、I 型 PKS 経路、NRPS 経路、リボソーム型ペプチド合成経路、テルペン合成経路、核酸合成経路から生合成される 40 個以上の化合物の生合成遺伝子クラスターを同定した。</p> <p>(1)-2 生合成遺伝子クラスターの取得 生合成遺伝子クラスターの取得に関しては、クラスターの大きさによって、Cosmid ベクターを用いる手法と、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターを用いる手法の二種類の方法に分けて行った。 Cosmid ベクターでは、avermectin 生産菌である <i>Streptomyces avermitilis</i> の生合成遺伝子クラスターのクローニングや、ゲノムプロジェクト研究において、既に多くの実績のあるコスミドベクターである pKU408 を用いて、25 個の化合物について Cosmid クローンの取得に成功した。 BAC ベクターを用いたゲノムライブラリーの構築に関しては、まずその技術開発そのものから行った。BAC ライブラリーの調製は手技的に極めて難しく、世界でも有数のラボでのみ安定に調製が可能であるが、そのゲノムサイズは 100 kbp 程度であることが多い。現在、我々は 120 kbp 前後であれば、ほぼ確実に BAC ライブラリーの調製が可能になっており、今回の開発研究で取得した最大サイズのインサートは、concanamycin の生合成遺伝子クラスター取得を目的に調製した際に得られた 215 kbp (インサートサイズ) であった。BAC ライブラリーより、シークエンス情報より得た、生合成遺伝子クラスターの両末端配列を用いて設計したプライマーを用いて、目的生合成遺伝子クラスターを持つクローンの選抜を行った結果、38 化合物の生合成遺伝子クラスターを取得した。</p>
----------------------	--

	<p>(2) 安定生産技術の開発 (2)-1 上記(1)でクローニングした生合成遺伝子クラスターに関して、最終的に再度にシーケンス確認したクローンをを用いて、放線菌ホストに導入し異種発現生産の検討を行った。本プロジェクトでは、生産性の高さ、形質転換法が精査されている SUKA (SUKA17) 株を、主放線菌ホストとして用いた。SUKA 株は、目的化合物の生合成前駆体が外来性生合成遺伝子クラスターを導入することによって生成した生合成酵素の各反応に効率良く利用されるため、内在性の代謝産物の生合成遺伝子クラスターを欠失させ、内在性代謝産物の生成を停止させていること、また親株が工業生産に使用されている菌株であるというのが大きな特徴である。この他のホストとして、世界中でホスト菌株として汎用されている <i>S. albus</i> J1074 株 (制限修飾系変異株、SAL1074)、および <i>S. lividans</i> KASU-1 (幾つかの内在性生合成遺伝子をノックアウトしている) を用いて、形質転換効率および生産性の比較検討を行った。</p> <p>(2)-2 異種発現システムの改良による安定生産技術の開発 本開発研究で問題となった BAC ベクターの SUKA 株への遺伝子導入効率の低さを克服するため、種々のシステム開発を行った結果、線状プラスミドである SAP1 を用いた、遺伝子導入システムを開発した。本システムは、遺伝子導入効率の高い <i>S. lividans</i> を介して SUKA 株に遺伝子導入するものである。これにより、そのままでは SUKA 株へ導入出来なかった生合成遺伝子クラスターを SUKA 株に導入することが可能になり、異種発現生産への応用が期待される。 SUKA17 株において、通常の BAC 導入法では形質転換体が取得出来なかった生合成遺伝子クラスターのうち、産業上最も重要であると考えられる avemectin や FK-506 を含む数個の化合物について、SAP1 法を用いて SUKA22 形質転換株の取得を行った。その結果、10 個の化合物のうち一つの化合物を除いて、SUKA22 株での異種発現生産に成功した。</p>	
	投稿論文	「査読付き」62件、「その他」9件
	特許	「出願済」0件、「登録」0件、「実施」0件 (うち国際出願0件) 特記事項:
	その他の外部発表 (プレス発表等)	学会発表等48件
IV. 実用化の見通しについて	<p>本開発研究で得られた成果のうち技術・システムは、放線菌ゲノムの精密ドラフトシーケンス技術、BAC ベクターによる巨大ゲノム断片取得技術、放線菌ホストへの巨大遺伝子クラスター導入方法である。これらの関しては、組合員である製薬等企業で利用することが今後の普及活動になるが、既に企業サンプルに関しては幾つかの実施例を行い、事業へ展開しているものもある。また、BAC ベクターを用いた巨大ゲノムライブラリー作製に関しては、ヒトゲノム、病原菌ゲノム、および牛や豚などの優良品種ゲノム解析の一般的スタンダード (国際スタンダードも含む) として利用される可能性があると共に、受託業務へと事業展開することも視野に入れている。</p> <p>また、本開発で得られた、生合成遺伝子クラスターやそのゲノム配列に関しては、組合員で利用するとともに、高生産性が証明できた SUKA 株については、組合員の中で標準ホストとして普及させると共に、将来的にはライセンス使用料を得る形で広く普及させる。</p> <p>また、本プロジェクトで異種発現生産を行ったある化合物について、その生合成遺伝子クラスターの SUKA22 株での強制発現によって、1 g/L の生産性を達成している。本化合物は、元の親株では当該遺伝子は休眠状態なので、いかなる培養方法によっても生産物は得られていない。この程度の生産性は、産業生産に見合う量であり、極めて近い将来実用化が期待できるものである。</p> <p>さらに、これまで自然界から単離した菌株では生産が見られなかった化合物の生産誘導ができたこと、応用研究およびその後の産業利用にはほど遠い生産量であった化合物を、合目的に生産および力価向上を行える技術として、製薬等企業での創薬スクリーニングに応用することにより、これまでに無い医薬品の開発を展開する。</p>	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成 20 年 3 月 作成
	変更履歴	平成 22 年 3 月、中間評価で高い評価を受け、最終目標達成のため期間延長を行う事により、改訂。 平成 23 年 2 月、新規技術開発の追加による研究開発項目の整理に伴い改訂。 平成 23 年 8 月、研究開発項目 < 2 > の研究開発責任者の決定により改訂。 平成 24 年 4 月、研究開発責任者の異動に伴う所属先の変更により改訂。

用語集

Cosmid ベクター: コスミドベクターは、30kbp-45kbp の大きさの DNA 断片を挿入することができる。このベクターは、Cos 領域という特殊な配列を有し、この配列をバクテリオファージが認識することで、パッケージングが行われる。

BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクター: 大腸菌を宿主とする人工染色体ベクター。大腸菌プラスミドの一種 F プラスミドの複製系を利用する。

ゲノムライブラリー (Genome library): ゲノムを制限酵素、超音波、シアリング（剪断）などにより、物理的に細かく断片化し、プラスミド、コスミド、BAC などのクローニングベクターにクローニング（組換え）したもの。シーケンシングやその他の遺伝子研究に、ゲノムそのものを直接取り扱うことは非効率かつ困難なため、このようなライブラリー化が行われる。

次世代シーケンサー: Sanger シーケンシング法を利用した蛍光キャピラリーシーケンサーである「第 1 世代シーケンサー」と対比させて使われている用語。

第 2 世代シーケンサー: 逐次 DNA 合成・光検出法を用いた超並列シーケンシング。DNA ポリメラーゼまたは DNA リガーゼによる逐次的 DNA 合成法を用いて、蛍光・発光など光検出により、超並列的に塩基配列を決定する。代表的機器は、454 (GS-FLX、Roche)、「Hiseq2000、Miseq (Illumina)」、「SOLiD (Life Technology)」。

第 3 世代シーケンサー: 1 分子リアルタイム・シーケンシング。DNA 1 分子を鋳型として DNA ポリメラーゼにより DNA 合成を行い、1 塩基ごとの反応を蛍光・発光などの光で検出することにより、リアルタイムで塩基配列を決定する。代表的機器は、PacBio (Pacific Biosciences)。

ポリケタイド生合成: Polyketide. アセチル CoA を出発物質とし、マロニル CoA を伸張物質としてポリケトン鎖を合成した後、様々な修飾を受けて生合成された化合物の総称である。「脂肪酸の生合成」と「ポリケチドの生合成」の過程は非常に良く似ているが、前者はカルボニル基 (-CO-) の還元を受けて炭化水素鎖を形成するのに対し、後者はカルボニル基の還元を受けずにポリケトン鎖を形成する点で差異がある。両者の生合成の過程を合わせて酢酸・マロン酸経路と総称する。PKS は I 型、II 型、III 型の 3 種類が存在する。後に詳しく述べるが I 型 PKS は複数のドメインが一つのポリペプチド上に連なった長大な蛋白質、II 型 PKS は異なる機能を持った蛋白質の複合体、III 型ポリケタイド合成酵素はケトシンテースドメインのみからなる小型の蛋白質である。いずれの酵素もスターター基質と呼ばれる CoA エステル（もしくは ACP 体）に伸長鎖基質（マロニル CoA など）を複数回縮合する反応を触媒する。スターター基質としてはアセチル-CoA、脂肪酸 CoA エステル、ベンゾイル CoA、クマロイル CoA などが通常用いられる。

KS: β -ketoacyl-ACP synthase

AT: acyl transferase

ACP: acyl carrier protein

KR: β -ketoacyl-ACP reductase

DH: dehydratase

ER: enoylreductase

TE: thioesterase

非リボゾーマル型ペプチド合成: Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS)。mRNA を設計図としてペプチド鎖を合成するリボソームを用いないペプチド合成。

A: adenylation。アデニル化部位

PCP: Peptide Carrier Protein with attached 4'-phospho-pantetheine

T: thioesteration。チオエステル化

C: condensation。縮合反応

メロテルペノイド: テルペノイドとポリケタイドの ハイブリッド型化合物。

ドラフトゲノム配列: おおよその全貌は解読できた、という状態のゲノム配列。全ゲノム配列の 100% は解読されてはいない、ギャップが残っていたり並べ方は不確定な情報。

de novo シークエンス: 新規ゲノム配列解析。

コンティグ: DNA 配列断片群を重ね合わせて (アライメントして) できるコンセンサス配列や、それを構成する配列断片群。

Paired End および Mate Pair シークエンス: Paired-End Sequencing は、個々の短い DNA 断片を両末端から読む方法である。両側からのリードが重複していれば、配列決定精度を向上させることができる。一方、DNA 断片の長さが大きく、両側からのリードが重複しない場合には、Mate-Pair Sequencing に

近い結果が得られる。Mate-Pair Sequencing は、長い DNA 断片の両末端をライブラリー構築によって接近させた後、それら両末端の配列を決定する方法である。一定距離だけ離れた場所の 2 つの配列を解明できることから、*de novo* sequencing や欠失・挿入などの大きな DNA 構造の変化の解析に役立つ。Mate-pair sequence…大きな構造変化の検出や *de novo* sequence における scaffolding に Paired-end sequence のインサートサイズが数百 bp であるのに対して Mate-pair sequence のインサートサイズは 2 ~ 5kbp。

antiSMAS: antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell

SUKA: Special Use of Kitasato Actinobacteria。 *Streptomyces avermitilis* を親株に内在性生合成遺伝子クラスターをノックアウトしたホスト株。

SAL1074: *Streptomyces albus* J1074 株。

KASU: Kitasato Actinomytales Special Use。 *Streptomyces lividans* より幾つかの生合成遺伝子クラスター (Δ act Δ geo Δ mib str) をノックアウトしたホスト株。

SAP1: Streptomyces Avermitilis Plasmid 1。 *Streptomyces avermitilis* に存在する 2 つの線状プラスミドのうちの一冊目のプラスミド。

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDO が関与することの意義

本事業は、健康寿命を延伸し、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指す「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施するものであり、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」を加速し、創薬効率の向上に資する創薬基盤技術の構築を目的とするものであり、ゲノム情報をベースに生合成遺伝子資源としてライブラリー化することによって安定的な資源化を目指す点、また、整備されたライブラリーの有効な活用を可能とする汎用生産系の構築は極めてチャレンジングである。

また、民間企業単独で開発することは極めて困難であり、異なる事業体の連携推進というNEDOの保有する機能が貢献できる内容であるため、NEDOが実施する事業として妥当である。

1.2 実施の効果(費用対効果)

本事業においては、2年間の実施期間において当該技術の見極めを図るために研究開発対象とする生合成遺伝子クラスターを放線菌由来のものに限定しているが、当該技術は他の生物種由来の生合成遺伝子クラスターにも適用が可能と考えられるため、放線菌由来以外の有用天然物の生産への波及効果が期待される。

天然物由来の医薬品として、放線菌由来の化合物であるタクロリムスは、国内売上が年間約500億円である。タクロリムスは生産菌を使用して産業化に至ったが、生産菌では生産量が少なく産業化が難しい化合物も本事業の成果をもとに大量かつ安定的に生産することにより、創薬開発に貢献することが可能である。

2. 事業の背景・目的・位置づけ

本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や、画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

近年、製薬企業の研究開発費は増大の一途であるものの、承認される薬剤の数は増えていない。研究開発費の増大分は、主として臨床開発費に充てられ、探索研究に回せるリソースは相対的に減少している状況にあることもその理由の一つであるが、創薬ヒット化合物の発見につながる新たなスクリーニング手法の技術革新と技術実証の不足により、新規医薬品候補化合物の探索効率が大幅に低下している可能性も指摘されている。このため、最先端の知識と分析技術を組み合わせ、創薬開発のより早い段階から適切な医薬品候補物質の取得を可能とする、標的蛋白質の立体構造をベースとした *in silico* スクリーニングや探索対象となる化合物空間の拡大など、創薬の効率化に繋がる新たな技術の開発が求められている。

創薬ヒット化合物の探索については、近年、製薬企業を中心に、コンビナトリアルケミストリーによる化合物合成とそのライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングが盛んに行われたが、必ずしも期待された成果が出ておらず、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。微生物は、天然化合物のリソースとして最も有望なものの一つであるが、培養抽出物として安定的かつ大量に取得できないなど、そのままではスクリーニングの効率化に様々な問題点がある。そこで、これまでに無い新しい骨格を持った化合物も含め、微生物の持つ天然化合物の生合成遺伝子を取り出して別の宿主菌株で発現させるなど、目的とする天然化合物を安定的かつ効率よく発現させる手法を開発することが重要である。

ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」を加速するため、我が国の強みとする微生物ライブラリーや、天然物化学に対する知識基盤等を最大限に活用し、創薬リード化合物候補となりうる広いケミカルスペースを持った天然化合物を生産する生合成遺伝子とそれを応用した化合物生産を効率的に行う技術開発により、安定生産技術としての汎用性を見極めるべく、「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発／有用天然化合物の安定的な生産技術開発」を実施する。

これにより、天然物化学情報基盤の強化等により、ゲノム情報を活用した創薬技術の高度化による我が国バイオ産業の競争力強化、新産業の創出・育成を通じて、国際的優位性を確保することが期待できる他、個別化医療への応用とともに、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開が期待できる。

Ⅱ. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

最終目標（平成24年度末）

有用天然物の合成に必要な 40 個程度の生合成遺伝子クラスターを取得し、その生産物に対応づけたデータベースを構築する。これら 40 個程度の生合成遺伝子クラスター全てについて、化合物生産株となる別の宿主放線菌へ導入し、目的の天然物を 5 mg/L レベルで安定的に生産する技術を開発する。さらにこれら 40 個程度について、安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善を図る。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を委託により実施した。

（1）生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

放線菌が生産する広範な天然化合物リソースから、大きく複数に分類される化合物群の代表的な化合物を選抜するとともに、製薬企業が興味を持つ構造及び活性がユニークな天然物由来の化合物候補を選抜し、これらの天然化合物の生合成遺伝子クラスターの情報を取得する。

この情報を基に、生合成遺伝子クラスターのライブラリーを作製する。また、これらの生合成遺伝子クラスターの正確なシーケンス情報を解読すると共に、化合物と生合成遺伝子に対応づけるデータベースを構築し、類縁化合物の生合成遺伝子を探索するツールの開発につなげる。

（2）安定生産技術の開発

天然物を生産する別の宿主放線菌株を用いて、これら多種多様な天然化合物の生合成遺伝子クラスターを導入し、実際のスクリーニングに適用可能な生産性を目標に生産させる技術を開発する。安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善に取り組むことにより、安定生産技術としての汎用性を見極める。

前述の研究開発項目の具体的な内容は以下のとおりである。

(1) - 1 異種発現生産の標的とする化合物の生合成遺伝子クラスターの同定（次世代天然物化学技術研究組合、共同実施先：沖縄科学技術大学院大学 (OIST)、北里大学、東京大学、理化学研究所）

放線菌が生産する広範な種類からなる天然化合物リソースから、生合成前駆体や生産経路を基に分類した化合物群のうち、代表的な化合物および製薬企業が興味を持つ構造及び活性がユニークな天然物由来の化合物を対象に、異種発現系に供する 40 個程度の化合物を選抜し、それらの生合成遺伝子クラスターの同定を目標とした。

(1) - 2 生合成遺伝子クラスターの取得（次世代天然物化学技術研究組合、共同実施先：北里大学、東京大学）

同定した有用な生合成遺伝子クラスター情報を基に、プロジェクト期間を通じて 40 個程度の生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築および生産物に対応づけたデータベースの構築を目標とした。

(2) - 1 異種発現システムを用いた生産実証による汎用性の検証（次世代天然物化学技術研究組合、共同実施先：北里大学、東北大学）

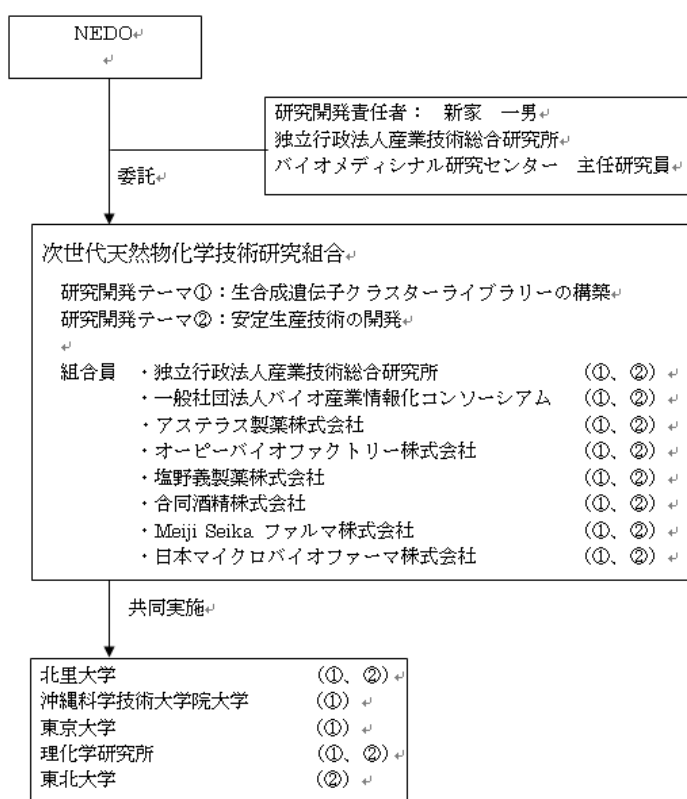
培養抽出物という混合物状態ではなく、単離天然化合物として天然物ライブラリーの構築を目指し、現在考えられる最高技術を用いた異種発現システムの検証を行った。

(2) - 2 異種発現システムの改良による安定生産技術の開発（次世代天然物化学技術研究組合、共同実施先：北里大学、理化学研究所）

スクリーニングサンプルとしてアッセイ系に供与でき、かつ必要とされる研究機関への配布が可能な、5mg/L を安定的に生産可能な汎用性の高い異種発現システムの構築を目標とした。

2.2 研究開発の実施体制

独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 主任研究員 新家一男氏をプロジェクトリーダーとし、以下の体制で研究開発を実施した。



2.3 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施した。具体的には、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じてプロジェクトの進捗について報告を受けることを行った。

また、年2回の頻度で研究開発推進委員会を開催し、研究開発の進捗状況を報告するとともに、外部有識者からの助言等により、研究開発の推進を図った。研究開発推進委員会の委員は以下のとおりである。

氏名	所属・役職
仁平 卓也 (委員長)	大阪大学 生物学国際交流センター センター長 分子微生物学研究室 教授
江口 正	東京工業大学大学院 理工学研究科 物質科学専攻 教授
上村 大輔	神奈川大学理学部化学科 教授
磯貝 隆夫	福島県立医科大学 創薬関連 TR 部門ゲノム塩基配列解析分野 特任教授
中川 智	協和発酵バイオ(株) ヘルスケア商品開発センター 学術研究企画室 マネージャー

2.4 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

次世代天然物化学技術研究組合（8社、1独法、1団体）を設立し、本事業により得られた成果を本組合の製薬企業における創薬基盤技術として活用するとともに、天然化合物ライブラリーの利用技術も含めたリソースの管理・提供を行う共同利用センターとしての事業化を図る体制とした。

3. 情勢変化への対応

国内外の関連の学会などに参加、研究発表と情報収集を行うなどして、最新の研究動向の把握に務めた。

さらに、平成23年度の研究成果として「標的化合物によっては元生産菌の生産培地でしか生産されない場合がある」ことを明らかとなり、「異種発現システムを用いた生産実証による汎用性の検証」をする上で、複数の培地について生産性を検討する必要となった。

このため、平成24年8月に98百万円の追加予算を配賦し、高性能質量分析装置等を2台導入した。これにより、増加した生産検討培地の解析を期間内に完了した。

4. 中間評価結果への対応

実施せず。

5. 評価に関する事項

技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成25年度に実施する。

Ⅲ. 研究開発成果について

1.事業全体の成果（公開版）

事業全体の成果

目 標	研究開発成果	達成度	課題と解決方針 ※未達の場合のみ
<p>プロジェクト全体の目標（出典：基本計画 p12）</p> <p>(1) 生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築 40個程度の生合成遺伝子クラスターを取得する</p> <p>(2) 安定生産技術の開発 目的の天然物を5 mg/L レベルで安定的に生産する技術を開発する</p>	<p>(1) 64個の生合成遺伝子クラスターを取得した 160%</p> <p>(2) > 5 mg/L: 32化合物 (80%) < 5 mg/L: 12化合物 (30%) 生産無し: 20化合物</p>	<p>(1) 大幅達成</p> <p>(2) 達成</p>	<p>(2)</p> <p>本プロジェクトは、現在存在する最高水準の技術を用いて、これまで世界でどこも行う事が出来なかった大規模な検証を行うものであり、技術のさらなる改良と問題点の洗い出しに目標があった。異種発現生産の成功率が、10%と言われている中、本開発研究では、69%と突出した成功率であった。</p> <p>また、異種発現生産が誘導されなかった化合物や低生産性の化合物に関しては、短期間と言う事もあり、全ての化合物に対して遺伝子改変などを行うことが出来なかったが、選抜した化合物については、8割以上の成功率で、異種発現誘導及び力価向上を達成出来た。</p> <p>このように、遺伝子改変を行う事により、高確率で異種発現誘導および生産性向上を行えることを示すことが出来たが、巨大生合成遺伝子に関しては、遺伝子改変を容易に行えない。この辺りに関しては、当研究開発のみでは解決出来るものではなく、将来のさらなる遺伝子技術の進歩が望まれる。</p>

2.研究開発項目毎の成果

はじめに

天然物は、合成化合物と比較して広いケミカルスペースを持ち、現在上市されている臨床医薬品の6割以上を占めており、長い間薬剤開発のリード化合物のソースとして用いられてきた。特に、微生物は生物活性物質の宝庫と呼ばれており、我々が思い付かないような多種多様な構造を有する化合物を生産する。ここ数十年の間、欧米の効率主義に発する、コンビナトリアルケミストリーによる化合物合成とそれらのライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングが我が国の製薬企業にも導入され、盛んに薬剤スクリーニングが行われたが、必ずしも期待された成果が出ていない。そのため、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。しかしながら、新規化合物の単離が困難になってきていることに加え、天然物ライブラリー作製には多くの手間と費用がかかるなど非効率的であるという理由から、天然化合物スクリーニング研究は、多くの製薬企業で衰退の一途を辿っているのが現状である。天然物ライブラリーを用いたスクリーニングが非効率的であるという他の理由として、培養抽出物という多くの夾雑物の混合物を用いるため、薬剤開発を行うためには、天然物ライブラリーに特化したアッセイ系を構築しなければならず、また擬陽性を如何に排除するかなどの工夫が要求される。一方で、ヒトゲノムプロジェクトに伴い、多くの創薬ターゲットが見出されてきたが、それらは必ずしも天然物ランダムスクリーニングに適しているとは言えず、天然化合物は薬剤リード化合物として有望であるにも拘わらず、適用するのは困難であるのが現状である。ここで、培養抽出物の状態ではなく、単離天然化合物ライブラリーの確立が今後天然化合物スクリーニングを展開する上で必須であると考えられる。

微生物の中でも、特に放線菌からは多くの临床上、重要な医薬品が見出されおり、生物活性物質生産には最も貴重な微生物である。しかしながら、放線菌は大腸菌と異なり、ごく一部の放線菌を除き、分子生物学的な研究を行うための「道具」に乏しく、遺伝子破壊や特定遺伝子の高発現など遺伝子の導入が不可能、あるいは極めて困難な場合が多かったのが現状である。1985年に放線菌の遺伝子操作による新規抗生物質の創製 (Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. D. A. Hopwood, F. Malpartida, H. M. Kieser,

H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. M. Rudd, H. G. Floss and S. Omura, *Nature* **312**, 642-644, 1985) を皮切りに、その後 Khosla らによる「Unnatural natural Products」の研究など (Engineered biosynthesis of novel polyketides. R. McDaniel, S. Eber-Khosla, D. A. Hopwood and C. Khosla, *Science* **262**, 1546-1550, 1993)、多くの生合成遺伝子の異種発現研究が行われ、多くの報告例と共に放線菌ゲノム研究の道具が揃ってきており、二次代謝産物の高生産に適したホストとして放線菌を使うことの有効性が認知されてきているが、単に生合成遺伝子を利用した異種発現が出来れば良いと言うレベルでは無い時代になってきているのも現実である。特に、北里大学、池田等によって開発された異種発現システムは、生産ホストとして工業生産株を用いるという点、ゲノム中に存在する内在性の二次代謝産物の生合成遺伝子を欠損させた点、導入遺伝子の安定維持の観点から安定領域に目的遺伝子を組み込むという点など多くの優れた点を持ち、実際に様々な異種生合成遺伝子クラスターを導入・発現を可能とし、生産量に関しても期待が持てる状況である。また、「工業生産株を異種発現ホストとして改良して用いる」というコンセプトは、これまで主にアカデミックでの研究目的だった生合成遺伝子クラスターの異種発現システムを、応用を見据えたレベルまで引き上げたという点で、今後企業での利用を目的とした大規模な検証がようやく行える時期に来たと言える。

また、天然物化学は、我が国が世界をリードする研究分野、および産業分野であり、これまで多くの知識、技術、および生物活性物質生産株を保有している。本研究では、これまで企業等で行って来た実際の天然物スクリーニングの抱える問題点を洗い出し、天然物化学の多くの経験および技術基盤など世界を遙かにリードしている優位性を利用し、産業レベルでの応用を見据えた実践に基づく次世代天然物化学を担う技術を確立するものであり、我が国の創薬開発を大きく推進すると考えられる。

(1) 【生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築】

放線菌全ゲノム解析が終了している菌株について、これまで多くの研究者が様々な手法で化合物の単離を試みてきているが、ゲノム配列上に見出される生合成遺伝子クラスターの数と比較して、ごく一部の化合物の生産しか確認できていない。例えば、工業生産菌として世界で初めてゲノム解析が行われた *Streptomyces avermitilis* には37種の生合成遺伝子クラスターの存在が確認されているが、それらのうちの12種の生合成遺伝子クラスターによって生成した化合物しか単離されていない。我々も、単離天然化合物ライブラリーの構築の過程で、様々な菌株の分離法や培養法の改良を検討したが、休眠遺伝子の活性化においてはその効果は限定的であった。また、生産菌は保存後の再培養において、目的化合物の生産性が損なわれる場合が多く、今後はこれらの発現が確認された生合成遺伝子クラスターと共に、休眠生合成遺伝子クラスターを、汎用宿主に導入あるいは発現可能なプロモーター制御下で人為的に発現させることが出来れば、化合物の安定供給が可能となるだけでなく、未知の休眠遺伝子クラスターの利用も可能となり、より幅広いケミカルスペースを持った化合物ライブラリーの構築が可能になると考えられる。そこで、池田等によって開発された異種発現システムを主な基盤として、どのような化合物が異種発現により生産が可能か、どのような化合物の生産が困難あるいは不可能であるか、さらには工業応用レベルでの生産が可能な化合物はどのようなものか、さらなる改良を行うことによりどれだけ大きな範疇の化合物が高生産できる可能性を秘めているかを、多種多様な既知化合物を用いて検証することが、今後の企業での応用を考えた場合重要なポイントとなる。

放線菌の生産する化合物いわゆる二次代謝産物は、それらの生合成に利用される一次代謝産物である前駆体の種類から、大きく6つに分類されている。すなわち、(1) 脂肪酸およびポリケチド経路 (マクロライドおよび芳香族ポリケチド)、(2) アミノ酸経路 (ポリペプチド)、(3) 核酸経路、(4) メバロン酸および非メバロン酸経路 (テルペン)、(5) 糖質経路 (アミノグリコシド)、および (6) アンサマイシン系化合物に見られるシキミ酸経路とポリケチドとの融合化合物のような、幾つかの経路の複合型化合物 (ハイブリッド型) に分類される。したがって、これらの分類された化合物群を網羅的にカバーすること、かつ特異な構造的特徴を持つ化合物を標的にすることが、「放線菌が生産する広範な天然化合物リソース」を

広範囲にカバーするためには必須であり、今後企業での応用を視野に入れた、大きな「天然化合物リソース」への汎用性に繋がると考えられる。

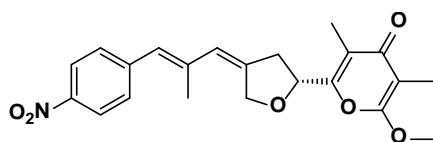
本研究では、臨床応用されているような、産業上重要な化合物であるに拘わらず、その生合成遺伝子クラスターが巨大であるが故に、生合成遺伝子クラスターの取得および異種発現が、テクニカルな困難さのためにほとんど成されていない化合物を主な対象として含め、多種多様な構造を有する化合物を対象に、生合成遺伝子クラスターの取得、およびそれに続く異種発現生産の大規模な検証を行った。

(1)-1. 異種発現生産の標的とする化合物の生合成遺伝子クラスターの同定（次世代天然物化学技術研究組合、共同実施先：沖縄科学技術大学院大学学園（OIST）、北里大学、東京大学、理化学研究所）

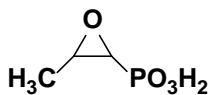
生合成遺伝子クラスターの取得の方法は幾つか考えられるが、既知の生合成遺伝子情報に基づき取得する手法と、ギガシークエンサーを活用して取得するゲノム配列に準じた取得法とに分けることが出来る。

(1)-1-1 生合成遺伝子クラスターが報告されている化合物

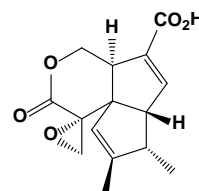
本プロジェクトは学術的研究では無く、それらの化合物の生合成遺伝子クラスターの取得および異種発現が困難であっても、産業上重要であることが研究対象の優先度が高い。また、構造の多様性を高めるために、異種発現生産は報告されていないが、遺伝子破壊などによって既に生合成遺伝子クラスター候補が報告されている化合物も、研究対象とした。下記に本研究で対象とした、生合成遺伝子クラスター全体あるいは一部が報告されている化合物を図 1 に示す。また、報告されている推定生合成遺伝子クラスターのサイズを合わせて示す。



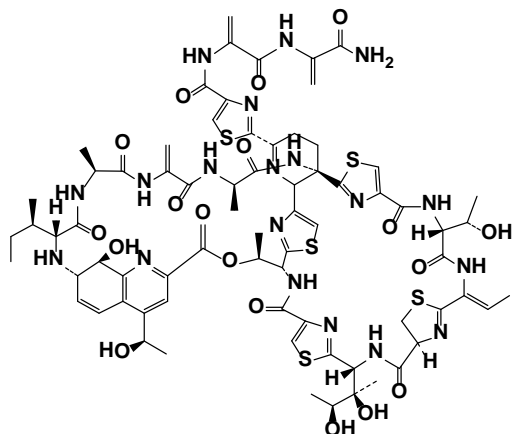
Aureothin (28 kbp)



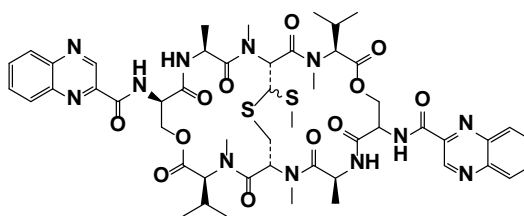
Fosfomycin (12 kbp)



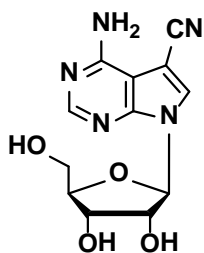
Pentalenolactone (13.3 kbp)



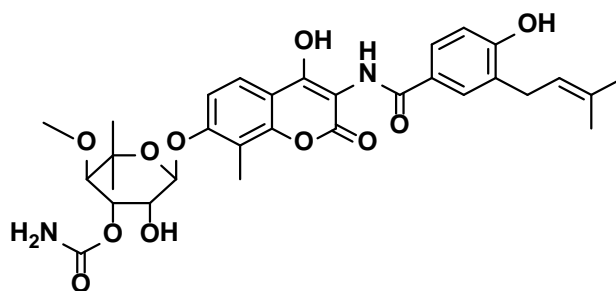
Thiostrepton (30 kbp)



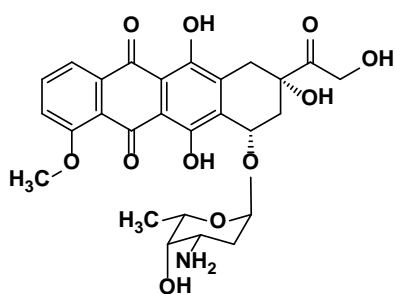
Echinomycin (36 kbp)



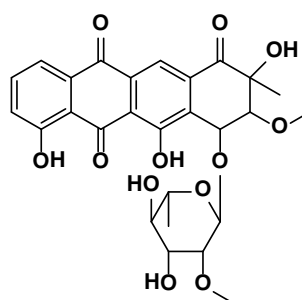
Toyocamycin (12 kbp)



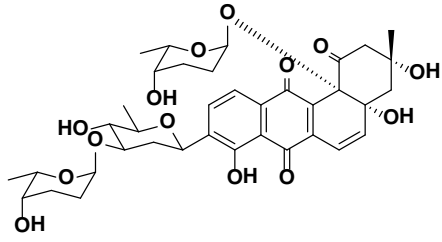
Novobiocin (25.5 kbp)



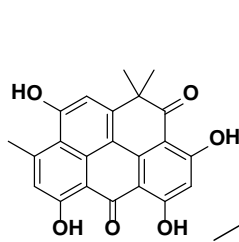
Adriamycin (20 kbp)



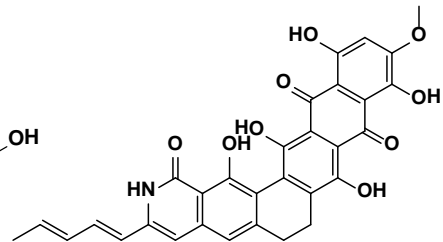
Aranciamycin (28 kbp)



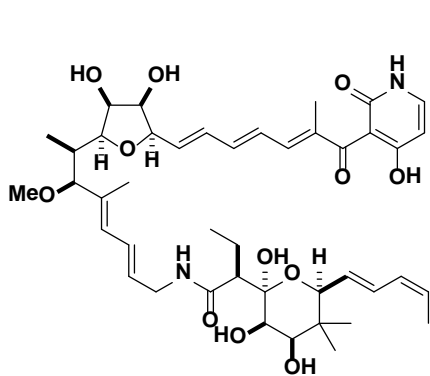
Urdamycin (15 kbp)



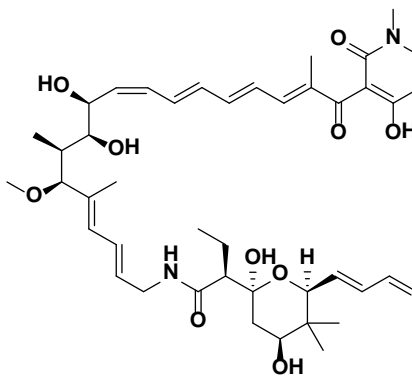
Resistomycin (15 kbp)



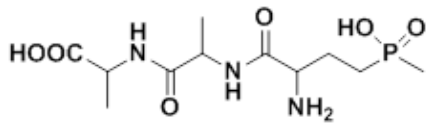
Fredericamycin (27 kbp)



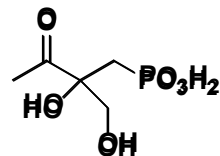
Mocimycin (80.6 kbp)



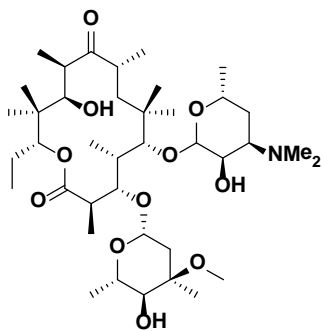
Factumycin (80.6 kbp)



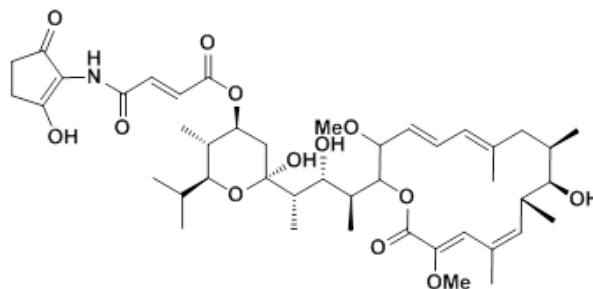
Bialaphos (34.6 kbp)



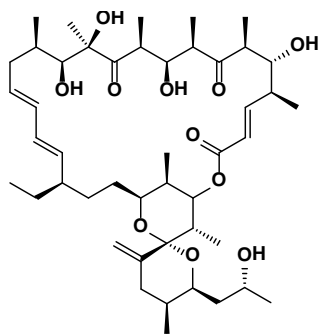
Phosphonothricin (16.6 kbp)



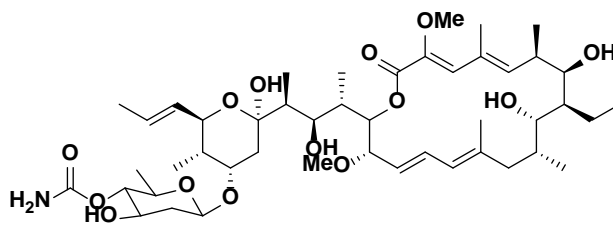
Erythromycin (54.6 kbp)



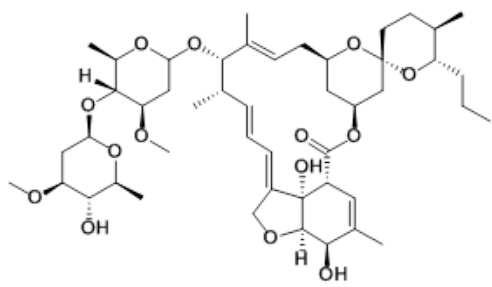
Bafilomycin (71.7 kbp)



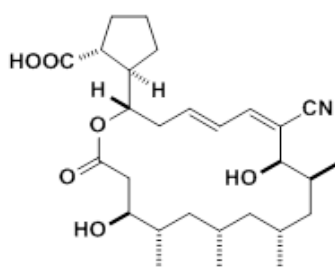
Oligomycin (101.1 kbp)



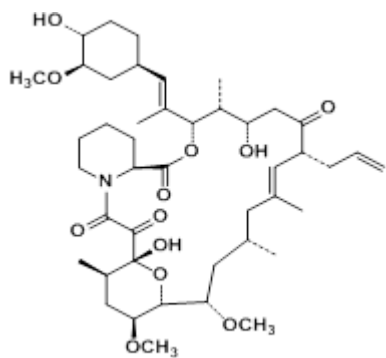
Concanamycin (99 kbp)



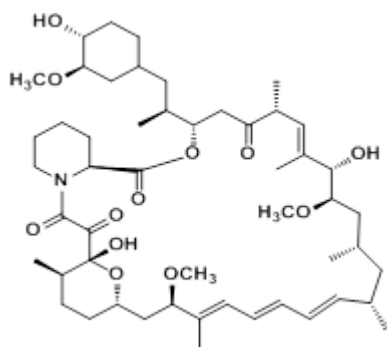
Avermectin (80.6 kbp)



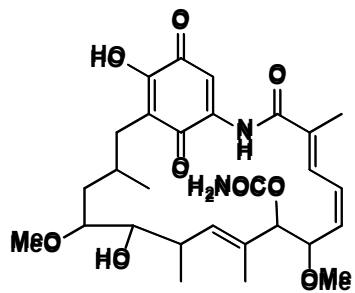
Borrelidin (54.9 kbp)



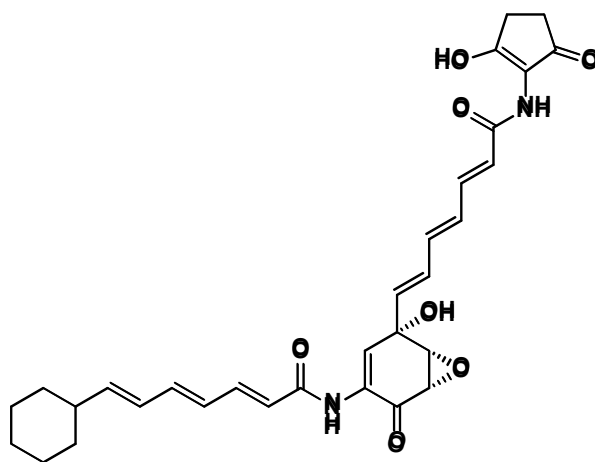
FK-506 (70.7 kbp)



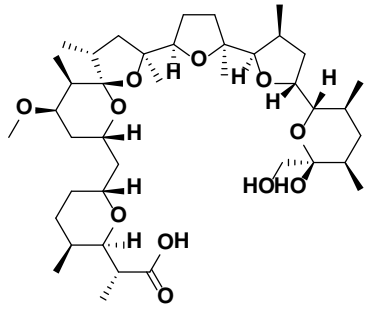
Rapamycin (107 kbp)



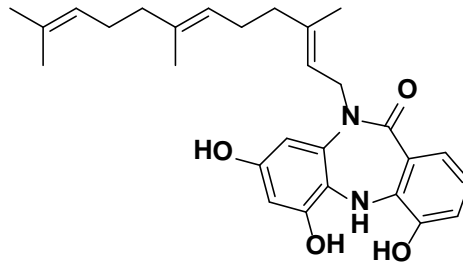
Geldanamycin (80.6 kbp)



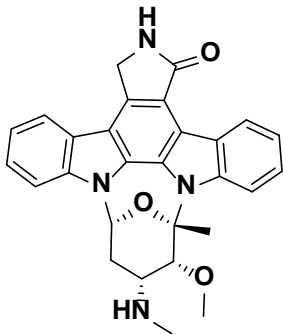
Asukamycin (80.6 kbp)



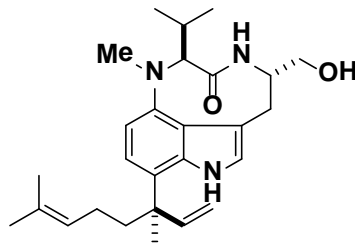
Nigericin (80.6 kbp)



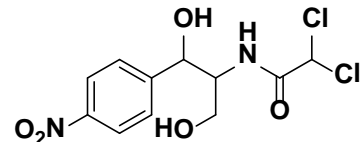
Diazepinomicin (43.2 kbp)



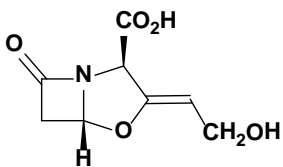
Staurosporine (26 kbp)



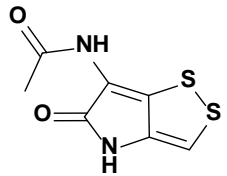
Teleocidin (12.8 kbp)



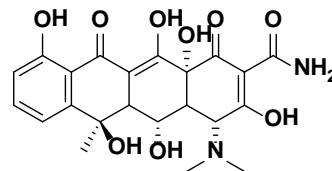
Chloramphenicol (23.5 kbp)



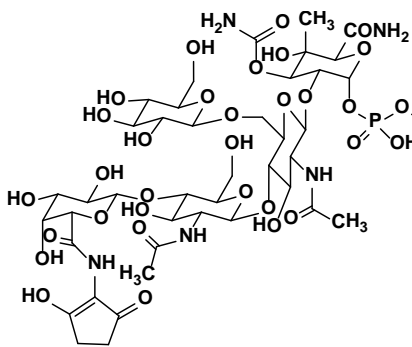
Clavulanic acid (25 kbp)



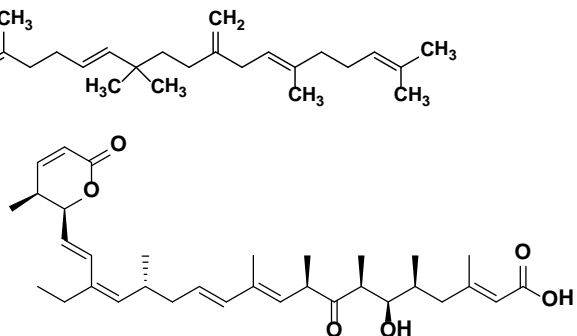
Holomycin (18 kbp)



Oxytetracycline (25 kbp)



Moenomycin (42.6 kbp)



Leptomycin (80 kbp)

図 1. 生合成遺伝子クラスターが報告されている化合物 (推定も含む)

(1)-1-2 生合成遺伝子クラスターが未報告あるいは生合成経路が不明な化合物

(1)-1-2-1 放線菌ドラフトゲノム解析法の確立

従来、生合成遺伝子クラスターの同定には、構造的特徴からキーとなる生合成反応から候補となる遺伝子を選抜し、遺伝子破壊による生産性消失を指標とするなど、極めて労力のかかる研究であった。

このような中、ギガシーケンサーの登場により、より迅速かつ安価に遺伝子配列情報が得られるようになり、多くの研究者が生合成遺伝子情報の取得にギガシーケンサーを利用し始めている。我々も、新奇骨格を有し生合成遺伝子クラスターの予測が困難であると考えられる化合物に関して、ギガシーケンサーによる *de novo* シーケンスを行い、得られた配列情報より能動的に生合成遺伝子クラスターを取得する技術の開発を行った。

放線菌ゲノムは、GC 含量の高い配列を持ち、繰り返し配列も多く存在する。そのため、放線菌のゲノム解析は極めて困難であり、現在のようにシーケンス技術が進歩していても、思うような結果が得られていないのが現実である。そこで、我々はサンゴのゲノム解読など、ギガシーケンサーを用いた *de novo* シーケンス解析で多くの実績を有する OIST (Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University、沖縄科学技術大学院大学) にて、放線菌に特化したドラフトゲノム解析法の開発を行った。

Roche 454 シーケンサー、およびプロジェクト終了直前ではあるが Miseq も導入し、より効率的な放線菌ドラフトゲノム解析を改良開発することにより、二年間で 44 菌株のドラフトシーケンスを行った。

放線菌はドラフトゲノム解析の対象として、現時点でも極めて困難な微生物（全生物を含め）であり、未だ我々のような高精度でドラフトゲノム解析を行える機関は無い。また、二年間の精力的な改良により、現在では年に 100 菌株以上のドラフトゲノム解析が可能になっている。

(1)-1-2-2 生合成遺伝子クラスター解析ツール (Genome Viewer) の開発

我々は、上記ドラフトゲノム情報より、化合物構造の特徴に基づく目的生合成遺伝子クラスターを同定する手法の開発を行った。まず、ドラフトゲノム情報のアノテーション、およびアノテーション情報を効率的に解析することが可能なビューワー (ソフト) の開発を行った。ベースとして用いたソフトは、北里大学、池田教授等が開発した「Genome Viewer」であるが、本ビューワーは、目的領域を指定して書き出すことにより、ORF 毎に区切られたゲノム配列情報を視覚化する。本ソフトに antiSMASH の様な、生合成遺伝子予測が可能なソフトのモジュールを自由に組み込めるように、ソフトの改良を行った。また、antiSMASH に関しては、基のデータベースを詳細に改変することにより、より高精度に生合成遺伝子をアノテーションすることを可能にした。

本ビューワーでは、キーワードによる検索により、ゲノム中に存在する各生合成遺伝子を抜き出すことが出来る。また、研究者自身が情報を容易にアップデートすることが可能であり、より詳細な情報を閲覧することにより、各研究者が容易にゲノム情報を解析することを可能にする。

本ビューワーは、Web を介して閲覧可能であり、IP アドレスあるいは認証による管理など高いセキュリティを持つと共に、各社独自のサイトを設けることにより、各社個別に情報管理を行えると共にゲノム情報の解析が可能である。

(1)-1-2-3 I型ポリケタイド生合成遺伝子クラスターの同定

我々は、上記ドラフトゲノム情報より、化合物構造の特徴に基づく目的生合成遺伝子クラスターを同定する手法の開発を行った。放線菌の生産する最も特徴的かつ産業上重要な化合物としてマクロライド系化合物が挙げられる。下図 2 の生合成遺伝子クラスターは、leptomycin の生合成遺伝子クラスターの模式図であるが、leptomycin は真核細胞生物の脂肪酸合成酵素（多機能ドメイン酵素）に似た、I 型ポリケタイド生合成経路 (Type-I PKS、I 型 PKS) により生合成される。I 型 PKS は、KS (β -ketoacyl-ACP synthase)、AT (acyl transferase)、ACP (acyl carrier protein)、KR (β -ketoacyl-ACP reductase) を主なドメインとして、DH (dehydratase) 及び ER (enoylreductase) の組み合わせにより一つのモジュールを形成する。Leptomycin の生合成遺伝子クラスターでは 6 個の相同性の高い繰り返し配列から構成される。脂肪酸合成酵素では、マロニル CoA (酢酸ユニット) のみを取り込まれるが、放線菌の I 型 PKS では、他の生物種には無い生合成メカニズムであるメチルマロニル CoA (プロピオン酸ユニット) の直接取り込み機構を持つのが特徴であり、これらユニットが縮合され主構造 (マクロライド化合物のアグリコン) が構築される。Leptomycin では、下記に示す様に、枝分かれ部分がメチルマロニル CoA の取り込まれる部分であるが、我々はこの酢酸ユニットとプロピオン酸ユニットの取り込みの違いにより、目的化合物の生合成遺伝子クラスターを同定する手法の開発を行った。

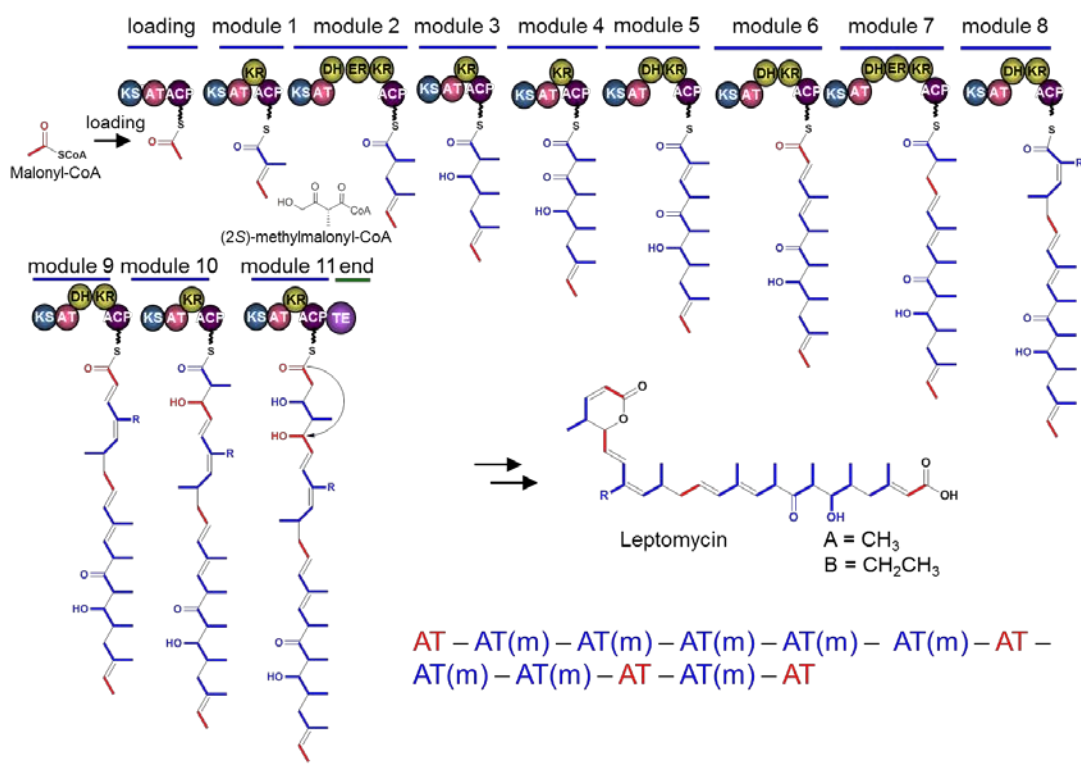


図 2. Leptomycin 生合成経路と生合成前駆体取り込みパターン

Leptomycin はその構造から、**酢酸**、**プロピオン酸**、**プロピオン酸**、**プロピオン酸**、**プロピオン酸**、**プロピオン酸**、**酢酸**、**プロピオン酸**、**プロピオン酸**、**酢酸**、**プロピオン酸**、**酢酸**の順に取り込み縮合される。これらのユニットは AT (acyl transferase) ドメインにより運ばれてくるが、そのゲノム配列の微妙な違いにより区別されることが知られている。我々は、この微妙な違いを精度良く区別するシステムを開発した。すなわち、**プロピオン酸ユニット**は **AT(m)** (メチルマロニル CoA を利用するというので、頭文字の m を付けた記号とした) によって、**酢酸ユニット**は **AT** を利用する差を基に分類する。本手法を用いて、今回のプロジェクトの目的化合物の一つである JBIR-102 の生合成遺伝子クラスターの同定を行った例を示す。

JBIR-102 は、*Saccharopolyspora* sp. RL78 が生産するシクロプロパン環を有する化合物である。シクロプロパン環を有する化合物は、様々な生理活性を示すことが多く、このようなシクロプロパン環合成酵素を同定することにより、様々な化合物のシクロプロパン環化が期待される。本化合物は、その構造的特徴から、**プロピオン酸**、**酢酸**、**プロ**

ロピオン酸、酢酸、プロピオン酸、酢酸、酢酸の順に前駆体を取り込まれて生合成されると考えられる (図 3)。

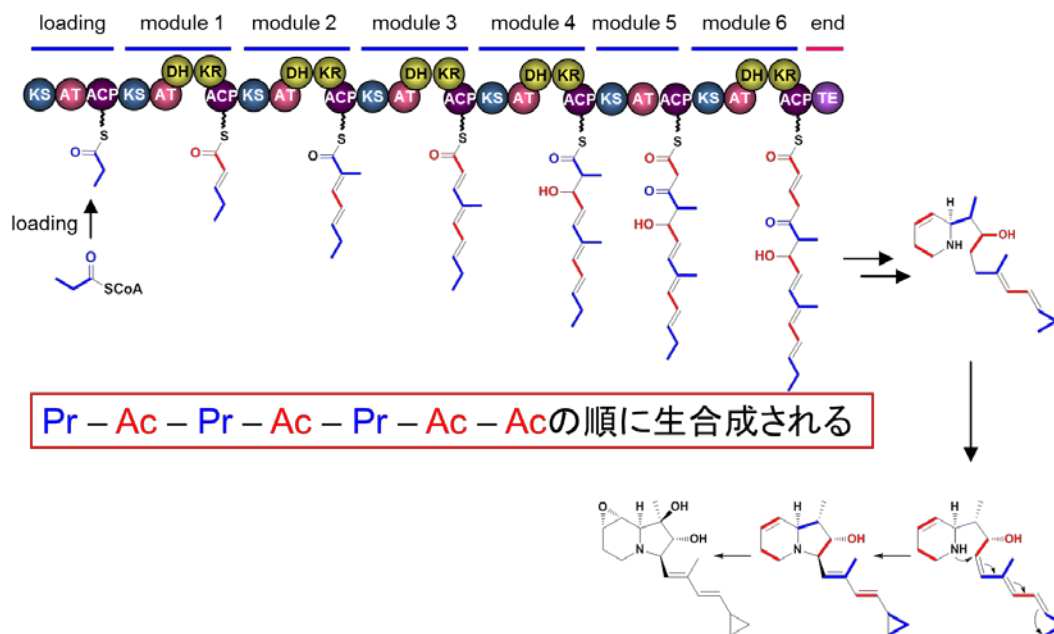


図 3. JBIR-102 生合成経路

これらの各ポリケタイド生合成遺伝子クラスターについて、前駆体取り込みパターンに一致するクラスターを検索し、選抜したポリケタイドクラスター周辺を詳細に検討することにより、JBIR-102 の生合成遺伝子クラスターの同定を行った。

(1)-1-2-4 非リボゾーマル型ペプチド生合成遺伝子 (Non-Ribosomal Peptide Synthetase、NRPS) クラスターの同定

NRPS は、A (アデニル化部位)、PCP あるいは T (チオエステル化)、C (縮合反応) を主なドメインとして、一つのマジュールを形成する。縮合したペプチド鎖は、TE (thioesterase) ドメインにより切り出される。放線菌では、多くの NRPS 系化合物の生合成研究が行われて来ており、様々な知見が蓄積されている中で、NRPS 系化合物に取り込まれるアミノ酸は、A ドメインによって制御されていることが知られている (一部の例外は見られるが)。そこで、我々も常法通り、NRPS 系化合物については、A ドメインの配列の解析によって目的生合成遺伝子クラスターの同定を行った。

(1)-1-2-5 リボゾーマル型ペプチド生合成遺伝子 (Ribosomal Peptide Synthetase, RiPS) クラスターの同定

ペプチド系化合物は、長きに亘り NRPS によって生合成される化合物が多いと考えられて来た。しかしながら、近年のゲノムシーケンスから生合成遺伝子クラスターの探索が行われるようになってきた中で、アミノ酸配列から推定される NRPS 生合成遺伝子クラスターが見つからないケースが多く見られるようになってきた。リボゾームによって生合成されるペプチド系化合物は、アミノ酸の数×3 (トリプレットコード) 塩基の配列のみが生合成遺伝子クラスター同定の指標となるため、高い精度のゲノムシーケンスが要求されることから、期待されたペースでリボゾーマル型ペプチド生合成遺伝子クラスターの報告されていないのが現状である。

優れた抗菌スペクトルを示す化合物 bottromycin は、高度に修飾されたアミノ酸から構成される化合物であるが、長い間その生合成遺伝子クラスターは同定されていなかった。我々は、生産菌である *Streptomyces bottropensis* NBRC13023 ゲノム解析を行い、本物質のアミノ酸配列パターンから、該当する NRPS 生合成遺伝子クラスターの探索を行った。しかしながら、本菌株のゲノム中には該当する NRPS の候補は全く見出されなかった。そこで、我々は本物質がリボゾーマル型ペプチド生合成経路によって生合成されると考えた。

本物質は、高度に修飾された 8 個のアミノ酸からなる。したがって、24 塩基のみが本物質の生合成遺伝子クラスターを同定する唯一の情報である。通常、24 塩基による配列検索は、余りにも短い配列であるため検索では弾かれてしまう。そこで、我々は配列検索のパラメーターを改変し、短い配列でも検索が可能なシステムを構築した。また、短い配列で検索するが故にゲノムシーケンスの精度が極めて重要である。この 24 塩基による検索を行った結果、GPVVVFDC のアミノ酸配列を含む **MGPVVVFDC**MTADFLNDDPNNAELSALEMEELESWGAWDGEATS の配列を持つ precursor peptide (leader peptide) を同定した。本配列は、本菌株には一つしか見出されなかったため、高い確率で候補遺伝子として選抜し、本 precursor peptide をコードす

る遺伝子周辺を詳細に検証した結果、本 precursor peptide をコードする領域を bottromycin の生合成遺伝子クラスターと同定することに成功した。

上記のようなゲノム情報に基づいた生合成遺伝子クラスター同定法により、40 株の放線菌より、I 型 PKS 経路、NRPS 経路、リボゾーマル型ペプチド合成経路、テルペン合成経路、核酸合成経路から生合成される 40 個以上の化合物の生合成遺伝子クラスターを同定した。

(1)-2 生合成遺伝子クラスターの取得（次世代天然物化学技術研究組合、共同実施先：北里大学、東京大学）

生合成遺伝子クラスターの取得に関しては、クラスターの大きさによって、Cosmid ベクターを用いる手法と、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターを用いる手法の二種類の方法に分けて行った。Cosmid は 40 kbp 前後（約 45 kbp まで）の大きさの DNA 断片のクローニングに使用され、これまで多くの微生物二次代謝産物生合成研究に用いられて来た。これに対し、BAC ベクターは 100 kbp を超える DNA 断片のクローニングが可能なベクターであり、I 型 PKS 生合成遺伝子クラスターをクローニングするには必須なアイテムである。BAC ベクターは、ヒトゲノム計画において、ゲノムライブラリーを作製するために利用されていたが、大きなサイズの DNA 断片を含むライブラリーを調製するのは極めて困難であり、ごく一部の機関でしか実用化されていなかったと言っても過言では無い。また、微生物ゲノムを対象に BAC ベクターによるライブラリー構築の例は極端に少なく、産業応用を目的としたマクロライド系化合物のような大きな分子量の化合物の巨大な生合成遺伝子クラスターの研究には、本技術開発が必須である。

(1)-2-1 クラスターサイズが 40 kbp 以下の生合成遺伝子クラスター

前述したように、40 kbp 程度の生合成遺伝子クラスターに関しては、主として Cosmid ベクターを用いてゲノムライブラリーの調製を行い、目的クローンの選抜を行った。

現在、放線菌用に改良された Cosmid ベクターは複数存在するが、クローニング後のシーケンス解析が困難であったり、増幅時に不安定であるようなベクターも多い。そこで、本プロジェクトでは、avermectin 生産菌である *Streptomyces avermitilis* の生合成遺伝子クラスターのクローニングや、ゲノムプロジェクト研究において、既に多くの実績のあるコスミドベクターである pKU408 を用いた。本 Cosmid ベクターは、他の Cosmid ベクターと比較して、大きな遺伝子断片が入ったクローンの出現率が多いことも特徴の一つである。

本システムを用いて、25 個の化合物について Cosmid クローンの取得に成功した。

(1)-2-2 クラスターサイズが 40 kbp 以上の生合成遺伝子クラスター

BAC ベクターを用いたゲノムライブラリーの構築に関しては、まずその技術開発そのものから行った。BAC ライブラリーの調製は手技的に極めて難しく、世界でも有数のラボでのみ安定に調製が可能であるが、そのゲノムサイズは 100 kbp 程度であることが多い。現在、我々は 120 kbp 前後であれば、ほぼ確実に BAC ライブラリーの調製が可能になっており、今回の開発研究で取得した最大サイズのインサートは、concanamycin の生合成遺伝子クラスター取得を目的に調製した際に得られた 215 kbp (インサートサイズ)であった。現在、150 kbp 近辺、180 kbp 近辺、および 200 kbp 以上のサイズの BAC ライブラリー調製法の確立を目指し種々の改良を行っている。また、グローバルスタンダードとなることが期待される本手法は、ヒトゲノム、各種病原性微生物、さらに優秀な種和牛のゲノム解析用のライブラリー調製に適用する計画である。

本 BAC ライブラリーより、シーケンス情報より得た、生合成遺伝子クラスターの両末端配列を用いて設計したプライマーを用いて、目的生合成遺伝子クラスターを持つクローンの選抜を行った結果、38 化合物の生合成遺伝子クラスターを取得した(結果的にある一つの BAC ベクターに新規化合物の生合成遺伝子クラスターが同時に含まれていたため、総計 39 化合物の生合成遺伝子クラスターを取得している)。

(2) 【安定生産技術の開発】

(2)-1. 異種発現システムを用いた生産実証による汎用性の検証（次世代天然化学技術研究組合、共同実施先：北里大学、理化学研究所、東北大学）

上記（1）【生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築】でクローニングした生合成遺伝子クラスターに関して、最終的に再度にシーケンス確認したクローンを用いて、放線菌ホストに導入し異種発現生産の検討を行った。本プロジェクトでは、生産性の高さ、形質転換法が精査されている SUKA (SUKA17) 株を、主放線菌ホストとして用いた。SUKA 株は、目的化合物の生合成前駆体が外来性生合成遺伝子クラスターを導入することによって生成した生合成酵素の各反応に効率良く利用されるため、内在性の代謝産物の生合成遺伝子クラスターを欠失させ、内在性代謝産物の生成を停止させていること、また親株が工業生産に使用されている菌株であるというのが大きな特徴である。この他のホストとして、世界中でホスト菌株として汎用されている *S. albus* J1074 株（制限修飾系変異株、SAL1074）、および *S. lividans* KASU-1（幾つかの内在性生合成遺伝子をノックアウトしている）を用いて、形質転換効率および生産性の比較検討を行った。

(2)-1-1. Cosmid ベクターで取得した生合成遺伝子クラスターの放線菌ホストでの異種発現生産

Cosmid ベクターで取得した生合成遺伝子クラスターに関しては、プロジェクト当初の予定通り、SUKA (SUKA17) 株を主ホストとして異種発現生産を検討した。さらに、主ホストである SUKA17 株に加えて、SUKA17 株で異種発現生産が確認出来なかった化合物については、SAL1074 および KASU-1 の二種類のホストを追加して異種発現生産を検討した。

それぞれの宿主菌株をクローニングした Cosmid クローンで形質転換し、薬剤選択性を指標にヒットクローンを選抜した。これらのクローンに関して、主に 4 種類の培地を用いて異種発現生産を確認した。本プロジェクトにおいて、Cosmid ベクターを用いて取得した 25 個の生合成遺伝子クラスターに関して異種発現生産を検討した。SUKA 株と本 Cosmid ベクターの相性は極めて良く、SUKA17 株に適用した 24 個の生合成遺伝子ク

スター全て形質転換できた。これら 24 形質転換体のうち、何ら遺伝子改変を行うことなく、化合物の異種発現生産が確認されたものは 15 化合物であった。生産性に関しては、もっとも高いもので、360 mg/L (resistomycin) と驚くべき高い生産性であった。また、これらのうち、aristeromycin および toyocamycin に関しては、それぞれ誘導体である coaristeromycin および sangivamycin を生産していた。

異種発現生産が確認されなかった化合物について、lactacystin、thiostrepton および telomestatin の 3 化合物については、生物活性的に重要な化合物であることから、遺伝子改変による異種発現生産誘導を試みた。その結果、lactacystin および thiostrepton の 2 化合物については、それぞれプロモーター交換および耐性遺伝子を導入することにより、異種発現生産誘導することが出来た。しかしながら、telomestatin に関しては、複数のプロモーター交換体などを調製したが、全く生産性は誘導されなかった。

生産性が低かった novobiocin および bottromycin に関して、培地あるいは遺伝子改変を行う事により、生産性の向上を誘導することに成功した。Novobiocin は、植物の二次代謝産物である artemisinic acid 生合成遺伝子の一つである P450 遺伝子 CYP71AV1 の導入により、20 倍以上の力価向上が観察された。また、bottromycin については、培地改変により、1.5 mg/L から 10.5 mg/L へ生産性向上が観察され、さらに生合成遺伝子クラスターの最小化により、40 mg/L という高生産性を誘導した。Bottromycin に関しては、特異な抗菌スペクトルを持つが、極めて生産性が低い (100~400 µg/L) ことから世界中で生合成研究が行われており、本プロジェクト期間中に幾つか論文が報告された。このうち、Rolf Müller 等は生合成遺伝子クラスターを同定し、異種発現生産に成功している (Chemistry & Biology, 19, 1278 - 1287 (2012))。彼らは、ホストとして *S. coelicolor* および *S. albus* (strain 名は不明) を用いているが、生産量はそれぞれ 1 µg/L および 4 µg/L と産業的応用にはほど遠い値であった。なお、これらの生産性は SUKA 株の形質転換体の 1/1000 以下である。

以上に示したように、本開発研究において取得した Cosmid クローンに関しては、25 個中 21 個と言う極めて高い成功率で目的化合物の異種発現生産が確認された (84%)。

(2)-1-2. BAC 法で取得した生合成遺伝子クラスターの放線菌ホストでの異種発現生産

BAC ベクターで取得した生合成遺伝子クラスターに関しては、プロジェクト当初ホストとして使用する予定であった SUKA17 株に加えて、reveromycin 一化合物を除き、SAL1074 および KASU-1 の二種類のホストを加えた、3 つのホストを用いて異種発現生産を検討した。

BAC ベクターを用いて取得した 39 化合物の生合成遺伝子クラスターについて、SUKA17 株に遺伝子導入した結果、18 個の化合物について形質転換体が取得出来た（形質転換体取得率 46%）。後述するが、BAC に関しては SUKA17 株への形質転換効率は、空ベクターでも著しく低く、生合成遺伝子クラスターが挿入された BAC クローンとほとんど同等の形質転換効率であった。しかしながら、形質転換体が得られたクローンに関しては、12 化合物（factumycin 生合成遺伝子クラスターが、未知生合成遺伝子クラスターを含んでおり、 β -carboline 系化合物の異種発現生産が誘導された）が異種発現生産された（生産株取得率 67%）。また、その生産量に関しては、70%以上の化合物が 5 mg/L 以上の生産性で異種発現生産されていた。

SUKA17 株に対して、操作性が容易なことから様々な研究に使用されている *S. lividans* を親株とする KASU-1 株では、親株同様、高い形質転換効率を示し、試験した 38 個全ての化合物の生合成遺伝子クラスター形質転換体が取得された。しかしながら、それらの形質転換体について、異種発現生産を検討したところ、11 個の化合物のみ生産が誘導され、かつそれらのうちの半分は生産性が 1 mg/L 未満であり、異種発現生産用のホストとしては、それほど有望ではなかった。しかしながら、KASU-1 株のみで生産が確認された化合物として、borrelidin（抗菌、抗マラリア）、rapamycin（抗腫瘍剤、免疫抑制剤として臨床応用）および企業化合物 4（臨床開発候補化合物）のような、産業応用上、重要な化合物も含まれていること、また形質転換体の取得が容易であることから、検証ホストとしては利用価値があると考えられる（後述する、SUKA 株への遺伝子導入を媒介する菌として利用できる）。

SAL1074 に関しては、SUKA17 株および KASU-1 株の中間の性質を示した。その形

質転換体取得率は 71%であり、生産株取得率は 52%であった。生産性も 60%以上の化合物が 1 mg/L 以下であった。SAL1074 株の形質転換体取得に関しては、空ベクターの導入率よりも生合成遺伝子クラスターが入ったクローンの方の導入率の方が高いと言った、特異な現象が観察された。

以上の 3 つのホストを用いて、39 化合物について異種発現生産を検討した結果、合計 23 個の化合物について、異種発現生産が確認された (59%)。BAC ベクターを用いた巨大生合成遺伝子クラスターの異種発現生産に関しては、ほとんど報告例が無く、我々が構築したシステムと比較することは不可能であるが、一般に Cosmid ベクターを用いた生合成研究でも、遺伝子改変など行わない場合、その成功率は 10%程度と言われている。今回、我々は Cosmid クローンをを用いた異種発現生産では 84%と高い成功率を示したが、汎用されている *S. lividans* ではその成功率は約 2 割と低いものであったことから、一般的に「10%」と言われている数字は妥当なものであると考えられる。また、BAC クローンをを用いた異種発現生産では、何も遺伝子改変など行っていないことを考慮すると、極めて高い確率で異種発現生産に成功したと言っても過言では無いと考えられる。

今回の開発研究で、BAC ベクターを用いた異種発現生産は、コスミド (84%) と比較して低い結果となったが、この原因としてホストとして用いた SUKA 株への形質転換効率が低いことが原因の一つと考えられた。SUKA 株は、他の 2 つのホストと比較して BAC ベクターの形質転換効率が低いのが、形質転換体を得られた場合、それらの異種発現生産成功率は約 7 割と極めて高く、5 mg/L 以上の生産量が観察された割合も 75%と群を抜いて高かった (SAL1074 および KASU-1 は、それぞれ 21%および 36%)。Cosmid クローンをを用いた異種発現生産の成功率、および生産性の高さから、我々が主ホストとして用いた SUKA 株は、現在存在する最も優れた放線菌ホストと考えられる。したがって、SUKA 株への BAC クローンの形質転換効率を向上させることが、今後の産業応用を目指した、有用天然化合物異種発現生産には最も大きな課題と考えられる。

表 1. BAC クローンの形質転換効率、および異種発現生産効率

ホスト	生合成遺伝子クラスター数	形質転換体	形質転換体取得率	化合物生産株数	生産株取得率
SUKA17	39 個	18 個	46%	12 個	67%
SAL1074	38 個	27 個	71%	14 個	52%
KASU-1	38 個	38 個	100%	11 個	29%

表 2. BAC クローン形質転換体の化合物生産量

生産性	SUKA17	SAL1074	KASU-1
> 5 mg/L	9 個	3 個	4 個
1-5 mg/L	0 個	1 個	1 個
< 1 mg/L	3 個	9 個	6 個
生産化合物数	12 個	14 個	11 個

(2)-1-3. 新規化合物生産

放線菌ゲノム中には、これまで報告例の無かった未知生合成遺伝子クラスターが存在することが知られている。BAC ベクターによって取得した、生合成遺伝子クラスター中には、目的生合成遺伝子クラスターに加え、ある一定以上の長さからなる余分な領域が含まれる。したがって、BAC クローンを用いて形質転換した宿主菌株は、未知生合成遺伝子クラスターによって生合成される化合物を生産することが期待される。本プロジェクトにおいて、異種発現生産候補化合物の一つである factumycin は、85.6 kbp からなる生合成遺伝子クラスターによって生合成される。本化合物の生合成遺伝子クラスターを BAC を用いてクローニングした結果、約 100 kbp のヒットクローンを得た。本 BAC クローンを、SUKA17 株に導入したところ、factumycin の生産は確認出来なかったが、三種類の新規化合物の生産が確認された。本化合物を単離し、構造決定を行った結果、植物二次代謝産物として知られる、 β -calboline 系の新規化合物であることを明らかにした。

この他にも、生合成遺伝子クラスター導入により、複数の誘導体新規化合物の生産に成功し、今後の未知利用遺伝子の応用、あるいは菌体内化合物修飾への応用が現実的に可能であることを示すことができた。

(2)-2. 異種発現システムの改良による安定生産技術の開発（次世代天然化学技術研究組合、共同実施先：北里大学、理化学研究所）

前述したように、異種発現生産が認められなかった化合物、あるいは生産性の低かった幾つかの化合物に関して、常法ではあるがプロモーター交換や制御因子の導入などにより、異種発現生産の誘導および生産性向上に成功している。本技術開発では、最終化合物では無く、前駆体あるいは不活性型化合物の生産が確認された例が多く見られた。そこで、我々は耐性遺伝子の重要性に着目し、耐性遺伝子の強化を行うことにより、化合物の異種発現を誘導できると考え、耐性遺伝子の同調発現システムを導入することにより、期待通りの結果を得ることに成功している。この他にも、一つ一つの ORF の直前にプロモーターを挿入したユニットを、クラスター内に組み込む事により異種発現生産を誘導する報告があるが、我々も同様の手法により化合物の異種発現生産に成功している。

以上の様に、個々の化合物に関しては、種々の遺伝子改変を行う事により異種発現生産を誘導することが可能であると考えられるが、極めて多くの労力を要するのは否めない。本研究開発の異種発現生産の大規模検証により、当初の予想通り工業生産株の内在性生合成遺伝子クラスターを破壊した SUKA 株が、異種発現生産に最も適したホストであることを明らかにしたが、一方で、巨大生合成遺伝子クラスターが挿入された BAC クローンの SUKA 株への導入効率が低いという短所も見出した。我々は、この SUKA 株への遺伝子導入の低さを克服することにより、煩雑な遺伝子改変を行うこと無く（あるいは一つの目的化合物においては改変量を減らす）、異種発現生産の成功率を上げることが可能ではないかと考えた。

そこで、本開発研究で問題となった BAC ベクターの SUKA 株への遺伝子導入効率の低さを克服するため、種々のシステム開発を行った結果、線状プラスミドである SAP1 を用いた、遺伝子導入システムを開発した。本システムは、遺伝子導入効率の高い *S. lividans* を介して SUKA 株に遺伝子導入するものである。これにより、そのままでは SUKA 株へ導入出来なかった生合成遺伝子クラスターを SUKA 株に導入することが可能に

なり、異種発現生産への応用が期待される。

SUKA17 株において、通常の BAC 導入法では形質転換体が取得出来なかった生合成遺伝子クラスターのうち、産業上最も重要であると考えられる avemectin や FK-506 を含む数個の化合物について、SAP1 法を用いて SUKA22 形質転換株の取得を行った。その結果、10 個の化合物のうち一つの化合物を除いて、SUKA22 株での異種発現生産に成功した。

特許、論文、外部発表等の件数

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表		
	国内	外国	PCT※ 出願	査読 付き	その 他	学 会 発 表・講演	新聞・雑誌等 への掲載	その他
平成 23 年度	0 件	0 件	0 件	33 件	4 件	21 件	0 件	0 件
平成 24 年度	0 件	0 件	0 件	29 件	5 件	27 件	0 件	0 件

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

IV. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

1. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

本開発研究で得られた成果のうち技術・システムは、放線菌ゲノムの精密ドラフトシーケンス技術、BAC ベクターによる巨大ゲノム断片取得技術、放線菌ホストへの巨大遺伝子クラスター導入方法である。これらの関しては、組合員である製薬等企業で利用することが今後の普及活動になるが、既に企業サンプルに関しては幾つかの実施例を行い、事業へ展開しているものもある。また、BAC ベクターを用いた巨大ゲノムライブラリー作製に関しては、ヒトゲノム、病原菌ゲノム、および牛や豚などの優良品種ゲノム解析の一般的スタンダード（国際スタンダードも含む）として利用される可能性があると共に、受託業務へと事業展開することも視野に入れている。

本開発で得られた生合成遺伝子クラスターやそのゲノム配列に関しては、組合員で利用するとともに、高生産性が証明できた SUKA 株については、組合員の中で標準ホストとして普及させると共に、将来的にはライセンス使用料を得る形で広く普及させる。

本プロジェクトで異種発現生産を行ったある化合物について、その生合成遺伝子クラスターの SUKA22 株での強制発現によって、1 g/L の生産性を達成している。本化合物は、元の親株では当該遺伝子は休眠状態なので、いかなる培養方法によっても生産物は得られていない。この程度の生産性は、産業生産に見合う量であり、極めて近い将来実用化が期待できるものである。

さらに、これまで自然界から単離した菌株では生産が見られなかった化合物の生産誘導ができる技術、応用研究およびその後の産業利用にはほど遠い生産量であった化合物を合目的に生産および力価向上を行える技術として、製薬等企業での創薬スクリーニングに応用することにより、これまでに無い医薬品の開発を展開する。

添付資料

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日

産業技術環境局

製造産業局

1. 目的

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL (Quality of Life: 生活の質) の向上を図ることが求められている。

この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図る。

2. 政策的位置付け

○新成長戦略(基本方針)(2009年12月30日)

強みを活かす成長分野として「グリーン・イノベーション」分野と「ライフ・イノベーション」分野を策定、人材育成や技術開発を後押しするほか、需要を創造すると同時に利用者の立場に立った社会ルールの変更に取り組む。また、政府は新たな分野に挑戦する人々を支援するとしている。

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略(2009年2月12日改訂)

内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価、官民対話等、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

○「ドリームBTジャパン」(2008年12月11日BT戦略推進官民会議)

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス利活用等の課題に対処すべく、イノベーション強化11項目や官民が協働で取り組むべき最重点課題を策定した。

○新経済成長戦略のフォローアップと改訂(2008年9月19日閣議決定)

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

○「iPS細胞研究の推進について（第一次とりまとめ）」（2008年7月3日総合科学技術会議 iPS細胞研究WG）

iPS細胞研究の成果がもたらす医療への波及効果や新しいバイオインダストリーの進展等について検討を行い、iPS細胞研究を推進するための研究推進体制、国の支援の在り方、知的財産戦略、国際化協力の在り方等をとりとまとめた。

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療及び在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施するとともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

○がん対策推進基本計画（2007年6月閣議決定）

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体及び関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

○新健康フロンティア戦略（2007年4月新健康フロンティア戦略賢人会議）、同アクションプラン（2007年12月）

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦略及び新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」及び「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。
- ③医療機器¹など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

¹ 医療機器は、画像診断システムなどの「診断機器」、内視鏡下手術支援システムなどの「治療機器」、その他家庭用医療機器、歯科材料、眼科用品を含む。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に関与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、及び、有用性が認められた糖鎖機能を産業利用するための基盤技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）（運営費交付金）

①概要

我が国が強みとする完全長cDNAライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

(健康安心イノベーションプログラム)
「ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティックスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や、画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

近年、製薬企業の研究開発費は増大の一途であるものの、承認される薬剤の数は増えていない。研究開発費の増大分は、主として臨床開発費に充てられ、探索研究に回せるリソースは相対的に減少している状況にあることもその理由の一つであるが、創薬ヒット化合物の発見につながる新たなスクリーニング手法の技術革新と技術実証の不足により、新規医薬品候補化合物の探索効率が大幅に低下している可能性も指摘されている。このため、最先端の知識と分析技術を組み合わせ、創薬開発のより早い段階から適切な医薬品候補物質の取得を可能とする、標的蛋白質の立体構造をベースとした *in silico* スクリーニングや探索対象となる化合物空間の拡大など、創薬の効率化に繋がる新たな技術の開発が求められている。

こうした状況のもと欧米における創薬研究では、タンパク質の立体構造に基づいた薬剤の開発による創薬研究の効率化への取り組みが進みつつある。このため、今後の医薬品産業の国際競争力の強化に向けて、タンパク質の立体構造解析技術や計算科学による創薬候補化合物探索技術等の基盤技術の構築が重要となっている。特に市販薬剤のターゲット（作用点）として、ほぼ50%を占めている膜タンパク質は、生命現象の解明や創薬開発において重要な標的タンパク質である。また、膜タンパク質は細胞膜上における複合体形成や構造変化等により機能を発現していることから、細胞表層における膜タンパク質及びその複合体の立体構造解析技術や膜タンパク質とリガンドの相互作用解析技術、その構造情報に基づいた計算科学的解析技術を構築し、創薬ヒット候補化合物を効率よく絞り込むための基盤技術を開発することで、「タンパク質立体構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure Guided Drug Development)」を実現し、創薬研究を効率化することが重要である。

他方、創薬ヒット化合物の探索については、近年、製薬企業を中心に、コンビナトリアルケミストリーによる化合物合成とそのライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングが盛んに行われたが、必ずしも期待された成果が出ておらず、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。微生物は、天然化合物のリソースとして最も有望なものの一つであるが、培養抽出物として安定的かつ大量に取得できないなど、そのままではスクリーニングの効率化に様々な問題点がある。そこで、これまでに無い新しい骨格を持った化合物

も含め、微生物の持つ天然化合物の生合成遺伝子を取り出して別の宿主菌株で発現させるなど、目的とする天然化合物を安定的かつ効率よく発現させる手法を開発することが重要である。

本プロジェクトは、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」を加速するため、以下の2つの技術開発を実施する。

〈1〉 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発

我が国の強みである世界最高レベルの膜タンパク質構造解析技術、タンパク質間相互作用解析技術、高度な計算科学技術等の研究ポテンシャルを最大限活用し、膜タンパク質及びその複合体の細胞表層上における立体構造解析、相互作用解析、計算科学を用いた創薬候補化合物の効率的な探索と更に実用性の高いリード化合物への展開等の創薬基盤技術の開発を行う。

〈2〉 有用天然化合物の安定的な生産技術開発

我が国の強みとする微生物ライブラリーや、天然物化学に対する知識基盤等を最大限に活用し、創薬リード化合物候補となりうる広いケミカルスペースを持った天然化合物を生産する生合成遺伝子とそれを応用した化合物生産を効率的に行う技術開発により、安定生産技術としての汎用性を見極める。

これにより、構造情報を基にした新しい観点からの画期的な新薬の創出、さらには膜タンパク質及びその複合体の機能、機構を説明する新しい概念の構築、天然物化学情報基盤の強化等により、ゲノム情報を活用した創薬技術の高度化による我が国バイオ産業の競争力強化、新産業の創出・育成を通じて、国際的優位性を確保することが期待できる他、個別化医療への応用とともに、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開が期待できる。

(2) 研究開発の目標

〈1〉 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発

標的とするタンパク質の「立体構造に指南された創薬戦略 (SGDD: Structure Guided Drug Development)」を実現し、創薬研究を効率化する基盤技術を確立する。

〈2〉 有用天然化合物の安定的な生産技術の開発

放線菌を対象に、新規の医薬品開発につながる有望な天然化合物の合成に必要な生合成遺伝子クラスターを体系的に取得し、安定生産に適した宿主放線菌、導入ユニットの構築及び導入技術を確立する。

(3) 研究開発内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

〈1〉 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発 (平成20年度～平成24年度)

- ① 電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術
- ② 核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術
- ③ 高精度 *in silico* スクリーニング等のシミュレーション技術

各項目は相互に連携し、GPCR (Gタンパク質共役受容体) など創薬ターゲットとして重要な共通膜タンパク質に対して、①で構造データを、②で相互作用・機能データを取得し、③の動的特性、ドッキング解析に反映させるとともに、③で得られた結果を①、②にフィードバックしながら効率的なリード化合物スクリーニング手法に展開し、具体的な創薬実証研究に応用していく。

〈2〉 有用天然化合物の安定的な生産技術開発 (平成23年度～平成24年度)

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

- ① 創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発は、経済産業省により、企業、民間研究機関、独立行政法人、大学等（委託先から再委託された研究開発実施者を含む）から公募によって研究開発実施者が決定され、共同研究契約等を締結する研究体が構築され、平成19年度より委託して実施されている。平成20年度より、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下「NEDO」という。）が本事業を運営・管理するに当たっては、外部有識者から構成される技術評価委員会等を設置し、平成19年度の進捗状況を踏まえた事業内容・計画及び実施体制の妥当性についての審議に基づいた評価を行った上で委託して実施する。
- ② 本研究開発では、「電子線等による膜タンパク質及びその複合体の構造解析技術」、「核磁気共鳴法等による膜タンパク質及びその複合体とリガンド分子の相互作用解析技術」、「高精度in silico スクリーニング等のシミュレーション技術」を連携させながら一体的に進めることが必要であり、適切な実施体制を構築する。
- ③ 共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、NEDOが指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を研究開発項目毎に設置し、その下で効果的な研究開発を実施する。研究開発項目①「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、国立大学法人名古屋大学細胞生理学研究所教授 兼 京都大学大学院理学研究科 兼 独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター タンパク質構造解析チーム招聘研究員 藤吉好則氏を研究開発責任者とする。研究開発項目②「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」については、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 新家一男氏を研究開発責任者とする。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDO は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO に設置する委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成20年度から平成24年度までの5年間とする。

本研究開発は平成19年度に経済産業省が実施した「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」事業について、平成20年度より NEDO の事業として実施するものである。

4. 評価に関する事項

NEDO は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成21年度、事後評価を平成25年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取り扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) 膜タンパク質の発現・精製、結晶化技術と極低温高分解能電子顕微鏡の高速化と精密化、及びそれらを駆使したタンパク質構造解析とそのデータベースなど、本技術開発を通じて得られる有用な情報。
- b) 膜タンパク質複合体における分子間相互作用解析法のノウハウ、本技術開発を通じて得られる有用な情報。
- c) 化合物データベース、in silicoスクリーニング用計算プログラム等、本技術開発を通じて得られる有用な情報。
- d) 有望な天然化合物の合成に必要な生合成遺伝子クラスターのライブラリーとそのデータベース、ホスト放線菌とユニット遺伝子導入技術、発現させた天然化合物。

② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備事業又は標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③ 知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第26条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

④ 成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、研究開発期間中に必要な見直しを行う。
- b) 受託者は、上記a)で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、国内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号に基づき実施する。

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）等、研究開発関連の指針を厳守しなけ

ればならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」（平成16・12・24製局第1号）を厳守しなければならない。

6. 基本計画の改訂履歴

- (1) 平成20年3月、制定。
- (2) 平成22年3月、中間評価で高い評価を受け、最終目標達成のため期間延長を行う事により、改訂。
- (3) 平成23年2月、新規技術開発の追加による研究開発項目の整理に伴い改訂。
- (4) 平成23年8月、研究開発項目<2>の研究開発責任者の決定により改訂。
- (5) 平成24年4月、研究開発責任者の異動に伴う所属先の変更により改訂。

研究開発項目<2> 「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」

1. 研究開発の必要性

近年、製薬企業を中心に、コンビナトリアルケミストリーによる化合物合成とそれらのライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングが盛んに行われたが、必ずしも期待された成果が出ていない。目的とする高い活性を持った化合物群へのニーズは現在でも極めて大きく、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。微生物は、天然化合物のリソースとして最も有望なものの一つであるが、培養抽出物として安定的かつ大量に取得できないなど、そのままではスクリーニングの効率化に様々な問題点がある。

放線菌には、実際の化合物として単離されていない多くの生合成遺伝子が存在する。これまで、放線菌の物質生産能を向上させる技術として、培養法の改良や菌株の変異などが行われてきたが、全ゲノムシーケンスが完了し代謝産物が精査された放線菌株でも、生合成遺伝子数から推定される化合物数は約2割程度しか単離されておらず、多くの未利用生合成遺伝子が存在する。

そこで、このような未利用遺伝子を同種・異種宿主菌株により強制的に発現させる手法を開発すれば、これまでに無い新しい骨格を持った化合物の生産も可能となる。また、天然化合物の中には生産が安定しないものも多くあるため、生産が不安定な生産菌より生合成遺伝子を取り出し宿主菌株で発現させることにより、安定的な化合物の供給も可能となる。

2. 具体的な研究開発内容

(1) 生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

放線菌が生産する広範な天然化合物リソースから、大きく複数に分類される化合物群の代表的な化合物を選抜するとともに、製薬企業が興味を持つ構造及び活性がユニークな天然物由来の化合物候補を選抜し、これらの天然化合物の生合成遺伝子クラスターの情報を取得する。

この情報を基に、生合成遺伝子クラスターのライブラリーを作製する。また、これらの生合成遺伝子クラスターの正確なシーケンス情報を解読すると共に、化合物と生合成遺伝子を対応づけるデータベースを構築し、類縁化合物の生合成遺伝子を探索するツールの開発につなげる。

(2) 安定生産技術の開発

天然物を生産する別の宿主放線菌株を用いて、これら多種多様な天然化合物の生合成遺伝子クラスターを導入し、実際のスクリーニングに適用可能な生産性を目標に生産させる技術を開発する。安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善に取り組むことにより、安定生産技術としての汎用性を見極める。

3. 達成目標

① 最終目標（平成24年度末）

有用天然物の合成に必要な40個程度の生合成遺伝子クラスターを取得し、その生産物を対応づけたデータベースを構築する。これら40個程度の生合成遺伝子クラスター全てについて、化合物生産株となる別の宿主放線菌へ導入し、目的の天然物を5 mg/L レベルで安定的に生産する技術を開発する。さらにこれら40個程度について、安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善を図る。

創薬・診断分野の技術マップと重要技術(1/2)

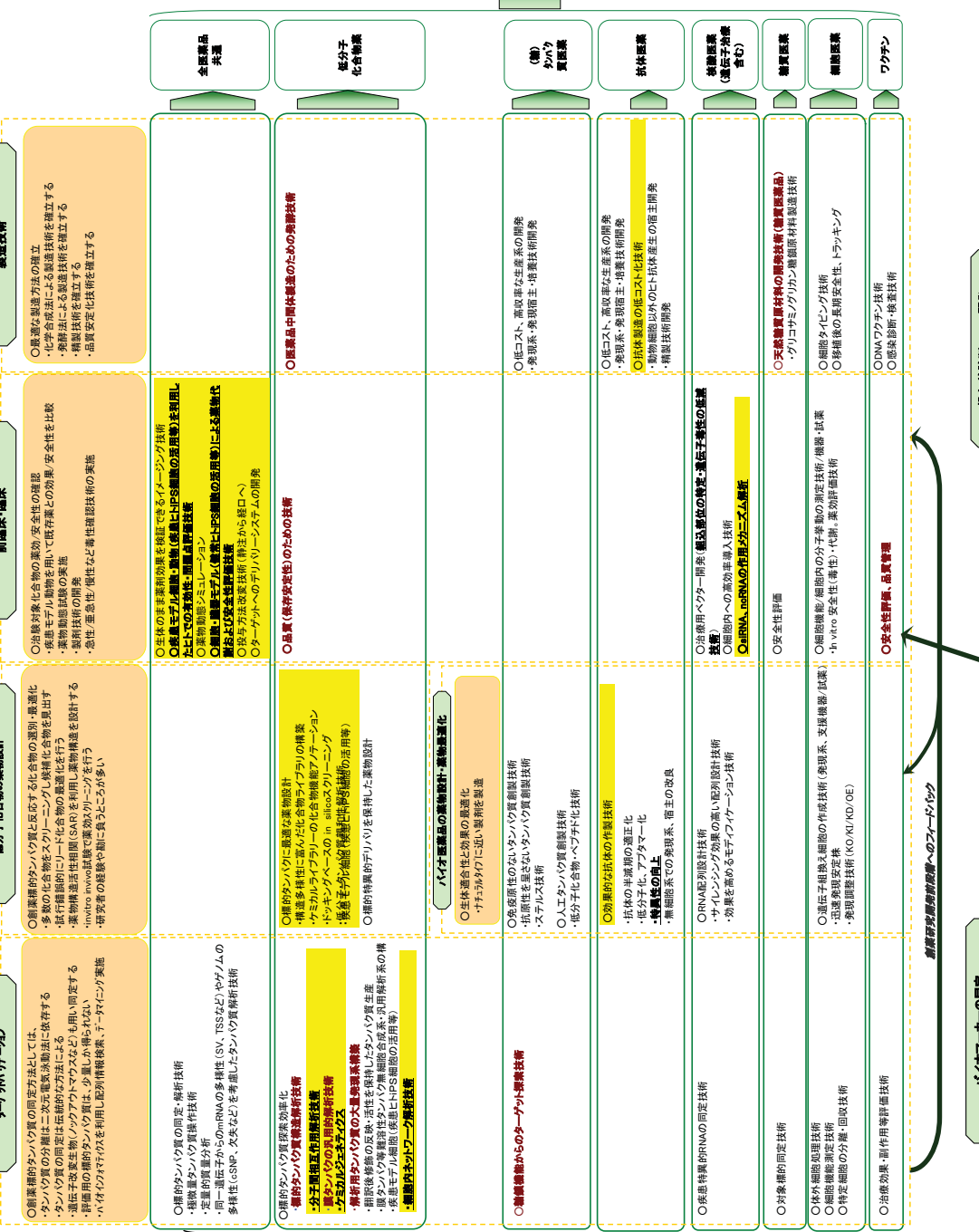
個の医療・健康安心社会の実現(個人に合わせた優れた治療法の提供・予防)・産業競争力の強化

・ 画期的な医薬品の開発・効率的な開発
 ・ 薬剤パラエニティの増加

・ 個々人の特性に応じた
 処方法の確立

重要技術の抽出項目

画期的な医薬品・診断技術の開発	凡例
医薬品開発の効率化	水色
GOLの向上	黄色
強みが活かせる技術分野の異なる強化	ピンク
選みかきかせる技術	赤色・茶色
選みかきかせる技術	下線・太字



創薬1より良い医薬品を生み出し、利用できるようにする

【最新鋭なシーズ創薬技術の確立】

シーズ創薬

創薬2における活用

創薬・診断分野の技術マップと重要技術(2/2)

創薬・診断分野の技術マップと重要技術(2/2)

創薬・診断分野の技術マップと重要技術(2/2)

創薬・診断分野の技術マップと重要技術(2/2)

創薬・診断分野の技術マップと重要技術(2/2)

健康で長生き 薬になったとしてもいち早く健康に戻りたい

事前評価書

※本事前評価書は、平成23年度から新規に追加して実施する「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」について作成したものである。

	作成日	平成23年1月17日
1. 事業名称 (コード番号)	ゲノム創薬加速化支援バイオ産業基盤技術開発 (P08005、P1100*)	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術部	
3. 事業概要	<p>(1) 概要：創薬開発のより早い段階から適切な医薬品候補物質の取得を可能とする、標的蛋白質の立体構造をベースとした <i>in silico</i> スクリーニングや、探索対象となる化合物空間の拡大など、創薬の効率化に繋がる新たな創薬基盤技術の開発を目標に、以下の研究開発を実施する。</p> <p>①創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発 ②有用天然化合物の安定的な生産技術開発</p> <p>(2) 事業規模：平成23年度事業費 14億円（予定） （うち新規追加部分に関する事業費は3億円（予定））</p> <p>(3) 事業期間：平成20年度～24年度（5年間）</p>	
4. 評価の検討状況	<p>(1) 事業の位置付け・必要性</p> <p>① 事業の位置付け</p> <p>本事業は、健康寿命を延伸し、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指す「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施するものであり、ポストゲノム研究の産業利用が期待される「ゲノム創薬」を加速し、創薬効率の向上に資する創薬基盤技術の構築を目的とするものである。</p> <p>これまで、創薬標的として重要な膜タンパク質及びその複合体の細胞表層上における立体構造解析及び相互作用解析技術の開発及び得られる構造・機能情報と計算科学を組み合わせることによって創薬候補化合物の効率的な探索と、更に実用性の高いリード化合物への展開等の創薬基盤技術の開発を実施してきたところである。一方、創薬ヒット化合物の探索については必ずしも期待された成果が出ておらず、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。</p> <p>このため、基本計画を改訂し、新規の医薬品開発につながる有望な天然化合物の安定生産に必要な技術の開発に、平成23年度から新規に着手すべく研究開発項目の整理・追加を行い、ゲノム創薬を加速する創薬基盤技術構築の一層の充実を図るべく実施するものである。</p> <p>② 必要性</p> <p>近年、製薬企業の研究開発費は増大の一途であるものの、承認される薬剤の数は増えていない。研究開発費の増大分は、主として臨床開発費に充てられ、探索研究に回せるリソースは相対的に減少している状況にあることもその理由の一つであるが、創薬ヒット化合物の発見につながる新たなスクリーニング手法の技術革新と技術実証の不足により、新規医薬品候補化合物の探索効率が大幅に低下している可能性も指摘されている。製薬産業にとって最も重要な医薬品のもととなるリード化合物を効率的に取得する技術が極めて重要であり、ニーズも高い。このため、最先端の知識と分析技術を組み合わせ、創薬開発のより早い段階から適切な医薬品候補物質の取得を可能とする、標的蛋白質の立体構造をベースとした <i>in silico</i> スクリーニング技術の構築を平成20年度から行ってきたところである。</p>	

一方で、創薬ヒット化合物の探索については、コンビナトリアルケミストリーによる化合物合成とそのライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングが盛んに行われたが、必ずしも期待された成果が出ておらず、豊富な生物活性と大きなケミカルスペースを持った天然化合物が再注目されている。しかし、微生物は、天然化合物のリソースとして最も有望なものの一つであるが、培養抽出物として安定的かつ大量に取得できないなど、そのままではスクリーニングの効率化に様々な問題点がある。そこで、これまでに無い新しい骨格を持った化合物も含め、微生物の持つ天然化合物の生合成遺伝子を取り出して別の宿主菌株で発現させるなど、目的とする天然化合物を安定的かつ効率よく発現させる手法を開発することが重要である。

このため、創薬効率をより一層向上させるためには、これまで行ってきた構造ベースの創薬技術に加え、創薬リード化合物候補となりうる広いケミカルスペースを持った天然化合物を生産する技術の開発により、化合物空間の拡大を可能とする技術の開発は極めて重要である。基礎研究の進展により幾つかの生産実例が報告されていること、生産菌を含む3つの放線菌のゲノム解析の完了により比較ゲノム解析のアプローチが可能となったこと、次世代シーケンス技術の進展などを背景とし、技術の汎用性を見極めることが可能な状況に至っており、本タイミングで開発計画に追加して実施する必要性は高く、妥当である。

(2) 研究開発目標の妥当性

基本計画を改定し、新たな研究開発項目として追加し、平成 23 年度から 2 年計画で実施する研究開発項目②「有用天然化合物の安定的な生産技術開発」に関する研究開発目標は次のとおり。

(目標)

有用天然物の合成に必要な 40 個程度の生合成遺伝子クラスターを取得し、その生産物に対応づけたデータベースを構築する。これら 40 個程度の生合成遺伝子クラスター全てについて、化合物生産株となる別の宿主放線菌へ導入し、目的の天然物を 5mg/L レベルで安定的に生産する技術を開発する。さらに、これら 40 個程度について、安定的な生産が可能な天然物と困難なものを体系的に整理し、生産が困難なものについてはその原因を解明し、生産の改善を図る。

(妥当性)

- ・対象を放線菌に絞り、短期間で集中的に開発を行い、有用天然物の安定的生産技術としての見極めを付ける目的で数値化した目標値である。また、当該技術を用いる創薬フェーズを明確とし、機能保持細胞株を用いた初期のスクリーニングで用いる上で十分と想定される生産量を数値目標として設定したものであり、その達成には大きな開発要素があるため目標として妥当である。
- ・なお、数値目標として 40 個程度は開発期間・規模に鑑みて妥当であると考えますが、具体的な開発ターゲットの選定が肝要であることから、公募の際に提案者に明示させるとともに、研究開発マネジメントの中で技術の見極めに最適な対象を選定し、具体化する計画である。

なお、従来の研究開発項目を継承する研究開発項目①「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、当初設定のとおり研究開発目標により継続して実施する。

(3) 研究開発マネジメント

公募を通じて、高い技術を有する民間企業や大学等の研究機関を組み合わせた最適な研究開発体制を構築する。

経済産業省及び研究開発実施者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて設置される技術検討会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じてプロジェクトの進捗に関する報告や研究現場訪問等により、進捗状況の適切な把握と問題の早期発見・是正により、適切な運営管理を実現する。

開発期間中に得られた成果は積極的に知的財産権として確保する他、「NEDOプロジェクトにおける知財マネジメント基本方針」に従って、適切に管理する。

(4) 研究開発成果

構造情報を基にした新しい観点からの画期的な新薬の創出、さらには膜タンパク質及びその複合体の機能・機構を説明する新しい概念の構築、天然物化学情報基盤の強化等により、ゲノム情報を活用した創薬技術の高度化による我が国バイオ産業の競争力強化、新産業の創出・育成を通じて、国際的優位性を確保することが期待できる他、個別化医療への応用とともに、健康維持・増進などを含めた幅広い分野への展開が期待できる。

(5) 実用化・事業化の見通し

- ① 膜タンパク質及びその複合体の細胞表層上における立体構造・相互作用解析技術、計算科学を用いた創薬候補化合物の効率的な探索および更に実用性の高いリード化合物への展開を可能とするin silico技術など、創薬基盤技術の提供。
- ② 有望な天然化合物の合成に必要な生合成遺伝子クラスターのライブラリーとそのデータベース、ホスト放線菌とユニット遺伝子導入技術、発現させた天然化合物の提供。

これら研究開発成果を活用することによって、創薬研究のより早い段階において開発候補薬の効率的で的確な絞り込みが実現し、創薬研究の短縮や研究開発費の削減、さらにはより安全な医薬品の開発の促進が期待される。

(6) その他特記事項

特になし。

5. 総合評価

近年の製薬企業の研究開発費増大に承認薬剤数が伴わない問題を解決するために必要な基盤技術の開発を行うものである。我が国が強みとする微生物ライブラリーや、天然物化学に対する知識基盤を最大限に活用し、オリジナリティーの高い創薬リード化合物候補となりうる広いケミカルスペースを確保することは極めて重要である。

基礎研究の進展や次世代シーケンサーに代表される解析技術の進歩を取り込み、従来の職人芸とも言える育種による有用物質生産から、ゲノム情報をベースに生合成遺伝子資源としてライブラリー化することによって安定的な資源化を目指す点、また、整備されたライブラリーの有効な活用を可能とする汎用生産系の構築は極めてチャレンジングである。基礎研究の進展、生産菌を含む3つの放線菌のゲノム解析の完了により比較ゲノム解析のアプローチが可能となったこと、次世代シーケンス技術の進展などを背景とし、有用天然物の安定的生産技術として成立するかどうかを見極める上でタイムリーな取り組みである。

また、民間企業単独で開発することは極めて困難であり、異なる事業体の連携推進というNEDOの保有する機能が貢献できる内容であるため、基本計画の変更により新たな開発項目を追加し、NEDOが実施する事業として適切であると判断する。

特許、論文、外部発表等の件数

特許、論文、外部発表等の件数（内訳）

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表		
	国内	外国	PCT※ 出願	査読 付き	その 他	学 会 発 表・講演	新聞・雑誌等 への掲載	その他
平成 23 年度	0 件	0 件	0 件	33 件	4 件	21 件	0 件	0 件
平成 24 年度	0 件	0 件	0 件	29 件	5 件	27 件	0 件	0 件

(※Patent Cooperation Treaty :特許協力条約)

【特許】

なし

【論文】(査読つき)

平成 23 年度

1. J. Ueda, M. Izumikawa, A. Mukai, A. Nagai, J.-H. Hwang, M. Takagi and K. Shin-ya. New angucycline C-glycosides from *Streptomyces* sp. RI33. *J. Antibiot.*, **64**, 367-372 (2011).
2. S. Fuse, K. Okada, Y. Iijima, A. Munakata, K. Machida, T. Takahashi, M. Takagi, K. Shin-ya and T. Doi. Total synthesis of spiruchostatin B aided by an automated synthesizer. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 3825-3833 (2011).
3. J. Ueda, M. Izumikawa, I. Kozone, H. Yamamura, M. Hayakawa, M. Takagi and K. Shin-ya. A phenylacetylated peptide, JBIR-96, isolated from *Streptomyces* sp. RI051-SDHV6. *J. Nat. Prod.*, **74**, 1344-1347 (2011).
4. K. Motohashi, K. Inaba, S. Fuse, T. Doi, M. Izumikawa, S. Tabrez Khan, M. Takagi, T. Takahashi and K. Shin-ya. JBIR-56 and JBIR-57, 2(1*H*)-pyrazinones from a marine sponge-derived *Streptomyces* sp. SpD081030SC-03. *J. Nat. Prod.*, **74**, 1630-1635 (2011).
5. M. Takagi and K. Shin-ya. New species of actinomycetes do not always produce new compounds with high frequency. *J. Antibiot.*, **64**, 699-701 (2011).
6. M. Izumikawa, M. Takagi and K. Shin-ya. Isolation of a novel macrocyclic dilactone - JBIR-101 - from *Promicromonospora* sp. RL26. *J. Antibiot.*, **64**, 689-691 (2011).
7. T. Kawahara, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-124: a novel antioxidative agent from a marine sponge-derived fungus *Penicillium citrinum* SpI080624G1f01. *J. Antibiot.*, **65**, 45-47 (2012).
8. M. Izumikawa, T. Hosoya, M. Takagi and K. Shin-ya. A new cyclizidine analog—JBIR-102—from *Saccharopolyspora* sp. RL78 isolated from mangrove soil. *J. Antibiot.*, **65**, 41-43 (2011).
9. M. Izumikawa, R. Satou, K. Motohashi, A. Nagai, Y. Ohnishi, M. Takagi and K. Shin-ya. Naphthoquinone-like polyketide isolated from *Streptomyces* sp. RI-77 and its predicted biosynthetic pathway. *J. Nat. Prod.*, **74**, 2588-2591 (2011).

10. S. Tabrez Khan, M. Takagi and K. Shin-ya. Actinobacteria associated with the marine sponges *Cinachyra* sp., *Petrosia* sp., and *Ulosa* sp. and their culturability. *Microbes Environ.*, **27**, 99-104 (2012).
11. T. Kawahara, M. Izumikawa, M. Otaguro, H. Yamamura, M. Hayakawa, M. Takagi and K. Shin-ya. JBIR-94 and JBIR-125, antioxidative phenolic compounds from *Streptomyces* sp. R56-07. *J. Nat. Prod.*, **75**, 107-110 (2012).
12. D. E. Cane, H. Ikeda. Exploration and Mining of the Bacterial Terpenome. *Accounts of Chemical Research*, **515**, 123-162 (2012).
13. M. Uchida, S. Takamatsu, S. Arima, K. T. Miyamoto, S. Kitani, T. Nihira, H. Ikeda and T. Nagamitsu. Total synthesis and absolute configuration of avenolide, extracellular factor in *Streptomyces avermitilis*. *J. Antibiot.* **64**, 781-787 (2011).
14. S. Kitani, K. T. Miyamoto, S. Takamatsu, E. Herawati, H. Iguchi, K. Nishitomi, M. Uchida, T. Nagamitsu, S. Omura, H. Ikeda and T. Nihira. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16410-16415 (2011).
15. Chu, W.K.W. Ikeda, H. Cane, D.E. Cloning and characterization of Pfl_1841, a 2-methylenebornane synthase in *Pseudomonas fluorescens* PfO-1. *Tetrahedron*, **67**, 6627-6632 (2011).
16. S. Takahashi, A. Toyoda, Y. Sekiyama, H. Takagi, T. Nogawa, M. Uramoto, R. Suzuki, H. Koshino, T. Kumano, S. Panthee, T. Dairi, J. Ishikawa, H. Ikeda, Y. Sakaki and H. Osada. Reveromycin A biosynthesis uses RevG and RevJ for stereospecific spiroacetal formation. *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 461-468 (2011).
17. T. K. Miyamoto, S. Kitani, M. Komatsu, H. Ikeda and T. Nihira. The autoregulator-receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. *Microbiology*, **157**, 2266-2275 (2011).
18. M-J. Seo, D. Zhu, S. Endo, H. Ikeda and D. E. Cane. Genome mining in *Streptomyces*. Elucidation of the role of Baeyer-Villiger monooxygenases and non-heme iron-dependent dehydrogenase/oxygenases in the final steps of the biosynthesis of pentalenolactone and neopentalenolactone. *Biochemistry*, **50**, 1739-1754 (2011).

19. D. Zhu, M.-J. Seo, H. Ikeda and D. E. Cane. Genome mining in *Streptomyces*. Discovery of an unprecedented P450-catalyzed oxidative rearrangement that is the final step in the biosynthesis of pentalenolactone. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2128-2131 (2011).
20. S. Takamatsu, X. Lin, A. Nara, M. Komatsu, D. E. Cane and H. Ikeda. Characterization of a silent sesquiterpenoid biosynthetic pathway in *Streptomyces avermitilis* controlling *epi*-isozizaene and albaflavenone biosynthesis and isolation of a new oxidized *epi*-isozizaene metabolite. *Microb. Biotechnol.*, **4**, 184-191 (2011).
21. S. Giglio, W.K.W. Chou, H. Ikeda and D. E. Cane. Monis, T. Biosynthesis of 2-methylisoborneol in *Cyanobacteria*. *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 992-998 (2011).
22. Takamatsu, S. Xu, L-H. Fushinobu, S. Shoun, H. Komatsu, M. Cane, D.E. Ikeda, H. Pentalenic acid is a shunt metabolite in the biosynthesis of the pentalenolactone family of metabolites: Hydroxylation of 1-deoxypentalenic acid mediated by CYP105D7 (SAV_7469) of *Streptomyces avermitilis*. *J. Antibiot.*, **64**, 65-71 (2011).
23. N. Kato, H. Suzuki, H. Takagi, M. Uramoto, S. Takahashi and H. Osada. Gene disruption and biochemical characterization of verruculogen synthase of *Aspergillus fumigates*. *Chembiochem*, **12**, 711-714 (2011).
24. N. Kato, M. Tokuoka, Y. Shinohara, M. Kawatani, M. Uramoto, Y. Seshime, I. Fujii, K. Kitamoto, T. Takahashi, S. Takahashi, Y. Koyama and H. Osada. Genetic safeguard against mycotoxin cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *Chembiochem*, **12**, 1376-1382 (2011).
25. H. Suzuki, S. Takahashi, H. Osada and K. Yoshida. Improvement of transformation efficiency by strategic circumvention of restriction barriers in *Streptomyces griseus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 675-678 (2011).
26. S. Panthee, S. Takahashi, H. Takagi, T. Nogawa, E. Oowada, M. Uramoto and H. Osada. Furaquinocins I and J: Novel polyketide isoprenoid hybrid compounds from *Streptomyces reveromyceticus* SN-593. *J. Antibiot.*, **64**, 509-513 (2011).
27. H. Takayama, S. Takahashi, H. Osada, Y. Iwabuchi and N. Kanoh. Detection of cytochrome P450 substrates using small-molecule droplet array on NADH-immobilized solid surface. *Chembiochem*. **12(18)**, 2748-2752 (2011).
28. T. Nogawa, S. Takahashi, A. Okano, M. Kawatani, M. Uramoto, T. Saito and H. Osada. Spirotoamides A and B, novel 6,6-spiroacetal polyketides isolated from a microbial

metabolite fraction library. *J. Antibiot.*, DOI: 10.1038/ja.2011.121. (2011).

29. T. Doi, T. Muraoka, T. Ohshiro, D. Matsuda, M. Yoshida, T. Takahashi, S. Omura, and H. Tomoda, Conformationally Restricted Analog and Biotin-Labeled Probe Based on Beauveriolide III, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**(1), 696–699 (2012).
30. M. Yoshida, Y. Fujino, K. Saito, and T. Doi, Regioselective Synthesis of Flavone Derivatives via DMAP-catalyzed Cyclization of *o*-Alkynoylphenols, *Tetrahedron*, **67**, 9993–9997 (2011).
31. M. Yoshida, Y. Fujino, and T. Doi, Synthesis of γ -Benzopyranone by TfOH-Promoted Regioselective Cyclization of *o*-Alkynoylphenols, *Org. Lett.*, **13**, 4526–4529 (2011).
32. T. Doi, Y. Numajiri, T. Takahashi, M. Takagi, and K. Shin-ya, Solid-phase Total Synthesis of (–)-Apratoxin A and Its Analogues and Their Biological Evaluation, *Chem. Asian J.*, **6**, 180–188 (2011).
33. T. Doi, K. Shibata, M. Yoshida, M. Takagi, M. Tera, K. Nagasawa, K. Shin-ya, and T. Takahashi, (*S*)-Stereoisomer of Telomestatin as a Potent G-quadruplex Binder and Telomerase Inhibitor, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 387–393 (2011).

平成 24 年度

34. T. Kawahara, M. Takagi, and K. Shin-ya. Three new depsipeptides, JBIR-113, JBIR-114 and JBIR-115, isolated from a marine sponge-derived *Penicillium* sp. fS36. *J. Antibiot.*, **65**, 147-150 (2012).
35. T. Hosoya, T. Hirokawa, M. Takagi, and K. Shin-ya. Trichostatin analogs JBIR-109, JBIR-110, and JBIR-111 from the marine sponge-derived *Streptomyces* sp. RM72. *J. Nat. Prod.*, **75**, 285-289 (2012).
36. M. Izumikawa, M. Takagi, and K. Shin-ya. JBIR-78 and JBIR-95: Phenylacetylated peptides isolated from *Kibdelosporangium* sp. AK-AA56. *J. Nat. Prod.*, **75** (2), 280-284 (2012).
37. M. Takagi, Jun-ya Ueda, Ji-Hwan Hwang, J. Hashimoto, M. Izumikawa, H. Murakami, Y. Sekido, and K. Shin-ya. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitor from an anamorphic fungus. *J. Nat. Prod.*, **75** (4), 764-767 (2012).
38. T. Kawahara, T. Hosoya, M. Tsukamoto, S. Okabe, H. Yamamura, M. Hayakawa, H. Seimiya, M. Takagi, and K. Shin-ya. JBIR-120: A new growth inhibitor of

- hormone-refractory prostate cancer cells. *J. Antibiot.*, **65** (7), 373-375 (2012).
39. C. Maruyama, J. Toyoda, Y. Kato, M. Izumikawa, M. Takagi K. Shin-ya, H. Katano, T. Utagawa, and Y. Hamano. A stand-alone adenylation domain catalyzes multiple amide-bond formation in streptothricin biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.*, **8** (9), 791-797 (2012).
40. T. Kawahara, A. Nagai, M. Takagi, and K. Shin-ya. JBIR-137 and JBIR-138, new secondary metabolites from *Aspergillus* sp. fA75J. *J. Antibiot.*, **65** (10), 535-538 (2012).
41. M. Takagi, and K. Shin-ya. Construction of a natural product library containing secondary metabolites produced by actinomycetes. *J. Antibiot.*, **65** (9), 443-447 (2012).
42. T. Kawahara, A. Nagai, M. Takagi, and K. Shin-ya. A new furaquinocin derivative, JBIR-136, from *Streptomyces* sp. 4963H2. *J. Antibiot.*, **65** (11), 579-581 (2012).
43. T. Kawahara, J.-H. Hwang, M. Izumikawa, J. Hashimoto, M. Takagi, and K. Shin-ya. JBIR-129 and -139, cytotoxic 34-membered polyol macrolides of microbial origin. *J. Nat. Prod.*, **133**, 1638-1641 (2012).
44. T. Kawahara, M. Izumikawa M. Takagi, and K. Shin-ya. Relative configuration of JBIR-129, a cytotoxic 34-membered glycosidic polyol macrolide from *Streptomyces* sp. RK74. *Org. Lett.*, **14** (17), 4434-4437 (2012).
45. A. Aroonsri, S. Kitani, J. Hashimoto, I. Kosone, M. Izumikawa, M. Komatsu, N. Fujita, Y. Takahashi, K. Shin-ya, H. Ikeda, and T. Nihira. Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone-autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 8015-8024 (2012).
46. T. Hosoya, M. Takagi, and K. Shin-ya. New pyridone alkaloids JBIR-130, JBIR-131 and JBIR-132 from *Isaria* sp. NBRC 104353. *J. Antibiot.*, doi: 10.1038/ja.2012.106.
47. M. Komatsu, K. Komatsu, H. Koiwai, Y. Yamada, I. Kozone, M. Izumikawa, J. Hashimoto, M. Takagi, S. Omura, K. Shin-ya, D.E. Cane, H. Ikeda. Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth. Biol.* doi: 10.1021/sb3001003 (2013).
48. D. Zhu, Y. Wang, M. Zhang, H. Ikeda, Z. Deng, and D. E. Cane. Product-mediated regulation of pentalenolactone biosynthesis in *Streptomyces* by the MarR/SlyA family activators PenR and PntR. *J. Bacteriol.* **195**, 1255-1266 (2013)

49. H. Yamamura, Y. Ohnishi, J. Ishikawa, N. Ichikawa, H. Ikeda, M. Sekine, T. Harada, S. Horinouchi, M. Otoguro, T. Tamura, K. Suzuki, Y. Hoshino, A. Arisawa, Y. Nakagawa, N. Fujita, and M. Hayakawa. Complete genome sequence of the motile actinomycete *Actinoplanes missouriensis* 431^T (= NBRC 102363^T). *Stand. Genome Sci*, **7**, 294-303 (2012).
50. A. Aroonsri, S. Kitani, H. Ikeda, and T. Nihira. Kitasataline, a novel beta-carboline alkaloid from *Kitasatospora setae* NBRC 14216. *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 56-58 (2012).
51. J. Inokoshi, M. Matsuhama, M. Miyake, H. Ikeda, and H. Tomoda. Molecular cloning of the gene cluster for lariatins biosynthesis of *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 451-460 (2012).
52. N. Koyama, Y. Tokura, D. Münch, H.-G. Sahl, T. Schneider, Y. Shibagaki, H. Ikeda, and H. Tomoda. The nonantibiotic small molecule cyclabdan enhances the potency of β -lactams against MRSA by inhibiting pentaglycine interpeptide bridge synthesis. *PLoS One*, **7**, e48981 (2012).
53. Y. Yamada, D. E. Cane, and H. Ikeda. Diversity and Analysis of Bacterial Terpene Synthases. In David A. Hopwood, ed. *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part A, Methods in Enzymology Vol. 515*, pp.123-162, Burlington, Academic Press (2012).
54. H. Ikeda. Designing of *Streptomyces* host for secondary metabolite production. *IFO Res. Commun.* **26**, 159-173 (2012).
55. T. Nogawa, S. Takahashi, A. Okano, M. Kawatani, M. Uramoto, T. Saito, and H. Osada. Spirotoamides A and B, novel 6,6-spiroacetal polyketides isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.*, **65**, 123-128, 2012.
56. T. Nogawa, S. Takahashi, Y. Sekiyama, H. Takagi, M. Uramoto, H. Koshino, M. Kawatani, T. Shimizu, and H. Osada. Creation of novel reveromycin derivatives by alcohol-added fermentation. *J. Antibiot.* 2012 Dec 12. doi: 10.1038/ja.2012.115.
57. K. Ohsawa, M. Yoshida, and T. Doi. A direct and mild formylation method for substituted benzenes utilizing dichloromethyl methyl ether—silver trifluoromethanesulfonate. *J. Org. Chem.*, **78**, 3438-3444 (2013).
58. M. Yoshida, K. Saito, Y. Fujino, and T. Doi. A concise synthesis of 3-aroylflavones via Lewis base 9-azajulolidine—catalyzed tandem acyl transfer—cyclization. *Chem. Commun.*, **48**, 11796-11798 (2012).

59. K. Inamoto, L. D. Campbell, T. Doi, and K. Koide. A highly sensitive fluorescence method reveals the presence of palladium in a cross-coupling reaction mixture not treated with transition metals. *Tetrahedron Lett.*, **53**, 3147-3148 (2012).
60. K. Inamoto, J. Kawasaki, K. Hiroya, Y. Kondo, and T. Doi. Tandem-type Pd(II)-catalyzed oxidative Heck reaction/ intramolecular C-H amination sequence: A novel route to 4-aryl-2-quinolinones. *Chem. Commun.*, **48**, 4332-4334 (2012).
61. K. Inamoto, C. Hasegawa, K. Hiroya, Y. Kondo, T. Osako, Y. Uozumi, and T. Doi. Use of dimethyl carbonate as a solvent greatly enhances the biaryl coupling of aryl iodides and organoboron reagents without adding any transition metal catalysts. *Chem. Commun.*, **48**, 2912-2914 (2012).
62. T. Doi, K. Oikawa, J. Suzuki, M. Yoshida, and N. Iki. Development of a near infrared fluorescence labeling reagent: synthesis of indole-functionalized indocyanine green derivatives. *Synlett*, 306-310 (2012).

【論文】(総説)

平成 23 年度

1. 高橋 俊二.微生物の英知を生かす、バイオメディア 90 巻 2 号 p.95 2012
2. S. Takahashi, H. Osada. Highlight of the month, Biology: Journey of many steps. RIKEN Research Vol 6, Number 9, p.2-3, 2011.
3. 高橋 俊二, 長田 裕之.リベロマイシン合成におけるスピロアセタール環化酵素の発見、バイオサイエンスとインダストリー Vol. 69 (6), 486-487, 2011.
4. 長田 裕之, 高橋 俊二. 抗生物質研究からケミカルバイオロジー研究へ 特集 / これからの天然物化学 科学工業 Vol.62 (8), p.8[588]-13[593], 2011.

平成 24 年度

5. 新家 一男. 分子標的薬ーがんから多疾患までの治療をめざしてー、テロマータンパク質・テロメララーゼ系」、日本臨床 Vol.70, 140-143, 2012.
6. 池田 治生. 放線菌のゲノムデザイン. 穴澤秀治 監修 「微生物を活用した新世代の有用物質生産技術」、シーエムシー出版. 42-48, 2012.
7. 小松 護、池田 治生. 放線菌における物質生産のための合成生物学. 生物工学会誌, Vol. 90, 285-288, 2012.

8. N. Kato, S. Takahashi, T. Nogawa, T. Saito, and H. Osada, Construction of a microbial natural product library for chemical biology studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16: 101-108, 2012. DOI 10.1016/j.cbpa.2012.02.016
9. 高橋俊二、長田裕之. リベロマイシン A 生合成に関わる未知酵素の解明—スピロアセタール環化酵素の発見、化学と生物, Vol.51, 138-140, 2013.

【外部発表】(a) 学会発表・講演

平成 23 年度

1. H. Ikeda. The Genome-Minimized *Streptomyces* Host for the Secondary Metabolism. BIT'S 4th Annual World Congress of Industrial Biotechnology, ibio-2011, Darlian, China, 2011.4.26.
2. H. Ikeda. Synthetic Biology of the Secondary Metabolism in the Industrial Microorganism. IUMS 2011, Sapporo, Japan, 2011.9.8
3. H. Ikeda & D. E. Cane. Discovery of new branch of pentalenolactone family tree and two different region-specific Baeyer-Villiger monooxygenases. IUMS 2011, Sapporo, Japan, 2011.9.9
4. H. Ikeda. Engineered *Streptomyces* host for heterologous expression of secondary metabolism. ESF-EMBO Symposium on “Synthetic Biology of Antibiotic Production”, Sant Feliu de Guixols, Spain, 2011.10.6.
5. 藤江 学、小柳 亮. 「OIST でのゲノム研究の現状-技術的改良とその成果-」新学術領域「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」、インフォマティクスオープンセミナー、2011 年 7 月 4 日
6. 藤江 学. 「OIST におけるゲノムシーケンスの現状-次世代シーケンサーの技術的課題とその克服-」、沖縄ゲノムサイエンス講演会、2011 年 9 月 9 日
7. 宇佐美 剛志、小柳 亮. 「OIST でのゲノム解析：次世代シーケンス解析の紹介から産業応用例」、南方資源利用技術研究会、2011 年 11 月 25 日
8. 藤江 学、宇佐美 剛志、小柳 亮. 「OIST での放線菌ゲノム解析」、「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」シンポジウム、2011 年 12 月 20 日
9. 小曾根 郁子. イオンモビリティを利用した低分子化合物の構造解析、第 38 回 BMS コンファレンス、2011 年 7 月 10 日

10. 高木 基樹. 放線菌が生産する多様な二次代謝産物を用いた化合物ライブラリーの構築、第 26 回日本放線菌学会大会 (学会賞受賞講演)、2011 年 9 月 8 日
11. 高木 基樹、新家 一男. 放線菌由来の二次代謝産物を用いた天然物化合物ライブラリー、第 26 回日本放線菌学会大会、2011 年 9 月 8 日
12. 永井 文、Shams Tabrez Khan、高木 基樹、新家 一男. マングローブ土壌からの放線菌の単離および二次代謝産物、第 26 回日本放線菌学会大会、2011 年 9 月 8 日
13. 小曾根 郁子、高木 基樹、新家 一男. UPLC-TOF-MS を用いた放線菌二次代謝産物プロファイリング解析、第 26 回日本放線菌学会大会、2011 年 9 月 8 日
14. 泉川 美穂、上田 純也、小曾根 郁子、山村 英樹、早川 正幸、高木 基樹、新家 一男. *Streptomyces* sp. 及び *Kibdelosporangium* sp. から単離された新規フェニルアセチル化ペプチド化合物に関する研究、第 26 回日本放線菌学会大会、2011 年 9 月 9 日
15. 吉田 将人、藤野 雄太、齋藤 虹矢、土井 隆行. 位置選択的環化反応を利用したフラボノイド類縁体の合成研究、第 100 回有機合成シンポジウム、2011 年 11 月 11 日
16. 吉田 将人、大澤 宏祐、高木 基樹、広川 貴次、植草 義徳、加藤 晃一、新家 一男、夏目 徹、土井 隆行. タンパク質間相互作用阻害活性を示す Thielocin B1 の全合成と相互作用解析、第 53 回天然有機化合物討論会、2011 年 9 月 28 日
17. 土井隆行. 生物活性機能発現をめざした天然物合成、類縁体合成、分子プローブ合成、平成 23 年度前期有機合成化学講習会、2011 年 6 月 23 日
18. 大澤 宏祐、吉田 将人、高木 基樹、新家 一男、土井 隆行. タンパク質間相互作用阻害活性を示す Thielocin B1 の全合成、第 99 回有機合成シンポジウム、2011 年 6 月 16 日、
19. S. Takahashi, K. Takuto and H. Osada. Exquisite control of Spiroacetal Formation in reveromycin A biosynthesis. The 6th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, 2012 年 1 月 26~28 日
20. S. Takahashi, T. Kumano, H. Takagi, T. Nogawa, E. Oowada, S. Panthee, M.

Uramoto, H. Koshino, and H. Osada. Deciphering of reveromycin A biosynthesis, H. RIKEN-MAXPLANCK JOINT RESEARCH CENTER Kick Off Symposium, (Max Planck), Dortmund, Germany, Mar 6-7, 2012.

21. N. Kato, H. Okumura, S. Takahashi, and Osada H. Functional characterization of verruculogen synthase FtmF of *Aspergillus fumigates*”, RIKEN-MAXPLANCK JOINT RESEARCH CENTER Kick Off Symposium, (Max Planck), Dortmund, Germany, Mar 6-7, 2012.

22. 高山 浩、守谷 崇、川又 綾乃、高橋 俊二、長田 裕之、岩渕 好治、叶 直樹. 化合物アレイ型プラットフォームを用いた cytochrome P450 の基質スクリーニング法の開発、ケミカルバイオロジー学会、2012 年 6 月 7~9 日

平成 24 年度

23. S. Takahashi, S. Panthee, and H. Osada. Novel compound which up-regulates secondary metabolite gene cluster. The International Conference of Natural Product Biosynthesis, MEXT Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovation Areas; Biosynthetic machinery, 日米生合成シンポジウム、June17-22 , 2012.

24. N. Kato, H. Okumura, H. Suzuki, S. Takahashi and H. Osada A point mutation in *ftmD* inactivates the fumitremorgin biosynthetic pathway in *Aspergillus fumigates* Af293. The International Conference of Natural Product Biosynthesis, Awaji Yumebutai, June (2012) 日米生合成シンポジウム、June17-22 , 2012.

25. 高橋 俊二. 放線菌二次代謝産物の生合成、第 3 回生合成マシナリー札幌セミナー、2012 年 7 月 23 日

26. 高橋俊二、宮澤岳、熊野匠人、大輪田恵利、高木海、浦本昌和、清水猛、長田裕之. リベロマイシン生合成における 3 級水酸基のサクシニル化、第 27 回 放線菌学会、2012 年 9 月 6-7 日

27. 宮澤岳、高橋俊二、高木海、浦本昌和、長田裕之. 2-アルキルマロニル-CoA 生合成経路の解析、第 27 回 放線菌学会、2012 年 9 月 6-7 日

28. S. Panthee, S. Takahashi, T. Hayashi, T. Shimizu, M. Muroi, T. Nogawa, Y. Futamura, and H. Osada. Identification of small molecules inducing reveromycin production. 第 27 回 放線菌学会、2012 年 9 月 6-7 日

29. 野川俊彦、高橋俊二、関山恭代、高木海、岡野亜紀子、浦本昌和、川谷誠、越野広雪、清水猛、長田裕之. 新規リベロマイシン誘導体の創製と活性評価、第 54 回天然有機化合物討論会、2012 年 9 月 18-20 日
30. S. Takahashi, S. Nagano, T. Nogawa, H. Takagi, M. Uramoto, N. Kanoh, Y. Shiro, and H. Osada, Structure and Function of P450revI in Reveromycin A Biosynthesis. チトクロム P450 発見 50 周年記念シンポジウム、2012 年 12 月 2-3 日
31. 宮澤岳、高橋俊二、本郷やよい、Lauren Ray、中村健道、Gregory L Challis、長田裕之. [3,3-D₂]heptanoic acid を用いたリベロマイシン D 生合成経路の解析、日本農芸化学会、2013 年 3 月 24-28 日
32. 高橋 俊二、宮澤 岳、熊野 匠人、大輪田 恵利、高木 海、野川 俊彦、清水 猛、浦本 昌和、長田 裕之. リベロマイシン生合成におけるサクシニル化機構の解析、日本農芸化学会、2013 年 3 月 24-28 日
33. S. Panthee, S. Takahashi, T. Hayashi, T. Shimizu, M. Muroi, and H. Osada. Secondary metabolite production in *Streptomyces* can be induced by β -carboline compounds. 日本農芸化学会、2013 年 3 月 24-28 日
34. 加藤直樹、野川俊彦、高橋俊二、長田裕之. 病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の第 8 染色体上の二次代謝遺伝子クラスターに含まれる転写活性化因子の役割、日本農芸化学会、2013 年 3 月 24-28 日
35. 土井隆行. 生物活性環状デブシペプチド天然物の全合成と機能解明に向けたアプローチ、第 44 回若手ペプチド夏の勉強会、2012 年 8 月 5 日～7 日
36. 塚本裕一、川瀬歩、土井隆行. アリルパラジウム中間体を求核剤として用いるアルデヒドの不斉分子内アリル化反応、第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム、2012 年 11 月 5 日～6 日
37. 吉田将人、石田恵崇、竹内久征、中川大、八代田陽子、吉田稔、高木基樹、新家一男、土井隆行. デストラキシン E およびその誘導体の全合成と生物活性評価、第 49 回ペプチド討論会プログラム、2012 年 11 月 7 日～9 日
38. 藤原広一、塚本裕一、土井隆行. 2-アルキル-2-ヒドロキシ-3-フラノン骨格構築法の開発および E-492 類の全合成研究、第 102 回有機合成シンポジウム、2012 年 11 月 8 日～9 日

39. 土井 隆行. 天然物の全合成と機能解明に向けたアプローチ、日本薬学会第 133 年会（学術振興賞受賞講演）、2013 年 3 月 27 日橋本 拓哉、橋本 絢子、新家 一男、池田 治生、西山 真、葛山 智久. BAC を利用した 17 員環マクロサイクリック化合物 versipelostatin の異種生産、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日
40. 松田 研一、長谷部 文人、富田 武郎、志波 優、吉川 博文、新家 一男、葛山 智久、西山 真. 新規アミノ酸キャリアタンパク質を用いて生合成される天然化合物の探索、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日
41. 林 健文、西山 真、葛山 智久. *Saccharothrix* sp. ST-888 が生産する除草剤 phosphonothrixin の生合成遺伝子のクローニング、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日
42. 工藤 慧、葛山 智久、西山 真. HDAC 阻害剤 trichostatin A 生合成遺伝子のクローニング、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日
43. 泉川美穂、本橋慶一郎、佐藤龍太郎、永井文、大西康夫、高木基樹、新家一男、新規ナフトキノ系化合物 JBIR-85 の単離、構造決定および生合成に関する研究、2012 年度（第 27 回）日本放線菌学会大会、2012 年 9 月 7 日
44. 泉川美穂、伊藤将士、河原哲平、坂田紀秋、土田外志夫、新家一男、中皮腫細胞に対して細胞毒性活性を示す化合物 MBJ-0020 に関する研究、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日
45. 河原 哲平、泉川 美穂、Hwang Ji-Hwan、橋本 絢子、高木 基樹、新家 一男. 放線菌 *Streptomyces* sp.由来の 34 員環マクロリド配糖体の単離と構造、第 54 回天然有機化合物討論会、2012 年 9 月 18 日
46. I. Kozone, and K. Shin-ya, Large-scale and wide-range library construction of biosynthesis gene cluster from actinomycetes, The International Conference of Natural Product Biosynthesis, 2012 年 6 月 18,19 日
47. 小曾根 郁子、酒井 紀子、鈴木 真理、西田 みち代、永井 文、白石 和子、橋本 絢子、高木 基樹、新家 一男、放線菌由来生合成遺伝子クラスターの大規模かつ広域的なライブラリー構築、2012 年度（第 27 回）日本放線菌学会大会、2012 年 9 月 6 日
48. 小曾根 郁子、酒井 紀子、鈴木 真理、西田 みち代、永井 文、白石 和子、橋本 絢子、高木 基樹、新家 一男、放線菌由来生合成遺伝子クラスターの大規模かつ広域的なライブラリー構築、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日

49. 藤江 学 「次世代シーケンサーでのサンプル調製のコツ ～デジタル PCR の利用～」 Bio-Rad ランチョンセミナー 日本ゲノム微生物学会、長浜バイオ大学 2013年3月10日

【外部発表】(b)新聞・雑誌等への掲載

なし

【外部発表】(c)その他

なし