

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
／有用天然化合物の安定的な生産技術開発」
平成23(2011)年度～平成24(2012)年度 2年間
(事後評価)

プロジェクトの概要

3. 研究開発成果について
4. 実用化に向けての見直し
および取り組みについて

NEDO

バイオテクノロジー・医療技術部

2013年12月11日

1/19

発表内容

公開

- | | |
|-------------------------------|--|
| 1. 事業の位置付け・必要性について | (1) NEDOの事業としての妥当性
(2) 事業目的の妥当性 |
| 2. 研究開発マネジメントについて | (1) 研究開発目標の妥当性
(2) 研究開発計画の妥当性
(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性
(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
(5) 情勢変化への対応等 |
| 3. 研究開発成果について | (1) 目標の達成度と成果の意義
(2) 知的財産権等の取得および
標準化の取り組み
(3) 成果の普及 |
| 4. 実用化に向けての見直し
および取り組みについて | (1) 成果の実用化の見直し
(2) 実用化に向けた具体的取り組み |

2/19

(1) 個別研究開発項目の目標と達成状況

	目標	成果	達成度	今後の課題
1) 生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築	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。	BACベクターを用いた、巨大生合成遺伝子取得法を確立した結果、大幅な効率化に成功し、総計64個の生合成遺伝子クラスターを取得した	◎	今後は、より大きなサイズのBACライブラリー調製技術、および放線菌以外の微生物への応用が望まれる。
2) 安定生産技術の開発	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	64化合物について異種発現生産の検討を行い、さらに遺伝子改変、遺伝子導入法などの改良を行った結果、 > 5 mg/L: 32化合物 (80%) < 5 mg/L: 12化合物 (30%) 生産無し: 20化合物であった。	○	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。

事業目標

- ・生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

(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

成果

放線菌ゲノムの高速・高精度ドラフトゲノムシーケンス法の確立



Roche 454



MiSeq

放線菌ゲノムは高いGC含量 (70%) からなり、繰り返し配列が多いなど、極めてゲノム解析が困難な微生物であり、世界でも正確に解析出来る機関は限定されている

次世代シーケンサーを用いた高速かつ高精度にシーケンスする技術を確立し、2年間で44菌株を解析

MiSeqを用いた新たな解析法の改良により、>100/年の解析が可能なシステムを確立した

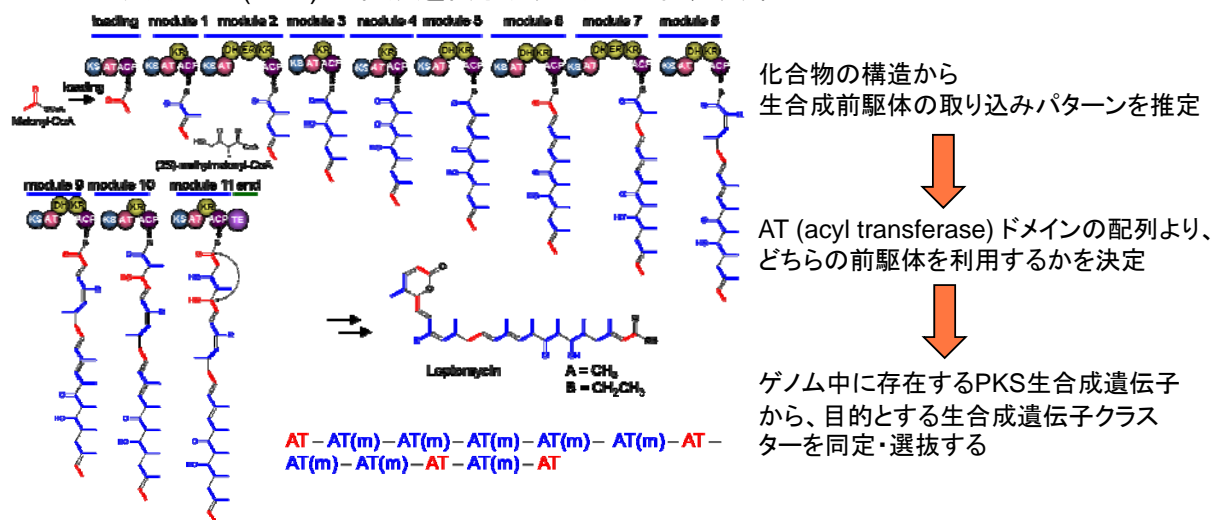
事業目標

・生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

(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

成果

型ポリケタイド (PKS) 生合成遺伝子クラスターの同定法確立



事業原簿 III-19~29

5/19

事業目標

・生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

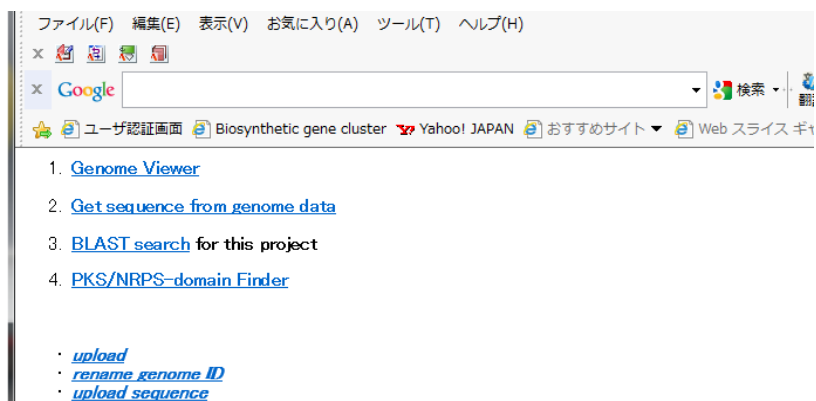
(1) - 1 異種発現生産の標的とする化合物の生合成遺伝子クラスターの同定

成果

ゲノム解析ソフトの開発:

- ・アッセンブル、アノテーションされたデータを研究者間で情報共有可能
- ・Webでのアクセスで、IPアドレスおよびパスワードによるセキュリティー管理。
- ・ゲノムという巨大なデータのやりとりの必要が無く、各機関での解析結果をup to dateにアップデート可能。
- ・会合でのmtg (1~1.5ヶ月毎に開催) を頻繁に開催する必要が無い(会合時のmtgに持ち歩きは不可能)。
- ・各企業毎に個別のサイトを設定することにより機密性を維持。

サイトオープニング画面



事業原簿 III-17~18

6/19

3. 研究開発成果について (1) 目標の達成度 ◎

事業目標

・生成遺伝子クラスターライブラリーの構築

(1) - 1 異種発現生産の標的とする化合物の生成遺伝子クラスターの同定

成果

ゲノム解析ソフトの開発:

解析画面

Genome Viewer

Browse graphically

Molecule: EM52 (leptomycin, leptofuranin) From: 0 0 0 0 Mbp
 sequence from 1 to 50000 bp Span: 50,000 bp
 3rd-letter G+C plot (FramePlot)
 View Reset Clear

Keyword search

Molecule: EM52 (leptomycin, leptofuranin) Keyword: KS (You can use perl regular expression.)
 case sensitive Search Clear

List all genes by ID -- select genome --

Predicted Cluster <- new! (2012/6/8)

Genome: select genome Cluster: select cluster
 sequence from bp to bp
 View Reset

3. 研究開発成果について (1) 目標の達成度 ◎

事業目標

・生成遺伝子クラスターライブラリーの構築

(1) - 1 異種発現生産の標的とする化合物の生成遺伝子クラスターの同定

成果

ゲノム解析ソフトの開発:

検索結果画面

「KS」をキーワードに検索
56個のIDを表示

We found 56 result(s) for "KS":

ID	Start	End	Gene	MW	Description	Note	Category
EM52_01090	214000	212738	aacP	43710	putative α -oxoacyl-ACP synthase II(KS)		t3pls
EM52_01074	949399	844839	zpsA	41731	type-III PKS		
EM52_01082	872975	874189	fadA	42137	putative acyl-CoA thiolase(KS)		
EM52_01051	1147297	1148505	neqR	41141	putative 3-oxoacyl-ACP synthase III(KS)		
EM52_01691	1941706	1967661		889736	modular polyketide synthase (KS-AT-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-ER-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-KR-ACP)	leptomycin ? t1 pls	
EM52_01692	1967720	1975123		255296	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT)	leptomycin ? t1 pls	
EM52_01693	1975148	1980723		531729	modular polyketide synthase [AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-ER-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP]	leptomycin ? t1 pls	
EM52_01694	1990943	2001408		362720	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP)	leptomycin ? t1 pls	
EM52_01695	2001482	2003632		75160	modular polyketide synthase (KS-AT)	leptomycin ? t1 pls	
EM52_01742	2060963	2074669		463549	modular polyketide synthase (KS-AT-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-ER-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_01743	2074791	2084294		329997	modular polyketide synthase (KS-AT-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_01744	2084331	2095136		371810	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_01745	2095133	2098405		106892	modular polyketide synthase (KS-AT)	t1 pls	
EM52_02201	2627692	2626577		247643	modular polyketide synthase (KS-AT-ACP-KS-AT-ACP-TE)	t1 pls	
EM52_02202	2633364	2627731		195005	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-KR-ACP)	pericidinA1 t1 pls	
EM52_02203	2640029	2633391		223439	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-ER-KR-ACP)	pericidinA1 t1 pls	
EM52_02204	2645463	2640322		178311	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-KR-ACP)	pericidinA1 t1 pls	
EM52_02205	2655800	2645571		357480	modular polyketide synthase (KS-AT-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP)	pericidinA1 t1 pls	
EM52_02206	2663627	2655846		270318	modular polyketide synthase (KS-AT-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP)	pericidinA1 t1 pls	
EM52_02404	2892280	2879629		469947	modular polyketide synthase and non-ribosomal peptide synthetase (A-KR-ACP-KS-AT-ACP/T-C-A-T)	t1 pls	
EM52_03048	9846414	9847478	zpsA	37625	type-III PKS	t2 pls	
EM52_03327	4004679	4003438	zpsA	42821	putative chain length factor (3-oxoacyl-ACP synthase III(KS)	t2 pls	
EM52_03328	4005941	4004685	zpsA	44054	putative 3-oxoacyl-ACP synthase I(KS)	t2 pls	
EM52_03511	4161673	4198731		816671	modular polyketide synthase (KS-AT-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03518	4198774	4191638		170150	modular polyketide synthase (KS-AT-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03519	4191688	4206330		458481	modular polyketide synthase (KS-AT-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP-TE)	t1 pls	
EM52_03521	4207963	4224389		564856	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-ER-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03522	4224387	4229069		161111	modular polyketide synthase (KS-AT-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03523	4229088	4240200		380309	modular polyketide synthase (KS-AT-KR-ACP-KS-AT-DH-ER-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03531	4247635	4275600	zpsA	934753	modular polyketide synthase (KS-AT-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-ER-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03532	4275987	4265970		335902	modular polyketide synthase (KR-ACP-KS-AT-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03533	4286007	4297076		390069	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-ER-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03534	4297091	4321525	zpsA	838241	modular polyketide synthase (KS-AT-KR-ACP-KS-AT-DH-ER-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03540	4387039	4390260		112624	modular polyketide synthase (KS-AT-ACP)	t1 pls	
EM52_03541	4390922	4397050		229716	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-ER-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03542	4397155	4403431		319138	modular polyketide synthase (KS-AT-KR-ACP-KS-AT-KR-ACP)	t1 pls	
EM52_03543	4405424	4410417		413190	modular polyketide synthase (KS-AT-DH-KR-ACP-KS-AT-DH-ER-KR-ACP)	t1 pls	

事業目標

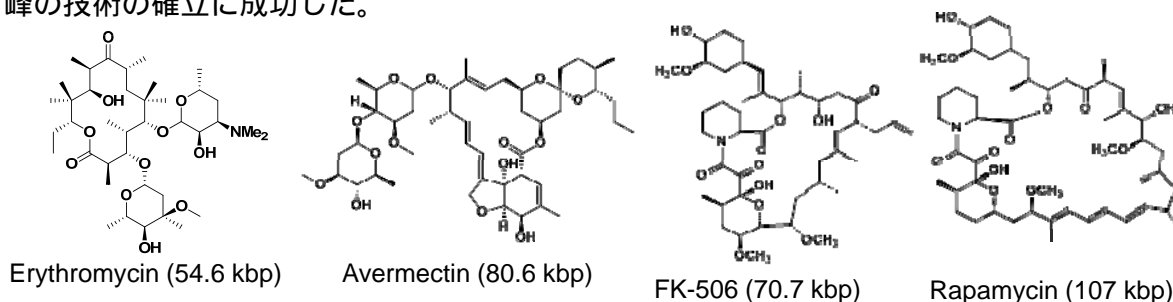
・生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

(1)–2 生合成遺伝子クラスターの取得

成果

生合成遺伝子クラスターの取得は、~40 kbpまでのサイズはCosmidベクターを用い、それ以上のサイズはBAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターを用いた。放線菌が生産する代表的な化合物群であり、臨床薬として用いられているerythromycin、avermectin、FK-506、rapamycinのような型PKS生合成経路で生産されるが、その巨大な生合成遺伝子クラスターを取得するためには、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターを用いたゲノムライブラリー作製技術の開発が必須である。

本研究開発で、BACライブラリー作製技術に関して、種々の改良を行った結果、世界最高峰の技術の確立に成功した。

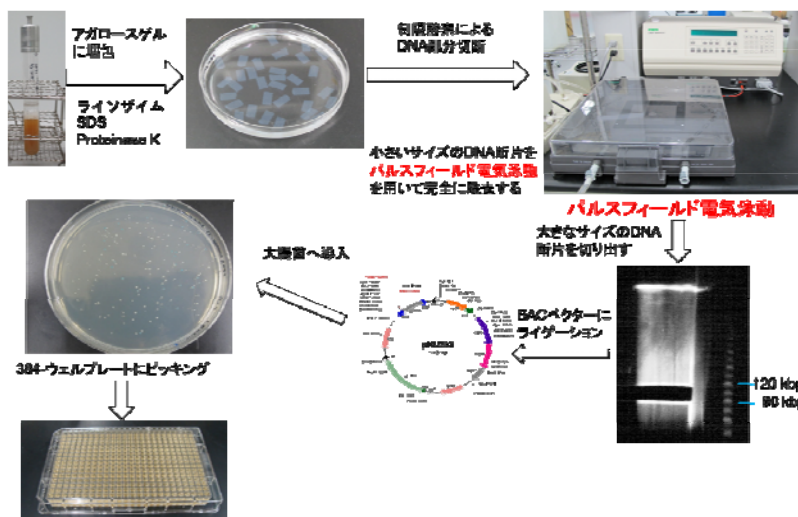


事業目標

・生合成遺伝子クラスターライブラリーの構築

(1)–2 生合成遺伝子クラスター取得

成果



生合成遺伝子クラスター取得数

Cosmid: 25化合物
BAC: 39化合物
総計64化合物
(目標値: 40化合物)

事業目標

・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

成果

親株が工業生産株であり、内在性生合成遺伝子クラスターをノックアウトしたSUKA (SUKA17) 株を、メインの放線菌ホストとして用いた。

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)

Cosmidで取得した生合成遺伝子クラスターの異種発現生産

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	25 個	25 個	100%	17個	68%
SAL1074	14 個	14 個	100%	6 個	43%
KASU-1	15 個	15 個	100%	5 個	33%

事業原簿 Ⅲ-35～39

11/19

事業目標

・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

成果

メインとして用いたSUKA17株が最も高い生産性であった。これにより、工業生産株であり、内在性生合成遺伝子クラスターをノックアウトするシステムが有効であることを明らかにすることが出来た。SAL1074株の内在性生合成遺伝子クラスターをノックアウトした株も同様に、化合物生産性の向上が観察された。

Cosmidで取得した生合成遺伝子クラスターの異種発現生産 (化合物生産量)

生産性	SUKA17	SAL1074	KASU-1
> 5 mg/L	13 個 (76%)	4 個 (67%)	3 個 (60%)
1-5 mg/L	1 個	0 個	1 個
< 1 mg/L	3 個	2 個	1 個
生産化合物数	17 個	6 個	5 個

事業原簿 Ⅲ-35～39

12/19

事業目標

・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

成果

親株が工業生産株であり、内在性生合成遺伝子クラスターをノックアウトしたSUKA (SUKA17) 株を、メインの放線菌ホストとして用いた。

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)

BACで取得した生合成遺伝子クラスターの異種発現生産

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%

事業原簿 Ⅲ-40～45

13/19

事業目標

・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

成果

メインとして用いたSUKA17株が最も高い生産性であった。これにより、工業生産株であり、内在性生合成遺伝子クラスターをノックアウトするシステムが有効であることを明らかにすることが出来た。SAL1074株の内在性生合成遺伝子クラスターをノックアウトした株も同様に、化合物生産性の向上が観察された。

BACで取得した生合成遺伝子クラスターの異種発現生産 (化合物生産量)

生産性	SUKA17	SAL1074	KASU-1
> 5 mg/L	9 個 (75%)	3 個 (21%)	4 個 (37%)
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

事業原簿 Ⅲ-40～45

14/19

事業目標

・安定生産技術の開発

(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

成果

SUKA17株は、異種発現生産成功率および生産量が高いがBACの遺伝子導入率が低い。この遺伝子導入率の低さを克服することにより、異種発現生産の成功率を上げることが期待される。この問題を克服するため、線状染色体SAP1を用いて遺伝子導入する新規なシステムの確立に成功した。

SAP1法によるSUKA22株への生合成遺伝子クラスター導入および異種発現生産

BAC	化合物	SUKA17	J1074	KASU1	SUKA22/SAP1
1	ivermectin	0	0	0	40
2	bafilomycin	11	< 1	< 1	20
3	diazepinomicin	0	< 1	0	3.5
4	企業株1		1.2	0.9	1
5	factumycin	0	0	0	0
	(β-carboline)	21	0	1.8	72
6	FK-506			0	< 1
7	pentalenolactone	0	0.5	0	< 1
8	rapamycin			< 1	X
9	asukamycin		< 1	0	102
10	nemadectin	6.6	0	0	140
11	concanamycin				25

- これまで、年に数個の化合物を対象にした、ラボスケールで行っていた、個々の化合物に関する個別研究であった生合成遺伝子のクローニング、および異種発現生産研究に関して、一気に検証例を押し上げることにより、今後の産業応用が可能な一般的・汎用性の高い技術として確立したことは大変意義深い。また、日本が世界をリードして来た天然物化学をさらなる高みに引き上げることができた研究開発であった。
- 巨大生合成遺伝子クラスター取得技術として、BACベクターを用いる手法の開発を行ったが、世界でも限定したラボのみが取り扱える技術を、誰もが使える技術として確立したことは、今後我が国のこの分野の研究を大きく発展させることが期待される。また、BAC技術は、今後益々発展すると考えられるシークエンス技術の進歩とテーラーメイド医療へ大きく貢献することが期待される(次世代シークエンサーを用いたドラフトゲノムシークエンスとBACの精密シークエンスとのマッチング)。
- 本研究開発の最も大きな成果の一つは、これまでほとんど報告例が無かった大きな生合成遺伝子クラスターから生合成される化合物の異種発現生産と、それを実現するための技術の確立にある。また、これまで、自然から単離した菌株が生産しなかった化合物の生産を誘導できたこと、また生産性の向上を応用レベルで達成できたことは、今後の創薬スクリーニングに大きく貢献するものと考えられる。

(3)知的財産権、成果の普及

平成23年4月～平成25年12月

	平成23年度	平成24年度
特許出願(うち外国出願)	0	0
論文(査読付き)	33	29
外部発表	21	27
その他	4	5
計	58	61

事業原簿 Ⅲ-49

平成25年12月11日現在 17/19

実用化の考え方

当該研究開発に係る生合成遺伝子クラスターライブラリーや技術の公開及び利用により、医薬品の開発に貢献する

4. 実用化の見通しについて (2) 成果の実用化可能性

実用化項目	成果の実用化可能性	実用化までのシナリオ
次世代シークエンサーを用いた精密シークエンスによる目的生合成遺伝子の同定技術	○	既に幾つかの遺伝子に関しては、組合企業において産業利用されており、今後の本分野でのスタンダード法として普及させる。また、BACライブラリーと組み合わせた新規高精度シークエンス法を確立し、様々な生物の精密標準ゲノムシークエンス法として広く普及させ、テーラーメイド医療などでの産業応用に展開する。
BACベクターを用いた、巨大サイズのゲノムライブラリー作製技術およびクロニング法	○	BACライブラリー調製技術に関しては、受託事業として次世代天然物化学技術研究組合が事業化を行う。これまで誰も達成出来ていない、メタゲノム的手法による、巨大生合成遺伝子クラスターを取得可能な画期的技術として磨き上げ、新規化合物生産に応用する。
異種発現生産した化合物の創薬等スクリーニングへの応用	○	既に次世代天然物化学技術研究組合が行っている、天然物ライブラリーの普及活動に用いられており、今後の創薬等スクリーニングに広く利用する。 異種発現生産した化合物のうち、産業上有用な化合物に関しては、開発企業での応用試験を進める
生合成遺伝子クラスターの取得および異種発現生産に関するツールおよび技術に関するツール及びシステム	○	直ぐにでも、ライセンス化による普及利用を進める