

地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)

(感染症分野)

課題名 インドネシアの生物資源多様性を利用した抗マラリア・

抗アメーバ新規薬剤リード化合物の探索

相手国 インドネシア

国際共同研究期間*1

平成27年 4月 1日から平成32年 3月31日まで

JST側研究期間*2

平成26年 5月 1日から平成32年 3月31日まで

(正式契約移行日 平成27年 4月 1日)

*1 R/Dに記載の協力期間

*2 開始日=暫定契約開始日、終了日=R/Dに記載の協力期間終了日又は当該年度末

平成26年度実施報告書

代表者：氏名 野崎 智義

所属・役職 国立大学法人 筑波大学 生命環境科学研究科・教授

<平成26年度採択>

I. 国際共同研究の内容（公開）

本研究開発は、インドネシアの有する極めて多様な生物資源の価値と、微生物から新規薬剤を創成する日本の知的基盤と最先端技術とを融合し、マラリアを始めとする地球規模で重要な感染症の制圧に不可欠な薬剤を開発することを目的とする。具体的には、マラリアと赤痢アメーバ症に対する新しい薬剤の創成を目指し、インドネシア国内の多様な放線菌・糸状菌資源などを利用し、酵素阻害活性と抗原虫活性をもつ新規阻害剤の探索、精製、構造決定を行うこととする。さらに、大量生産・動物実験により薬効が高く、原虫への選択毒性の高いリード化合物を選択し、将来的には企業との共同研究により社会実装を目指す。期間全体では以下の研究を行う。マラリア原虫および赤痢アメーバの標的酵素の調整法・アッセイ法・ハイスループットスクリーニング系を確立し、インドネシア側に技術移転する。その後、現地にて採集された微生物培養抽出液から、マラリア原虫および赤痢アメーバの組換え酵素・粗精製酵素等を阻害するものを選択する。また、阻害活性を示す抽出液の原虫増殖阻害の検討を行う。同時に微生物培養抽出液から、原虫の増殖を阻害するものを直接探索し、増殖阻害活性を示す抽出液を選択する。抽出液から粗精製・精製された化合物を用いてインビトロ・インビボでの原虫殺滅作用を検証する。同時に、本邦での技術研修と先方での実地指導を継続して行う。

1. 当初の研究計画に対する進捗状況

研究題目・活動	H26年度	H27年度	H28年度	H29年度	H30年度	H31年度
1. マラリア創薬 1-1微生物資源ライブラリーの拡充 1-2DHOD・複合体II/III阻害活性培養液のスクリーニング 1-3増殖阻害活性培養液のスクリーニング 1-4阻害剤の精製 1-5阻害剤の構造解析 1-6動物評価系有効性確認 1-7構造生物学的解析		新規抽出液2000件追加 微生物培養抽出液の酵素阻害評価系への持ち込み	新規抽出液5000件追加 酵素阻害抽出液の選択	微生物資源ライブラリー拡充の完了 有効抽出液の選択 第1剤の精製完了	酵素阻害剤の一次スクリーニング完了 原虫増殖阻害抽出物のスクリーニング完了 第2～の阻害化合物精製完了 構造解析完了	動物での有効性の確認の完了
2. 赤痢アメーバ症創薬 1-1微生物資源ライブラリーの拡充 1-2SAT/CS/NADK阻害活性培養液のスクリーニング 1-3増殖阻害活性培養液のスクリーニング 1-4阻害剤の精製 1-5阻害剤の構造解析 1-6動物評価系有効性確認 1-7構造生物学的解析		5000件微生物資源追加 微生物培養抽出液の酵素阻害評価系への持ち込み	1万件微生物資源追加 酵素阻害抽出液の選択	微生物資源ライブラリー拡充(2万)の完了 有効抽出液の選択 第1剤の精製完了	酵素阻害剤の一次スクリーニング完了 原虫増殖阻害抽出物のスクリーニング完了 第2～の阻害化合物の精製完了 構造解析完了	動物での有効性の確認の完了
3. リード化合物大量培養 3-1大量合成至適化 3-2構造決定のための生産 3-3動物実験のための生産 4. インドネシアへの技術移転とキャパシティ・デベロップメント 4-1微生物・原虫培養の構築 4-2培養抽出液の阻害活性スクリーニング系の確立 4-3有望化合物の精製法の研修・技術移転 4-4構造解析法の研修・技術移転 4-5原虫病・熱帯病研究施設間の連携の構築・強化		日本での原虫培養の研修終了 日本での酵素評価の研修終了 日本での精製の研修1 日本での構造解析法の研修1	インドネシアへの原虫培養の移転終了 インドネシアへの酵素活性阻害評価の自立 精製法の移転 インドネシアへの精製の研修2 インドネシアへの構造解析法の研修1	第1剤の合成の至適化 第1剤の大量生産 大量合成・菌株改良研修1 インドネシア国内の創薬コンソシアムによるシンポジウム開催1	第2～剤の合成の至適化 第2～剤の大量生産 大量合成・菌株改良研修2 インドネシア国内の創薬コンソシアムによるシンポジウム開催2	精製の研修の終了と自立 構造解析法の研修2の終了と自立

* インドネシア側の予算によりスクリーニングの研修が H26 年度に前倒しで実施された。更に、新しい酵素アッセイを追加することを考慮し、H29 年度まで継続する予定とする。

** インドネシア側の予算により精製の研修が H26 年度に前倒しで実施された。

JST成果目標シート

研究課題名	インドネシアの生物資源多様性を利用した抗マラリア・抗アメーバ新規薬剤リード化合物の創成
研究代表者名 (所属機関)	野崎 智義 (筑波大学 生命環境)
研究期間	H26採択(平成26年10月1日～平成31年3月31日)
相手国名/主要相手国研究機関	インドネシア共和国/インドネシア科学技術応用庁バイオテックセンター、インドネシア科学研究所、厚生省国立衛生研究所、アイルランガ大学、プラウジャヤ大学

付随的成果

日本政府、社会、産業への貢献	・アジアの微生物資源の創薬イノベーションへの活用 ・日本企業による成果の事業化
科学技術の発展	・インドネシアの医薬品自己開発能力の開発による日本での創薬パイプラインの拡大 ・生物多様性の有効活用
知財の獲得、国際標準化の推進、生物資源へのアクセス等	・新規抗マラリア・アメーバ薬剤のリードの知財獲得 ・微生物資源ライブラリーの拡充と応用の拡大 ・創薬における国際競争力の獲得
世界で活躍できる日本人材の育成	・国際的に活躍可能な日本側の若手研究者の育成(国際会議への参加、国際誌への論文掲載など) ・創薬を指導できる若手指導者の育成
技術及び人的ネットワークの構築	・創薬に不可欠な多様な分野の人材の国際交流によるネットワークの構築
成果物(提言書、論文、プログラム、マニュアル、データなど)	・新規抗寄生虫薬のリード化合物の創成 ・生活習慣病・がんを含む他の疾病に対する創薬へ応用可能なパイプラインの提供 ・日伊の共同研究による論文の発表

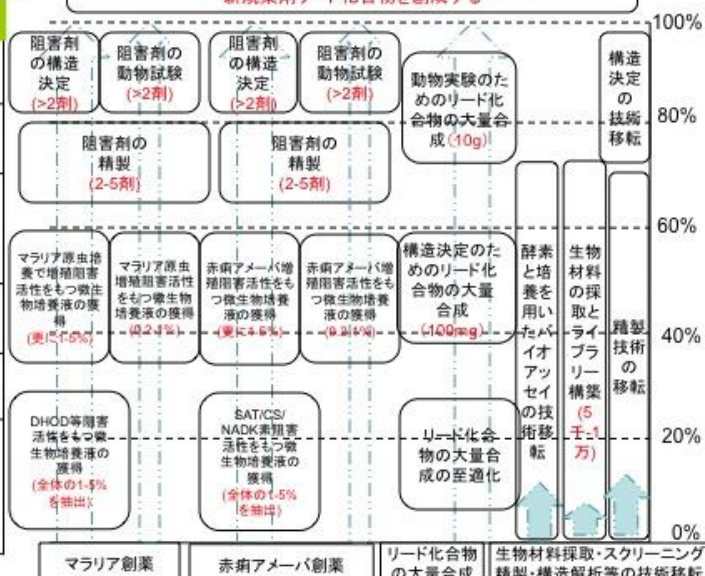
上位目標

インドネシアの科学技術力の総合的向上と主要感染症薬の自国供給
日本に対するバイオリソースの供給ルートの確保
二国間協調による医薬品の創成システムの構築

インドネシア国内での自国生物資源の自主的利用が活性化される
バイオテクノロジー・製薬など新しい産業領域の強化

プロジェクト目標

インドネシアの生物資源から抗マラリア・抗アメーバ活性を示す
新規薬剤リード化合物を創成する



2. プロジェクト成果の達成状況とインパクト

(1) プロジェクト全体

- ・プロジェクト全体のねらい、当該年度の成果の達成状況とインパクト等

インドネシアは世界有数の生物多様性と生物資源価値を有するが、創薬等への応用に必要な学問・技術分野の基盤が国内に育成されていない。このため国際的に問題となるマラリアを始めとする感染症の制圧に不可欠な新規薬剤の開発力が不十分である。本研究はインドネシアの有する極めて多様な生物資源の価値と、天然生物資源から新規薬剤を創成する日本の知的基盤と最先端技術とを融合し、地球規模で重要な感染症であるマラリアと赤痢アメーバ症に対する新規創薬を目指し、抗原虫活性をもつ新規リード化合物の探索、精製、構造決定を行うことを目的としている。

本研究構想の具体的なゴールとしては以下が挙げられる。

1. インドネシア国内の微生物資源ライブラリーを利用して、抗マラリア・抗赤痢アメーバ特異酵素を阻害する微生物培養抽出液のスクリーニング、有効化合物の精製・構造決定を達成し、両原虫症に対し動物モデルで治療効果を示す創薬リード化合物を2剤以上同定する。
2. 同様のリード探索を標的酵素の阻害活性でなく、原虫培養系の増殖阻害・殺滅効果を指標に行い、両疾患に対し動物モデルで治療効果を示す創薬リード化合物を2剤以上同定する。

以上の具体的な目標の達成により、

3. インドネシアにおける微生物資源ライブラリーの整備・応用を可能とする。更に、今後の自国の創薬研究に不可欠な評価系の確立、有用化合物の同定と精製の技術の移転、構造解析や薬効の動物モデルでの評価系などの知的・技術的基盤を確立することを目指している。

当該年度は以下を達成した。日本側研究者をインドネシアに派遣し、R/D, MoUの締結に向けた研究機

関、関連省庁との調整を行った。具体的には 7/6-7/10、9/24-10/14 に事前調査をすべての国内関連機関からのべ7名、更に、10/5-10/10 に詳細計画策定計画の策定調査を実施した。これにより R/D, MoU の締結後の研究の具体的な進め方に関して打ち合わせを行った。

更に同時期に、各研究施設において阻害剤探索のために必要な施設整備のための調査を行った。これを受けて 2/24-27 および 3/23-29 に施設整備状況の確認と詳細な研究の進め方の打ち合わせを目的としてべ2名の調査派遣を行った。更に、国内では以下の準備研究を行った。野崎グループは赤痢アメーバの標的酵素の大腸菌発現の至適化、抽出・分離精製の至適化を行った。稲岡グループは熱帯熱マラリア原虫の標的酵素の大腸菌発現の至適化、抽出・分離精製の至適化を行った。塩見グループは阻害剤精製のプロトコルの検討を行った。渡辺グループは糸状菌・放線菌の大量培養のプロトコルの検討を行った。各研究題目の成果等は以下に示す。

インドネシア国内では Biotech Center (BC) を中心とした、本邦での技術研修を行った。BC より、のべ5名の研究者を1-2ヶ月筑波大、北里大、東京大で酵素アッセイ、細胞培養、精製等の初期研修を行った。これらは RISTEK の予算で負担された。更に、BC に保存されている微生物資源の一部に関して再培養を試み、高い生存率を確認した。更に BC および Airlangga 大学(AU)から H27 年度以降に短期研修派遣する人材の選考を行った。

以上、当該年度予定されていたすべての計画が予定通りに実施された上、一部の本邦研修は前倒しで実施され、目標以上の成果を達成した。

(2) 研究題目1 マラリア創薬

①研究題目1の研究のねらい

研究グループ 東京大学

期間全体では以下の研究を行う。マラリア原虫標的酵素の調整法・アッセイ法・ハイスループットスクリーニング系を確立し、インドネシア側に技術移転する。その後、現地で採集された微生物培養抽出液から、マラリア原虫のミトコンドリア呼吸鎖酵素 (DHODH、MQO や複合体 III 等) を阻害するものを選択する。この実験によって、格標的酵素阻害活性を示す抽出液の原虫増殖阻害の検討を行う。同時に微生物培養抽出液から、マラリア原虫の増殖を阻害するものを直接探索し、増殖阻害活性を示す抽出液を選択する。抽出液から粗精製・精製された化合物を用いてインビトロ・インビボでの原虫殺滅作用を検証する。同時に、本邦での技術研修と先方での実地指導を継続して行う。

H26 年度は、マラリア原虫の標的酵素のうち、DHODH の大腸菌を用いた大量発現、精製の最適化を行った。また MQO に関しては世界で初めてとなる大腸菌を用いた組替えタンパク質の大量発現に成功した。そして、東京大学にて BPPT のスタッフ 2 名を受け入れ、DHODH お呼び MQO を大量発現した大腸菌膜を用いてスクリーニングの研修を行った。

研究グループ 北里大学

期間全体では以下の研究を行う。原虫酵素阻害活性または原虫増殖阻害活性をもつ微生物培養液を選択し、再培養を行って十分な量を確保した後、そこから各種クロマトグラフィーを用いた精製により抗原虫活性物質を単離する。単離した抗原虫活性物質について、理化学的性質を測定して分子量等の物性を解析することでデータベースから化合物の同定を行う。新規化合物の場合は、各種 NMR スペクトルを中心とした解析によりその化学構造を明らかにする。同時に、本邦での技術研修と先方での実地指導

を継続して行う。

H26年度は、北里大学にてBPPTのスタッフ2名を受け入れ、微生物培養液からの生物活性物質の各種クロマトグラフィーを用いた精製と化合物の同定の研修を行った。

②研究題目1の研究実施方法

本研究で標的酵素としているマラリア原虫の呼吸鎖酵素のうちジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHODH)とリンゴ酸：キノン脱水素酵素(MQO)の大腸菌発現の至適化、抽出・分離精製を行った。マラリア原虫のDHODHに関しては、既知の方法で調整した場合の2.3~3倍ほど高い分子活性($K_{cat} = 18.4 \text{ s}^{-1}$)を保持した精製酵素を得る新たな方法を確立した。MQOに関しては、大腸菌を用いた大量発現は未だに成功例が無かったが、DHODHと同様に予想したミトコンドリア移行シグナルを除いた状態で、大腸菌を用いて大量発現を試みた。DHODHと同様にMQOの大量発現が確認され、極めて高い比活性を持つ大腸菌の膜各分を得る事が出来た。

マラリア原虫標的酵素のスクリーニング系は確立中であったため、抗原虫物質の精製に関する技術移転は抗菌物質の精製の研修により代用した。すなわち微生物培養液より抗大腸菌活性や抗カンジダ活性を示すものを選択し、その培養液より抗菌活性を示す化合物をHPLC等の各種クロマトグラフィーを用いて精製した。単離した化合物はその理化学的性質を測定して、その結果をデータベースと照合することで同定した。以上、H26年度の目標を達成した。

(3) 研究題目2 アメーバ創薬

①研究題目2の研究のねらい

研究グループ 筑波大学

期間全体では以下の研究を行う。赤痢アメーバの標的酵素の調整法・アッセイ法・ハイスループットスクリーニング系を確立し、インドネシア側に技術移転する。その後、現地にて現地で採集された微生物培養抽出液から、赤痢アメーバのCS, SAT, NDAK等を阻害するものを選択する。また、阻害活性を示す抽出液の原虫増殖阻害の検討を行う。同時に微生物培養抽出液から、赤痢アメーバの増殖を阻害するものを直接探索し、増殖阻害活性を示す抽出液を選択する。抽出液から粗精製・精製された化合物を用いてインビトロ・インビボでの原虫殺滅作用を検証する。同時に、本邦での技術研修と先方での実地指導を継続して行う。同時に、研究グループ間の共同研究の取りまとめ、プロジェクト全体の管理を行う。

H26年度は、赤痢アメーバの標的酵素(CS, SAT, NADK)の大腸菌発現の至適化、抽出・分離精製の至適化を行った。CS, SAT, NADKはヒスチジン標識付加した大腸菌組換えタンパク質の発現・精製を行った。発現・超音波破碎・抽出・精製に関して至適化を行った。更にBPPTのスタッフ1名を受け入れ、赤痢アメーバの組換え酵素の阻害アッセイの系を用いたスクリーニングの研修を行った。

研究グループ 北里大学 (研究題目1にまとめて記載)

②研究題目2の研究実施方法

赤痢アメーバの標的酵素(システイン合成酵素 CS, セリンアセチル転移酵素 SAT, NAD キナーゼ NADK)の大腸菌発現の至適化、抽出・分離精製を行った。CS, SAT, NADKはヒスチジン標識付加した

大腸菌組換えタンパク質として発現させ、ニッケル NTA により精製を行った。発現・抽出では発現誘導時の温度、IPTG の濃度等に関して至適化を行った。更に、超音波破碎・抽出・精製に関して至適化を行った。

赤痢アメーバ原虫標的酵素のスクリーニング系は確立中であったため、抗原虫物質の精製に関する技術移転は抗菌物質の精製の研修により代用した。すなわち微生物培養液より抗大腸菌活性や抗カンジダ活性を示すものを選択し、その培養液より抗菌活性を示す化合物を HPLC 等の各種クロマトグラフィーを用いて精製した。単離した化合物はその理化学的性質を測定して、その結果をデータベースと照合することで同定した。以上、アッセイ系の至適化・精製に関しても H26 年度の目標を達成した。

(4) 研究題目 3 リード化合物大量生産

① 研究題目 3 の研究のねらい

研究グループ 日本マイクロバイオファーマ

期間全体としては、リード化合物を確認するための動物試験に必要な試料を大量調製できるように指導する。具体的には、見出されたばかりの微生物の生産性は非常に低いので、菌改良、最適培養条件の検討等を行い、生産性を向上し、更にフラスコ培養から攪拌培養系のジャーファーマンターを用いて、動物試験用に供する大量試料を調製できるようにする。

H26 年度は H27 年度からのプロジェクトの準備として、大量培養の研究設備の整備が技術移転に不可欠であるため、研究施設において大量培養のために必要な設備整備のための調査を 7/6-7/10 ならびに 9/24-10/4 の 2 回インドネシアに派遣し、具体的設備の整備に関して打ち合わせを行った。

② 研究題目 3 の研究実施方法

インドネシアで動物試験用に供する大量試料を調製できるようにするために現地調査を行なった。現地でフラスコ培養のような振盪培養系はほぼ整備されているが、攪拌培養系での培養条件検討のためのミニジャーと大量調製のためのジャーファーマンターは新規に設置する必要があることを現地で確認した。新規に設置するミニジャーとジャーファーマンターの仕様を検討し、概算額を見積した。以上、当該年度予定されていた計画は予定通りに実施された。

(5) 研究題目 4 インドネシアへの技術移転とキャパシティデベロップメント

① 研究題目 4 の研究のねらい

研究グループ 東京大学、筑波大学、北里大学、日本マイクロバイオファーマ

技術移転はインドネシア研究者を本邦へ招聘し、研修させる短期研修と日本人研究者がインドネシアに渡航し打ち合わせと指導を行う派遣とで行う。招聘に関しては 1-3 ヶ月程度の本邦研修がのべ 6-12 人程度/年行われる。派遣に関しては、1 週間から 2 ヶ月程度の派遣がそれぞれの研究グループから 5 年間にわたり行われる。

H26 年度は H27 年度からのプロジェクトの準備として、本邦研修を中心とした技術移転を中心に行った。また研究施設の整備が技術移転に不可欠であるため、各研究施設において阻害剤探索のために必要な施設整備のための詳細な調査を 10 月ならびに 2-3 月に実施し、施設整備状況確認を行った。

② 研究題目 4 の研究実施方法

本邦での短期研究としては、BC よりのべ 5 名の研究者を 1-2 ヶ月筑波大、北里大、東京大で酵素アッセイ、細胞培養、精製等の初期研修を行った。これにより Biotech Center (BC) を中心として来年度当初

に必要なスクリーニングの初期段階に必要な研究項目の基礎が移転された。以上、当該年度予定されていた計画は予定通りに実施された。

また、実際に日本側研究者を 7/6-7/10、9/24-10/4、10/5-10/10、2/24-27 および 3/23-29 の 5 回インドネシアに派遣し、研究の具体的な進め方に関して打ち合わせを行った。

以上

	論文数	0	件
	うち国内誌	0	件
	うち国際誌	0	件
	公開すべきでない論文	0	件

	国内	国際
その他の著作物 本プロジェクト期間累積件数	0	0

③その他の著作物(相手側研究チームとの共著のみ)(総説、書籍など)

著者名,タイトル,掲載誌名,巻数,号数,頁,年	出版物の種類	発表日・出版日	特記事項

著作物数 0 件
公開すべきでない著作物 0 件

④その他の著作物(相手側研究チームとの共著でないもの)(総説、書籍など)

著者名,論文名,掲載誌名,出版年,巻数,号数,はじめ-おわりのページ	出版物の種類	発表日・出版日	特記事項

著作物数 0 件
公開すべきでない著作物 0 件

⑤研修コースや開発されたマニュアル等

研修コース概要(コース目的、対象、参加資格等)、研修実施数と修了者数	開発したテキスト・マニュアル類	特記事項

VI(2)(公開)学会発表

	国内	国際
招待講演 本プロジェクト期間累積件数	0	0
口頭発表 本プロジェクト期間累積件数	0	0
ポスター発表 本プロジェクト期間累積件数	0	0

①学会発表(相手側研究チームと連名のもののみ)(国際会議発表及び主要な国内学会発表)

年度	国内/ 国際の	発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日等	招待講演	口頭発表	ポスター発表
			0	0	0

②学会発表(相手側研究チームと連名でないもの)(国際会議発表及び主要な国内学会発表)

年度	国内/ 国際の	発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日等	招待講演	口頭発表	ポスター発表
			0	0	0

VI(3) (特許出願した発明件数のみを公開し、他は非公開) 特許出願

①国内出願
国内特許出願数 0 件

②外国出願
外国特許出願数 0 件

VI(5) (公開)ワークショップ・セミナー・シンポジウム・アウトリーチ等の活動

①ワークショップ・セミナー・シンポジウム・アウトリーチ等

年月日	名称	場所	参加人数	概要

②合同調整委員会開催記録(開催日、出席者、議題、協議概要等)

年月日	出席者	議題	概要

JST成果目標シート

研究課題名	インドネシアの生物資源多様性を利用した抗マalaria・抗アメーバ新規薬剤リード化合物の創成
研究代表者名 (所属機関)	野崎 智義 (筑波大学 生命環境)
研究期間	H26採択(平成26年10月1日～平成31年3月31日)
相手国名／主要相手国研究機関	インドネシア共和国／インドネシア科学技術応用庁 バイオテックセンター、インドネシア科学研究所、厚生省国立衛生研究所、アイルランガ大学、ブラウイジャヤ大学

付随的成果

日本政府、社会、産業への貢献	<ul style="list-style-type: none"> ・アジアの微生物資源の創薬イノベーションへの活用 ・日本企業による成果の事業化
科学技術の発展	<ul style="list-style-type: none"> ・インドネシアの医薬品自己開発能力の開発による日本での創薬パイプラインの拡大 ・生物多様性の有効活用
知財の獲得、国際標準化の推進、生物資源へのアクセス等	<ul style="list-style-type: none"> ・新規抗マalaria・アメーバ薬剤のリードの知財獲得 ・微生物資源ライブラリーの拡充と応用の拡大 ・創薬における国際競争力の獲得
世界で活躍できる日本人人材の育成	<ul style="list-style-type: none"> ・国際的に活躍可能な日本側の若手研究者の育成(国際会議への参加、国際誌への論文掲載など) ・創薬を指導できる若手指導者の育成
技術及び人的ネットワークの構築	<ul style="list-style-type: none"> ・創薬に不可欠な多様な分野の人材の国際交流によるネットワークの構築
成果物(提言書、論文、プログラム、マニュアル、データなど)	<ul style="list-style-type: none"> ・新規抗寄生虫薬のリード化合物の創成 ・生活習慣病・がんを含む他の疾病に対する創薬へ応用可能なパイプラインの提供 ・日伊の共同研究による論文の発表

上位目標

インドネシアの科学技術力の総合的向上と主要感染症薬の自国供給
日本に対するバイオリソースの供給ルートの確保
二国間協調による医薬品の創成システムの構築

インドネシア国内での自国生物資源の自主的利用が活性化される
バイオテクノロジー・製薬など新しい産業領域の強化

プロジェクト目標

インドネシアの生物資源から抗マalaria・抗アメーバ活性を示す
新規薬剤リード化合物を創成する

