

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16333

研究課題名（和文）ペプチド構造を有する環状ジヌクレオチド等価体を利用した創薬研究

研究課題名（英文）Drug discovery research using cyclic dinucleotide derivatives with peptide structures as bioisosteres

研究代表者

辻 徹一郎 (Tsuji, Genichiro)

国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部・主任研究官

研究者番号：90786196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、様々な生理活性を有する環状ジヌクレオチド(CDN)について、アミン分子を骨格とした誘導体を設計・合成し、その機能評価を行った。アミン骨格の利用により、多種の誘導体への構造展開が可能であり、分解酵素への耐性向上などの機能を付与できることが分かった。活性は充分ではないものの、合成した誘導体において、グラム陽性菌に対するバイオフィーム形成阻害活性や哺乳類の免疫関連タンパク質であるSTINGの刺激もしくは抑制作用を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CDNは病原菌のバイオフィーム形成阻害作用やI型インターフェロンの誘導作用など、医薬品としての利用が期待されている。本研究では、アミン構造を利用したCDN誘導体によって、迅速な合成、分解酵素への耐性、また膜透過性の改善など、医薬品として重要な機能の付与が可能であることを示した。この成果は、将来のCDNの医薬品としての応用において有用な知見となると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cyclic dinucleotides (CDNs) are molecules with a variety of biological activities. In this study, CDN derivatives based on amine molecules have synthesized and evaluated their functions. The introduction of an amine skeleton into the CDN molecule enabled the synthesis of a wide variety of derivatives and can impart functions such as improved resistance to degradative enzymes. Although the activity was not sufficient, the synthesized derivatives showed biofilm formation inhibitory activity against Gram-positive bacteria, and stimulation or inhibition of STING, an immune-related protein in mammals.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：環状ジヌクレオチド c-di-GMP バイオフィーム STING アミン ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

近年、c-di-GMP や c-di-AMP (図 1 左)に代表される環状ジヌクレオチド(CDN : Cyclic DiNucleotide)分子の生体内における重要な機能が次々と明らかになってきており、例えば c-di-GMP には細菌によるバイオフィーム(細菌を病巣に固着させ抗生物質の透過性を著しく減弱させる)の形成を阻害する作用があることがわかっている。また、最近では CDN 分子によって哺乳類の免疫関連タンパク質である Stimulator of interferon genes (STING)への刺激を介して I 型インターフェロンを誘導することも明らかとなった¹。このように CDN 分子は様々な生理活性を有しており、医薬品としての応用も期待されている。しかしながら、天然型の CDN 分子は生体内の酵素で分解されてしまう点や、細胞膜透過性に乏しいことが医薬品としての利用に制限をかけている。これらの点を克服すべく、天然の CDN 分子構造の元素を置き換えた修飾体の合成法が確立されている (図 1 右)²。しかしながら、その方法が適用できるのは従来の糖骨格を有する CDN 構造分子のみに限られており、工程数も多いことから多様な分子構造を有する誘導体合成には適していない。

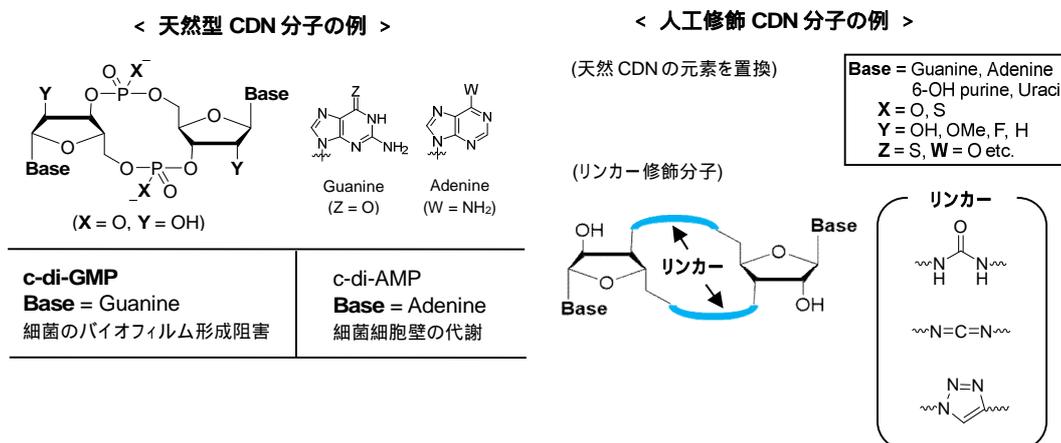


図 1. 既存の CDN 誘導体の例

2. 研究の目的

そこで本研究では、天然の CDN 分子の糖-リン酸骨格を置換することで既存の CDN が抱える構造上の問題点の克服を目指した。具体的には新規の CDN 誘導体の構造としてアミン分子を基本骨格とした構造を利用することで、迅速合成、また機能付加を行うことし、その設計・合成を計画した。また、得られた誘導体の物性や生理活性を評価することで新規の医薬品候補となりうる CDN 誘導体を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アミン分子をベースとした CDN 誘導体の合成

CDN 誘導体の合成においては、多種の化合物を簡便に合成するために環状もしくは鎖状のアミン分子を母骨格とした合成経路を設定した (図 2)^{3,4}。

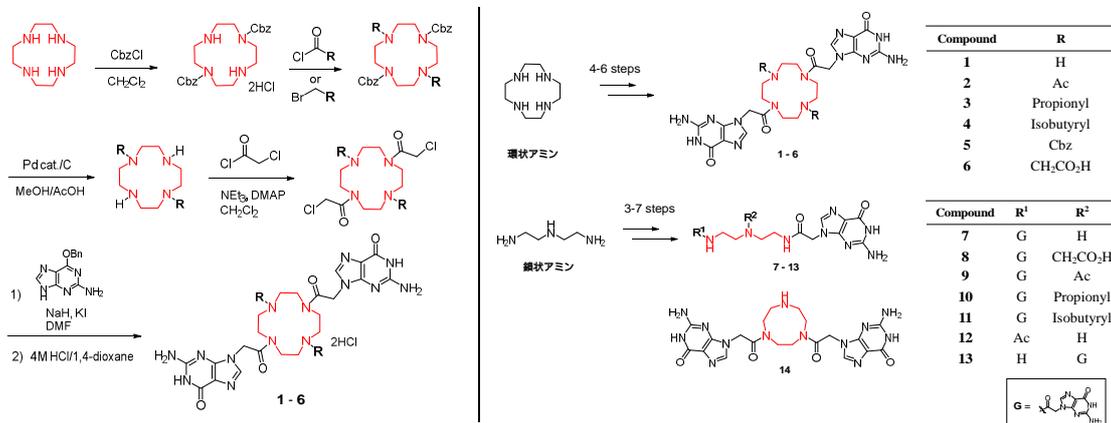


図 2. アミン分子を母骨格とした CDN 誘導体の合成

(2) CDN 誘導体のバイオフィーム形成阻害活性評価

細菌のバイオフィーム形成阻害活性については、グラム陽性菌として、黄色ブドウ球菌、ミュートランス菌、表皮ブドウ球菌、リステリア菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を選択した。またグラム陰性菌として、緑膿菌、多剤耐性緑膿菌、アシネトバクター、大腸菌を選択した。これらの細菌を CDN 誘導体の存在・非存在下に培養し、形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレット法によって染色し、洗浄後、抽出した色素を吸光度測定によって測定することでバイオフィームの形成率を定量した。また同時に、化合物による抗菌作用によって細菌数が減少していないかを確認するために、595 nm における吸光度測定によって濁度を計測した。

(3) CDN 誘導体の STING に対する刺激・抑制活性評価

CDN 誘導体の STING に対する作用は、STING をコードするプラスミドをトランスフェクション試薬によって導入した HEK 293T 細胞を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより評価した。この細胞について CDN 誘導体の存在・非存在下に培養した後、発光試薬の処理によって得られた蛍光発光から、ルシフェラーゼ活性を測定し、STING に対する刺激 (アゴニスト) 活性もしくは阻害 (アンタゴニスト) 活性を評価した。

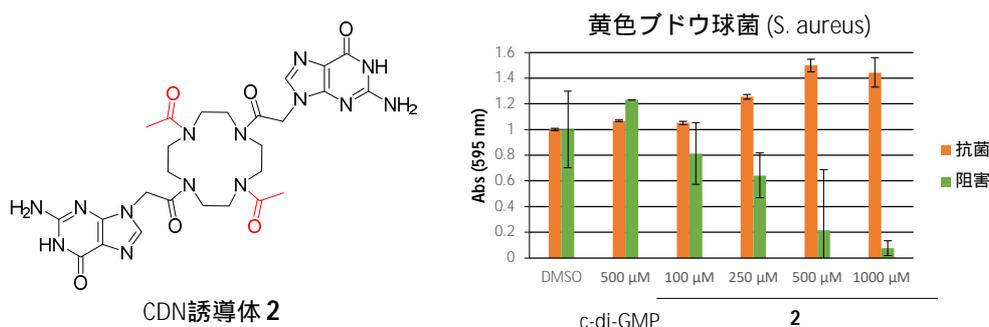
4. 研究成果

(1) アミン分子をベースとした CDN 誘導体の合成

図 2 に示す経路においては、環状アミンを利用することで環化の工程を省略できる。入手容易な環状もしくは鎖状アミンを出発原料として、核酸塩基部を導入することで複数の新規 CDN 誘導体を簡便に合成することができた。

(2) CDN 誘導体のバイオフィーム形成阻害活性評価

合成した CDN 誘導体のうち、アセチル基を有する環状アミン誘導体 2 がグラム陽性菌のうち、特に黄色ブドウ球菌に対して強いバイオフィーム形成阻害活性を示すことが明らかとなった (図 3)。この時、細菌細胞数は減少していなかったことから、この化合物は細菌に対する抗菌活性ではなく、バイオフィームの形成を選択的に阻害していることが分かった。また、すでに形成されたバイオフィームについては除去・分解作用を示さなかったことから、この分子はバイオフィームの接着過程や成長過程において阻害活性を示すことが示唆された³。一方で、合成した CDN 誘導体はグラム陰性菌に対しては有意なバイオフィーム形成阻害活性を示さなかった。構造活性相関の結果から、核酸塩基としてグアニンを 2 つ有する構造が誘導体 2 のバイオフィーム形成阻害活性に重要であることも分かった。



	DMSO	c-di-GMP	1	2	3	4	5	6
<i>E. coli</i>	100 (100)	81 (76)	133 (93)	36 (52)	153 (105)	118 (559)	138 (91)	83 (85)
<i>P. aeruginosa</i>	100 (100)	48 (78)	85 (100)	60 (90)	76 (118)	114 (313)	86 (105)	82 (90)
<i>S. aureus</i>	100 (100)	123 (106)	89 (108)	20 (150)	76 (124)	87 (267)	80 (111)	74 (117)
<i>S. mutans</i>	100 (100)	18 (98)	96 (138)	40 (136)	46 (117)	88 (206)	17 (143)	90 (105)

	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>E. coli</i>	99 (95)	138 (95)	116 (101)	97 (95)	107 (97)	108 (85)	104 (95)	103 (95)
<i>P. aeruginosa</i>	87 (112)	82 (126)	104 (119)	94 (98)	83 (98)	99 (119)	103 (116)	105 (105)
<i>S. aureus</i>	42 (102)	87 (99)	76 (108)	85 (92)	103 (92)	135 (100)	87 (124)	92 (103)
<i>S. mutans</i>	98 (109)	78 (188)	87 (154)	125 (106)	147 (104)	101 (92)	87 (98)	92 (121)

図 3. アミン分子を母骨格とした CDN 誘導体のバイオフィーム形成阻害活性評価

(3) CDN 誘導体の STING に対する刺激・抑制活性評価

合成したアミン骨格を有する CDN 誘導体を評価した結果、化合物の濃度依存的な STING 活性の上昇が確認され、環状化合物 **14** が天然アゴニストである 2'-3'-cyclic GMP-AMP (cGAMP) と比べ、弱いながらもアゴニスト活性を示すことが分かった (図 4)⁴。

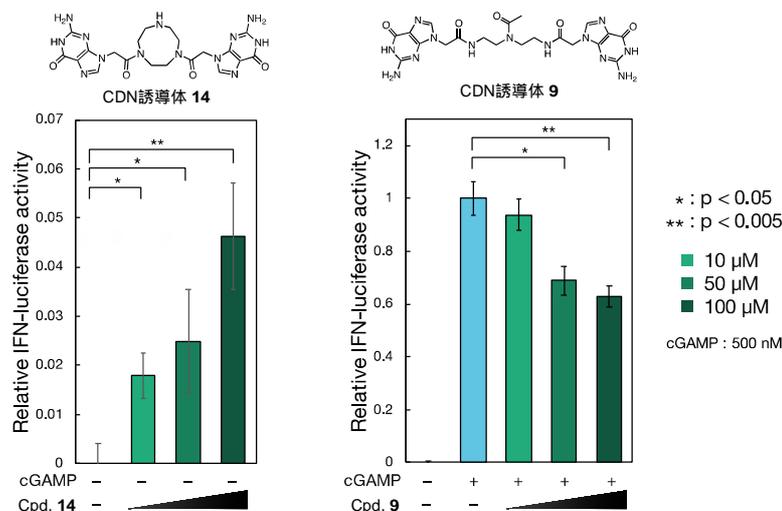


図 4. アミン分子を母骨格とした CDN 誘導体の STING に対する刺激・抑制活性評価

また、アゴニストである cGAMP と共添加した際に濃度依存的な活性の低下が見られたことから鎖状化合物 **9** がアンタゴニスト活性を有することが示された。環状化合物 **14** や鎖状化合物 **9** をリン酸加水分解酵素である Nuclease P1 で処理した反応物を HPLC で分析した結果、これらの分子はリン酸加水分解酵素に対して安定であることが確認された (図 5)。

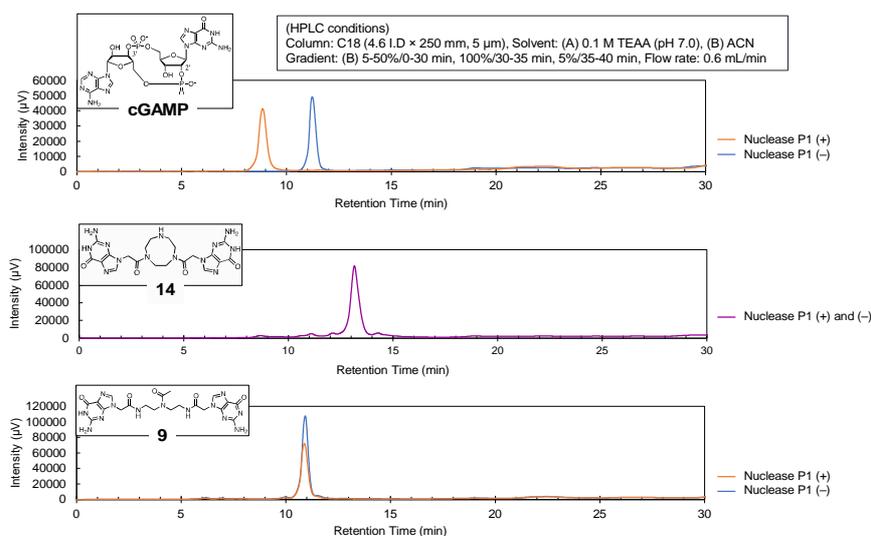


図 5. CDN 誘導体のリン酸加水分解酵素に対する安定性試験

(4) まとめ

本研究では CDN 誘導体の医薬品としての利用を指向し、アミン構造をベースとした誘導体の設計、合成経路の確立および機能評価を行った。活性は従来の CDN 分子と比較して弱いものの、骨格置換した分子においても元の分子と同様の作用を示すことが分かった。今後は活性の向上や膜透過性の付与などを念頭とした構造展開を実施していく。

引用文献

- 1) R. Libanova et al., Cyclic di-nucleotides: new era for small molecules adjuvants. *Microb. Biotechnol.*, **5**, 168–176 (2012).
- 2) C. O. Temeng et al., Cyclic dinucleotide (c-di-GMP, c-di-AMP, and cGAMP) signalings have come of age to be inhibited by small molecules. *Chem. Commun.*, **52**, 9327-9342 (2016).
- 3) K. Ikeda, Y. Yanase, K. Hayashi, Y. Hara-Kudo, G. Tsuji, Y. Demizu, Amine skeleton-based c-di-GMP

- derivatives as biofilm formation inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **32**, 127713 (2021).
- 4) Y. Yanase, K. G. Tsuji, M. Nakamura, N. Shibata, Y. Demizu, Control of STING Agonistic/Antagonistic Activity Using Amine-Skeleton-Based c-di-GMP Analogues. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 6847 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda Kentaro, Shoda Takuji, Demizu Yosuke, Tsuji Genichiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Discovery of non-proteinogenic amino acids inhibiting biofilm formation by <i>S. aureus</i> and methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128259 ~ 128259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2021.128259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Kentaro, Yanase Yuta, Hayashi Katsuhiko, Hara-Kudo Yukiko, Tsuji Genichiro, Demizu Yosuke	4. 巻 32
2. 論文標題 Amine skeleton-based c-di-GMP derivatives as biofilm formation inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127713 ~ 127713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2020.127713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanase Yuta, Tsuji Genichiro, Nakamura Miki, Shibata Norihito, Demizu Yosuke	4. 巻 23
2. 論文標題 Control of STING Agonistic/Antagonistic Activity Using Amine-Skeleton-Based c-di-GMP Analogues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6847 ~ 6847
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23126847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻 巖一郎、柳瀬 雄太、柴田 識人、出水 庸介
2. 発表標題 In silicoスクリーニングによるSTINGリガンドの効率的探索と機能評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田健太郎, 柳瀬雄太, 辻 巖一郎, 林克彦, 工藤由起子, 出水庸介
2. 発表標題 c-di-GMP誘導体の合成とバイオフィーム形成阻害評価
3. 学会等名 第34回日本バイオフィーム学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳瀬 雄太, 池田 健太, 辻 巖一郎, 柴田 識人, 内藤 幹彦, 出水 庸介
2. 発表標題 免疫系制御を指向した新規STINGリガンドの効率的探索
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻 巖一郎, 池田 健太郎, 柳瀬 雄太, 林 克彦, 工藤 由起子, 出水 庸介
2. 発表標題 アミン骨格を有するc-di-GMP誘導体の合成とバイオフィーム形成阻害評価
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 健太郎, 柳瀬 雄太, 辻 巖一郎, 林 克彦, 菊池 裕, 工藤 由起子, 出水 庸介
2. 発表標題 アミン骨格を利用した環状ジヌクレオチド誘導体の合成とバイオフィーム形成阻害評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳瀬 雄太、池田 健太郎、辻 巖一郎、柴田 識人、内藤 幹彦、出水 庸介
2. 発表標題 STINGを標的としたCDN誘導体の設計と合成
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田健太郎, 柳瀬雄太, 辻巖一郎, 林克彦, 菊池裕, 工藤由起子, 出水庸介
2. 発表標題 新規環状ジヌクレオチド誘導体の合成とバイオフィーム形成阻害能の評価
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳瀬雄太, 池田健太郎, 辻巖一郎, 林克彦, 菊池裕, 工藤由起子, 出水庸介
2. 発表標題 アミン構造を基盤とした環状ジヌクレオチド等価体の創製
3. 学会等名 第45回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田健太郎, 柳瀬雄太, 辻巖一郎, 林克彦, 菊池裕, 出水庸介
2. 発表標題 アミン骨格を基盤とした環状ジヌクレオチド等価体の合成とバイオフィーム形成阻害能の評価
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------