

## 自己評価報告書

平成 23 年 5 月 6 日現在

機関番号：33903

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20350076

研究課題名(和文) 新感染症治療薬の創製を目指した環状ジグアニル酸の生理活性探索と活性発現機構の解明

研究課題名(英文) Toward development of novel medicines for bacterial infection: Search of biological functions and elucidation of mechanism on occurrence of the functions of *c*-di-GMP and related compounds

研究代表者

早川 芳宏 (HAYAKAWA YOSHIHIRO)

愛知工業大学・工学部・教授

研究者番号：50022702

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸・蛋白質・糖化学、

環状ビス(3'-5')ジグアニル酸

## 1. 研究計画の概要

黄色ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌などのバイオフィルムの形成を調節する機能、宿主の免疫力を増大させる機能、大腸ガン細胞の増殖を阻止する機能などをもつことが我々によって最近明らかにされ、さらに、これらの機能以外にも多くの重要な生物機能をもつ事が他の研究者らによって示唆されている環状ビス(3'-5')ジグアニル酸(*c*-di-GMP)の未知機能の発見および機能発現機構の解明を行い、その結果を基に医薬品として実用可能な*c*-di-GMP人工修飾体の創製を目指す

## 2. 研究の進捗状況

研究代表者の最終目的は、医薬品として実用可能な*c*-di-GMP人工修飾体の創製であるが、本申請研究が目指すものは、最終目的の基礎となる*c*-di-GMPの未知なる生理活性の探索と活性発現機構の解明である。この2点のうち、*c*-di-GMPの未知なる生理活性探索研究は予想以上に成功裡に進んでおり、これまでに*c*-di-GMP類は、生理活性・生物機能、内容によって大別すると(1)細菌のバイオフィルム形成阻害作用、(2)免疫活性化機能、(3)抗がん作用をもつことを、国内外の複数の共同研究によって発見した。このうち、本助成研究の主たる目的である(1)と(2)に関する研究において、助成期間内に得た主な成果を以下に示す、( [ ]内は共同研究機関)。

細菌のバイオフィルム形成阻害作用関連：(1)*c*-di-GMPは、黄色ブドウ球菌に対して細胞外部から働くと同菌のバイオフィルム形成を強く阻害し、同菌のHeLa細胞への感染力を減少させる[メリーランド大学

(米)、シエルブルーク大学(加)]; (2)*c*-di-GMPはマウス乳腺炎における黄色ブドウ球菌の感染力を著しく弱める[同上]; (3)*c*-GpsGps、*c*-dGpGpなどいくつかの*c*-di-GMP人工修飾体は、黄色ブドウ球菌や緑膿菌において、バイオフィルム形成を*c*-di-GMPよりも強く阻害する[名古屋大学]; (4)*c*-di-GMPは緑膿菌においてアルギン酸合成酵素Alg44と結合し、バイオフィルムの一成分であるアルギン酸の合成を誘導する[ハーバード大学(米)]; (5)*c*-di-GMPは*Shewanella oneidensis*菌において、バイオフィルム形成及び分解を制御するシグナル分子として働く[スタンフォード大学(米)]; (6)2'-*O*-TBDMMS-*c*-di-GMPは*Anaplasma phagocytophilum*のバイオフィルム形成を阻害し、感染力を低下させる[オハイオ州立大学(米)]。

免疫活性化機能関連：(7)*c*-di-GMPは宿主(マウス)の免疫機能を活性化させる[メリーランド大学、サカチェワン大学(加)]; (8)*c*-di-GMPは抗原とともにマウスに投与すると、マウスの免疫力を活性化させ、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染に対する抵抗力を増強させる[Intragenics Research Institute(米)]; (9)*c*-di-GMPは、マウスにおいて、C1fA抗原とともに投与するとアジュバントとして働き、免疫抗体(とくに細胞性免疫に係る抗体)の産生を活性化する[同上]; (10)*c*-di-GMPは免疫に携わるT細胞の産生を活性化する[メリーランド大学]; (11)*c*-di-GMPは、骨髄由来のマクロファージに取り込まれてType1インターフェロン(INF $\beta$ )を産生し、免疫を誘導する[カ

リフォルニア大学バークレー校 (米)]。

これら以外にも、最近、*c*-di-GMP はインフルエンザウイルスなど、ある種のウイルス感染阻害剤としても働く事を、予備的実験ではあるが見出している。このことはまったくの想定外のこと、もしもこの発見が正しければ、ウイルス感染は細菌感染よりもシビアな者が多いため、本研究は更なる大きな研究に発展する可能性が高い。

一方、*c*-di-GMP の機能発現機構解明研究は、その鍵物質と成るピオチン化 *c*-di-GMP の合成が難航、未だ標的化合物の合成を達成していないため、予定通り進行していない。

### 3. 現在までの達成度

進捗状況で述べたように、本研究が掲げる二つの主たる目的のうち、*c*-di-GMP の生理活性探索に関しては現在までに想定以上の成果を上げる事ができ、達成度は 100% と言える。他方、*c*-di-GMP の機能発現機構解明に関しては、達成度は低く、30% 程度である (研究の鍵と成るピオチン化 *c*-di-GMP の合成に関しては達成度 60% 程度)。したがって、本研究の現在までの総合的達成度は 70-80% と考えている。

### 4. 今後の研究の推進方策

現在までの進捗状況が思わしくない *c*-di-GMP の機能発現機構解明研究は、その鍵物質と成るピオチン化 *c*-di-GMP の合成が達成されない限り実行できないので、今後は、持てる力を最大限この合成に注入し、研究期間内 (本研究は平成 23 年度で終了) に完成させたい。一方、*c*-di-GMP 類の生理活性研究においては、これまで得た活性のほとんどは *in vitro* 実験の結果なので、それを *in vivo* 実験で確認する必要があるが、そのためには大量の *c*-di-GMP 類の入手が必要である。したがって、*c*-di-GMP 類の大量合成も行う

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

細菌のバイオフィーム形成阻害作用関連

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) T.-H. Lai, Y. Kumagai, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and Y. Rikihisa, Anaplasma phagocytophilum PleC and PleD Diguanylate Cyclase Two-Component System and Role of Cyclic Di-DMP in Host-Cell Infection. J. Bacteriology, 191, 693-700 (2009). (査読有)
- (2) Y. Ishihara, M. Hyodo, Y. Hayakawa, T. Kamegaya, K. Yamada, A. Okamoto, T. Hasegawa, and M. Ohta, Effect of Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid and Its Analogs on Bacterial Biofilm Formation. FEMS Microbiology Lett, 301, 193-200 (2009). (査読有)

- (3) Y. Kumagai, J. Matsuo, Y. Hayakawa, and Y. Rikihisa, Cyclic di-GMP Signaling Regulates Invasion of Ehrlichia chaffeensis into Human Monocytes. J. Bacteriology, 192, 4122-4133 (2010). (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

免疫活性化機能関連

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) D.-L. Hu, K. Narita, M. Hyodo, Y. Hayakawa, A. Nakane, and D. K. R. Karaolis, *c*-di-GMP as a Vaccine Adjuvant Enhances Protection Against Systemic Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Infection Vaccine. Vaccine, 27, 4867-4873 (2009). (査読有)
- (2) S. M. McWhirter, R. Barbalat, K. M. Monroe, M. F. Fontana, M. Hyodo, K. J. Ishii, S. Akira, M. Colonna, Z. J. Chen, K. A. Fitzgerald, Y. Hayakawa, and R. E. Vance, A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP, J. Exp. Med., 206, 1899-1911 (2009). (査読有)
- (3) John-Demian Sauer, Katia Sotelo-Troha, Jakob von Moltke, Kathryn M. Monroe, Chris S. Rae, Sky W. Brubaker, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, Joshua J. Woodward, Daniel A. Portnoy, and Russell E. Vance, The N-Ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket (Gt) Mouse Mutant Reveals an Essential Function of Sting (Tmem173, Mita, Mpys, Eris) in the *in vivo* Interferon Response to *Listeria monocytogenes* and Cyclic-di-nucleotides. Infection and Immunity, in press. (査読有)

総合的なもの

[雑誌論文] (計 1 件)

[図書] (計 1 件)

- (1) M. Hyodo and Y. Hayakawa, Synthesis, Chemical Properties and Biological Activities of Cyclic Bis(3'-5')diguanylic Acid (*c*-di-GMP) and Its Analogues. In "Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine", P. Herdewijn, Ed., pp 343-363, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]