

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31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

研究成果の概要（和文）:

環状ジグアニル酸（*c*-di-GMP）および人工修飾体の 生理活性探索と 生理活性発現機構の解明研究を行い、 については、*c*-di-GMP 類は、肺炎双球菌、Ehrlichia chaffeensis 菌、Anaplasma phagocytophilum 菌、Borrelia burgdorferi 菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）などの感染力を、主に免疫活性化作用によって低下させることを発見、 については、*c*-di-GMP 類が示すいくつかの生理活性の中でも最も重要な免疫活性化の機能発現機構解明の鍵となる、「免疫は、*c*-di-GMP が哺乳動物に存在する免疫タンパク”stimulator of interferon genes (STING)”と結合する事によって発現される」という証拠を発見した。

研究成果の概要（英文）:

We have carried out this work aiming to find biological functions of cyclic bis(3'-5')diguanylic acid (*c*-di-GMP) and related compounds and to elucidate the mechanism on occurrence of the functions. As the result, the work has disclosed that *c*-di-GMP and some of its derivatives bear bioactivities, which include reduction of infection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by acting as an immunomodulator and vaccine adjuvant. Further, the work has revealed that *c*-di-GMP binds to stimulator of interferon genes (STING), existing in mammals, to induce immunity; this discovery will be a keystone for elucidation of mechanism on occurrence of functions of *c*-di GMP and related compounds.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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、バイオフィルム、免疫、薬剤耐性菌、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

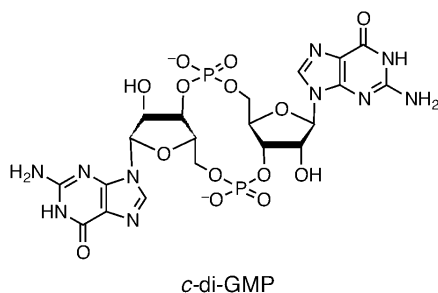
研究開始当時、*c*-di-GMP およびその人工修飾体（以下、*c*-di-GMP 類）は黄色ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌などのバイオフィルムの形成を調節する機能、宿主の免疫力を増大させる機能、大腸ガン細胞の増殖を阻止する機能などをもつことが我々によってすでに明らかにされていたが、これらの機能以外にも多くの重要な生物機能をもつ事が予想され、それらの発見が待たれていた。また、薬理的に有用な機能をもつが故に、*c*-di-GMP をリード化合物とする創薬の期待が高まりつつあり、そのためには *c*-di-GMP 類の生理活性機能発現機構を分子レベルで知る事が不可欠であった。

2. 研究の目的

本研究では、研究全体の最終目的である「*c*-di-GMP をリード化合物とする医薬品の創製」を達成するための基礎と成る二つの課題、すなわち、*c*-di-GMP 類の未知の生理活性の発見と 生理活性発現機構の解明を主たる目的とした。

3. 研究の方法

主たる二つの研究目的のうち *c*-di-GMP 類（*c*-di-GMP の構造は下記）の未知の生理活性の発見に関しては、これまで調査した事がない肺炎双球菌、Ehrlichia 菌、Anaplasma 菌、Berrelia 菌、現在院内感染すると最もシリアスな問題を引き起こすメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）などを対象に、また、*c*-di-GMP 類の生理活性・生物機能発現機構の解明に関しては、本目的達成に不可欠な、*c*-di-GMP が結合するタンパク質の発見、特定、とくに、*c*-di-GMP がもつ生理活性の中でも最も注目を浴びている“免疫誘起・活性化”に関わるレセプタータンパクの特定・発見を、研究組織内および複数の海外共同研究者と共同で行った。具体的には、核酸化学合成を専門とする研究代表者が *c*-di-GMP およびその人工修飾体を合成し、それを用いて、分子生物学・医学・細菌学を専門とする研究分担者および海外共同研究者が上記目的 および の研究を行った。



4. 研究成果

(1) 実施した研究の目的の一つである *c*-di-GMP および人工修飾体の生理活性探索においては、以下のような事を発見した（主なもののみ。[]内は研究組織以外の共同研究機関）。

c-di-GMP は、肺炎球菌感染に対して有効な免疫賦活剤として働き、同感染を弱めることを明らかにした [Intragenics Research Institute (米)]

c-di-GMP の二つのリン酸基をチオリン酸基に置き換えたもの、グアノシンの一つをデオキシグアノシンに置き換えたもの、二つのグアノシンをイノシンに置き換えたものなどいくつかの人工修飾体は、黄色ブドウ球菌や腸炎ピブリオ、緑膿菌において、*c*-di-GMP そのものよりもバイオフィルム形成を強く阻害することを見出した。

c-di-GMP の 2'-水酸基に *tert*-ブチルジメチルシリル基を導入した人工修飾体、2'-*O*-TBDMS-*c*-di-GMP は、Anaplasma phagocytophilum 菌のヒト細胞 HL-60 へのヒト顆粒球アナプラズマ感染を阻害する事を明らかにした [オハイオ州立大学 (米)]

c-di-GMP 類は *c*-di-GMP のアンタゴニストとして働き、Ehrlichia chaffeensis 菌の生体への侵入に関与するタンパク質の機能を阻害すること、その結果同菌のヒト白血球への侵入を抑制し、同菌の感染を弱めることを突き止めた [オハイオ州立大学 (米)]

2'-*O*-TBDMS-*c*-di-GMP は Ehrlichia chaffeensis 菌の凝集、吸着性、および成長を抑制する事を明らかにした [オハイオ州立大学 (米)]

MRSA 感染において、予め *c*-di-GMP と抗原 (mSEC あるいは CifA) で処理したマウスは、同処理をしていないマウス（に比べて感染 1 週間後の生存率ははるかに高い（処理マウスの生存率 87.5%；無処理マウスの生存率 33.3%）ことを実証した。また、この結果は、*c*-di-GMP が免疫賦活剤として働いた結果である事が分かった。その証拠として、*c*-di-GMP は、免疫グロブリン抗体、とくに IgG1 抗体の産生、およびインターフェロン IFN の産生を促進することを同時に見出した [Intragenics Research Institute (米)]

上記の結果のうち は最も重要な結果と捉えている。なぜならば、この結果は、*c*-di-GMP が予防薬（ワクチン）として使用できる可能性を示唆しており、*c*-di-GMP のワクチンとしての可能性を示した初めての例であるからである。

(2) 実施研究のもう一つの目的である *c*-di-GMP 類が関与する生理活性の同発現機構解明においては、以下のような事を発見し

た(主なもののみ。[]内は研究組織以外の共同研究機関)

c-di-GMPの免疫活性化機能を評価するため行った実験から、*c*-di-GMPは細胞質内で、TBK1、IRF3、NFκB、MAPキナーゼなどの誘導に伴いながら、これまで知られていない伝達経路を經由して免疫を活性化している事を明らかにした[カリフォルニア大学パークレー校(米)]

N末端側にセンサードメイン、C末端側に diguanylate cyclase (DGC) をもつタンパク質を有する嫌気性菌 *Desulfotalea psychrophila* において、センサードメインのヘムタンパク質に酸素が結合している場合のみ DGC が活性を示し、*c*-di-GMP 生合成が行われること、また、このタンパク質の活性中心はチロシン 55 とグルタミン 81 である事を突き止めた。この発見は二成分制御系による細菌環境への応答を示す興味深い発見である[岡崎自然科学研究機構]

Borrelia burgdorferi (ライム病ボレリア菌) 中において、以前われわれが発見した *c*-di-GMP と結合するタンパク質 PilZ と同一性の高い配列を有するタンパク質 PilA が、PilZ 同様 *c*-di-GMP と結合することを発見した。また、このタンパク質を失活させると細菌の移動度、感染力が減少し、菌の生存数も減少する事を明らかにした。この発見は、*Borrelia burgdorferi* 菌のライフサイクルにおいて、*c*-di-GMP が PilA や PilZ タンパク質に結合する事が重要、不可欠である事を示す。したがって、*c*-di-GMP よりも強くこれらのタンパク質と結合する誘導体を創製し、投与すれば、*c*-di-GMP とこれらのタンパク質との結合を阻害し、同菌の感染を防ぐことができるかと期待される有意義な発見である[イーストカロライナ大学(米)]

c-di-GMPは哺乳動物に存在するタンパク質 STING (stimulator of IFN genes) と結合し、同タンパク質の機能発現スイッチをオンにして免疫機能尾を発現させることを以下の様にして明らかにした。すなわち、まず、何もしないマウスは *c*-di-GMP を投与すると免疫が活性化されるのに対し、*N*-エチル-*N*-ニトロソ尿素 (ENU) 処理したマウスは *c*-di-GMP を投与しても免疫が活性化されない事を見出した。この違いは、ENU 処理したマウスでは、同処理によって *c*-di-GMP を受容して免疫を発現するレセプタータンパクが破損されたことに起因するのではないかと推測し、ENU 処理によって損壊したタンパク質を探した所、それが STING であることを突き止めた。これを受け、次に正常な STING を取り出し、STING が実際に *c*-di-GMP を受容するか否か (*c*-di-GMP が STING と結合するか否か) を *in vitro* 実験で確かめた所、STING は *c*-di-GMP を受容する事が分かった。さらに、

c-di-GMP と結合した STING は、免疫機能発現の証拠となるインターフェロンを生産する事も分かった。すなわち、*c*-di-GMP のレセプターは STING であり、*c*-di-GMP は STING に取り込まれると同タンパク質の免疫機能発現スイッチをオンにする事を明らかにした。あわせて、*c*-di-GMP 同様に天然超微量物質で、*c*-di-GMP と類似の構造をもつ環状ジアデニル酸 (*c*-di-AMP) も STING と結合し、STING の免疫活性化機能発現スイッチをオンにし、同機能を誘起させる事も見出した。この発見は *c*-di-GMP のような環状ジヌクレオチドによる免疫発現に関わるレセプタータンパク質が STING であることを世界で初めて特定したもので、*c*-di-GMP がもつ生理活性のなかでも特に重要視されている免疫誘起・活性化の機能発現機構解明の鍵になる極めて重要な発見である。その重要性が故に、この研究成果を表した論文は "Nature" に掲載され、多くの注目を浴びた[カリフォルニア大学パークレー校(米)]

このように、実施研究の大きな目的であった「*c*-di-GMP 類の生理活性発現機構の解明」については、残念ながら達成できたとは言いがたいが、成果において、*c*-di-GMP は STING と結合する事によって STING の免疫機能スイッチをオンにするという発見は本目的達成の鍵ともなるべき発見で、近い将来、本目的が達成される事が大いに期待される。

(3) その他、実施研究の目的とは直接関係はないが、以下のような発見もした。

Anaplasma phagocytophilum 菌の PleD タンパク質が、GTP を原料にして *c*-di-GMP を生合成する酵素である diguanylate cyclase (DGC) の活性を有し、この菌の感染力に大きな影響を与えている事を発見した[オハイオ州立大学(米)]

結論として、本実施研究では、所期の目的の一つである *c*-di-GMP 類の未知の生理活性探索については、満足すべき成果が、もう一つの *c*-di-GMP の生物機能発現機構解についても、今後につながる有意義な経過が得られたと思っている。

研究成果の中での特に有意義なものは、*c*-di-GMP の免疫活性化能に関するいくつかの発見であろう。

免疫は、生物が、外的病原に抵抗するためあるいは外的病原によって不幸にして発病した場合、自力で治癒するために生来持っている力で、細菌性疾患のみならず、ウイルス性疾患やガンなど、ほとんど全ての疾病に有効な天賦の治癒力である。したがって、免疫活性化による免疫療法は、現在、有効な特効薬や治療法が少ないウイルス性疾患やガンの治療に有望あるいは不可欠な方法として大きな注目を浴びており、それに必要な医薬

品、すなわち“免疫賦活剤”開発が強く望まれている。

このような状況下、本実施研究で、c-di-GMPに免疫活性化機能があること、c-di-GMPはSTINGと結合して免疫を誘起することが発見された事は極めて大きな意義をもつ。とくに後者は、c-di-GMPをリード化合物とした医薬品の開発を行う場合、必須となるc-di-GMPが関わる免疫活性化機能の発現機構解明研究において、その鍵となる大きな発見である。今後、c-di-GMPとSTINGとの複合体を何らかの方法(いくつかの具体策有り)で単離し、その詳細な構造解析を行ない、c-di-GMPのどの官能基が、どのような様式でSTINGの機能発現スイッチをオンにするかを特定、ついで、得られた知見を基に、c-di-GMPの各種官能基のうち免疫活性化機能発現に必要な官能基は残し、あるいはそれらをより効果的に機能を発現できる官能基に改善し、一方不必要な官能基・部位は削除した、医薬的に真に有効な人工化合物を設計、創製したい。すなわち、本研究で得られた結果を基に研究をさらに発展させ、最終的にはc-di-GMPに基づく実用可能な免疫賦活剤を開発したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

Dara L. Burdette, Kathryn M. Monroe, Katia Sotelo-Troha, Barbara Eckert, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, and Russell E. Vance, STING is a direct innate immune sensor of cyclic dinucleotides, *Nature*, 査読有, **478**, 2011, 515–518.

Yumi Kumagai, Junji Matsuo, Zhihui Cheng, Yoshihiro Hayakawa, and Yasuko Rikihisa, Cyclic dimeric GMP Signaling Regulates Intracellular Aggregation, Sessility, and Growth of *Ehrlichia chaffeensis*, *Infect. Immun.*, 査読有, **79**, 2011, 3905–3912.

Joshua E. Pitzer, Syed Z. Sultan, Yoshihiro Hayakawa, Gerry Hobbs, Michael R. Miller, and Md A. Motaleb, *Infect. Immun.*, 査読有, **79**, 2011, 1815–1825.

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. *Infect. Immun.*, 査読有, **79**, 1011, 688–694.

Yumi Kumagai, Junji Matsuo, Yoshihiro Hayakawa, and Yasuko Rikihisa, Cyclic di-GMP Signaling Regulates Invasion of *Ehrlichia chaffeensis* into Human Monocytes. *J. Bacteriology*, 査読有, **192**, 2010, 4122–4133.

Hitomi Sawai, Shiro Yoshioka, Takeshi Uchida, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, Koichiro Ishimori, and Shigetoshi Aono, Molecular oxygen regulates the enzymatic activity of a heme-containing diguanylate cyclase (HemDGC) for the synthesis of cyclic di-GMP. *Biochem. Biophys. Acta*, 査読有, **1804**, 2010, 166–172.

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.*, 査読有, **301**, 2009, 193–200.

Sarah M. McWhirter, Roman Barbalat, Kathryn M. Monroe, Mary F. Fontana, Mamoru Hyodo, Nathalie T. Joncker, Ken J. Ishi, Shizuo Akira, Marco Colonna, Zhijian J. Chen, Katherine A. Fitzgerald, Yoshihiro Hayakawa, and Russell E. Vance, A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP, *J. Exp. Med.*, 査読有, **206**, 2009, 1899–1911.

Dong-Liang Hu, Kouji Narita, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, Akio Nakane, and David K. R. Karaolis, c-di-GMP as a Vaccine Adjuvant Enhances Protection Against Systemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infection Vaccine, *Vaccine*, 査読有, **27**, 2009, 4867–4873.

Tzung-Huei Lai, Yumi Kumagai, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, and Yasuko Rikihisa, *Anaplasma phagocytophilum* PleC and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic di-GMP in host-cell infection. *J. Bacteriology*, 査読有, **191**, 2009, 693–700.

A. D. Ogunniyi, J. P. Paton, A. C. Kieby, J. A. McCullers, J. Cook, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and D. K. R. Karaolis, c-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection. *Vaccine*, 査読有, **26**, 2008, 4676–4685.

[学会発表](計5件)

Hiroya Asami, Ayaka Motoda, Masaki Tsukamoto, Yoshihiro Hayakawa, and

Hiroyuki Saigusa, Non-destructive vaporization of GMP facilitated by the phosphoesterification: Conformational preference in the gas phase, The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, Yokohama, 2010, November 11.

Yumi Kumagai, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, and Yasuko Rikihisa, *c*-di-GMP produced by *E. chaffeensis* Regulates Bacterial Internalization into Host Cells and Intracellular Growth, 109th American Society for Microbiology General Meeting, Philadelphia (U.S.A.), 2009, May 17–21.

〔図書〕(計1件)

Mamoru Hyodo and Yoshihiro Hayakawa, Wiley-VCH, Weinheim, "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", Piet Herdewijn, Ed.. 2008, pp 343–363.

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: 核酸固相合成用リンカー及び担体
発明者: 塚本眞幸、鈴木紀尊、早川芳宏、前田恵里、森健二郎、味吞憲二郎
権利者: 名古屋大学、日東電工(株)
種類: 特許
番号: 特願 2012-016895
出願年月日: 24年1月30日
国内外の別: 国内

名称: 核酸固相合成用リンカー及び担体
発明者: 早川芳宏、塚本眞幸、森健二郎、味吞憲二郎、前田恵里、小西達也
権利者: 日東電工株式会社、名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-242445
出願年月日: 21年10月21日
国内外の別: 国内

名称: 核酸固相合成用リンカー及び担体
発明者: 早川芳宏、塚本眞幸、森健二郎、味吞憲二郎、前田恵里、小西達也
権利者: 名古屋大学、日東電工(株)
種類: 特許
番号: 12/908,676
出願年月日: 22年10月20日
国内外の別: 外国

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ait-news.jp/111011/index.html>
<http://aitech.ac.jp/ac/bc.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

塚本 眞幸 (TSUKAMOTO MASAKI)
名古屋大学・大学院情報科学研究科・助教
研究者番号: 10362295
太田 美智男 (OHTA MICHIO)
椛山女学園大学・看護学部・教授
研究者番号: 20111841
山田 景子 (YAMADA KEIKO)
名古屋大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 00402561

(3) 連携研究者

()

研究者番号: