

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22750148

研究課題名（和文） 環状ジアデニル酸の生理活性探索

研究課題名（英文） Synthesis and biological activity of cyclic diadenylic acid and its derivatives

## 研究代表者

塚本 眞幸 (TSUKAMOTO MASAKI)

名古屋大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：10362295

研究成果の概要（和文）：バクテリアの二次情報伝達物質として注目されている環状ジアデニル酸 (*c*-di-AMP) の効率的な化学合成法を確立した。この手法を基盤として生理活性探索を行ったところ、*c*-di-AMP が淡水域に生息する緑藻類の一種であるクラミドモナスの細胞分裂を促進することがわかった。さらに、2'位に種々の置換基を有する *c*-di-AMP 誘導体も同様の生理活性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We established a practical synthesis of cyclic bis(3'-5')diadenylic acid (*c*-di-AMP), which was recently identified as a second messenger monitoring DNA integrity during sporulation in the soil bacterium *Bacillus subtilis*. Using the synthetic *c*-di-AMP obtained by our method, we revealed that *c*-di-AMP promotes the cell division of *Chlamydomonas reinhardtii*, a kind of freshwater green algae. The three 2'-modified *c*-di-AMPs synthesized by our method were also found to enhance the cell division.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：有機合成化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

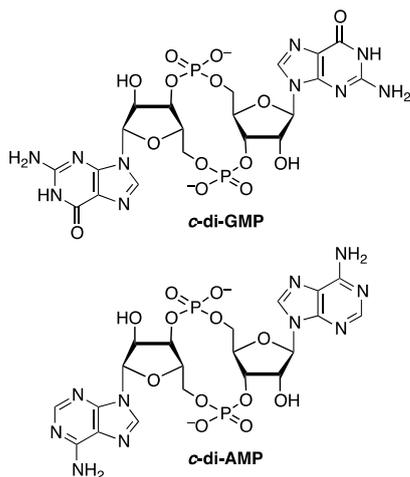
キーワード：天然物有機化学、環状ジアデニル酸

## 1. 研究開始当初の背景

環状ジグアニル酸 (*c*-di-GMP) は、Molt 4 細胞や Jurkat 細胞の分裂抑制機能、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌などのバイオフィルム形成調節機能、宿主の免疫力増強・活性化機能、大腸ガン細胞の増殖阻止機能など多彩な生理活性を持つことが明らかになり、医学、薬学、生物学、化学等の分野で、大きな注目を浴びている。このような状況下、*c*-di-GMP と極めて類似した構造を持つ環状ジアデニル酸 (*c*-di-AMP) が、土壤中に存在する枯草菌 (*Bacillus subtilis*) から、同菌における芽胞

形成中の DNA 統合性を伝達する二次情報伝達物質として、2008年に発見された。

この *c*-di-AMP は、*c*-di-GMP と極めて類似した構造をもつため、*c*-di-GMP 同様多様な生理活性をもつ可能性が高いと期待され、*c*-di-AMP の生理活性探索に高い関心が寄せられている。実際、この化合物は、リステリア菌において、I 型インターフェロンの産生を誘発する。また、免疫機能を活性化するアジュバントとしての活性を有する。このように、*c*-di-AMP は治療薬としての可能性も秘めている。しかし、細胞が生合成する *c*-di-AMP



の量は超微量であるため、天然からの十分量の入手は不可能である。また、本化合物は市販されているが、極めて高価である。そのため、十分量の入手は化学合成に頼らざるを得ないが、研究開始当初、その要求に応え得る合成法は無かった。

これまでに開発された *c*-di-AMP 化学合成法としては、トリエステル法に基づく Dennis らの方法および環状の糖骨格を構築後、塩基部分を導入する Giese らの方法があるがこれらの合成法は目的物を得るまでに多段階を要し、かつ通算収率も必ずしも高くはない。そのため、研究を行うに十分な量の *c*-di-AMP の入手は非常に困難である。また、これらの合成法では、*c*-di-AMP の生理活性探索研究や生理活性発現機能解明研究を広範かつ精密に遂行するに必要な *c*-di-AMP の人工修飾体、例えば、2'位に種々の置換基を有する *c*-di-AMP の人工修飾体の創製は、困難であると思われる。したがって、*c*-di-AMP のみならず種々の人工修飾体を効率良く、大量に供給できる化学合成法の開発は、重要で、かつ強く望まれていた。

## 2. 研究の目的

汎用性の高い *c*-di-AMP およびその誘導体の化学合成法を確立する。目的化合物の合成が完了後、一連の化合物の生理活性探索を実施する。

## 3. 研究の方法

合成は、次の方法に従った (Scheme 1)。市販のホスホロアミダイトを出発原料として、アミダイト法により直鎖二量体を合成し、次いで保護基を適切に除去した後にホスホトリエステル法により分子内環化を施した。最後に、脱保護により、目的化合物を得た。さらに、本法を用いて、2'位に種々の置換基を有する *c*-di-AMP 誘導体も合成した。

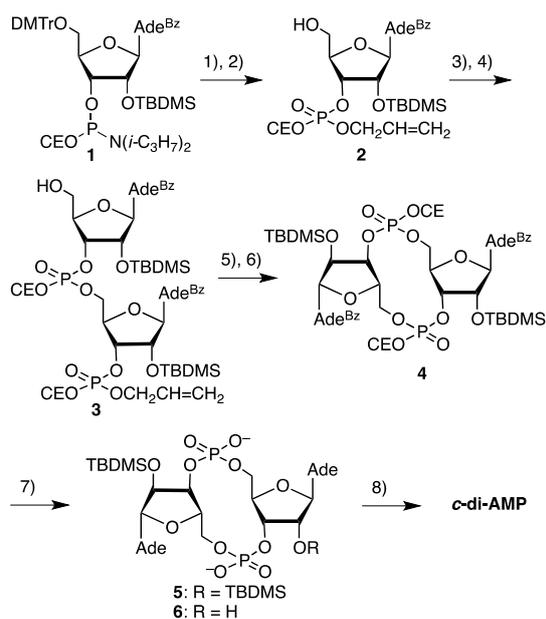
生理活性探索の対象として、淡水域に生息する緑藻類の一種であるクラミドモナスの

細胞分裂を取り上げた。プラスチック容器に、単位体積あたりの細胞数がおよそ  $2.0 \times 10^5$  cells/mL となるように実験系を設定し、光を照射しながら培養液であるトリス-アセテート-ホスフェート溶液とともに、クラミドモナスを3日間培養し、血球計算盤により細胞数を計測した。この細胞数を比較することにより、生理活性の強度を定量化した。

## 4. 研究成果

### (1) 合成法の開発

Scheme 1 に示すとおり、*c*-di-AMP の合成を行った。まず、市販のシアノエチル (CE) アデノシンホスホロアミダイト **1** [ベンゾイル (Bz) 保護基をもつアデニン塩基を Ade<sup>Bz</sup> と記載した] を出発原料に、促進剤として過塩素酸イミダゾリウム (IMP) を用いて、アセトニトリル中でアリルアルコールと縮合した。これにより生成したホスファイトトリエステルを、*tert*-ブチルヒドロペルオキシドで酸化後、ジクロロ酢酸により 5'-ヒドロキシ基の *p,p'*-ジメトキシトリチル (DMTr) 基を除去し、3'-リン酸トリエステル **2** を96%の収率で得た。次に、この縮合、酸化、脱 DMTr 化の3段階からなる反応を、アミダイト **1** と 3'-リ

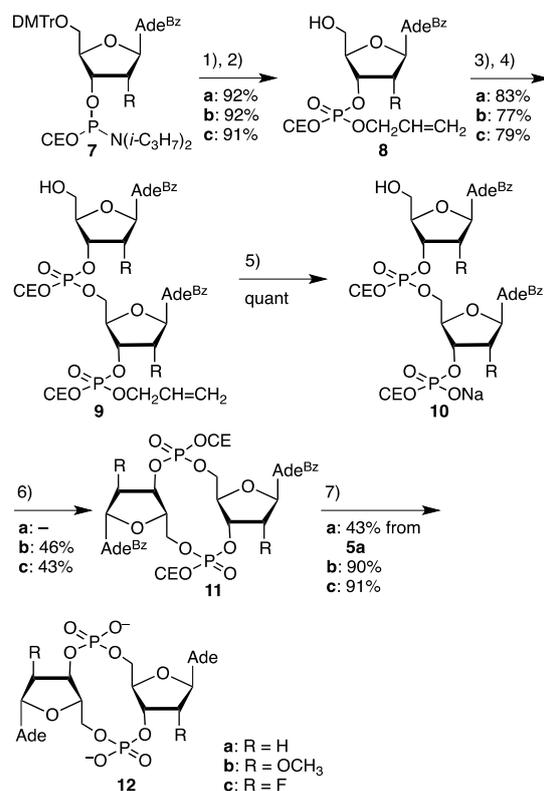


**Scheme 1.** Synthesis of *c*-di-AMP. Reagents and conditions: 1) a) allyl alcohol, imidazolium perchlorate (IMP), molecular sieves 3 Å (MS 3 Å), CH<sub>3</sub>CN, rt, b) *t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OOH/toluene, rt; 2) CHCl<sub>2</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; 3) a) **1**, IMP, MS 3 Å, CH<sub>3</sub>CN, rt, b) *t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OOH/toluene, rt; 4) CHCl<sub>2</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; 5) NaI, acetone, reflux; 6) 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride, *N*-methylimidazole, 28 °C; 7) conc. aq. NH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (1:1 v/v), 50 °C; 8) (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N•3HF, rt.

ン酸トリエステル **2** に適用することにより、収率 82% で直鎖二量体 **3** を合成した。

このようにして得られた **3** の 3' 末端のリン酸トリエステル部のアリル基を、ヨウ化ナトリウムで除去してリン酸ジエステルへと変換した。引き続き、塩化 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルを用いて 5' 末端のヒドロキシ基と 3' 末端のリン酸ジエステル部を分子内で縮合させたところ、2 段階 57% の収率で環化生成物 **4** を得た。

脱保護は、二段階で実施した。まず、**4** をアンモニア処理し、リン酸部のシアノエチル基とアデニン保護基のベンズイル基を除去した。この過程で、*tert*-ブチルジメチルシリル (TBDMS) 基が一部除去された化合物 **6** が 4% 生成した。最後にトリエチルアミン/フッ酸を作用させ、TBDMS 基を除去し、通算収率 40% で *c*-di-AMP を得ることができた。合成した *c*-di-AMP を、ESI タンデム型質量分析に供すると、標準試料と同じ解裂様式を示すことも確認した。

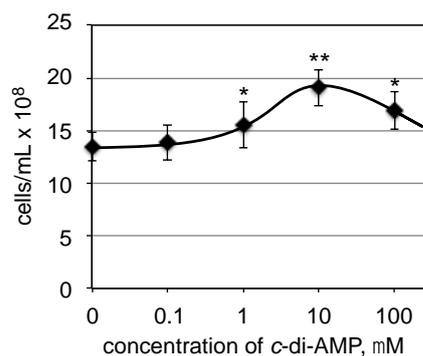


**Scheme 2.** Synthesis of 2'-modified *c*-di-AMPs. Reagents and conditions: 1) a) allyl alcohol, imidazolium perchlorate (IMP), molecular sieves 3 Å (MS 3 Å), CH<sub>3</sub>CN, rt, b) *t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OOH/toluene, rt; 2) CHCl<sub>2</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; 3) a) **7**, IMP, MS 3 Å, CH<sub>3</sub>CN, rt, b) *t*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OOH/toluene, rt; 4) CHCl<sub>2</sub>COOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; 5) NaI, acetone, reflux; 6) 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride, *N*-methylimidazole, 28 °C; 7) conc. aq. NH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (1:1 v/v), 50 °C.

同様に、2'位に種々の置換基を有する *c*-di-AMP 誘導体 **12** を、対応するアミダイト **7** から通算収率 28–32% で合成した (Scheme 2)。これら誘導体の合成の特徴として、1) **9** のアリル基を除去すると、ナトリウム塩 **10** がほぼ定量的に生成し、単離できる、2) Scheme 1 の天然体の合成と比較すると、各反応の収率がやや低くなる、などが挙げられる。しかし、生理活性試験を遂行する上では、大きな問題は見られなかった。

## (2) 生理活性探索

クラミドモナスを、光を照射しながら種々の濃度の *c*-di-AMP を含む標準的な条件下で培養したところ、Figure 1 に示すように培養後の細胞数が *c*-di-AMP の濃度 10 μM のときに最大となった。0 μM (コントロール) の条件と比較すると、42% の増殖促進効果が見られた。同一条件下、5'-AMP (5'-アデニル酸) および cAMP (環状アデノシン-リン酸) の促進効果は、それぞれわずか 14% および 17% であった。次に、2'位が水素、メトキシ、フッ素で置換された *c*-di-AMP 誘導体 **12** を、先に確立した培養条件で生理活性を調査した。その結果、メトキシ体 **12b** (45% の増加) > *c*-di-AMP (41%) > デオキシ体 **12a** (28%) > フルオロ体 **12c** (26%) の順に、増殖が促進された。いずれの誘導体も細胞増殖を促進することが明らかとなった。HPLC 分析における保持時間から、脂溶性 (細胞膜透過性) は **12b** が *c*-di-AMP よりも高いが、生理活性はほぼ同等である。したがって、増殖促進効果には、脂溶性だけではなく、ホスホジエステラーゼとの反応性、受容体との親和性なども影響を与えているものと推測される。



**Figure 1.** Dose response of *c*-di-AMP to the cell division of *Chlamydomonas reinhardtii*. *C. reinhardtii* cells were cultured in the presence of 0, 0.1, 1, 10 or 100 μM *c*-di-AMP for 3 days under a light condition of 17 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at 27 °C. Vertical bars represent the means ± S.E. (n = 40).

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4件)

- ① “Synthesis of 2'-Modified Cyclic Bis(3'-5')diadenylic Acids (*c*-di-AMPs) and Their Promotion of Cell Division in a Freshwater Green Alga” T. Tezuka, N. Suzuki, K. Ishida, K.-i. Oyama, S. Aoki, and M. Tsukamoto, *Chem. Lett.*, **41**, 1723–1725 (2012). 査読有
- ② “Controlling Glycosyl Bond Conformation of Guanine Nucleosides: Stabilization of the anti Conformer in 5'-*O*-Ethylguanosine” H. Asami, S.-h. Urashima, M. Tsukamoto, A. Motoda, Y. Hayakawa, and H. Saigusa, *J. Phys. Chem. Lett.*, **3**, 571–575 (2012). 査読有
- ③ Practical Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')diadenylic Acid (*c*-di-AMP). N. Suzuki, K.-i. Oyama, and M. Tsukamoto, *Chem. Lett.*, **40**, 1113–1114 (2011). 査読有
- ④ Gas-Phase Isolation of Diethyl Guanosine 5'-Monophosphate and Its Conformational Assignment. H. Asami, M. Tsukamoto, Y. Hayakawa, and H. Saigusa, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 13918–13921 (2010). 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 「2'-位を修飾した環状ジアデニル酸の合成およびそれらの生物活性」手塚修文、鈴木紀尊、石田啓悟、尾山公一、青木撰之、塚本眞幸、日本化学会第93春季年会、草津、3月22日(2013年)。
- ② “Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')diadenylic Acid (*c*-di-AMP) and Its 2'-Modified Analogs” N. Suzuki, K.-i. Oyama, and M. Tsukamoto, Asian Core Program 2012, Singapore, Dec. 12, 2012.
- ③ “Synthesis of 2'-Modified Cyclic Bis(3'-5')diadenylic Acids (*c*-di-AMPs)” H. Shirouzu, N. Suzuki, K.-i. Oyama, and M. Tsukamoto, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Nagoya, Nov. 16, 2012.
- ④ 「環状ジアデニル酸の効率的合成法の開発」鈴木紀尊、尾山公一、塚本眞幸、日本化学会第92春季年会、横浜、3月25日(2012年)。
- ⑤ “Facile Synthesis of Cyclic Bis(3'-5')diadenylic Acid (*c*-di-AMP)” N. Suzuki, K.-i. Oyama, and M. Tsukamoto, Nagoya University Global COE International Symposium on Elucidation and Design of Materials and Molecular Functions & Yoshimasa Hirata Memorial Lectures,

Nagoya, Nov. 29, 2011.

- ⑥ 「核酸塩基関連分子のレーザー脱離パフォーマンスの改善：サンプルとマトリクス粒子のサイズ調整」塚島史朗、浅見祐也、元田彩香、塚本眞幸、早川芳宏、三枝洋之、第5回分子科学討論会2011、札幌、9月21日(2011年)。
- ⑦ “Non-destructive vaporization of GMP facilitated by the phosphoesterification: Conformational preference in the gas phase” H. Asami, A. Motoda, M. Tsukamoto, Y. Hayakawa, and H. Saigusa, The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, Nagoya, Nov. 11, 2010.
- ⑧ 「グアニンヌクレオチドのリン酸基エステル化による非破壊的気化と赤外振動分光」浅見祐也、元田彩香、塚本眞幸、早川芳宏、三枝洋之、第4回分子科学討論会2010、大阪、9月16日(2010年)。
- ⑨ “Intact laser desorption of guanosine 5'-monophosphate facilitated by the phosphoesterification - Conformational analysis by infrared vibrational spectroscopy” H. Asami, A. Motoda, M. Tsukamoto, Y. Hayakawa, and H. Saigusa, Molecular and Ionic Clusters Conference 2010, Niigata, Sep. 8, 2010.

[産業財産権]

○ 出願状況 (計2件)

- ①名称：核酸固相合成用リンカー及び担体  
発明者：塚本眞幸、早川芳宏ら  
権利者：名古屋大学、日東電工(株)  
種類：特許  
番号：特願2012-016895  
出願日：2012年1月30日  
国内外の別：国内
- ②名称：Linker and Support for Solid Phase Synthesis of Nucleic Acid  
発明者：Y. Hayakawa, M. Tsukamoto, et al.  
権利者：名古屋大学、日東電工(株)  
種類：特許  
番号：12/908,676  
出願日：2010年10月20日  
国内外の別：外国

6. 研究組織

- (1)研究代表者  
塚本 眞幸 (TSUKAMOTO MASAKI)  
名古屋大学・情報科学研究科・助教  
研究者番号：10362295
- (2)研究分担者 なし  
( )  
研究者番号：
- (3)連携研究者 なし  
( )  
研究者番号：