

講演番号：3D7a15

講演日時：3月26日 11:54～ 1号館 D7 会場

Cyclic GMP-AMP 量産化技術の確立

Practical enzymatic production of cyclic GMP-AMP

○吉田 晃、石毛 和也（ヤマサ醤油・医薬化成品）

○Ko Yoshida, Kazuya Ishige (Yamasa Corp. Biochemicals div.)

【目的】環状ジヌクレオチドなどの STING リガンドは、樹状細胞などの抗原提示細胞に強く発現するアダプタータンパク質 STING に作用して自然免疫を強く惹起し、TLR リガンドである従来の核酸アジュバントと異なる新たなサブセットの核酸アジュバントとして注目されている。なかでも、GMP と AMP のヘテロ環状二量体である cyclic GMP-AMP (以下 cGAMP) は、がん免疫アジュバントとしての高い潜在能力が明らかとなり、次世代アジュバント候補として期待を集めている。しかしながら、cGAMP の実用的な合成法は開発されておらず、研究用試薬として著しく限定された量しか入手できないのが実情である。そこで、本研究では、cGAMP のワクチンアジュバントとしての開発に向けて、その量産化技術の確立を図った。

【方法と結果】報告者らは、代表的な cGAMP 合成酵素であるコレラ菌 *Vibrio cholerae* 由来 DncV を取得し、当該酵素を用いて ATP/GTP からの cGAMP 合成特性を調べた。この結果、本酵素の cGAMP 合成活性は著しく低く、その効率的な合成には大幅な活性向上が必要であることが判明した。また、一般的に cGAMP 合成酵素は、副反応として他種の環状ジヌクレオチドである cyclic di-GMP や cyclic di-AMP を生成させることが知られていたが、DncV を用いた場合においても、cyclic di-GMP/-AMP が著量副生することが確認された。これらの他種環状ジヌクレオチドは、その物理化学的特性が cGAMP と酷似していることに起因して cGAMP との分離が難しく、これらが著量副生した場合、アジュバントとして求められる高純度な製品の取得が困難であることが判明した。従って、これらの他種環状ジヌクレオチドの合成段階での副生抑制が、cGAMP 量産化技術確立に向けた大きな課題であることが明らかとなった。そこで、報告者らは、まず、当該酵素へのランダム変異導入により cGAMP 合成活性が向上した変異酵素を網羅的に取得し、これらの変異を組み合わせることにより、当該酵素の活性を飛躍的に高めることに成功した。また、同様に、cyclic di-GMP/-AMP の副生が抑制された変異酵素を取得し、変異点の組み合わせを最適化することで、その副生を顕著に低減させることに成功した。さらに、当該機能改変 DncV に、AMP からの ATP 供給系、および、GMP からの GTP 供給系を共役させ、それらの活性バランスを最適化することで、cGAMP 合成反応の効率をさらに高めることに成功した。このようにして構築した cGAMP 酵素合成系に、結晶化による精製方法を組み合わせることにより、高純度な cGAMP の量産が可能となった。

cyclic GMP-AMP, vaccine adjuvant, STING ligand

発表責任者：石毛和也 (ishige-k@yamasa.com)