



Title	細菌特有糖に着目したリポ多糖部分構造の化学合成と機能評価
Author(s)	松田, 彩那
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101923
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (松田 彩那)

論文題名 細菌特有糖に着目したリポ多糖部分構造の化学合成と機能評価

論文内容の要旨

グラム陰性菌の外膜構成成分リポ多糖 (LPS) は代表的な自然免疫活性因子であり、抗原となる多糖がKdoやHepといった細菌特有糖を含むコアオリゴ糖を介して活性中心のリピドAに結合した構造となっている。近年、この細菌特有糖KdoやHepの自然免疫制御への関与が示唆されている。

①ヒトインテグリン-1 (hIntL-1) と細菌特有糖との相互作用解析

hIntL-1は自然免疫への関与が示唆されているタンパク質である。先行研究により^{1,2)}、hIntL-1の認識モチーフは末端1,2ジオール構造であり、末端1,2ジオール構造を有するKdoやHepがhIntL-1と相互作用することからLPSがhIntL-1のリガンドとして示唆されている。本研究では、LPSの部分構造であるKdoやHepの多糖構造とhIntL-1との相互作用について精査した。まずは、KdoとHepの単糖、二糖構造のビオチン標識体を合成した (Figure 1)。また、末端1,2ジオール構造の有無によるhIntL-1との親和性の変化を解析するためマンノースの単糖および二糖構造についても標識体を合成した。

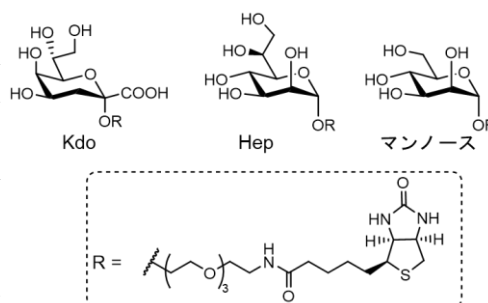
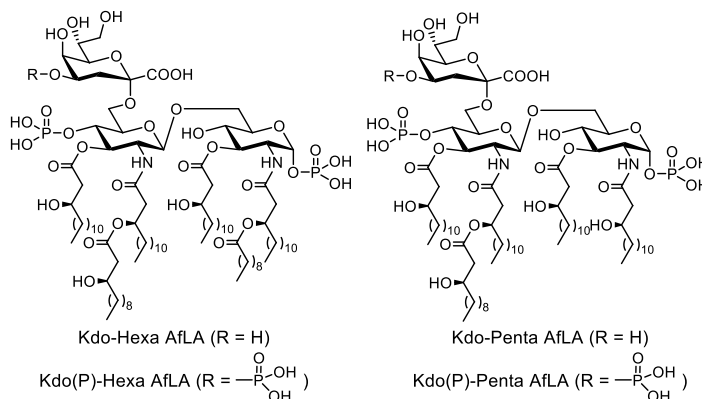


Figure 1. 標的化合物 (ビオチン標識体)

合成した標識化合物とhIntL-1との相互作用を表面プラズモン共鳴法によって解析したところ、Kdo単糖、Hep単糖、二糖はそれぞれhIntL-1との相互作用が確認された。また、マンノース単糖はHep単糖と比べhIntL-1との親和性が低下した。一方で、マンノース二糖はHep二糖と比べ、hIntL-1との親和性が同等であることが示された。これらの結果から、hIntL-1の糖質認識モチーフは、末端1,2ジオール構造だけでなく、オリゴマンノシド骨格を含むことが初めて明らかとなった。

②腸管バイエル板共生菌 *Alcaligenes faecalis* Kdo-lipid Aの合成

これまで、Kdoの付加によりリピドAの活性が変化するという事例が報告されている。例えば、*Escherichia coli* リピドAは免疫刺激活性を有するが、Kdoが付加したものは活性が約10倍増強される³⁾。一方で、*Helicobacter pylori* リピドAの一種についてはKdoの付加により、アゴニストからアンタゴニストへと変換することが報告されている⁴⁾。当研究室で研究が進められてきた腸管リンパ組織共生菌*A. faecalis*由来のアシル鎖の数が異なるリピドA群についても、Kdoの付加により活性の変化がみられることが示唆されていた。また、*A. faecalis*由来のKdoはリン酸基修飾を受けているが、リ

Figure 2. 標的化合物 (*A. faecalis* リピドA)

ン酸化Kdoを含むリピドAの報告例はなく、リン酸化KdoがリピドAに与える影響は不明瞭であった。そこで、前任者の宇戸によりKdoとリン酸化Kdoが付加したヘキサアシル型*A. faecalis* リピドA (Hexa AfLA) の合成と活性評価がなされた⁵⁾。その結果、Kdo-Hexa AfLA、Kdo(P)-Hexa AfLAはともにHexa AfLAより弱い自然免疫活性化能を示した。

本研究では、ペンタアシル型*A. faecalis* リピドA (Penta AfLA) がKdo、リン酸化Kdoの付加により活性にどのような変化が見られるかを精査するため、Kdo-Penta AfLAおよびKdo(P)-Penta AfLAを合成し、合成化合物を用いて活性を評価した (Figure 2)。その結果、Penta AfLAについては、Kdoの付加は活性に影響しない一方で、リン酸化Kdoの付加により自然免疫活性化作用が増強されることが明らかとなった。

Ref 1) Kiessling, L. L. *et al*, *Nat Struct Mol Biol.*, **2015**, 22, 603. 2) Kiessling, L. L. *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 2386. 3) Kusumoto, S. *et al*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, **2001**, 40, 1475-1480. 4) Fukase, K. *et al*, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 14464. 5) Uto, T. Doctor thesis (Osaka university) 2022.

論文内容の要旨

氏 名 (松田 彩那)

論文題名 細菌特有糖に着目したリポ多糖部分構造の化学合成と機能評価

論文内容の要旨

Lipopolysaccharide (LPS), one of the cell surface components of Gram-negative bacteria, activates innate immunity. In natural LPS structure, the antigenic polysaccharide is bound to terminal glycolipid lipid A via a core oligosaccharide that contains bacterial-specific Kdo and Hep. Lipid A is the active center of innate immune function of LPS, and recently it has been suggested that Kdo and Hep have also been implicated in innate immune regulation.

① Interaction analysis of human intelectin-1 (hIntL-1) with Kdo and Hep derivatives

hIntL-1 is suggested to be involved in innate immune regulation. Previous studies^{1,2)} have suggested that the motif recognized by hIntL-1 is the terminal 1,2 diol structure, and that Kdo and Hep, which have terminal 1,2 diol structures, interact with hIntL-1, suggesting LPS as a ligand for hIntL-1. In this study, we investigated the interaction between hIntL-1 and the disaccharide structures of Kdo and Hep, which are partial structures of LPS. First we synthesized the biotin labeled monosaccharide and disaccharide structures of Kdo and Hep (Figure 1). We also synthesized the biotin labeled monosaccharide and disaccharide structures of mannose to analyze the change in affinity with hIntL-1 depending on the presence or absence of the terminal 1,2-diol structure (Figure 1).

Surface plasmon resonance (SPR) analysis of the interaction of the synthesized compounds with hIntL-1 showed that the Kdo, Hep, and disaccharide monosaccharides interacted with hIntL-1, respectively. In addition, the affinity of mannose monosaccharide for hIntL-1 was lower than that of Hep monosaccharide. On the other hand, mannose disaccharide was shown to have the same affinity for hIntL-1 as compared to Hep disaccharide. These results revealed that the motif recognized by hIntL-1 contains not only a terminal 1,2-diol structure but also an oligomannoside moiety.

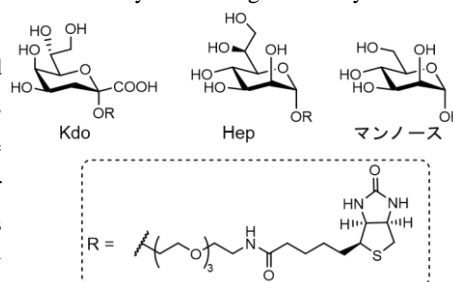
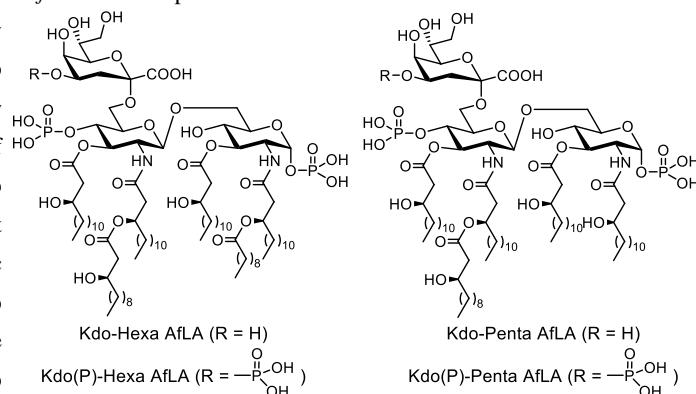


Figure 1. Target compounds (biotin-labeled)

②Synthesis of the Peyer's patches symbiotic bacterial *Alcaligenes faecalis* Kdo-lipid A

It has been reported that the activity of lipid A is affected by the addition of Kdo moiety. For example, the addition of Kdo to *Escherichia coli* lipid A enhances its immunostimulatory activity about 10-fold³⁾. On the other hand, the activity of *Helicobacter pylori* lipid A is converted from agonistic to antagonistic by the addition of Kdo⁴⁾. It was also suggested that the activity of lipid As derived from Peyer's patches symbiotic *A. faecalis* changes with the addition of Kdo. *A. faecalis* Kdo moiety is characterized by modification with a phosphate group, but the synthesis of lipid As with phosphorylated Kdo has not been achieved, and their function is unclear. Therefore,

Figure 2. Target compounds (*A. faecalis* lipid A)

the predecessor to this project, Dr. Uto, synthesized hexaacylated *A. faecalis* lipid A (Hexa AfLA), which has Kdo or phosphorylated Kdo added, and investigated their immune function⁵⁾. As a result, both Kdo-Hexa AfLA and Kdo(P)-Hexa AfLA showed weaker immunostimulatory activity than Hexa AfLA. In this study, in order to investigate how the activity of pentaacylated *A. faecalis* lipid A (Penta AfLA) is changed with the addition of Kdo or phosphorylated Kdo, I synthesized Kdo-Penta AfLA and Kdo(P)-Penta AfLA (Figure 2) and evaluated their activity. It was found that the addition of phosphorylated Kdo but not Kdo, enhanced the activity of Penta AfLA.

Ref 1) Kiessling, L. L. *et al*, *Nat Struct Mol Biol.*, **2015**, 22, 603. 2) Kiessling, L. L. *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 2386. 3) Kusumoto, S. *et al*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, **2001**, 40, 1475-1480. 4) Fukase, K. *et al*, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 14464. 5) Uto, T. Doctor thesis (Osaka university) 2022.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松 田 彩 那)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	深瀬 浩一
	副 査	教授	北條 裕信
	副 査	教授	島本 啓子
論文審査の結果の要旨			
<p>松田彩那氏は、リポ多糖 (LPS) に含まれる細菌特有糖ヘプトースや Kdo 等のヒトインテ렉チン (hIntL-1) との相互作用解析と共生菌 <i>Alcaligenes faecalis</i> 由来の Kdo-リピド A 合成に取り組んだ。</p> <p>LPS は、グラム陰性菌の外膜を構成する複合糖質であり、代表的な自然免疫活性化因子として知られ、多糖末端に存在する糖脂質リピド A が活性中心である。一方、腸管上皮細胞に発現している hIntL-1 は、細菌感染により発現が増加し、自然免疫に関与すると考えられている。hIntL-1 は微生物の表層に存在するガラクトフラノース構造を認識するレクチンであり、近年 LPS に含まれる細菌特有糖ヘプトースも認識することが報告され、両者に共通する末端 1,2 ジオール構造が認識モチーフであることが提案された。松田氏は、同様に末端 1,2 ジオール構造を有する Kdo ならびにヘプトースの二糖を合成し、SPR を用いた hIntL-1 との相互作用解析を実施した。これらの単糖と二糖の結合定数は同等であったが、末端 1,2 ジオール構造を含まないマンノースにおいても、二糖構造にすることで親和性が顕著に向上し、hIntL-1 が認識する新規な構造を見出した。</p> <p>当該研究室では、腸管関連リンパ組織パイエル板に共生する <i>A. faecalis</i> 由来の LPS が、腸管粘膜免疫制御の鍵化合物として機能していることを見出している。先に、<i>A. faecalis</i> LPS の構造が決定され、ヘキサアシル型、ペントアシル型、テトラアシル型のリピド A が同定された。当該研究室では、Kdo の付加がリピド A の活性に大きな影響を与えることが見出されていたので、ヘキサアシル型 <i>A. faecalis</i> Kdo-リピド A ならびにさらにリン酸基が結合した Kdo(P)-リピド A が合成された結果、それらの活性はリピド A より弱いことが示された。一方で、天然存在比が最も多いのはペントアシル型であるが、合成リピド A に免疫増強作用は見られず、アンタゴニストであることが判明した。Kdo ならびに Kdo(P) が結合したペントアシル型 <i>A. faecalis</i> リピド A の合成はされておらず、その生物機能は未解明であった。そこで、松田氏は、ペントアシル型 <i>A. faecalis</i> Kdo-リピド A ならびにペントアシル型 <i>A. faecalis</i> Kdo(P)-リピド A の合成に取り組み、それらの合成に成功した。さらに、ペントアシル型 <i>A. faecalis</i> Kdo(P)-リピド A が受容体を活性化して、免疫増強作用を示すことを明らかにした。Kdo(P) 構造の付加により、リピド A の活性がアンタゴニストからアゴニストに変換されたのは世界で初めてである。以上のように松田氏は、<i>A. faecalis</i> LPS の機能解析に合成化学的にアプローチし、新しい知見を見出した。</p> <p>以上のように松田氏の研究は、LPS の生物機能の解析に大きな貢献をした。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			