

Title	Characterization of natural Nod1 ligands from bacterial culture supernatant for elucidation of immune modulators in the environment
Author(s)	Ambara, Rachmat Pradipta
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58586
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

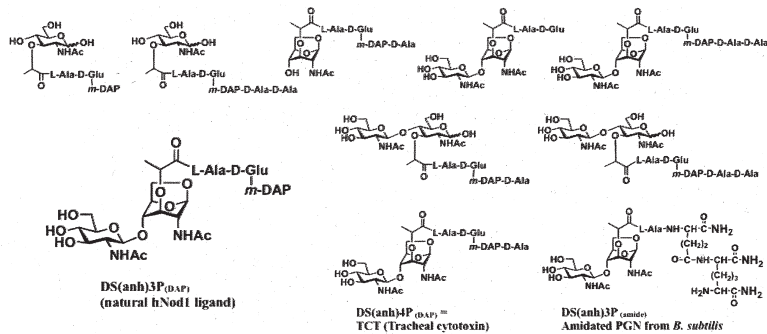
Osaka University

氏名	アンバラ ラクマツト プラディプタ Ambara Rachmat Pradipta
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 24334 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科化学専攻
学位論文名	Characterization of natural Nod1 ligands from bacterial culture supernatant for elucidation of immune modulators in the environment (細菌培養上清中の天然Nod1リガンドの解析と機能研究；環境中の免疫調節因子解明を目指した解析)
論文審査委員	(主査) 教授 深瀬 浩一 (副査) 教授 村田 道雄 教授 梶原 康宏 准教授 藤本ゆかり

論文内容の要旨

The innate immune receptors recognize specific molecules that are commonly found in microbes, and induce host defense responses to eliminate invading pathogens. Nucleotide-binding oligomerization domain protein (Nod1) is an intracellular protein that is involved in recognition of bacterial molecules and whose genetic variation has been linked to several allergic diseases, including asthma. Previous studies showed that the recognition core of Nod1 stimulatory molecules is γ -D-glutamyl-*meso*-diaminopimelic acid (iE-DAP). However, the actual structures of natural Nod1 ligands in the environment are not really understood.

We have demonstrated that some bacteria such as *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus* species release Nod1 ligands to the culture supernatants, and it showed more potent activities than the bacterial body. We were thus interested in the structure of natural Nod1 ligand in the culture of *E. coli*, and started the isolation and structural elucidation of the compounds. The *E. coli* supernatant was fractionated with reverse phase HPLC, and some Nod1 stimulatory fractions were obtained. From the structural characterization, we found the molecule structure of the most active fraction as native human Nod1 ligand. A major fragment, GlcNAc-(β 1-4)-(anh)MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-DAP was isolated and characterized by using MS and NMR. We also found other PGN fragments using 7-(diethylamino)coumarin-3-carbonyl labeling method to enhance the sensitivities in mass spectroscopy studies. We also analyzed culture supernatant of *Bacillus subtilis*, which have higher Nod1 stimulatory activity compare to other bacterial species, and found a similar PGN fragment but containing amidated-DAP. In addition, preliminary analyses of Nod1 from *Kurozu* and *Acetobacter pasteurianus* supernatant have been done. The results suggested that DAP containing bacteria release Nod1 ligands in the environment, which would accumulate in the environment and regulate the immune system through Nod1.



PGN fragments founded in *E.coli* supernatant and *B.subtilis*

論文審査の結果の要旨

Ambara Rachmat Pradipta は「Characterization of natural Nod1 ligands from bacterial culture supernatant for elucidation of immune modulators in the environment (細菌培養上清中の天然 Nod1 リガンドの解析と機能研究; 環境中の免疫調節因子解明を目指した解析)」という研究題目で以下の研究を実施した。

自然免疫の代表的な活性化因子の一つであるペプチドグリカン (PGN) は、細菌細胞壁の主成分であり、サイトカイン誘導活性やアジュバント作用などの免疫増強作用を示す。その受容体は細胞内に存在する Nod1、Nod2 と呼ばれるタンパク性の因子であり、リガンドとなる最小構造はそれぞれ γ -D-グルタミルジアミノピメリン酸 (iE-DAP) と ムラミルジペプチド (MDP) である。最近、ミシガン大学の猪原らは、バクテリアが環境中に Nod1、Nod2 リガンドを放出することを明らかにしたが、それらの構造は明らかではなかった。これらの環境中に放出される因子は、免疫系の正常な成長に重要であることが徐々に明らかにされつつある。特に Nod1 の機能不全はアレルギー罹患率を上げることが知られており、Nod1 刺激によるアレルギー発症の抑制に興味を持たれる。

そこで Ambara Rachmat Pradipta は、大腸菌の培養上清から、逆相系高速液体クロマトグラフィーを中心とした精製を繰り返して、活性因子の精製を行い、質量分析と NMR 解析により、特異なアンヒドロ糖構造を含む GlcNAc(1-4)(anh)MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-DAP を主活性因子として世界で初めて決定した。これは PGN 由来フラグメントであったので、さらに液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) を用いて他の PGN 由来フラグメントの解析を行い、多数の化合物群を同定した。先に合成されていた化合物群の生物活性試験とあわせ、大腸菌が環境中に放出する Nod1 活性化能を有する化合物群の同定に成功した。

次いで枯草菌 (バシラス) の培養上清についても解析を行い、同様の Nod1 活性化能を有する化合物群を同定した。土壌細菌にはバシラス属が含まれており、また納豆菌もバシラスである。多くの発酵食品が Nod1、Nod2 活性を有することが示されており、本研究はその候補となる化合物群の構造を示すものである。

さらに実際の発酵食品として皮膚のアレルギーに対して抑制作用が示唆される黒酢について、Nod1 活性化因子の探索を行った。分子構造の同定には到らなかったが、黒酢も Nod1 活性化因子を含んでいることを明らかにした。

高等動物は、バクテリアの感染に際し、バクテリア由来成分を自然免疫受容体で認識して、速やかに免疫系を活性化する。一方、環境中に放出されたバクテリア由来因子を取り込んで、免疫調節を行っている。本研究は、自然免疫受容体の中でも、重要な働きをしている Nod1 について、バクテリアが環境中に放出しているリガンドの構造を世界で初めて明らかにしたものである。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。