OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Synthesis and biological analysis of molecular probes of bacterial cell wall peptidoglycan for elucidation of Nod1 immunostimulatory mechanism
Author(s)	藤木, 勝将
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60107
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、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

氏名	藤木勝将（ふじき かつまさ）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第　25825　号
学位授与年月日	平成25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	Synthesis and biological analysis of molecular probes of bacterial cell wall peptidoglycan for elucidation of Nod1 immunostimulatory mechanism （細胞内受容体Nod1を介した自然免疫活性化機構解明を目指した細菌細胞壁ペプチドグリカン標識体の合成と機能解析）
論文審査委員	（主査） 教授　深瀬　浩一 （副査） 教授　梶原　康宏　　教授　中谷　和彦　　准教授　藤本　ゆかり

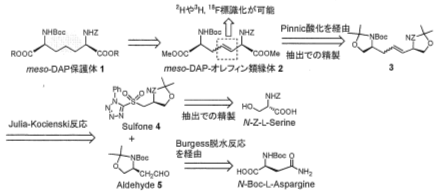
論文内容の要旨

自然免疫は、宿主に有する受容体を介して様々な異物を認識することで活性化される生体防御機構である。自然免疫を活性化する代表的な成分として、細菌細胞壁ペプチドグリカン (PGN)が知られている。当研究室では、様々な PGN フラグメントを化学合成し、ミシガン大の猪原らと共同することで、細胞内タンパク質 Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1、2 (Nod1/Nod2)が PGN の受容体であること、それぞれの最小活性構造が、Nod1 についてはγ-D-glutamyl-*meso*-diaminopimelic acid (iE-DAP)[1]、Nod2 については muramyl dipeptide (MDP)[2]であることを示すなど、PGN の自然免疫活性化機構の解明に貢献してきた[3),4)]。また、細菌に対する生体防御における Nod1/Nod2 の重要性と共に、Nod1 の遺伝子多型と喘息や花粉症等のアレルギー疾患との相関[5)]や、Nod2 の機能欠損と炎症性腸疾患のクローン病との相関[2)]が明らかとなっている。一方、細菌が菌体外に PGN フラグメントを放出し、環境中に免疫調節因子として存在していることも示されている[6)]。

Nod1/Nod2 の活性発現については、特に詳細な分子レベルの活性化機構については明らかにされていない。そこで、本研究では、Nod1 を介したリガンド認識機構解明を目指し、Nod1 リガンド標識体において重要な中間体である *meso*-DAP 保護体の簡便な合成法の開発と、それを用いた Nod1 刺激活性を保持した PGN 標識体の合成および Nod1 とリガンドの相互作用機構解析を行った。

***meso*-DAP 保護体 1 の簡便な合成法の開発**

以前に当研究室では、Julia-Kocienski 反応を鍵反応とした *meso*-DAP 保護体 **1** の化学合成を達成しているが、各合成段階においてシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどによる精製を必要とすることや、NaCN やクロム酸などの毒性の強い試薬を用いること、出発原料に比較的高価な D 体のアミノ酸を用いることなど、大量スケールでの合成には不向きであった。そこで、この合成経



Scheme 1. *meso*-DAP 保護体 1 の合成経路

路を改良することで、*meso*-DAP 保護体 **1** の簡便な合成法の開発を目指した。すなわち、1) 過剰な試薬や副生成物の除去を抽出により行い精製回数を減らし、2) 毒性の強い試薬の使用を避けた合成手法への改良、3) 出発原料に安価な L 体のアミノ酸を用いる、といった点を改良することで、*meso*-DAP 保護体 **1** の簡便な合成法の開発に成功した (Scheme 1)。また、この経路において、中間化合物として ^{3}H や ^{18}F といった放射性同位元素の標識化に応用可能なオレフィンを有する *meso*-DAP 類縁体 **2** の合成を達成した。

6 位蛍光標識 MS3P の合成と蛍光イメージング

以前にジペプチドやトリペプチドに対して蛍光標識基を導入したプローブは合成されていたが、標識体は非標識体に比べ活性が大きく低下した。そこでより生物活性を保持した Nod1 リガンド蛍光標識体を得るために、より強い Nod1 活性を持つ MS3P をリガンドとして用いた蛍光標識体の合成について検討した (Fig. 1)。MS3P は MDP 構造を持つが、以前の Nod2 リガンド標識体の結果より、糖の 1 位への導入が Nod2 活性を低下させることや、Nod1 認識に重要な DAP からより遠く導入することが好ましいと考え、1 位や 6 位に蛍光基を導入することとし、親水性リガンドのため、PEG をリンカーとして用いた。その結果、MS3P に比べ Nod1 刺激活性が約 100 倍程度低下したが、十分な Nod1 刺激活性を有する 1 位 MS3P-NBD 標識体の合成に成功した。一方、新たに 6 位に蛍光標識 MS3P-Rhodamine を合成したが、Nod1 刺激活性を示さなかった。これまでに合成された Nod1 リガンド蛍光標識体を用いて、共焦点顕微鏡による蛍光観察を行った結果、Nod1 活性を有する標識体は、不活性な標識体に比べ、明確な細胞内への取り込みが確認できた。

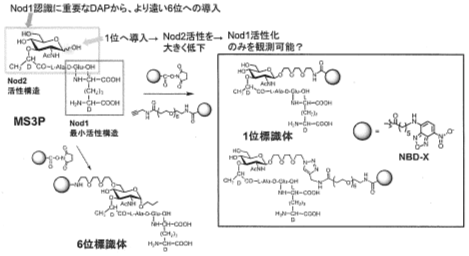


Fig. 1. 1 位および 6 位蛍光標識 MS3P の分子設計と Nod1 刺激活性を持つ 1 位 MS3P-NBD 標識体

光親和性標識 Nod1 リガンドの合成と結合解析

次に、Nod1 のリガンド結合部位の解析のため、Nod1 刺激活性を保持した光親和性標識体の合成を行った。即ち、Nod1 と光親和性標識リガンドを光照射により不可逆的に結合させ、Nod1/リガンド複合体を得ることで、結合について詳細な解析を目指した。リガンドの構造として、結合部位で共有結合形成しやすいように、最小リガンドである iE-DAP や、より強い Nod1 刺激活性を持つ A-iE-DAP を用いた。光親和性基には、ニトロ基やフルオロ基が置換した高反応性の芳香族アジドや、細谷らにより報告されたアジドメチル基を持つアジドフェニル基を [7]、直接またはリンカーを介して導入することとした。様々な光親和性標識 iE-DAP/A-iE-DAP の合成を行い、Nod1 刺激活性を測定した結果、アジドフェニル基を直接導入した光親和性標識 iE-DAP **6**,**7**,**8** が Nod1 刺激活性を完全に保持しており、これまでに報告例の無い Nod1 刺激活性を保持した分子プローブの合成に初めて成功した (Fig. 2)。

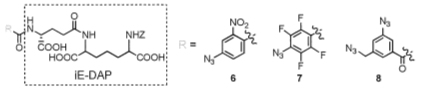


Fig. 2. Nod1 刺激活性を保持した光親和性標識 iE-DAP 6, 7, 8

Nod1 刺激活性を保持した光親和性標識体を用いて、Nod1 とリガンドの結合解析を行った。まず、recombinant Nod1 とのリガンド結合解析を行った。すなわち、アジドメチル基を有する芳香族アジド標識 iE-DAP **8** を用い、光反応による recombinant Nod1 との共有結合後、アルキルアジド基に Huisgen [3+2]環化反応を用いてビオチンタグを導入し、HRP 標識された抗ビオチン抗体やストレプトアビジンを用いた化学発光検出法により解析した。その結果、recombinant Nod1 と光親和性標識 iE-DAP **8** の結合体由来のタンパク質が検出された。さらに、フッ素置換アジドフェニル標識 iE-DAP **7** と共に光親和性標識 iE-DAP **8** を用いて recombinant Nod1 に認識させ、同様に化学発光検出を行った場合では、Nod1-リガンド結合体由来のタンパク質の検出は弱くなったことから、光親和性標識 iE-DAP **7** による結合阻害が確認された。この結果より、光親和性標識 iE-DAP **10** が Nod1 のリガンド結合部位に特異的に結合していることが示唆された。さらに、ビオチンタグのリンカーとして、PEG を用いることで、Nod1-リガンド結合体の化学発光検出の向上に成功した。これにより、アフィニティー精製や細胞内発現 Nod1 とのリガンド結合体の検出に有用なビオチンタグを得ることができた。

さらに、細胞内発現 Nod1 に対する光親和性標識 iE-DAP の相互作用について解析を行った。C 末端に FLAG タグを導入した Nod1 (Nod1-FLAG)を強制発現させた HEK293 細胞を光親和性標識 iE-DAP **6**,**7**,**8** と培養した後、光反応照射後の細胞溶出液をウエスタンブロッティング後、HRP 標識抗 FLAG 抗体を用いて化学発光検出法による解析の結果、Nod1-FLAG よりわずかに分子量の大きいタンパク質が検出された。この結果より、細胞内発現 Nod1 に対しても、光親和性標識 iE-DAP **8** が直接的に結合している可能性が示唆された。

参考文献

1) Chamaillard M. *et al*., *Nat. Immunol*. **2003**, *4*, 702-707. 2) Inohara N. *et al*., *J. Biol. Chem*. **2003**, *278*, 5509-5512. 3) Fujimoto Y., Fukase K. *et al*., *J. Endotoxin. Res*. **2007**, *13*, 189-196. 4) Kawasaki A. *et al*., *Chem. Eur. J*. **2008**, *14*, 10318-10330. 5) Eder, W. *et al*., *Allergy* **2006**, *61*(*9*), 1117-1124. 6) Fujimoto Y., Pradipta A. R. *et al*., *Nat. Prod. Rep*. **2012**, *29*, 568-579. 7) Hosoya, T. *et al*. *Org. Biomol. Chem*. **2004**, *2*, 637-641.

論文審査の結果の要旨

藤木勝将は、「Synthesis and biological analysis of molecular probes of bacterial cell wall peptidoglycan for elucidation of Nod1 immunostimulatory mechanism」という研究題目で以下の研究を実施した。

病原体センサーを介した病原体成分の認識と免疫活性化は自然免疫と呼ばれ、獲得免疫とならぶ重要な生体防御機構である。自然免疫を活性化する代表的な成分として細菌細胞壁ペプチドグリカン(PGN)があるが、先に Nod1 と Nod2 がそのセンサー受容体であり、それぞれの最小活性構造がγ-D-glutamyl-*meso*-diaminopimelic acid (iE-DAP)と muramyl dipeptide であることが当該研究室において明らかにされていた。本研究では、Nod1 を介したリガンド認識機構解明を目指し、原料と成る *meso*-DAP 保護体の簡便な合成法の開発と Nod1 リガンドの蛍光標識体や光親和性標識体の合成、さらにそれらを用いた Nod1 とリガンドの相互作用機構解析を実施した。

まず、*meso*-DAP の合成経路の改良に取り組み、精製過程の簡略化等より、*meso*-DAP 保護体の簡便な合成法を開発した。次に、生物活性を保持した蛍光標識体の合成を行った。一般に低分子生物活性分子は蛍光標識により活性に影響を受けやすいが、種々検討した結果、単糖トリペプチド Nod1 リガンドを用いて生物活性を有する Nod1 リガンドの蛍光標識体の合成に成功した。さらに蛍光標識 Nod1 リガンドが細胞内に取り込まれることを共焦点顕微鏡による蛍光観察により確認した。

さらに Nod1 刺激活性を保持した光親和性標識 Nod1 リガンドの合成に世界で初めて成功した。続いて光親和性標識体と recombinant Nod1 を用いた解析の結果、Nod1 リガンドが直接 Nod1 と結合することを証明した。また細胞内に発現させた Nod1 に対しても、同様の解析を行い、光親和性標識リガンドが Nod1 と直接に結合している可能性を示唆した。

以上のように、本研究は、Nod1 を介したペプチドグリカンの免疫増強活性発現機構について、Nod1 とそのリガンドの相互作用の解析を世界で初めて化学的に行ったものである。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。