The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	免疫調節作用を有するEntamoeba histolytica由来イノシトールリン脂質の合成と生物活性
Author(s)	相羽, 俊彦
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61494
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　相羽 俊彦　　）	
論文題名	免疫調節作用を有する*Entamoeba histolytica*由来イノシトールリン脂質の合成と生物活性

論文内容の要旨

本論文では、免疫調節活性を有する赤痢アメーバ*Entamoeba histolytica*由来イノシトールリン脂質について、新たに確立したイノシトールリン脂質の合成戦略に基づき化学合成を行い、生物活性試験を行うことで、免疫調節活性の解析を行った。

*Entamoeba histolytica*の細胞膜構成成分であるリポペプチドホスホグリカン(*Eh*LPPG)は、GPIアンカー型の糖イノシトールリン脂質であり、脂質受容体CD1dを介してナチュラルキラー(NK) T細胞を活性化することにより、宿主の免疫調節機能に作用することが報告されている[1]。EhPIaおよびEhPIbは、*Eh*LPPGの免疫調節作用の最小構造として単離されたイノシトールリン脂質である(Fig. 1)。これらの分子は、1) リゾ型グリセロ脂質、2) 炭素数28あるいは炭素数30の長鎖脂肪酸を持つ、といった特徴的な構造を有している。天然より単離された*Eh*LPPG、EhPIaおよびEhPIbは異なる脂質構造の混合物であること、グリセロール*sn*-2位の立体が未決定であったことから、詳細な脂質構造と生物活性との相関は明らかとなっていない。また、*Eh*LPPGは、GPI型の糖鎖構造を有しているが、特に糖鎖がイノシトールリン脂質に結合することによる免疫調節活性への影響は明らかとなっていない。そこで、本研究では、グリセロール*sn*-2位の両立体および*Eh*LPPGの糖鎖単位構造を有するEhPIを単一の脂質含有構造として化学合成し、生物活性試験を行うことにより、その免疫調節活性の解析を行うこととした。

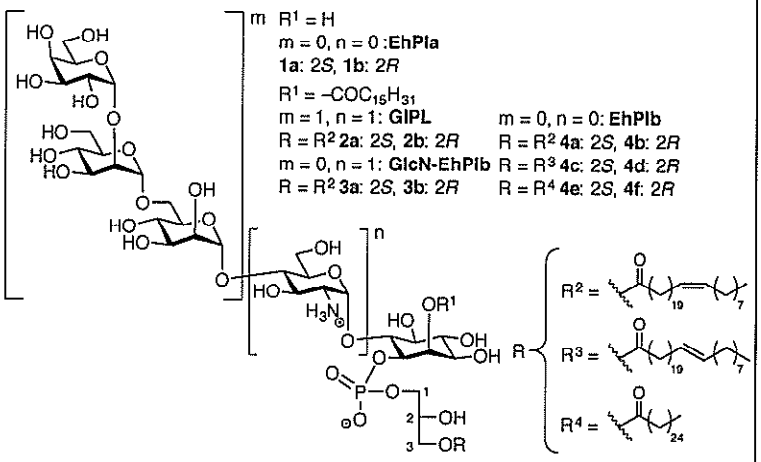
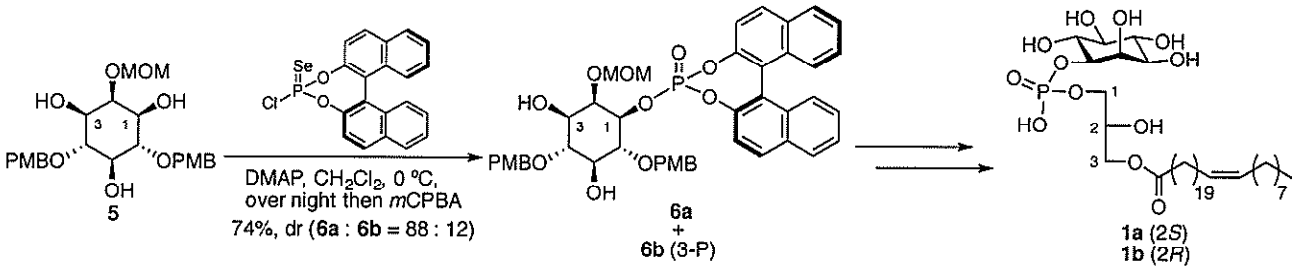


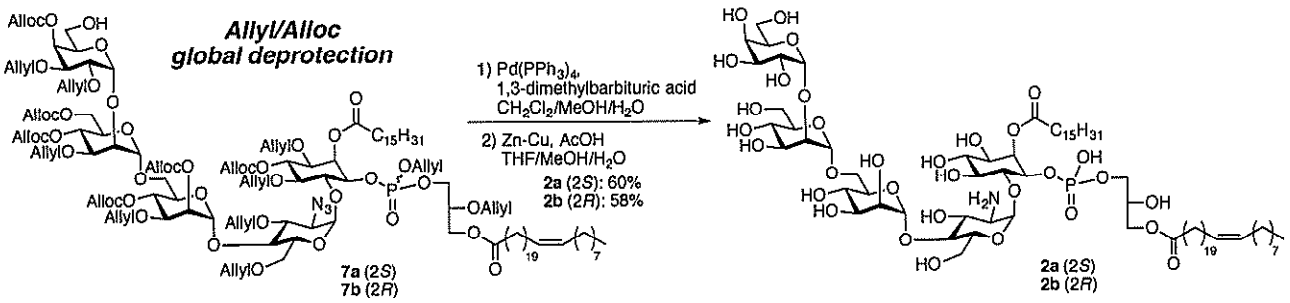
Fig. 1 Proposed structures of glycosyl inositol phospholipid from *Entamoeba histolytica*

はじめに、効率的なイノシトールリン脂質合成法の確立を目指し、イノシトールに対する位置選択的リン酸化反応の開発を行った(Scheme 1)。すなわち、不斉補助基にBINOL、リン原子上にセレンを有するリン酸化剤を適用することで、望むイノシトール一位リン酸化体を高収率で選択的に得ることに成功した。また、Ni触媒によるアルキル炭素間のカップリング反応を鍵反応とする長鎖脂肪酸合成法[2]を適用することで、グリセロール*sn*-2位の二つの立体のEhPIa(**1a, 1b**)の合成を達成した[3]。(第二章)



Scheme 1 Regioselective phosphprylation using phosphoselenoyl chloride and its application for the synthesis of EhPIa(**1a, 1b**)

つぎに、分子内に不飽和結合を有するEhPIbおよび糖鎖構造を有するEhPIbの合成を行った。EhPIbの合成において、分子内に不飽和結合を有する複雑な複合脂質合成に対する新たな合成戦略を開発した(Scheme 2)。すなわち、水酸基の永続的保護基にアリル基およびアリルオキシカルボニル基を適用し、最終脱保護において、これらの保護基を高極性溶媒中で遷移金属触媒[4,5]を用い一挙に除去する戦略である。本戦略を適用することにより、三種の脂質構造を有するEhPIb (**4a-f**) および単糖・四糖構造を有するEhPIb (**2a, 2b, 3a, 3b**) の合成を達成した。(第三章)



Scheme 2 New protecting group strategy based on allyl and allyloxycarbonyl (Alloc) groups and the synthesis of glycosyl inositol phospholipid (**2a**, **2b**)

最後に、合成化合物について、各種生物活性を行い、その免疫調節活性を解析した。CD1d分子との結合活性試験[6]では、炭素数30で*cis*二重結合を含有した脂肪酸を有するEhPIa (**1a**, **1b**) およびEhPIb (**4a**, **4b**) が結合活性を示し、CD1d分子との直接的な相互作用を示唆する結果が得られた(Fig. 2A)。また、NKT細胞刺激活性試験では、本研究で合成したEhPIb (**4a**, **4c**, **4d**)がIFN-γ誘導活性を示し、単離*Eh*LPPGの活性と同様の結果が得られたことから、EhPIbが活性構造であることを示すことに成功した(Fig. 2B)。さらに、本研究で合成したイノシトールリン脂質は、抗リーシュマニア活性を示すなど特異な活性を有することが明らかになるなど、赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質の新たな生物活性の発見に貢献した。(第四章)

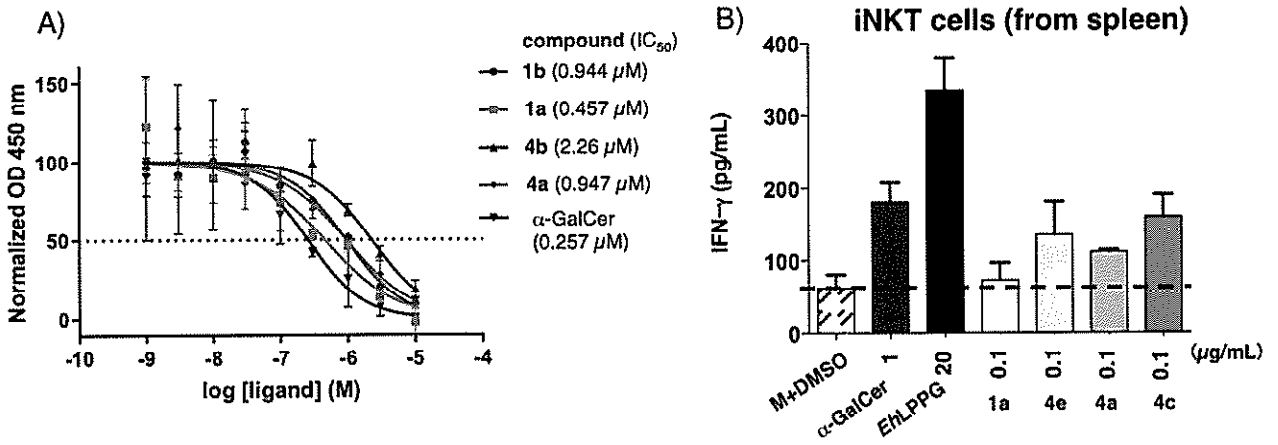


Fig. 2 A) Assessment of the binding affinities of synthesized compounds against mouse CD1d based on competitive ELISA assay. B) iNKT cells from mice spleen cell were co-incubated with ligand (**1a**, **4a**, **4c**, **4e**, α-GalCer and *Eh*LPPG)-pulsed BMDC for 48 h and IFN-γ was measured in the supernatant by ELISA.

References

(1) Lotter, H.; Gonzalez-Roldan, N.; Lindner, B.; Winau, F.; Isibasi, A.; Moreno-Lafont, M.; Ulmer, A. J.; Holst, O.; Tannich, E.; Jacobs, T. *Plos Pathog*. **2009**, *5*, e1000434. (2) Iwasaki, T.; Higashikawa, K.; Reddy, V. P.; Ho, W. W. S.; Fujimoto, Y.; Fukase, K.; Terao, J.; Kuniyasu, H.; Kambe, N. *Chem. Eur. J*. **2013**, *19*, 2956. (3) Aiba, T.; Sato, M.; Umegaki, D.; Iwasaki, T.; Kambe, N.; Fukase, K.; Fujimoto, Y. *Org. Biomol. Chem*. **2016**, *14*, 6672. (4) Tanaka, S.; Saburi, H.; Ishibashi, Y.; Kitamura, M. *Org. Lett*. **2004**, *6*, 1873. (5) Tsukamoto, H.; Suzuki, T.; Kondo, Y. *Synlett* **2007**, 3131. (6) Shiratsuchi, T.; Schneck, J.; Kawamura, A.; Tsuji, M. *J. Immunol. Methods* **2009**, *345*, 49.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　相　羽　俊　彦　）			
	（職）		氏　名
論文審査担当者	主 査	教 授	深瀬　浩一
	副 査	教 授	梶原　康宏
	副 査	教 授	北條　裕信
	副 査	教 授	藤本　ゆかり

論文審査の結果の要旨

相羽俊彦は、「免疫調節作用を有する *Entamoeba histolytica* 由来イノシトールリン脂質の合成と生物活性」と題した以下の研究を行った。

赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* の細胞膜構成成分であるリポペプチドホスホグリカン(EhLPPG)は、GPI アンカー型の糖イノシトールリン脂質であり、脂質受容体 CD1d を介してナチュラルキラー(NK) T 細胞を活性化することにより、宿主の免疫調節機能に作用する。EhPIa および EhPIb は、EhLPPG の免疫調節作用の最小構造として単離されたイノシトールリン脂質である。天然より単離された EhLPPG、EhPIa および EhPIb は異なる脂質構造の混合物であること、グリセロール sn-2 位の立体が未決定であったことから、詳細な脂質構造と生物活性との相関は明らかとなっていない。また、EhLPPG の糖鎖部分の免疫調節活性への影響は明らかとなっていない。そこで本研究では、グリセロール sn-2 位の両立体および EhLPPG の糖鎖単位構造を有する EhPI を単一の脂質含有構造として化学合成し、その免疫調節活性の解析を行った。

まず、イノシトールに対する位置選択的リン酸化反応の開発を行った。不斉補助基に BINOL、リン原子上にセレンを有するリン酸化剤を適用することで、望むイノシトール一位リン酸化体を高収率で選択的に得ることに成功した。また、Ni 触媒によるアルキル炭素間のカップリング反応を鍵反応とする長鎖脂肪酸合成法を適用することで、グリセロール sn-2 位の二つの立体の EhPIa の合成を達成した。

つぎに、分子内に不飽和結合を有する EhPIb および糖鎖構造を有する EhPIb の合成を行った。分子内に不飽和結合を有する複雑な複合脂質を合成するために、水酸基の永続的保護基にアリル基およびアリルオキシカルボニル基を用い、最終脱保護において、これらの保護基を遷移金属触媒を用い一挙に除去する戦略を確立し、三種の脂質構造を有する EhPIb および単糖・四糖構造を有する EhPIb の合成を達成した。

CD1d 分子との結合活性試験を実施し、炭素数 30 で cis 二重結合を含有した脂肪酸を有する EhPIa および EhPIb が結合活性を示した。NKT 細胞刺激活性試験では、合成 EhPIb が IFN-γ 誘導活性を示したことから、EhPIb が活性構造であることを確定した。さらに、本研究で合成したイノシトールリン脂質は、抗リーシュマニア活性を示すことを明らかにするなど、新規医療応用の可能性を示した。

以上のように相羽俊彦は、複雑構造の赤痢アメーバ由来イノシトールリン脂質の合成に成功した。本業績は、新しい合成戦略を提供することで複合糖質の合成と生物機能研究により一層の進歩をもたらすものとして高く評価できる。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。