



Title	Alcaligenes属由来リポオリゴ糖の単離・構造決定及びそのリピドAの合成と機能
Author(s)	溝手, 啓介
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69345
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 (溝手 啓介)
論文題名	<i>Alcaligenes</i> 属由来リポオリゴ糖の単離・構造決定及びそのリポドAの合成と機能 Characterization of Novel Lipooligosaccharide from <i>Alcaligenes</i> sp. and First Synthesis of Its Active Principle Lipid A

論文内容の要旨

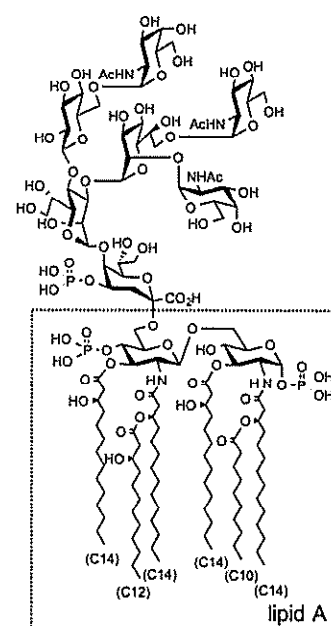
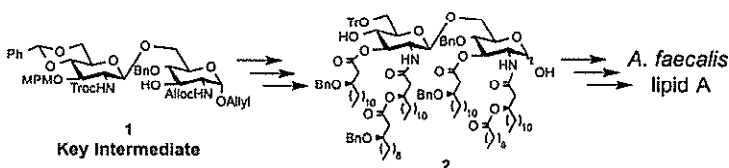
Lipopolysaccharides (LPS) are the major glycoconjugates in outer membrane of Gram-negative bacteria and activate innate immunity to induce strong inflammation. The terminal glycolipid called lipid A is the active principle of LPS. Low inflammatory LPS, lipid A, and their derivatives have been expected as adjuvants for vaccines and agents for immunotherapy. However, it is very difficult to separate beneficial activities while avoiding side effects (inflammation, sepsis). Therefore, adjuvant derived from bacteria components currently in practical use is only 3D-MPL (GlaxoSmithKline plc), hence it is necessary to develop adjuvants with functions not covered in existing adjuvants, such as anti-cancer action and anti-bacterial action to develop various type vaccine.

The previous research based on synthesis and functional elucidation of *Helicobacter pylori* lipid A has revealed the deep correlation between the characteristics of the microorganism and the lipid A activity. Therefore, based on the findings, it is expected that the symbiotic bacterium lipid A does not show harmful effects to humans. In order to develop the immunoregulatory lipid A which leads to adjuvant development, the author focused on *Alcaligenes faecalis* that has been known as symbiotic pathogen in human gut Pyere's patch, which plays an important role in immune response.¹ However, the biological activity and chemical structure of *A. faecalis* LPS/lipid A was not investigated. In this study, we isolated *A. faecalis* LPS from bacteria and its chemical structure was determined, and then the lipid A was synthesized and investigated the immunological functions.

Isolated *A. faecalis* LPS was identified as lipooligosaccharide (LOS) with shorter oligosaccharide compared to representative LPS such as *E. coli*. The chemical structure of LOS was elucidated to be a glycolipid composed of nona-saccharide and multiple fatty acids (molecular weight: ca. 3,000, Figure 1) *A. faecalis* LOS was found to be promising immune adjuvant, since it showed very low toxicity and weak inflammatory activity but high potency of antibody induction.

Furthermore, we synthesized *A. faecalis* lipid A from D-glucosamine hydrochloride via key intermediate **1**² (Figure 2). After the acylation of disaccharide intermediate to obtain **2**, two phosphate groups were simultaneously introduced and all protecting groups were removed to accomplish the synthesis of *A. faecalis* lipid A.

Finally, the biological activities of synthetic compounds were evaluated. It was revealed that *A. faecalis* lipid A has more moderate immune stimulating activity compared to *E. coli* LPS. It was confirmed the possibility of *A. faecalis* lipid A as an immunoadjuvant.

Fig. 1. *A. faecalis* LOS/lipid AFig. 2. Synthesis of *A. faecalis* lipid A

1) H. Kiyono et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 7419. 2) A. Shimoyama et al., *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 14464.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (溝 手 啓 介)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	深瀬 浩一
	副 査	教授	村田 道雄
	副 査	教授	北條 裕信

論文審査の結果の要旨

溝手啓介は、「*Alcaligenes* 属由来リボオリゴ糖の単離・構造決定及びそのリピド A の合成と機能」と題した以下の研究を行なった。

リボ多糖 (LPS) は大腸菌などのグラム陰性菌の細胞表層に存在する複合糖質であり、免疫増強活性とともに強力な炎症惹起作用をもつことから内毒素と呼ばれる。その活性中心がリピド A である。溝手は、グラム陰性菌の一種である *Alcaligenes faecalis* がヒトやマウスの腸内バイエル板の樹状細胞内に共生することから、その LPS がヒトの免疫系を制御するものと考え、その単離、構造ならびに活性中心であるリピド A の合成研究とその機能研究を行った。

まず溝手は、*A. faecalis* LPS を抽出し、生物活性を解析した結果、この菌の LPS は大腸菌のものに比べ炎症作用は弱い一方、抗体産生能は高く、ワクチンの効果を高めるアジュバントとして有用であることを明らかにした。続いて、LPS の構造研究に取り組み、LPS を単離精製した後、糖鎖部分のメタノリシスによる分解、GCMS 分析、NMR 解析を行なった。*A. faecalis* LPS は一般的な LPS よりも糖鎖の短いリボオリゴ糖 (LOS) を主成分とすることを見出し、その LOS が九糖と複数の脂肪酸からなる分子量約 3,000 の新規化合物であることを明らかにした。

続いて、*A. faecalis* リピド A の全合成を行った。種々の類縁体合成への適用を考慮し、種々の脂肪酸およびリン酸基を逐次導入可能な二糖鍵中間体を経る合成経路を採用し、二糖鍵中間体に対し保護基の切断とアシル鎖の導入を繰り返し行なった後、ホスホロアミダイト法により 2 つのリン酸基を同時導入し、最後に全ての保護基を切断することにより、*A. faecalis* リピド A の全合成を達成した。

さらに、合成化合物の免疫調節活性を解析した。*A. faecalis* リピド A は濃度依存的に炎症性サイトカインを誘導するが、ある一定の濃度を超えるとその誘導量が減少していくといった現象や、大腸菌 LPS との共刺激により抑制性サイトカイン IL-10 の誘導が相乗的に増強されるといった特異な活性を有することが明らかになった。*A. faecalis* リピド A は温和な免疫刺激活性を示すリガンドであり、有用な免疫アジュバントの候補であることが示された。

以上のように、溝手は、共生菌 LPS が穏やかな免疫活性化能を示すという合理的な研究仮説のもと、構造解析、合成研究、生物機能研究を実施して仮説を立証しており、その成果は高く評価できる。

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。