



Title	ABO式血液型糖鎖抗原の効率合成と生物機能研究
Author(s)	筒井, 正斗
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/77590
rights	
Note	

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 (Masato Tsutsui)

論文題名

Efficient synthesis of ABO blood type antigens and functional study of their biological activity

論文内容の要旨

The ABO blood group is a blood-classification system based on the three different carbohydrate antigens on red blood cells (Fig. 1). These antigens are recognized by natural antibodies and induce strong immune response. In this study, I achieved the efficient synthesis of A, B, and H antigens by focusing on the protective group of amino sugars. I also designed glycodendrimers to investigate the multivalent interactions of anti-blood group IgM antibody.

First, the A, B, and H antigens were synthesized by using the glucosamine (GlcN) protected with Troc group. The

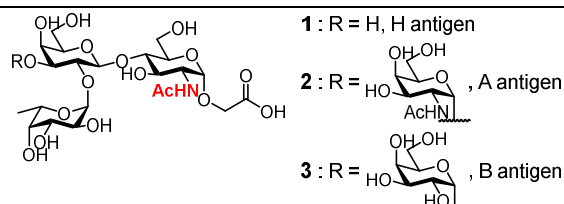


Figure 1 The structure of A, B, H antigens

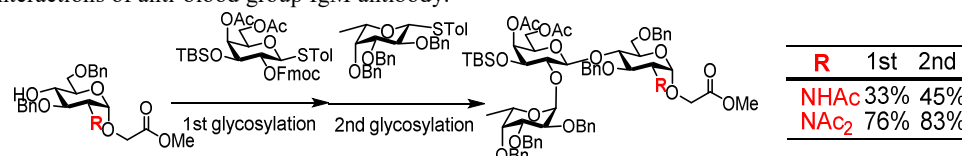


Figure 2 Efficient synthesis of H antigen by diacetyl strategy

carboxylic acid group was introduced at the reducing end to facilitate the synthesis of derivatives for biological assay. Next, H antigen was synthesized using diacetyl strategy in which NHAc is tentatively converted to NAc₂ during oligosaccharide construction (Fig. 2). The intermolecular hydrogen-bond of the NHAc group in the acceptor was observed by concentration- and temperature-dependent chemical shift of the amide proton and DOSY spectra in ¹HNMR. The larger effective molecular volume of the NHAc acceptor calculated by the DOSY than the NAc₂ acceptor suggested the formation of oligomeric structure of the NHAc acceptor. The reactivity of NHAc and NAc₂ acceptor was then investigated. Enhancement of the reactivity by NAc₂ protection was observed in both [1+1] and [1+2] glycosylations. These results indicate that the diacetyl strategy is an useful method for the efficient synthesis of the glycan containing GlcNAc.

Dendrimers with high affinity for IgM antibodies were designed and synthesized (Fig. 3). Three different sizes of dendrimers were synthesized by using 16-mer core structure. As the size of the dendrimers increases, the density of glycans is decreases. On the other hand, the number of interacting binding sites at same time increases as the dendrimer size increases. The largest one was designed to cover all binding sites of IgM at the same time. SPR measurements showed middle size dendrimer showed the highest affinity. Hemagglutination inhibition assay also showed the highest inhibitory activity of the middle size dendrimer. These results indicate it is important to design dendrimer that can interact with some binding sites simultaneously while maintaining glycan density during the design of dendrimers.

Finally, I examined the induction of immune response using blood group antigen. I labeled the target cells with blood group antigen, recruiting of antibodies against target cells, and the induction of CDC activity. The results showed that the multivalent effect of antigen is essential for the regulation of biological functions using the interaction between IgM antibodies and antigen. Therefore, the use of dendrimer for induction of immune response is promising.

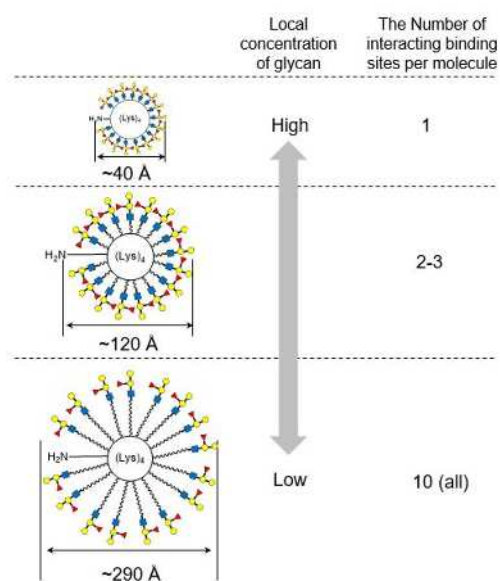


Figure 3 Design of Dendrimers

論文内容の要旨

氏 名 (筒 井 正 斗)

論文題名

ABO式血液型糖鎖抗原の効率合成と生物機能研究

論文内容の要旨

ABO式血液型は赤血球上の糖鎖構造による分類である (Fig. 1) . 血液型糖鎖は糖鎖抗原として機能し, 自然抗体により認識されて激しい免疫反応を引き起こす. 本研究ではアミノ糖の保護基に着目し, ABO式血液型糖鎖の効率合成を検討した. さらに生体内での多価相互作用の再現を指向して dendroliマーを設計し, 多価分子の結合モデルについて解析した.

まず, グルコサミン (GlcN) 2位をTroc保護したアクセプターを用いてABH抗原の合成を完了した. 還元末端にはカル

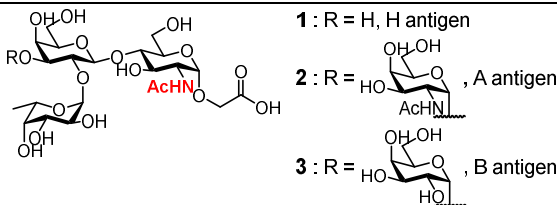


Figure 1 A, B, H 抗原の構造

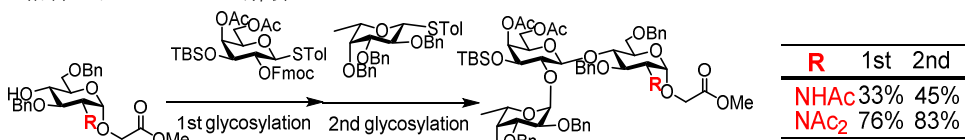


Figure 2 ジアセチルストラテジーを用いたH抗原の効率合成

ボン酸を導入し, 生物活性試験の際に誘導体を容易に合成できる構造とした. さらに当研究室で提唱しているジアセチルストラテジーを, GlcN含有糖鎖の合成へと適用した (Fig. 2) . NHAc体アクセプターが水素結合ネットワークを形成することを¹HNMRにて確認した. さらにDOSY法によって分子体積を概算し, NHAc体の分子間水素結合を介した多量体形成を示唆する結果を得た. N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のNHAc基をNAc₂基へと変更し, NHAc体, NAc₂体アクセプターを用いてH抗原の合成を行い, [1+1], [2+1]グリコシル化において反応性, 収率の劇的な向上を確認した. 以上の結果からGlcN含有糖鎖の効率合成法としてジアセチルストラテジーが有用であることを示し, 本ストラテジーの適用範囲を大きく広げることができた.

得られた各血液型抗原を用いて, IgM抗体に対して高い親和性を示す dendroliマーを設計・合成した (Fig. 3) . 16量体を用いることとし, 3種類のサイズの異なる dendroliマーを合成した. dendroliマーのサイズが大きくなるに従って, dendroliマー上の糖鎖密度は低下する. 一方, IgM抗体は10個の抗原認識部位を持つが, サイズが大きくなることで, 同時に相互作用可能な結合サイトの数が増え, 最も大きなものではすべての結合サイトを同時にカバーできるように設計した. SPR測定の結果, 中間のサイズの dendroliマーが最も高い親和性を示した. また, 血球凝集阻害試験においても, 同様に中間のサイズの dendroliマーが最も高い阻害活性であった. これらの結果から, dendroliマーの設計時には糖鎖密度を維持した上で, 同時に複数の結合サイトと相互作用できる分子を設計することが重要であることを示した.

最後に血液型糖鎖を用いた免疫反応の誘導を検討した. すなわち, 標的細胞を血液型糖鎖で標識し, この細胞に対して抗血液型IgM抗体のリクルート, さらには, CDC活性の誘導を検討した. その結果, 糖鎖抗原とIgM抗体の相互作用を用いた生体機能制御には, 糖鎖の多価効果が有効に働くことが必須であることが分かった. このことから, 上記で開発した dendroliマーの利用は有望であると考えている.

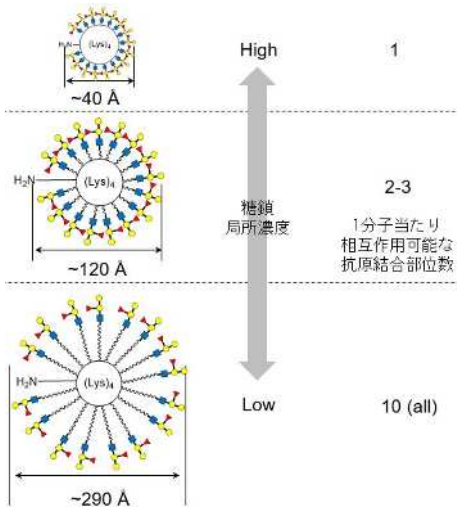


Figure 3 dendroliマーの設計

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (筒井 正斗)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	教授 深瀬 浩一
	副 査	教授 村田 道雄
	副 査	教授 島本 啓子

論文審査の結果の要旨

学位申請者は、アセトアミドを含む血液型糖鎖抗原の効率的な合成法の開発と、化学合成した B 型糖鎖抗原とその IgM 抗体との相互作用解析について研究を行った。ABO 式血液型は赤血球上の糖鎖構造による分類であり、A 型ならびに B 型糖鎖抗原は、それぞれ対応する自然抗体と相互作用して、血液型不適合として知られる免疫応答を誘導する。

まずグルコサミンのアミノ基をトリクロロエトキシカルボニル(Troc)基で保護して、糖鎖骨格合成を進めた後、Troc 基切断とアセトアミドへの変換を行うという、当該研究室で確立された戦略に基づき、新しい合成経路を開発して、A, B, H 型糖鎖抗原の効率合成を達成した。

続いて、アセトアミド基 (N-アセチル基) をアセチル化して合成を進めるジアセチルストラテジーについて検討し、H 型抗原のより効率的な合成法を確立した。合成基質となる糖にアセトアミド基が存在すると反応性が低下することが知られていたが、アミドプロトンの NMR ケミカルシフトの濃度依存性と温度依存性の観測、ならびに DOSY による拡散係数の測定により、分子間水素結合の存在を証明し、ジアセチル基とすることで、水素結合形成を抑制し、反応性を大きく向上させることに成功した。さらに得られた B 型抗原を用いて、IgM 抗体に対して高い親和性を示す樹状高分子(デンドリマー)を設計・合成した。3 種類のサイズの異なるデンドリマーコアを用い、それぞれの樹状末端に合計で 16 個の B 型抗原を含むデンドリマーの効率合成に成功した。一方、IgM 抗体は 10 箇所の糖鎖認識部位(CRD)を有し、全ての CRD を同時に認識可能な巨大デンドリマー、1 箇所の CRD にのみ相互作用可能な小さなデンドリマー、複数箇所と相互作用可能な中間のサイズのデンドリマーについて、SPR 測定と血球凝集阻害試験を実施し、中間のサイズのデンドリマーが最も高い活性を示すこと、IgM と糖鎖デンドリマーの相互作用において、それぞれの CRD と各糖鎖の結合と解離が速やかに繰り返される再結合モデルが重要であること明確にした。

以上の成果は、糖鎖合成ならびに糖鎖科学の発展に大きく貢献するものである。

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。