



Title	腸管関連リンパ組織共生菌リポオリゴ糖部分構造の合成と機能解析
Author(s)	宇戸, 智哉
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87823
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 (宇戸 智哉)

論文題名

腸管関連リンパ組織共生菌リポオリゴ糖部分構造の合成と機能解析

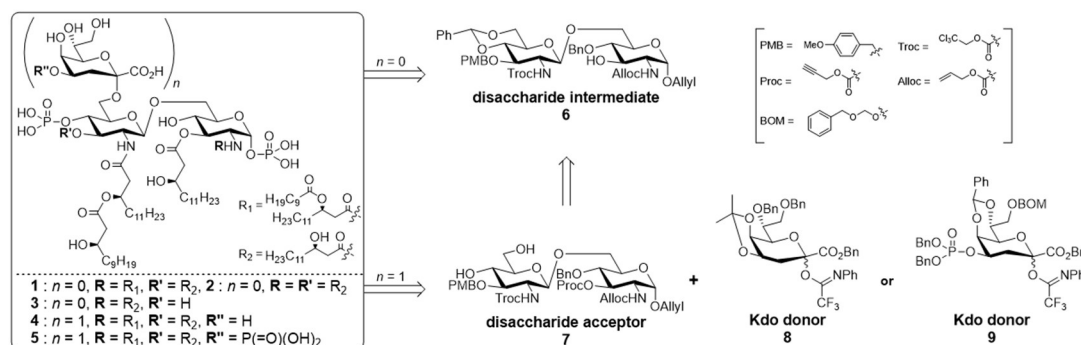
論文内容の要旨

グラム陰性菌外膜成分であるリポ多糖 (LPS) はO抗原とコアオリゴ糖からなる糖鎖部が細菌特有のHepやKdoを介して活性中心リポドAと結合した構造をとり、LPSからO抗原が欠落したものはリポオリゴ糖 (LOS) と呼ばれる。これらは受容体TLR4/MD2に認識され、自然免疫を活性化させる。

近年、グラム陰性菌*Alcaligenes faecalis*がパイエル板などの腸管関連リンパ組織に共生していることが報告された。所属研究室ではこれまでに、*A. faecalis*から抽出したLOSはヒトに対して毒性を示さないが、効率的に抗体産生を高めることを明らかにしてきた¹。それゆえ、*A. faecalis* LOSやそのリポドAは有望なワクチンアジュバントとして開発が進んでいる。最近、所属研究室はナポリ大学と共同で*A. faecalis* LOSの化学構造を決定し、リポドAのアシル鎖パターンに多様性があること、報告例が少ないリン酸化されたKdoを含んでいることを報告した³。さらには、二糖⁶を鍵中間体とした多様性指向型合成戦略により、*A. faecalis* リポドA **1-3**の系統的合成を達成した。合成したリポドA **1-3**について活性試験を実施したところ、*A. faecalis* LOSとリポドA **1**はTLR4依存的な免疫刺激活性を示したのに対し、*A. faecalis* LOSの主成分であるリポドA **2, 3**はTLR4アンタゴニストとして作用した³。天然存在比でリポドA **1-3**を混合した際、免疫活性化作用は確認できなかった。これまでの先行研究^{2,4,5}からKdo付加によりリポドAの免疫機能が変化することが示唆されているため、リン酸化Kdoの付加によりリポドA **1**の活性が向上すると予想された。しかし、*A. faecalis*に限らず、リン酸化Kdo-リポドAの合成例は皆無であり、新規合成戦略の構築が必要であった。

本研究では、リン酸化Kdo付加がリポドA **1**の免疫機能に与える影響の精査、並びに*A. faecalis* LOSが示した有益なアジュバント作用発現の分子基盤の解明を目的として、*A. faecalis* Kdo-リポドA **4, 5**の化学合成を行った。Kdo-リポドA **4**の合成においては、Kdoグリコシル化の α -選択性を高めるために、架橋基を導入することで糖骨格を舟形に固定したKdo供与体⁸を用いた。**7**と**8**をグリコシル化することで構築したKdo-GlcN₂三糖体に対して、直交型保護基の選択的除去と脂肪酸の逐次導入を行った後、アノマー位選択的なリン酸化と接触水素化による最終脱保護を経て、*A. faecalis* Kdo-リポドA **4**の初の化学合成を達成した。*A. faecalis* Kdo-リポドA **5**の合成においては、Kdoの5, 7位に導入したベンジリデンアセタール基の立体障害によって β 面をブロックすることで α -選択性を高めた⁷Kdo供与体⁹を設計した。**7**と**9**のグリコシル化によって三糖体を構築後、*A. faecalis* Kdo-リポドA **4**と同様の合成戦略により、世界初のリン酸化Kdo-リポドA **5**の化学合成を達成した。

合成した*A. faecalis* Kdo-リポドA **4, 5**およびリポドA **1**について、HEK-Blue™ hTLR4細胞を用いた免疫活性化能評価を実施したところ、予想に反して、Kdo付加により活性が減弱し、Kdoリン酸化は活性を更に減弱させることが確認された。以上の結果から、リポドA **1**にHepを含むコアオリゴ糖が付加することで**1**の活性が増強される、またはKdoを含むコアオリゴ糖の付加が、**2,3**の活性をアンタゴニストからアゴニストへ転換させる可能性が示唆された。



(1) N. Shibata *et al.*, *Mucosal Immunology* **2018**, *11*, 693. (2) A. Shimoyama *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14464. (3) A. Shimoyama *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 10023. (4) H. Yoshizaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1475. (5) Y. Zhang *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 558. (6) A. Shimoyama *et al.*, *Synlett* **2011**, *16*, 2359. (7) J. H. Huang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10894.

論文内容の要旨

氏 名 (宇戸 智哉)

論文題名

腸管関連リンパ組織共生菌リポオリゴ糖部分構造の合成と機能解析

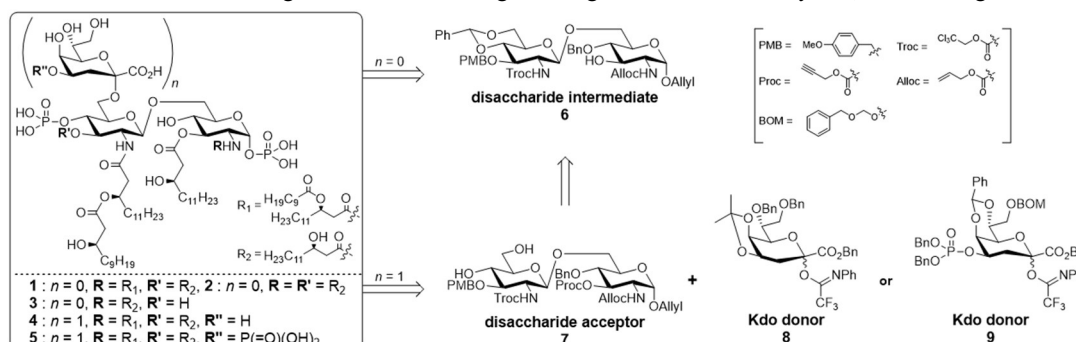
論文内容の要旨

Lipopolysaccharide (LPS), one of the components of Gram-negative bacterial outer membranes, consists of a terminal active center, lipid A, linked to O-antigen and core oligosaccharide via the bacteria-specific Hep and Kdo. LPS lacking O-antigen are called lipooligosaccharide (LOS). Lipid A activates innate immunity through the recognition of the receptor TLR4/MD-2.

Previously, it was reported that Gram-negative bacteria *Alcaligenes faecalis* inhabit the gut-associated lymphoid-tissue, Peyer's patches. We recently reported that LOS extracted from *A. faecalis* promoted antibody production without any harmful responses¹, thus *A. faecalis* LOS and its lipid A have been developing as promising vaccine adjuvants. In collaboration with Italy group, we determined the chemical structure of *A. faecalis* LOS possessing the characteristic phosphorylated Kdo with the heterogeneous acylation number in lipid A moiety³. Furthermore, we accomplished the systematic synthesis of *A. faecalis* lipid A **1-3** according to the diversity-oriented synthetic strategy via key intermediate **6**. *A. faecalis* LOS and synthesized lipid A **1** showed the TLR4-dependent immunostimulating activities, while synthesized lipid A **2, 3**, which were the main components in *A. faecalis* LOS, were found to be TLR4 antagonists³. The mixture of lipid A **1-3** in natural ratio did not show immunostimulating activity. Previous research^{2,4,5} suggested that the addition of Kdo affect the immune function of lipid A, thus we expected the addition of phosphorylated Kdo enhances the immunostimulating activity of lipid A **1**. On the other hand, no synthetic study of lipid A with phosphorylated Kdo have been reported, therefore it is necessary to establish the new synthetic strategy.

In this research, I synthesized *A. faecalis* Kdo-lipid A **4, 5** to investigate the impacts of phosphorylated Kdo on the immune function of lipid A **1** and to elucidate the molecular basis of *A. faecalis* LOS's adjuvant activity. In the synthesis of Kdo-lipid A **4**, I used Kdo donor **8** whose sugar backbone was fixed in a boat-like conformation to enhance the α -selectivity of Kdo glycosylation with **7**. After glycosylation, selective removal of protective groups and sequential introduction of fatty acids followed by global deprotection afforded *A. faecalis* Kdo-lipid A **4**. In the synthesis of Kdo-lipid A **5**, I designed a new Kdo donor **9**, in which the benzylidene group was introduced at C-5,7 position, to enhance the α -selectivity of Kdo glycosylation by blocking the β -face⁷. In a similar strategy to the synthesis of Kdo-lipid A **4**, I accomplished the chemical synthesis of *A. faecalis* Kdo-lipid A **5**. This is the first synthetic example of phosphorylated Kdo-lipid A.

Bioassay using HEK-Blue™ hTLR4 cells indicated that, contrary to expectations, Kdo-lipid A **4** showed weaker immunostimulating activity than lipid A **1**. Moreover, phosphorylation of Kdo moiety was further attenuated the activity. These results suggested that the addition of core oligosaccharide including Hep to **1** enhances the immunostimulating activity. It is also suggested that the addition of core oligosaccharide including Kdo might convert the activity of **2, 3** from antagonistic to agonistic.

Figure 1. Synthetic strategy of *A. faecalis* Kdo lipid A **4, 5**

(1) N. Shibata *et al.*, *Mucosal Immunology* **2018**, *11*, 693. (2) A. Shimoyama *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14464. (3) A. Shimoyama *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 10023. (4) H. Yoshizaki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1475. (5) Y. Zhang *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 558. (6) A. Shimoyama *et al.*, *Synlett* **2011**, *16*, 2359. (7) J. H. Huang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10894.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (宇 戸 智 哉)			
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	鈴木 孝禎
論文審査の結果の要旨			
宇戸智哉は「腸管関連リンパ組織共生菌リポオリゴ糖部分構造の合成と機能解析」と題した研究を実施した。 グラム陰性菌外膜成分であるリポ多糖（LPS）は O 抗原とコアオリゴ糖からなる糖鎖部が活性中心リピド A と結合した構造をとり、LPS から O 抗原が欠落したものはリポオリゴ糖（LOS）と呼ばれる。大腸菌などの一般的な細菌の LPS は、強力な免疫増強作用、炎症惹起作用とそれらに起因する毒性を示すが、当該研究室では腸管のパイエル板に共生するグラム陰性菌 <i>Alcaligenes faecalis</i> が産生する LOS が免疫増強作用を示すが毒性を示さないことが明らかにされ、さらに <i>A. faecalis</i> LOS の化学構造が決定された。一般に LPS や LOS は、オリゴ糖末端の Kdo と呼ばれる酸性糖がリピド A に結合した構造を有しており、<i>A. faecalis</i> LOS はリン酸基の結合した Kdo を有することを特徴としている。<i>A. faecalis</i> LOS は弱毒性免疫調節因子として、ワクチンの効力を高めるアジュバントとして有望であり、その活性中心である糖脂質リピド A はアジュバントとしての開発が進行中である。一方、<i>A. faecalis</i> LOS の活性は、リピド A とは完全には一致せず、より強力な免疫増強活性を有する。そこで宇戸智哉は <i>A. faecalis</i> LOS のオリゴ糖部分に着目し、リピド A に Kdo が結合した部分構造 Kdo-リピド A ならびにさらにリン酸基が結合したリン酸化 Kdo リピド A の合成研究を行った。 Kdo-リピド A の合成においては、Kdo グリコシル化の α-選択性を高めるために、架橋基を導入することで糖骨格を舟形に固定した Kdo 供与体を用い、効果的に三糖骨格を構築した。さらに直交型保護基の選択的除去と脂肪酸の逐次導入を行った後、アノマー位選択的なリン酸化と接触水素化による最終脱保護を経て、<i>A. faecalis</i> Kdo-リピド A の化学合成を達成した。リン酸化 Kdo リピド A の合成においては、Kdo の 4 位にリン酸基を 5, 7 位にベンジリデンアセタール基を導入した新規 Kdo 糖供与体を開発し、これを用いて三糖体の合成に成功した。さらに <i>A. faecalis</i> Kdo-リピド A と同様の合成経路により、初のリン酸化 Kdo-リピド A の化学合成を達成した。 合成した <i>A. faecalis</i> Kdo-リピド A とリン酸化 Kdo-リピド A について、培養細胞系で活性化能を評価したところ、予想に反して、Kdo 付加により活性が減弱し、Kdo リン酸化は活性を更に減弱させることが確認された。以上の結果は、リピド A にコアオリゴ糖が付加することさらに活性が増強されることを示唆するものである。 Kdo-リピド A の合成は、他種の細菌由来の化合物について数例報告されているのみで、リン酸化 Kdo-リピド A については本研究が初の合成例であり、糖質化学分野における大きな研究成果である。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。			