OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	C. jejuni リピドAの合成および高次機能化に向けた検討
Author(s)	松浦, 良史
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92166
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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名	（　松浦　良史　）
論文題名	*C. jejuni*リピドAの合成および高次機能化に向けた検討

グラム陰性菌の外膜成分リポ多糖（LPS）は、代表的な自然免疫の活性化因子である。LPSは、活性中心である糖脂質リピドAが、KdoやHep等の細菌特有の糖骨格を介して糖鎖抗原部分と結合した構造を有している。一方で*Campylobacter jejuni* などの一部の細菌は、糖鎖構造の短いリポオリゴ糖（LOS）を有する(図1)。ギランバレー症候群(GBS)は、四肢の麻痺等を伴う自己免疫疾患の一種である。その発症原因は、*C. jejuni* LOSの糖鎖構造とヒトの神経組織に発現するガングリオシドGM1の糖鎖構造に分子相同性があり、交差免疫反応が起こるためとされている。リピドAの免疫活性化作用が交差免疫反応の亢進に寄与している可能性が高く、また、抗原と自然免疫リガンドの複合化により、抗原特異的な免疫応答が促進されることも報告されている。*C. jejuni* LOSは、自然免疫リガンド（リピドA）と糖鎖抗原が複合化した構造を有しており、GBSの発症には、分子相同性に加え、リピドAと抗原との複合化が鍵となっていることが考えられた。そこで本研究では、複合化が免疫機能に与える影響を評価できる方法の構築を目指した。また、*C. jejuni*リピドAを含め、天然のリピドAは構造多様性を有する混合物であるため、複数種のリピドAを用いた多成分系での機能解析法を検討した。実際には、以下の2つのテーマを実施した。

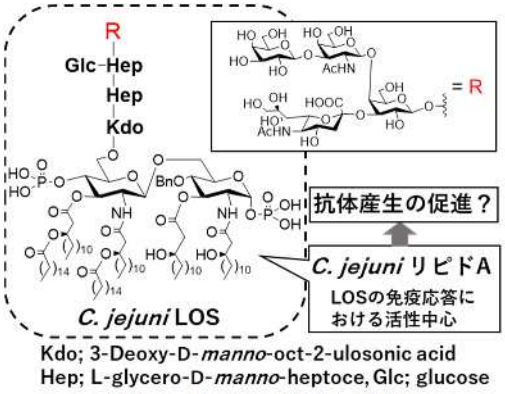


図1　*C. jejuni* LOSとGBS

テーマ１；*C. jejuni*リピドA-糖鎖抗原複合体の合成　天然のLOSは構造多様性を有し、純粋な成分で機能解析を行うのは困難である。そこで化学合成により複合体を用意することにした。具体的には*C. jejuni*リピドAに対し、リンカーを介して5糖からなるGM1 glycanを複合化した「*C. jejuni*リピドA-糖鎖抗原複合体**1**」をLOSのミミック分子として設計した(図2)。GM1 glycanと*C. jejuni*リピドA **4**の混合物と**1**の免疫機能の比較により、リピドAと糖鎖抗原の複合化がGBS発症に影響するのか精査可能となるため、本研究では**1**の合成法の確立を目指した。

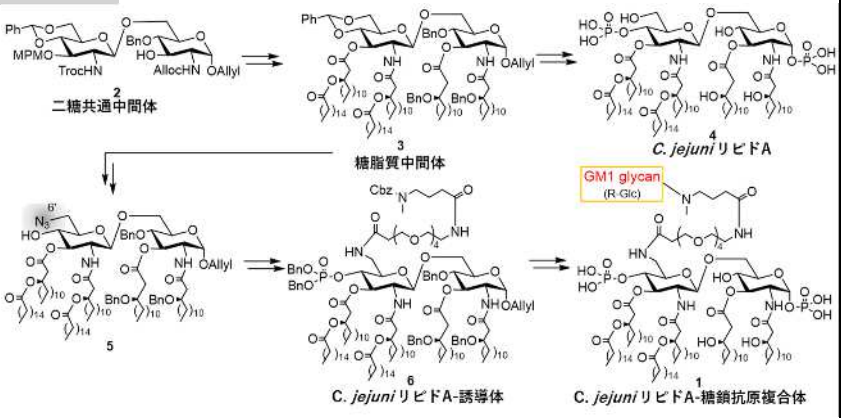


図2　*C. jejuni*リピドAおよび*C. jejuni*リピドA-糖鎖抗原複合体の合成

二糖共通中間体**2**[1]から、糖脂質中間体**3**の効率合成法を検討した後、リン酸基導入と脱保護を行うことでまず*C. jejuni*リピドA **4**の合成を世界で初めて達成した。さらに、**3**の6'位アジド化により**5**へと導き、リンカーの導入を行うことで*C. jejuni*リピドA誘導体**6**の合成を完了した。またGM1 glycanは加水分解酵素EGcase IによってGM1から直接調製した。**6**へのリン酸基導入を完了している (図2)。

テーマ２；複数種リピドA混合物の機能評価　リピドAは構造多様性を有する両親媒性分子であり、環境中では複数種リピドAを含む凝集体を形成していると考えられる。これまでにTLR4アゴニスト、アンタゴニスの混合方法、混合比によっては、アンタゴニスト作用だけでなく、相乗的な免疫活性化作用が発現することがドイツのグループとの共同研究により報告されている[2]。本研究では、TLR4アンタゴニストライブラリを用い、混合様式の違いに着目した構造活性相関研究を展開した。その結果、混合方法や混合比の違いに起因するアンタゴニスト作用および相乗的な免疫活性化作用の発現に、リン酸基構造の違いが関与することを見いだした。

参考文献:1) *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 14464.　2) *J Biol Chem.*, **2004**, *279*, 26307

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　Yoshifumi Matsuura　）	
論文題名	Chemical synthesis of *C. jejuni* lipid A and investigation for highly functionalized lipid A construction

Lipopolysaccharide (LPS), an outer membrane component of Gram-negative bacteria, is a representative innate immunity stimulator. LPS is composed of glycolipid lipid A, the active center, bound to the carbohydrate antigen portion via a bacterial-specific sugar backbone such as Kdo and Hep. On the other hand, some bacteria, such as *Campylobacter jejuni*, have lipooligosaccharides (LOS) with shorter sugar chain structures (Fig 1). Guillain-Barré syndrome (GBS) is a type of autoimmune disease that is accompanied by paralysis of the extremities. GBS is considered to be caused by the molecular homology between the glycan structure of *C. jejuni* LOS and ganglioside GM1, which is expressed in human nervous tissue, resulting in cross-reactive immune responses. Immune activating effect of lipid A could contribute to increased cross-reactive immune responses. It has also been reported that the conjugation of antigens and innate immune ligands can promote antigen-specific immune responses. *C. jejuni* LOS has a structure complexed with an innate immune ligand (lipid A) and a carbohydrate antigen. Therefore, in addition to molecular homology, the conjugation of lipid A with the antigen is thought to be a key factor in GBS onset. Therefore, in this study, we aimed to develop a method that enables to evaluate the impact of conjugation between lipid A and carbohydrate antigen on immune function. Natural lipid A, including *C. jejuni* lipid A, is a mixture with structural diversity. A method for functional analysis of mixtures containing several lipid A was investigated.

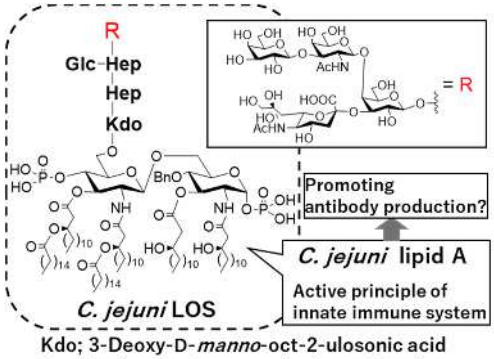


Fig 1.　*C. jejuni* LOS and GBS

Theme 1, synthesis of *C. jejuni* lipid A-carbohydrate antigen conjugate

The structural diversity of natural LOS makes it difficult to perform functional analysis with pure components. Therefore, we prepared the conjugate by chemical synthesis.

C. jejuni lipid A- carbohydrate antigen conjugate **1**, in which GM1 glycan is conjugated to *C. jejuni* lipid A via a linker, was designed as a mimic molecule of LOS (Fig. 2).

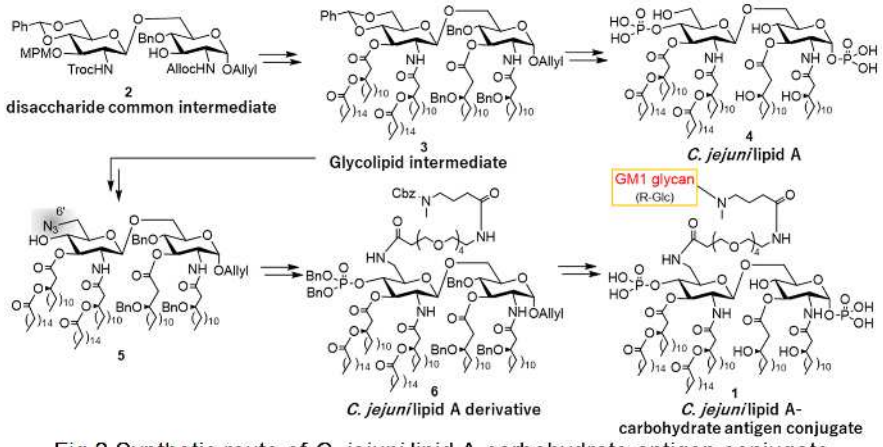


Fig.2 Synthetic route of *C. jejuni* lipid A-carbohydrate antigen conjugate

Since a comparison of the immune function of the mixture (GM1 glycan and *C. jejuni* lipid A **4**) and **1** will allow to investigate how the conjugation of lipid A and carbohydrate antigens affects the GBS onset, we tried to establish a synthetic method of **1**. After investigating an efficient synthesis method for glycolipid intermediate **3** from disaccharide common intermediate **2**, we first achieved the synthesis of *C. jejuni* lipid A **4** via phosphate group introduction and global deprotection. Furthermore, *C. jejuni* lipid A derivative **6** was synthesized by introducing the linker into **5**, which was synthesized by 6'-position azidation of **3**. GM1 glycan was prepared directly from ganglioside GM1 by the hydrolysis enzyme EGcase I. The introduction of phosphate groups into **6** also has been finished.

Theme 2, functional evaluation of mixtures containing several lipid A

Lipid A is an amphiphilic molecule with structural diversity and is thought to form aggregates containing several lipid A in the environment. It has been reported in collaboration with a German group that depending on the method and ratio of mixing TLR4 agonists and antagonists, not only antagonist action but also synergistic immune activation is expressed[2]. In this study, we applied the TLR4 antagonist library to develop a structure-activity relationship study focusing on differences in mixing mode. We found that differences in phosphate group structure are involved in the expression of antagonist and synergistic immune-activating effects due to differences in mixing methods and mixing ratios.

1) *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 14464.　2) *J Biol Chem.*, **2004**, *279*, 26307

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　松浦　良史　）

	（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　特任教授	島本　啓子

論文審査の結果の要旨

ギラン・バレー症候群（GBS）は、末梢神経系を侵し、筋力低下、麻痺、重症の場合は呼吸不全を引き起こす自己免疫疾患であり、食中毒の原因菌の一種である *Campylobacter jejuni* による感染症が引き金となることがある。*C. jejuni* のリポオリゴ糖（LOS）とヒトの神経組織に発現するガングリオシド GM1 の糖鎖構造に相同性があるため、交差免疫反応が起こり、GBS を発症するという分子相同性仮説が提唱されている。LOS による自然免疫活性化が抗体産生誘導に働いていると考えられるが、LOS の活性中心であるリピド A 部の自然免疫活性化能が解析されたことはない。また、抗原と自然免疫リガンドを複合化した自己アジュバント化ワクチンにおいては、抗原特異的な免疫応答が効果的に促進されることも報告されている。*C. jejuni* LOS は、同様の複合化した構造を有しているが、GBS の発症における複合化の効果が検証されたこともない。松浦は、4 種の *C. jejuni* リピド A の中で普遍的な構造を有する化合物の合成を担当し、アシル化反応について精密な解析を行いつつ、その合成を達成した。続いて、*C. jejuni* リピド A とセラミド GM1 糖鎖部の複合体の合成について検討を行った。

C. jejuni リピド A 合成について、多様な脂質をもつリピド A の合成に対応するために、適切に保護された二糖中間体に順次脂肪酸を入れる方策を採用した。松浦氏は、脂質の導入順、縮合剤、溶媒等に様々な検討を行って効率合成経路を確立し、さらに液々分配クロマトグラフィーによる精製を検討して、*C. jejuni* リピド A の合成に成功した。続いて、GM1 糖鎖をリピド A の複合体の合成のために、基本的な分子設計と合成経路について検討を行なった。

以上の業績によって、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。