

Title	ワクチンアジュバント開発を指向した共生菌・酢酸菌由来リピドAの化学合成および機能評価
Author(s)	山浦, 遼生
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96398
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (山浦 遼生)

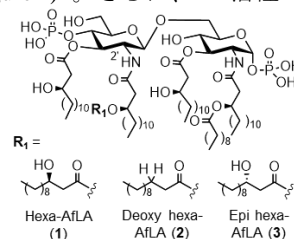
論文題名 ワクチンアジュバント開発を指向した共生菌・酢酸菌由来リポドAの化学合成および機能評価

論文内容の要旨

グラム陰性菌の外膜構成成分リポ多糖(LPS)は代表的な自然免疫活性化因子であり、多糖構造の末端に活性中心である糖脂質リポドAが結合した構造を有する。LPSやリポドAは、ワクチンの効果を高めるアジュバント作用を有する一方で、強い炎症作用に由来する毒性も示す。そこで、宿主免疫制御への関連が示唆された細菌種から適度な免疫応答を誘導するアジュバントを見出すという戦略を立て、腸内共生菌ならびに酢酸製造菌のリポドAに着目した。

①共生菌リポドAの合成および特徴的ヒドロキシ基に着目した構造活性相関研究

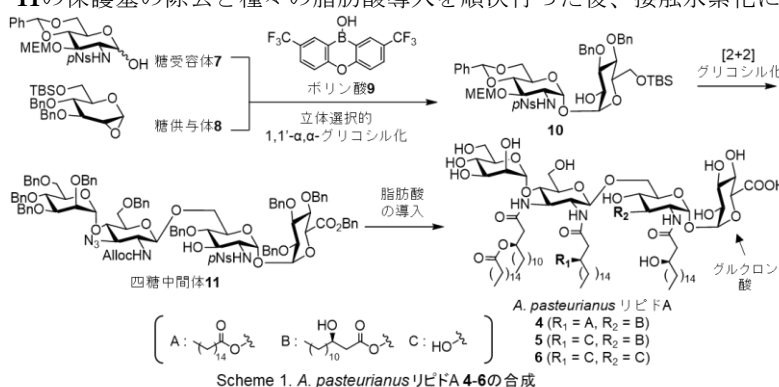
我々は以前、腸管リンパ組織共生菌*Alcaligenes faecalis*由来LPSが低毒性ながら顕著な抗体産生増強作用を示すことを明らかにし、アジュバントとしての有用性を示したり。本研究では、脂質パターンの異なる*A. faecalis*リポドAを系統的に合成し、Hexa-AfLA (1)が*A. faecalis* LPSの活性中心構造であることを示した(Figure 1)²⁾。さらに、1の活性の向上を目指し、2'位の脂肪酸側鎖に存在する特徴的ヒドロキシ基に着目し、類縁体2, 3を含む6種類の類縁体群を合成した(Figure 1)。LPS受容体を発現するHEK-Blue™ hTLR4細胞を用いた評価により、特徴的ヒドロキシ基が欠落したDeoxy hexa-AfLA (2)が1と比較して顕著に活性が低下し、着目したヒドロキシ基が1の活性に重要な構造であることが分かった。さらに、1のエピマーであるEpi hexa-AfLA (3)は、マウスへの経鼻投与によるIgA抗体産生増強作用において、1よりも顕著に高い活性を示すことが明らかになり、高活性な経鼻アジュバント候補化合物の探索に成功した³⁾。

Figure 1. *A. faecalis*リポドAおよびその類縁体

②酢酸菌リポドAの化学合成及び活性評価

以前、我々は鹿児島大の橋本らと共同で、発酵黒酢に含まれる酢酸菌*Acetobacter pasteurianus*由来のLPSが温和な免疫刺激活性を有し、黒酢の免疫賦活成分の候補物質であることを示した⁴⁾。また、*A. pasteurianus*リポドAが四糖骨格と複数の脂質から成るユニークな化学構造を有することが明らかになった⁴⁾。そこで我々は、天然に存在する三種の*A. pasteurianus*リポドA 4-6 (Scheme 1)の系統的合成を行い、*A. pasteurianus* LPSの活性中心構造の同定を目指した。

まず、1,1'- α,α -グリコシド結合で連結されたトレハロサミン骨格10を合成した(Scheme 1)。ポリン酸⁵⁾を触媒に用いたグルコサミン糖受容体7と糖供与体8のグリコシル化を検討し、*p*-Ns基を有する糖受容体7を用いた際に高収率かつ高立体選択的に目的の1,1'- α,α -グリコシド10を得ることに成功した。続いて、非還元末端二糖とのグリコシル化を行い、四糖中間体11を得ることに成功した。11の保護基の除去と種々の脂肪酸導入を順次行った後、接触水素化により全ての保護基を除去することで、4-6の初の化学合成を達成した。HEK-Blue™ mTLR4細胞を用いて活性評価を行ったところ、4および5が高い活性を示し、*A. pasteurianus* LPSの活性中心であるリポドAの化学構造を同定した。さらに、構造活性相関研究により、*A. pasteurianus*リポドAに特徴的なグルクロン酸構造が4の免疫学的機能および耐酸性機能に重要であることを明らかにした⁶⁾。



Ref: 1) N. Shibata, A. Shimoyama, K. Fukase, H. Kiyono, et al., *Mucosal Immunol.*, **2018**, *11*, 693. 2) A. Shimoyama, H. Yamaura, K. Fukase, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 10023-10031. 3) H. Yamaura, A. Shimoyama, K. Fukase et al., *in preparation*. 4) M. Hashimoto, K. Fukase, Y. Fujimoto, et al., *J. Bio. Chem.*, **2016**, *291*, 21184-21194. 5) Y. Takemoto, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 14054-14059. 6) H. Yamaura, A. Shimoyama, K. Fukase et al., *submitted*.

論文内容の要旨

氏名 (山浦 遼生)

論文題名 ワクチンアジュバント開発を指向した共生菌・酢酸菌由来リポドAの化学合成および機能評価

論文内容の要旨

Lipopolysaccharide (LPS), one of the cell surface components of Gram-negative bacteria, activates innate immunity. LPS and its active entity lipid A have potential as adjuvants that enhance the vaccine efficacy, but canonical *Escherichia coli* LPS has highly inflammatory effect and exhibits lethal toxicity. In this study, we established a strategy to develop adjuvants that induce appropriate immune responses from bacterial species that have been suggested to contribute to host immune regulation.

① Synthesis of symbiotic bacterial lipid A and its structure-activity relationship study

We previously demonstrated that LPS from a gut symbiotic bacterium *Alcaligenes faecalis* has low inflammatory but antibody-enhancing activity to show it is a promising adjuvant¹⁾. In this study, we systematically synthesized *A. faecalis* lipid A with different fatty acid patterns and showed that hexa-AfLA (**1**) is the active principle of *A. faecalis* LPS (Figure 1)²⁾. Furthermore, to improve the activity of **1**, we focused on the characteristic hydroxyl group in the secondary fatty acid at the 2' position of **1** and synthesized six kinds of AfLA analogues including **2** and **3** (Figure 1). After biological evaluation using HEK-Blue™ hTLR4 cells

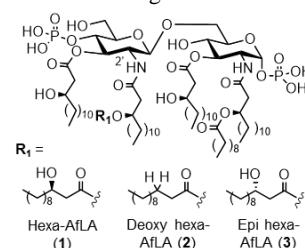


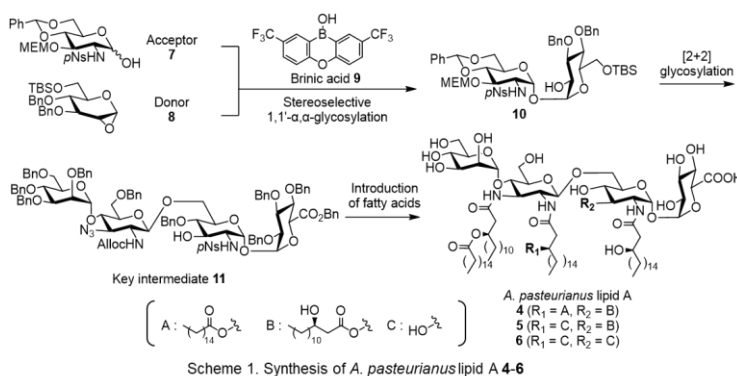
Figure 1. *A. faecalis* lipid A and its analogues

expressing the LPS receptor, we revealed that deoxy hexa-AfLA (**2**), which lacks the focused hydroxyl group, had a significantly lower activity than **1** to find the focused hydroxy group is key structure for the activity of **1**. Furthermore, epi hexa-AfLA (**3**), an epimer of **1**, was found to exhibit higher activity than **1** in IgA-enhancing activity after intranasal administration to mice³⁾.

② Chemical synthesis and functional evaluation of acetic acid bacterial lipid A

Previously, Hashimoto et al. demonstrated that LPS from an acetic acid bacterium *Acetobacter pasteurianus*, which is contained in fermented black vinegar, has mild immunostimulatory activity and is a candidate for the immunostimulatory component of black vinegar⁴⁾. It was also revealed that *A. pasteurianus* lipid A has a unique structure including a tetrasaccharide backbone with multiple fatty acids⁴⁾. In this study, we systematically synthesized three types of *A. pasteurianus* lipid As **4-6** (Scheme 1) to identify the active principle of *A. pasteurianus* LPS.

We first investigated the efficient construction of 2-trehalosamine **10** (Scheme 1). After investigation of protecting groups at 2-position in borinic acid **9**⁵⁾ catalyzed-glycosylation, glycosyl acceptor **7** having *p*-Ns group was found to afford 1,1'- α -glycoside **10** in high yield and high stereoselectivity. Subsequently, [2+2] glycosylation was performed to obtain tetrasaccharide intermediate **11**. After introduction of various fatty acids into appropriate positions of **11**, we cleaved all protecting groups by catalytic hydrogenation to achieve the first chemical synthesis of **4-6**. After biological evaluation using HEK-Blue™ mTLR4 cells, **4** and **5** showed immunostimulatory activity to identify active principle of *A. pasteurianus* LPS. Furthermore, structure-activity relationship studies revealed that the glucuronic acid residue, a characteristic structure of *A. pasteurianus* lipid A, is important for the immunological and acid-resistant functions of **4**⁶⁾.



Scheme 1. Synthesis of *A. pasteurianus* lipid A **4-6**

After biological evaluation using HEK-Blue™ mTLR4 cells, **4** and **5** showed immunostimulatory activity to identify active principle of *A. pasteurianus* LPS. Furthermore, structure-activity relationship studies revealed that the glucuronic acid residue, a characteristic structure of *A. pasteurianus* lipid A, is important for the immunological and acid-resistant functions of **4**⁶⁾.

Ref: 1) N. Shibata, A. Shimoyama, K. Fukase, H. Kiyono, et al., *Mucosal Immunol.*, **2018**, *11*, 693. 2) A. Shimoyama, H. Yamaura, K. Fukase, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 10023-10031. 3) H. Yamaura, A. Shimoyama, K. Fukase et al., *in preparation*. 4) M. Hashimoto, K. Fukase, Y. Fujimoto, et al., *J. Bio. Chem.*, **2016**, *291*, 21184–21194. 5) Y. Takemoto, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 14054–14059. 6) H. Yamaura, A. Shimoyama, K. Fukase et al., *submitted*.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山浦 遼生)		
	(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	招へい教授 國澤 純

論文審査の結果の要旨

山浦遼生氏は、ワクチンアジュバント開発を指向した共生菌・酢酸菌由来リピド A の化学合成および機能評価について研究を行った。

リポ多糖(LPS)やその活性中心である糖脂質リピド A は、自然免疫を活性化して抗体産生増強など獲得免疫を活性化する。これらは、ワクチンの効果を高めるアジュバント作用を有する一方で、強い炎症作用に由来する毒性も示す。そこで、山浦氏は、共生菌や発酵菌由来のリポ多糖・リピド A が宿主免疫を制御し、適度な免疫応答を誘導するという仮説のもとに、炎症性の低いアジュバントとして、腸内共生菌ならびに酢酸製造菌のリピド A に着目した研究を行った。

腸管リンパ組織共生菌 *Alcaligenes faecalis* 由来 LPS は低毒性ながら顕著な抗体産生増強作用を示す。その活性中心と考えられる糖脂質リピド A について、脂肪酸の数が異なる 3 種の同族体を系統的に合成し、免疫増強活性を評価した。その結果、山浦氏は 6 個の脂肪酸を有するリピド A (Hexa-AfLA) が活性本体であることを見出した。さらに、山浦氏は、2' 位の脂肪酸側鎖に存在する特徴的ヒドロキシ基に着目し、6 種類の類縁体群を合成し、構造活性相関研究を行った。その中から、天然型の Hexa-AfLA よりも、ヒト、マウスの両系において、より高い免疫増強作用を示し、マウスへの経鼻投与による IgA 抗体産生増強作用が顕著に高い化合物群を見出した。これらの化合物は、高活性な新規経鼻アジュバント候補化合物として有望である。

発酵黒酢に含まれる酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* 由来の LPS が温和な免疫刺激活性を有し、黒酢の免疫賦活成分の候補物質であることが示されていた。本研究では、四糖骨格から成るユニークな *A. pasteurianus* リピド A について、脂肪酸の数の異なる三種の *A. pasteurianus* リピド A の系統的合成を行った。1,1' - α, α -グリコシド結合で連結されたトレハロサミン骨格の合成について、2 位を p-Ns 基で保護したグルコサミン糖受容体と 1,2-エポキシ糖供与体のポリリン酸触媒を用いたグリコシル化反応を行い、高収率かつ高立体選択的に目的の 1,1' - α, α -グリコシドを得ることに成功した。続いて、非還元末端二糖とのグリコシル化を行い、四糖中間体に導いた後、保護基の除去と脂肪酸導入を順次行った後、全ての保護基を除去することで、*A. pasteurianus* リピド A の初の化学合成を達成した。また三種のリピド A の生物活性を測定し、*A. pasteurianus* LPS の活性中心であるリピド A の化学構造を同定した。さらに、構造活性相関研究により、*A. pasteurianus* リピド A に特徴的なグルクロン酸構造が 4 の免疫学的機能および耐酸性機能に重要であることを明らかにした。

以上の成果は、複雑な複合糖質の合成研究、新規なアジュバント探索研究の両方において、極めて優れた業績である。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。