

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01822

研究課題名(和文) ヒト抗体が認識するLPS/LOS内部コア糖鎖の合成とエピトープ解析

研究課題名(英文) Synthetic study of inner-core oligosaccharide of LPS/LOS recognized by human antibody

研究代表者

一柳 剛 (Ichiyangi, Tsuyoshi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00302240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グラム陰性菌が産生するリポ多糖(LPS)のコア糖鎖はワクチン開発の標的である。本研究はコア糖鎖合成法の開発と糖鎖プローブの作成を行った。また合成コア糖鎖を認識するヒト抗体選抜、その免疫学的性質の解明を行った。その結果、マンノ型3,4分岐構造の効率的合成、4,5分岐Kdo構造の効率的構築を達成し、ピシナルジオール分岐が連続したコア糖鎖の完全立体選択的合成を初めて達成し10種の糖鎖合成を完了した。つづいてビオチン及び磁気粒子コンジュゲートの作成を行った。そしてこれらを使用して、市販のヒト抗体より糖鎖認識抗体の選抜を行い抗体を得た。これらは菌体由来LPSの低分子領域を認識することを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：The synthesis of continuously branched core hexasaccharide produced by gram-negative bacteria was successfully accomplished by using block coupling of the oligosaccharide donor with a 2-4 linked Kdo acceptor. For the construction of 3,4-branched heptose structure, the use of toluene was found to be effective solvent from a 4-O-substituted heptose with a heptose donor. The 4,5-branched tri-, tetra-, and pentasaccharide were also synthesized with complete stereoselectivity by the same manner. The oligosaccharide-biotin conjugate and sugar coated magnetic nanoparticle were synthesized. The human IgG selected by using the synthetic carbohydrate coated magnetic nanoparticle was found to recognized Salmonella minnesota Re-LPS.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：リポ多糖 コアオリゴ糖 立体選択的合成 Kdo Heptose 糖鎖プローブ 抗体

1. 研究開始当初の背景

国内外を問わず淋菌やクラミジアによる性感染症が拡大していること、アフリカ中部での髄膜炎菌の蔓延による乳幼児の死亡率が高いことが深刻な問題となっている。そのため安価で効果的な病原性グラム陰性細菌感染防御法の開発が急務である。現在グラム陰性菌が細胞外膜に産生するリポ多糖(LPS)/リポオリゴ糖(LOS)がワクチン開発の標的分子として注目されている。

LPS/LOSは多糖(PS)、オリゴ糖(OS)が脂質部Lipid Aに結合した構造をもつ。そのPS/OS部には内部コア糖鎖と呼ばれる属による構造不変領域とそれ以外の可変領域が存在する。内部コア糖鎖は2-ケト-3-デオキシマンノオクツロン酸(Kdo)と7炭糖のマンノヘプトース(Hep)を中心に構成され、これらはヒトには存在しないことから安全な免疫源と期待されている。

2. 研究の目的

近年PS/OS部分を認識するヒト抗体の存在が見いだされ、内部コア糖鎖に結合する殺菌性のヒト抗体が存在することも報告された。しかしこの抗体がコア糖鎖のどの部分構造を認識しているかは未解明である。このエpitepの解明にはプローブとして構造が単一のコア糖鎖が必要である。しかし、グラム陰性菌のコア糖鎖は市販されてない。また分子生物学的手法では糖鎖不均一性のために純粋な糖鎖標品を得ることが困難である。本研究では、単一構造を持つ糖鎖の化学合成法を確立し、これらをプローブとしてエpitep解明に利用することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下に挙げる4つの課題解決に取り組んだ。

(1) 内部コア糖鎖の立体選択的合成法の確立と糖鎖ライブラリの作成

Kdo 供与体を用いる分子内グリコシド結合形成反応を検証する。

環状 Kdo 供与体を用いたグリコシル化反応の立体選択性を検証する。

構造が異なる 2~5 糖の内部コア糖鎖ライブラリを作成する

(2) 糖鎖プローブの作成

合成糖鎖-ビオチン、タンパクコンジュゲートを作成する。

糖鎖に結合するヒト抗体の精製方法を検討する

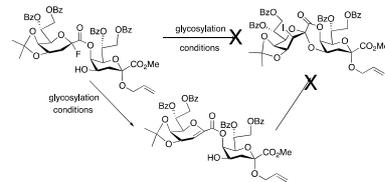
(3) 合成糖鎖を用いた免疫賦活性評価 合成糖鎖を用いた NO 産生誘導能を評価する。

(4) 合成糖鎖結合ヒト抗体の選抜とエpitep解析に向けた分析基礎条件の確立

4. 研究成果

(1) 内部コア糖鎖の立体選択的合成法の確立と糖鎖ライブラリの作成

● Kdo 供与体を用いる分子内グリコシド結合形成反応：受容体となる Kdo の 5 位水酸基と供与体 Kdo の 1 位カルボキシ基をエステル結合により架橋し、分子内での一般的なグリコシル化反応を試みた。その結果、期待した分子内でのグリコシル化反応は進行しなかった。主生成物は供与体側 Kdo の 2,3 位不飽和体となった。この不飽和エステルを N-ヨードコハクイミドで活性化したヨードグリコシル化を試みたが、期待した反応生成物を得ることは出来なかった。

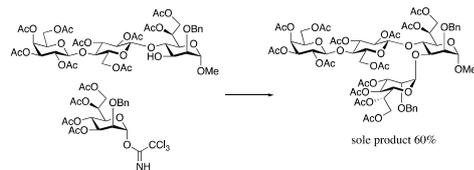


この結果から期待した環状化合物の構造のひずみが大きく、環化による構造安定化が反応の推進力とはならないことが示された。

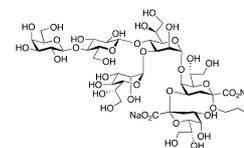
● 構造が異なる 2~5 糖の内部コア糖鎖ライブラリの作成

LPS/LOSの多くに共通して存在する Kdo2 糖を含む 10 種の分岐 3~6 糖、中性直鎖及び分岐オリゴ糖合成を達成した。

3,4-分岐ヘプトース合成では、反応溶媒としてトルエンを用いることで、従来の立体配座変換法と同等以上の収率で分岐構造構築出来ることを見いだした。



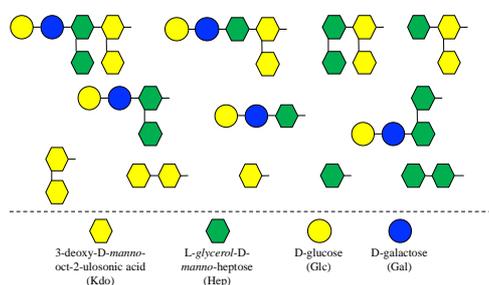
Kdo 2 糖へのオリゴ糖導入では完全 立体選択的導入を達成した。また、ピシナルジオール分岐構造が連続した酸性内部コアオリゴ糖合成を初めて達成した。(投稿準備中)



(2) 糖鎖プローブの作成

上記で合成した糖鎖の還元末端アシル基にチオグリコール酸を付加した後、ヒドラジンアミド変換後にビオチン化した。また同様の手法により磁気粒子と結合したプローブ作成を行った。その結果、チオグリコール酸の付加反応では糖鎖の大きさによる反応性の違いが認められたが、磁気粒子との縮合では

顕著な反応性の差異は認められなかった。



(3) 合成糖鎖を用いた免疫賦活活性評価

Kdo, Kdo 2 糖, 4,5 分岐 Kdo 3 糖を使用して化成評価を行ったが免疫賦活活性はほとんど認められなかった。

(4) 合成糖鎖結合ヒト抗体の選抜

合成した磁気粒子コンジュゲートのうち 6 種を使用して, 市販のヒト抗体 IgG より糖鎖結合抗体を選抜した。その結果, ヒト IgG 10 mg から 3-7 mg の糖鎖結合抗体を得ることが出来た。選抜した抗体の特異性を調べたところ, 菌体由来 LPS に対して, 低分子領域の LPS に対して結合すること。特にいずれの抗体も Kdo(α 2-4)Kdo に対し共通して結合することが確認できた。一方, 分岐オリゴ糖で選抜した抗体は菌体由来の LPS にほとんど結合を示さなかったことから, これらの抗体はコア糖鎖をエピトープしているのではなく, 真のリガンドは別に存在する可能性, あるいは 0 抗原糖鎖の存在によりそのエピトープの構造が変化している可能性が示唆された。

本研究では, 当初予定していた得られた抗体の殺菌能を明らかにすること, 菌体由来 LPS より選抜したヒト抗体との競合阻害実験を実施することが期間中に実施することが出来なかった。

今後これらを調査することにより, 抗原として利用可能かを明らかにすること, 合成コア糖鎖を抗原とした抗体産生を試み, その機能を評価得ることで, ワクチン開発へ展開が期待できる。

以上, 本課題における成果は細菌が産生する複合糖質糖鎖の立体選択的かつ効率的合成戦略の新たな概念を提示したものであり, LPS コア糖鎖の分子機能解明に向けた基礎を確立できたものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Tsuyoshi Ichiyanagi, Recent synthetic approaches to inner-core oligosaccharides of lipopolysaccharides and

lipooligosaccharides. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 査読有, 2018, 30, E25-E32, J11-J18. doi:10.4052/tigg.1709.1E

2. Naoki Ube, Miho Nishizaka, Tsuyoshi Ichiyanagi, Kotomi Ueno, Shin Taketa, Atsushi Ishihara “Evolutionary changes in defensive metabolism in the *Hordeum* genus”, *Phytochemistry*, 査読有, 2017, 141, 1-10. doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.05.004

3. Ruiqin Yi, Hirofumi Narimoto, Miku Nozoe, Tsuyoshi Ichiyanagi, Convergent synthesis of 4,5-branched inner-core oligosaccharides of lipopoly- and lipooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 2015, 79, 1931-1945. doi: 10.1080/09168451.2015.1069698

4. Totsaporn Srisapoomi, Tsuyoshi Ichiyanagi, Hiromitsu Nakajima, Tadanori Aimi and Sophon Boonlue, Biosynthesis of Integric Acid Isolated from the Wood-Decay Fungus *Xylaria feejeensis* 2FB-PPM08M. *Curr. Microbiol.* 査読有, 2015, 70, 550-555. <http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/>

[学会発表](計17件)

1. 一柳 剛, 合成化学的手法によるリポ多糖の内部コア糖鎖ライブラリ構築と活用, かがわ糖質バイオフォーラム「複合糖質・糖鎖研究会」(基調講演) 2018 年

2. 大谷直輝, 一柳 剛, L,D-ヘプトース含有オリゴ糖の合成研究, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

3. 一柳 剛, 田中奈央, 藪田行哲, Kdo 含有糖鎖で修飾した磁気ナノ粒子の作成と機能評価, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

4. Tsuyoshi Ichiyanagi, Hirofumi Narimoto: A SYNTHESIS OF A CONTINUOUS BRANCHED HEXASACCHARIDE OF INNER-CORE OF LPS/LOS, 19th European Carbohydrate Symposium, 2017 年

5. Tsuyoshi Ichiyanagi, Synthetic Study of Branched Inner-core Oligosaccharide of Lipopoly- and Lipooligosaccharide, KoRS-CB Mini-Symposium Carbohydrates: Chemistry and Biology, (招待講演) 2017 年

6. 一柳 剛, 成本裕文, 大谷直輝, *Neisseria* 属 LOS の分岐コア糖鎖の合成研究, 第 36 回日本糖質学会年会, 2017 年

7. 一柳 剛, 成本裕文, 野添未来, リポ多糖(LPS)の酸性コア糖鎖の合成研究, 日本農芸化学会中四国支部第 4 8 回講演会, 2017 年

8. 一柳 剛, 野口晴佳, 田中琢也, 田中奈央, 谷川優作, LPS のコア糖鎖合成に向けた新規 Kdo 誘導体の合成, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

9 . 成本裕文, 野添未来, 一柳 剛, 連続分岐した LPS/LOS の内部コア糖鎖の合成研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

10 . 成本裕文, 蟻 瑞欽, 野添未来, 一柳 剛, ブロック合成による分岐構造を有する LPS/LOS の酸性内部コア 4 糖および 5 糖の合成研究, 第 35 回日本糖質学会, 2016 年

11 . 野口晴佳, 田坂瑞葵, 田中琢也, 一柳 剛, Kdo 誘導体を供与体に用いる立体選択的グリコシル化反応, 第 35 回日本糖質学会, 2016 年

12 . 一柳 剛, 田坂瑞葵, 村岡南美, 田中琢也, リポ多糖の酸性内部コア Kdo2 糖の合成研究—Kdo 供与体の配座と反応性の比較—, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年

13 . 成本裕文, 蟻瑞欽, 野添未来, 一柳 剛, リポオリゴ糖の酸性内部コア 4 糖および 5 糖の合成, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 2016 年 3 月

14 . 石井亮, 一柳 剛, (+)-マグノフロリンの不斉全合成研究, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年

15 . Tsuyoshi Ichiyanagi, Ruiqin Yi, Yuichi Nagasawa, Hirofumi Narimoto, Miku Nozoe, A convergent synthesis of branched inner-core oligosaccharide of Neisserial LOS and their biotin conjugates, 23rd International Symposium on Glycoconjugate, 2015 年

16 . 成本裕文, 蟻瑞欽, 野添未来, 一柳 剛, 分岐構造を有するリポオリゴ糖の酸性内部コア糖鎖の化学合成, 第 34 回日本糖質学会年会, 2015 年

17 . 一柳 剛, LPS/LOS の酸性コア糖鎖の化学合成研究, 日本農芸化学会中四国支部創立 15 周年記念 第 19 回若手研究者シンポジウム(第 7 回農芸化学の未来開拓セミナー), 岡山大学, (招待講演) 2015 年

〔その他〕
ホームページ等
<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/yagi/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

一柳 剛 (ICHIYANAGI, Tsuyoshi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号 : 00302240