

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05845

研究課題名(和文) LPS内部コア糖鎖の収斂合成法の開発および殺菌性ヒト抗体の認識部位の解明

研究課題名(英文) Development of convergent synthesis of LPS Internal core oligosaccharides and recognition sites of bactericidal human antibodies

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：髄膜炎や淋病のを引き起こすナイセリア属細菌が産生する複合糖脂質(LPS)の構造普遍領域(コア糖鎖)を標的として、化学的手法により隣接位で連続分岐した高炭素糖で構成されるオリゴ糖の立体選択的合成方法を確立し髄膜炎菌LPSのコア七糖の合成を達成した。この方法論を用いてコア糖鎖ライブラリー、およびヘモフィルス属LPSの部分コア糖鎖ライブラリーを作成した。さらに合成糖鎖と磁気粒子のコンジュゲート、脂質とのコンジュゲートを作成し、バイオプローブの合成方法を確立した。このうち合成糖鎖で修飾した糖鎖磁気粒子を用いて、市販のヒト抗体IgG、IgMに糖鎖ヒト抗体が存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、髄膜炎菌や淋菌が産生する複合糖質の糖鎖を単一構造として得る化学合成方法を確立した。さらに合成した糖鎖を認識するヒト抗体の存在を確認した。この成果は髄膜炎や淋病に対する感染予防ワクチン開発に貢献することが可能であるだけでなく、他の病原性グラム陰性菌の感染予防ワクチン開発にも応用が可能である。また合成した糖脂質は、自然免疫における糖鎖の機能解明に貢献が可能である。

研究成果の概要(英文)：We have established a stereoselective synthesis of inner-core oligosaccharide (core OS) of lipooligosaccharide produced by *Neisseria meningitidis* and *N. gonorrhoeae*. Using this methodology, we prepared a library of partial core OS of Neisserial LOS and *Haemophilus* LPS. Furthermore, we prepared conjugates of synthetic glycans with magnetic particles and lipids and established a synthetic method for bio probes. Using magnetic particles modified with synthetic glycans, we found the presence of glycosylated human antibodies in commercially available human antibodies IgG and IgM.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：リポ多糖 コア糖鎖 ワクチン 立体選択的合成 糖鎖ライブラリー 糖鎖合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

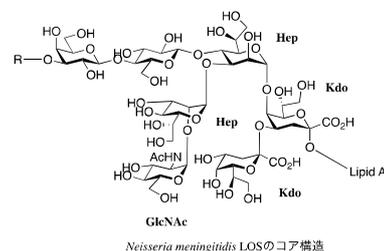
細菌による性感染症の拡大や細菌性髄膜炎による乳幼児感染者の高死亡率が問題となっている。これらの主たる原因はグラム陰性菌である *Neisseria* 属細菌による感染にある。これらに対する感染防御ワクチン開発プログラムが米国、欧州を中心に取り組まれている。その抗原として細菌の細胞外膜に存在する複合糖脂質 LPS/LOS が注目され、その構造普遍領域糖鎖(コア糖鎖)が安全な抗原候補となっている。このコア糖鎖を認識すると抗体の存在が明らかにされており、コア糖鎖に結合する殺菌性のヒト抗体が存在することも報告された。しかし、殺菌性ヒト抗体が LPS/LOS のどの糖鎖構造を認識し、その最小構造は何であるか？殺菌性抗体産生に必要な最小糖鎖構造は何か？が第1の「問い」である。この「問い」を解くために必要な糖鎖プローブの入手は容易ではない。構造が単一である糖鎖プローブを得る方法として化学合成法が期待できる。しかし、高炭素糖で構成される LPS/LOS のコア糖鎖の有効な構築法はまだない。隣接位で分岐した構造が連続する混雑した糖鎖構造をどのように構築するのか？が第二の「問い」としてあげられる。

2. 研究の目的

申請者は、LPS/LOS のコア糖鎖の免疫原性に着目し、コア糖鎖を認識する殺菌性ヒト抗体のエピトープとなる最小構造という「問い」を、合成化学的手法で作成した「単一構造を持つ糖鎖」ライブラリを用いて解き明かすことを最終の目的としている。本研究では上述の「問い」を解明するために以下の課題に取り組むことを目的とした。(1)連続分岐構造を有する *Neisseria* 属 LOS コア糖鎖の化学合成法の確立(2)コア糖鎖-磁気粒子コンジュゲートを使用したヒト抗体の選抜(3)選抜したヒト抗体の殺菌性の検証とエピトープの解析

3. 研究の方法

Neisseria 属 LOS のコア糖鎖構造を右図に示す。課題の高炭素糖である Kdo の *cis* 配置の分岐構造は、4 位に置換基を有する Kdo 受容体に Hep を還元末端に持つオリゴ糖供与体を縮合する方法で立体選択的に構築することとした。一方、3,4 に置換基を持つ Hep 誘導体の分岐構造は、4 位にラクトースユニットを持つ Hep 受容体に Hep もしくは Hep オリゴ糖供与体を付加する方法で構築することとする。この方法論を用いて、*Neisseria* 属 LOS コア糖鎖およびその部分糖鎖を合成し、酸性および中性コア糖鎖ライブラリーを構築することを目指す。



課題 合成糖鎖と磁気粒子、および脂質とのコンジュゲートによるプローブ作成では、合成糖鎖の還元末端アシル基を利用してリンカーを導入したのち、磁気粒子または脂質との縮合を行い、導入効率の最適化を行う。

課題 合成糖鎖磁気粒子を使用して、市販のヒト抗体 IgG, IgM から糖鎖結合抗体の選抜を行い、選抜した抗体を使用して各種 LPS に対する結合試験を試みる。また殺菌活性を評価する。

4. 研究成果

(1) 連続分岐構造を有するコア糖鎖の合成

3,4-分岐 Hep の合成 (Figure 1)

計画に従い、3 位に遊離水酸基、4 位にラクトースユニットを持つ Hep 受容体に対して Hep 供与体の導入を試みたところ、4 糖骨格を立体選択的に構築することが出来た。この反応では反応溶媒としてジクロロメタンやエーテル系溶媒を使用するよりもトルエンが最適であることを確認した。これは活性化された供与体がトルエンにより安定化されたことにより寿命が延びたためと考察している。一方、供与体の Hep の 2 位に NAP 基やグルコサミン誘導体の置換基が結合した供与体を用いたグリコシル化反応では、生成物を良好な収率で与えるが、立体選択性が低下することが確認された。この現象については、活性化された Hep 供与体の立体配座がイス型から大きく変化し、2 位置換基がエカトリアル配向に近い配置

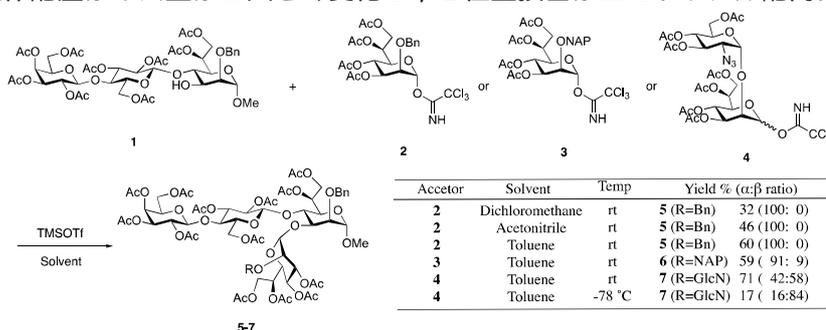


Figure 1

をとるために、受容体の攻撃面が制御できなかったためと考えられる。

連続分岐をもつコア糖鎖の合成(Figure 2)

4 位に置換基を持つ Kdo 二糖受容体の 5 位遊離水酸基に対して 3,4-分岐構造を持つ四糖および五糖供与体を縮合する反応が立体選択的、かつ 50%以上の良好な収率で進行することを確認した。これにより、髄膜炎菌が産生する LOS のコア七糖の完全立体選択的の合成を達成することに初めて成功した。

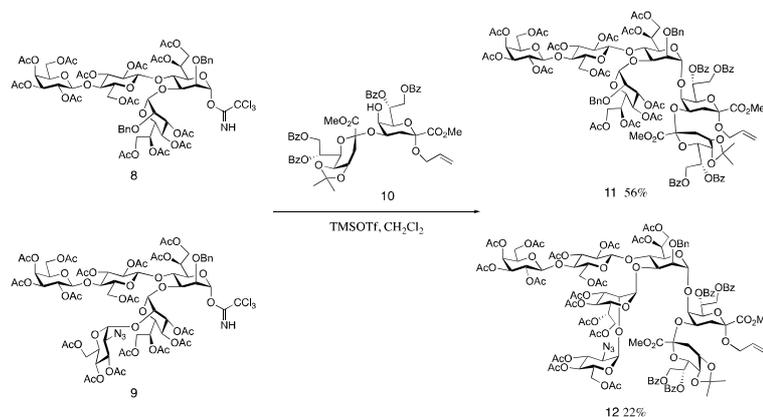


Figure 2

Hep2 位へのグルコサミンユニットの 立体選択的導入

Neisseria 属 LOS のコア糖鎖の場合、非還元末端側 Hep の 2 位にグルコサミンが結合した構造を持つ。この骨格構築を様々なグルコサミン誘導体を用いたグリコシル化反応で行うことを調査した。その結果、*N*-アセチル-2,3-*N,O*-trans-カーバメート基を有するグルコサミン誘導体を供与体として使用するグリコシル化反応で行うことで、完全立体選択的に結合した糖鎖を得ることに成功した。この反応はグリコシド結合が生成したのち、環内開裂反応を経由した異性化反応を伴うことによって立体選択性が発現していることを、反応中間体を単離することを通じて初めて明らかにした。

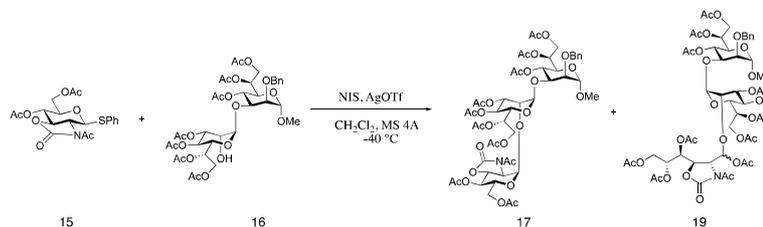


Figure 3

合成コア糖鎖ライブラリーの作成(Figure 4)

上述した、 の手法を使用して Neisseria 属, Haemophilus 属 LOS コア糖鎖の部分糖鎖ライブラリーの構築を達成した。

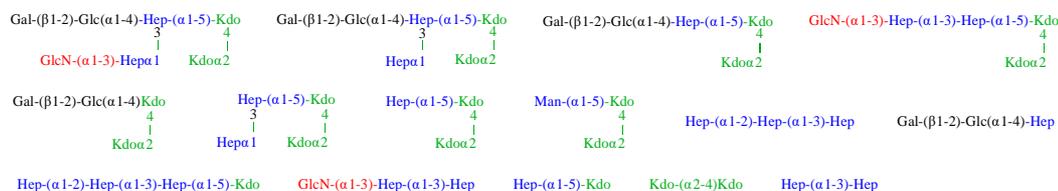


Figure 4

(2) 合成糖鎖と磁気粒子および脂質とのコンジュゲート作成

計画に従い合成糖鎖の還元末端のアリル基からチオグリコール酸エステルを伸長し、ヒドラジン処理の後、磁気粒子の活性エステルとの縮合反応により固定化を行い、5種の糖鎖修飾磁気粒子を作成した。一方、アリル基をオゾン酸化、続く Pinick 酸化によりカルボキシル基へと変換し、アルキルアミンとの縮合により対応する合成糖脂質を作成した。

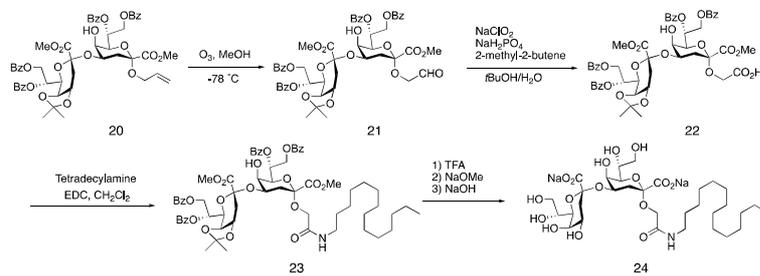
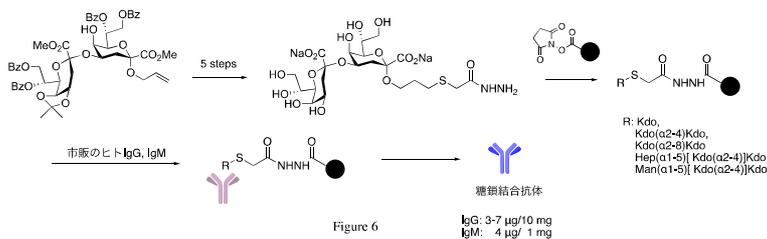


Figure 5

(3) 糖鎖結合ヒト抗体の選抜

上述した合成糖鎖磁気粒子を使用して、市販のヒト IgG および IgM を使用して糖鎖結合抗体の選抜を行った。その結果、10 mg の IgG より 3~4 μ g, 1 mg の IgM から 3 μ g の糖鎖ヒト抗体を選抜することが出来た。計画では選抜したヒト抗体を使用して淋菌に対する殺菌活性を調査する予定であったが、実施できておらず、今後の検討課題とした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichiyanagi Tsuyoshi, Narimoto Hirofumi, Ohtani Naoki	4. 巻 96
2. 論文標題 Synthesis of branched inner-core oligosaccharides of neisserial lipooligosaccharides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 132397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tet.2021.132397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 濱島将伍, 野口晴佳, 河村奈緒子, 田中秀則, 今村彰宏, 石田秀治, 一柳剛, 安藤弘宗
2. 発表標題 完全な 選択性を示すKdoグリコシド化法の開発とその利用
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 一柳 剛, 富樫佳祐, 後久保春花, 大谷直輝, 眞鍋史乃
2. 発表標題 異性化反応を利用するナイセリア LOS コア三糖の合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北山慎太郎, 石原亨, 馬越葵, 一柳剛
2. 発表標題 オオムギ由来モノガラクトシルモノリノレノイルグリセリドの合成と絶対立体配置の決定
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部朝渚, 尾川周平, 一柳剛
2. 発表標題 Haemophilus influenzae LPSのコア糖鎖ライブラリの合成
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾川周平, 服部 朝渚, 一柳 剛
2. 発表標題 Haemophilus属LPSのコア糖鎖の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一柳 剛, 大谷直輝, 尾川周平
2. 発表標題 Neisseria属細菌が産生するリポオリゴ糖の内部コア7糖の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浜島将伍, 野口晴佳, 河村奈緒子, 田中秀則, 今村彰宏, 石田 秀治, 一柳 剛, 安藤弘宗
2. 発表標題 完全に 選択的な Kdoグリコシド化法の開発研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富樫佳祐, 後久保春花, 尾川周平, 眞鍋史乃, 一柳 剛
2. 発表標題 Neisseria属LOSの中性コア3糖の合成
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾川周平, 富樫佳祐, 大谷直輝, 一柳 剛
2. 発表標題 Haemophilus属細菌が産生するリポ多糖の酸性内部コア糖鎖の合成研究
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧島将伍, 河村奈緒子, 田中秀則, 今村彰宏, 石田秀治, 一柳剛, 安藤弘宗
2. 発表標題 完全な 選択性を示す立体選択的Kdoグリコシド化法の開発研究
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾川周平, 大谷直輝, 織田健成, 一柳剛
2. 発表標題 L-glycero-D-manno-heptose からなるLPS内部コア3 糖の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富樫佳祐, 大谷直輝, 後久保春花, 一柳剛
2. 発表標題 様々なグルコサミン供与体によるヘプトース誘導体の2位水酸基への立体選択的グリコシル化
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜島将伍, 河村奈緒子, 田中秀則, 今村彰宏, 石田秀治, 一柳剛, 安藤弘宗
2. 発表標題 完全な 選択的Kdoグリコシド化法の開発研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 一柳剛, 大谷直輝, 成本裕文, 後久保春花
2. 発表標題 ナイセリア属細菌が産生するリポオリゴ糖の中性コア糖鎖の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Ichiyonagi, Ruiqin Yi, Naoki Otani
2. 発表標題 Synthesis of branched inner-core oligosaccharides expressed in lipopolysaccharide and lipooligosaccharide
3. 学会等名 ACS Fall 2019 National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Ichianagi
2. 発表標題 Isolation and structure determination of bioactive small molecules derived from fungal extract libraries in FMRC
3. 学会等名 3rd International Workshop on Mushroom Biology and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾川周平, 大谷直輝, 織田健成, 一柳剛
2. 発表標題 Haemophilus influenzae LPS の内部コア3糖の合成
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷直輝, 尾川周平, 後久保春花, 一柳剛
2. 発表標題 Neisseria属LOSの3,4-分岐ヘプトース構造を含む中性コア5糖の合成
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坂上吉一、富岡敏一、福田朔、馬渡一諭、高橋章、河原貴佳、網代広治、小沢隆、森康貴、原田彩花、新留琢郎、清野智史、小野智大、廉澤教雄、井手尾俊宏、杉本学、猪俣崇、安藤幹規、橋本岳人、小見山拓三、黒屋考正、櫻田理、山田修、城武昇一、矢木一弘、伊福伸介、一柳剛、森田洋、長尾朋和、荒木惟佑、瓦谷晴彦、他52名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 582
3. 書名 抗菌・抗ウイルス性能の材料への付与、加工技術と評価	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 クマリン骨格を有する抗ヘリコバクター活性物質	発明者 一柳剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-208982	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------