

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580474

研究課題名(和文) LPSの内部コア糖鎖に結合するヒト抗体のエピトープ解明に向けた糖鎖プローブ合成

研究課題名(英文) Synthesis of inner-core oligosaccharides of LPS and its protein conjugates for a definition of the epitope recognized by human antibodies

研究代表者

一柳 剛 (ICHIYANAGI, Tsuyoshi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00302240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では髄膜炎、淋菌、クラミジアなどの病原性グラム陰性菌が産生するリボ多糖(LPS)、リポオリゴ糖(LOS)の糖鎖に結合するヒト抗体の認識部位を明らかにするための9種類の糖鎖とそれらを標識化した糖鎖プローブの合成を達成した。合成した糖鎖はLPS/LOSのコア糖鎖と呼ばれる細菌の属によって保存されている糖鎖部位である。今後これらの糖鎖プローブを利用して細菌感染の仕組みを明らかにするとともに、ワクチン開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we successively achieved the synthesis of 9 type oligosaccharides, which are partial inner-core oligosaccharides of lipopolysaccharide/lipooligosaccharide produced by pathogenic gram-negative bacteria. And synthesized oligosaccharides were labeled with biotin and also conjugated to human serum albumin. These conjugates will be utilized for the definition of the epitope recognized by human antibody and the development of carbohydrate vaccine against pathogenic gram-negative bacterial infection.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：lipopolysaccharide lipooligosaccharide Kdo conjugate synthesis

1. 研究開始当初の背景

クラミジア、淋菌による感染症の拡大や、アフリカ中部では髄膜炎菌感染による乳幼児の死亡が非常に多いことが問題となっている。そのためこれらの感染防御法の開発が進められており、その中でもワクチンが最も有効とされている。現在ワクチン開発研究の標的分子の一つとしてリポ多糖(LPS)、リポオリゴ糖(LOS)の糖鎖が期待されている。

標的分子 LPS/LOS は多糖(PS)、オリゴ糖(OS)が Lipid A に結合した構造をもつ。PS/OS には「コア糖鎖」と呼ばれる構造不変領域とそれ以外の可変領域からなっており、「コア糖鎖」はヒトには存在しない、1~3 分子の 8 炭素骨格の酸性糖 2-ケト-3-デオキシマンノオクトロン酸(Kdo)と 2~3 分子のマンノヘプトース(Hep)から構成される。

これまでに PS/OS 部分を認識するヒト抗体の存在が見いだされ、また OS/PS の内部酸性コア糖鎖に特異的に結合する殺菌性のヒト抗体の存在が見いだされている。

これらのことより、粘膜を介して感染する病原性細菌が共通に発現するエピトープを明らかにすることができれば、人間に安全かつ幅広い活性を有するワクチンが開発可能であることが示唆された。従ってこのエピトープを解明するための構造が単一の糖鎖プローブを化学的手法により合成することができれば、ワクチン開発に大きく前進できるのではないかと考えた。

LPS/LOS 糖鎖の合成は、Brade, Paulsenらのグループ、国内では木曾、石田らの岐阜大グループ、深瀬らの大阪大グループが取り組まれており直鎖の Re-LPS の合成が達成されている。しかし酸性糖である Kdo を含む糖鎖合成については化学的、物理的性質が不明な点もあり、特に分岐型 Kdo 糖鎖の合成については1例あるのみで未開拓

であり、様々な構造を有するコア糖鎖の合成はなされていない。

申請者はこれまでに、入手が困難である構成糖 Kdo の効率的な合成(*J. Carbohydr. Chem.*, **2009**, *28*, 58-63.), および Hep 2 糖を中心とした淋菌 15253 菌株が産生する LOS のオリゴ糖合成を達成している。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに達成した Kdo 合成を利用して Kdo 糖鎖ライブラリを合成し、内部コア糖鎖を認識する殺菌性抗体のエピトープを調べるためのコア糖鎖ライブラリを作成することを第1の目的とした。第2にこの糖鎖を糖鎖プローブへと変換、さらに糖鎖プローブを利用して殺菌性ヒト抗体のエピトープ解析を行うことを目指した。

3. 研究の方法

これまでに開発したマンノースから Kdo 誘導体合成を利用して糖鎖ライブラリの作成方法を確立する、その後糖鎖コンジュゲート合成へと進め、ヒト抗体との結合実験を試みることにし、以下の課題に取り組んだ。

(1) コア糖鎖ライブラリの作成

① Kdo およびオリゴ糖供与体の合成

ライブラリ合成に必要な糖鎖ビルディングブロックを作成する。

② Kdo 4 位水酸基への α 選択的グリコシル化
Kdo 糖鎖合成で問題となっている、グリコシル化反応における立体選択性の問題を分子内グリコシル化とすることで解決を図る。

③ 酸性内部コア糖鎖の合成: 5 位水酸基へのオリゴ糖導入

Kdo 2 糖糖鎖への中性糖、およびオリゴ糖鎖の導入を検討し、糖鎖ライブラリを合成する。

(2) 酸性内部コア糖鎖コンジュゲートの合成

合成糖鎖を用いてビオチン標識化、および固相担体への導入、およびタンパクコンジュゲートを作成する。

(3)市販ヒト抗体と合成糖鎖コンジュゲートの結合実験

タンパクコンジュゲートおよびビオチン標識化糖鎖を用いて、ヒト抗体(IgG)結合実験を行い、結合録の高い糖鎖を選抜する。

4. 研究成果

本研究では、上記課題のうち(1),(2)について当初の目的を達成した。(3)についてはプローブとなる糖鎖コンジュゲート合成に時間を要したため、実験を試みる所に至らなかった。以下にそれぞれの結果について述べる。

(1) コア糖鎖ライブラリの作成

① これまでに開発したマンノースの C6 位かた 2 炭素伸長する経路で合成した Kdo を使用して LPS/LOS 内部コア糖鎖合成を試みたが、糖鎖伸張後の脱保護においてジチアンの除去が非常に困難であったため、新たな合成経路を開拓することとし、7,8 位にベンゾイル基 4,5 位にイソプロピリデン基を有する Kdo 誘導体として化合物 **1** を新たに設計しその合成方法を確立した。また化合物 **1** からフッ化糖供与体 **2**、および受容体 **3** へと変換し、4 位または 8 位水酸基とのグリコシル化反応を行うことにより、LPS/LOS に最もよく見出される 2 種類の Kdo 2 糖糖鎖 [Kdo(α 2-4)Kdo **4**, Kdo(α 2-8)Kdo **5**] 糖鎖の合成を達成した。(図 1)

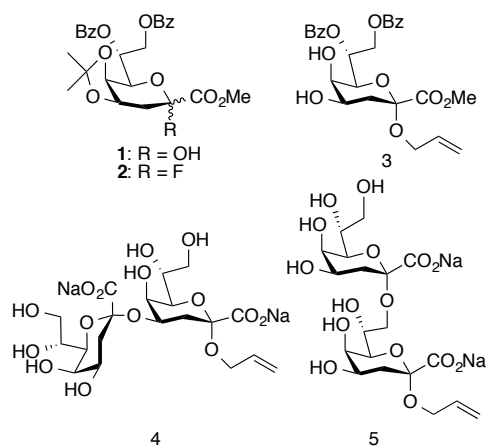


図1. 合成したKdo中間体およびKdo糖鎖

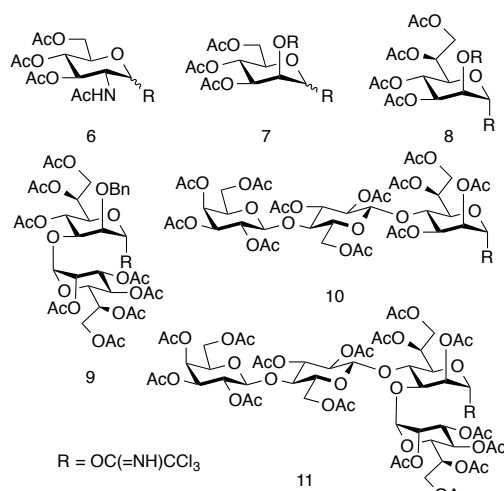


図2. 合成した中性コア糖鎖ブロック

また4,5-分岐Kdo糖鎖合成に向けた中性糖鎖ビルディングブロックを6種類調製した。(図2)

② Kdo 4 位水酸基への α 選択的グリコシル化はじめに、化合物 **1** から 1 位と 5 位でのラクトンを構築後アノマー位を脱離に基変換することを試みた。しかしながら、環外 C7 位のベンゾイル保護基の転移反応、続く C7-C1 のラクトン化など反応が複雑になったため、保護基の再検討が必要になった。一方糖供与体の 1 位カルボキシル基と糖受容体の 5 位水酸基をエステル化することで反応性および立体選択性の向上を試みた。この場合、4,5 位をイソプロピリデン基で結んでいることによるピラノース環の立体配座が船型に近い型になっていることが原因で、官能基変換の際にグリカル体生成が各段階で起こる問題が明らかになった。このことから 4,5 位の保護基についても再検討する必要が示された。

③ 酸性内部コア糖鎖の合成: 5 位水酸基へのオリゴ糖導入

マンノース、L,D-ヘプトース、2-デオキシ-2-アジドガラクトース誘導体を用いて Kdo(α 2-4)Kdo 2 糖の 5 位水酸基へのグリコシル化を検討した。その結果、目的とする 4,5-分岐 Kdo 糖鎖 **1 2-1 4** を得ることができた。(図 3)

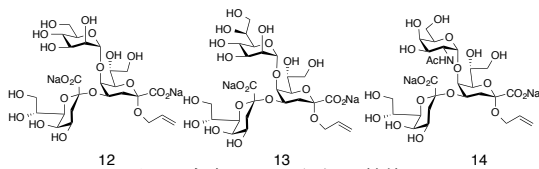


図3. 合成した4,5-分岐Kdo糖鎖

Paulsen らは、還元末端 Kdo の 5 位に糖を導入したのち、4 位に Kdo を導入する経路で 4,5-分岐 Kdo 合成を達成しているが、本研究ではまず 4 位に Kdo を導入したのち 5 位に導入する方法で分岐糖合成を達成した。このことは分岐糖合成において単糖を導入する場合の導入順は問題にならないことを示している。一方 Kdo の 5 位水酸基の反応性はガラクトース 4 位の反応性と大きく変わらないことが示された。一方マンノースとヘプトース供与体を比較したところ、ヘプトース供与体を用いた場合にのみオルトエステルの生成が認められたことから、環外水酸基はグリコシル化反応の途中で生成するオキソカルベニウムイオンを安定化に寄与する可能性が示唆された。環外水酸基の保護基の種類を変更することにより、ヘプトースの環外水酸基のグリコシル化への影響がより詳細に明らかにできると考えられる。

(2) 酸性内部コア糖鎖コンジュゲートの合成
Kdo と上記で合成した 3 種類の Kdo 糖鎖 Kdo(α 2-4)Kdo, Kdo(α 2-8)Kdo, Hep(α 1-5)[Kdo(α 2-4)]Kdo について、ビオチンとの縮合を行った。コンジュゲート作成において、糖鎖還元末端のアリル基に対してチオグリコール酸メチルを光化学反応によって導入した後、エステル部位をヒドラジンアミドへと変換、続いて側鎖カルボキシルを活性化したビオチンと縮合を行うことで、ビオチンコンジュゲートを得た。またアミノ基にて修飾された市販のアガロースゲルに対して、合成糖鎖のヒドラジンアミドをアシルアジド化経路して縮合させることにより、固相への固定化を行った。一方ヒトアルブミンに対しても同様に側鎖リシン残基にアシル化を経て合

成糖鎖を導入した。この際合成糖鎖はアルブミン 1 分子に対して平均 5 個程度結合したが、導入効率が低いことが明らかになったが、リンカーの長さを含めた反応条件の最適化により問題が解決可能であると考えられる。

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 5 件)

- ① Ruiqin Yi, Atsushi Ogaki, Mayumi Fukunaga, Hiromitsu Nakajima, Tsuyoshi Ichiyanagi “ Synthesis of 4,5-disubstituted-3-deoxy-D-manno-ulosonic acid (Kdo) derivatives ” *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 3675-3682. 査読有, DOI: 10.1016/j.tet.2014.04.024
- ② Tsuyoshi Ichiyanagi, “Recent synthetic study of inner-core saccharide of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides” *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2014**, *26*, 149, 77-78. 査読無, DOI: 10.4052/tigg.26.77.
- ③ Tsuyoshi Ichiyanagi, “Glycosylation Using an Organogold Complex as Promoter” *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2012**, *24*, 137, 132-133. 査読無, DOI: 10.4052/tigg.24.132.
- ④ Ryohei Yamasaki, Alice Ikezaki, Masaaki Seo, Tsuyoshi Ichiyanagi, Ichie Aoto, “ Western blot analysis of lipooligosaccharide at the lower femtomole level with normal human sera” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76(2)*, 294-298. 査読有, DOI: 10.1271/bbb.110664.
- ⑤ Tsuyoshi Ichiyanagi, Mayumi Fukunaga, Ryoya Tagashira, Shie Hayashi, Masato

Nanjo, Ryohei Yamasaki, "A new Kdo derivative for the synthesis of an inner-core disaccharide of lipopolysaccharides and lopoligosaccharides" *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5964-5971. 査読有, DOI:10.1016/j.tet.2011.06.039

[学会発表] (計13件)

- ① 田坂 瑞葵, 門脇 拓哉, 蟻 瑞欽, 一柳 剛, 分子内グリコシド結合形成反応を利用する Kdo2 糖の合成研究, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 明治大学生田キャンパス, 2014 年 3 月 29 日
- ② Ruiqin Yi, Mai Shimada, Tsuyoshi Ichiyanagi, Synthesis of 4,5-di-O-substituted-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) derivatives, 第 32 回日本糖質学会年会, 大阪国際センター, 2013 年 8 月 7 日
- ③ 庄野 結大, 大柿 敦嗣, 門脇 拓哉, 一柳 剛, 共通の中間体を用いた 2-8 結合を持つ Kdo2 糖の合成研究, 第 32 回日本糖質学会年会, 大阪国際センター, 2013 年 8 月 6 日
- ④ Tsuyoshi Ichiyanagi, Synthetic study of Kdo derivatives for branched inner-core oligosaccharides of LPS/LOS. KoRS-CB Kolloquium, Universität Konstanz, Germany 15 July 2013.
- ⑤ Tsuyoshi Ichiyanagi, Mai Shimada, Ruiqin Yi, SYNTHESIS OF GLYCOCONJUGATE CONTAINING IN THE INNER-CORE OLIGOSACCHARIDES EXPRESSED IN LPS/LOS 17th European Carbohydrate Symposium, Tel-Aviv, Israel, July 7-11, 2013
- ⑥ 一柳 剛, 庄野 結大, 蟻 瑞欽, 島田 麻衣, 大柿 敦嗣, 門脇 拓也, LPS/LOS の酸性内部コア糖鎖の合成研究, 日本農芸化学会 2013 年度大会 東北大学, 2013 年 3

月 26 日

- ⑦ Keita Shono, Atsushi Ogaki, Mai Shimada, Tsuyoshi Ichiyanagi, Synthesis of dimeric Kdo by using a common Kdo intermediate, 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), Madrid, Spain, 2012 年 7 月 28 日
- ⑧ Mai Shimada, Mayumi Fukunaga, Tsuyoshi Ichiyanagi, Synthesis of glycoconjugate precursors containing in acidic core oligosaccharide expressed in LPS/LOS, 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012), Madrid, Spain, 2012 年 7 月 28 日
- ⑨ 保坂 善真, 田村 純一, 一柳 剛, 上原 正人, コンドロイチン硫酸の糖鎖構造が決定する細胞分化の方向性, 第 153 回日本獣医学学術集会, 大宮ソニックシティ, 2012 年 3 月 28 日
- ⑩ 一柳 剛, 大柿 敦嗣, Yi Ruiqin, 庄野 結大, 島田 麻衣, LPS/LOS に存在する Kdo 2 糖の合成: Kdo 供与体の反応性, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 2012 年 3 月 24 日
- ⑪ 一柳 剛, 庄野 結大, 大柿 敦嗣, 島田 麻衣, 共通の中間体を用いた LPS に含まれる Kdo 2 糖 [Kdo(2-8)Kdo] の合成, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 2012 年 3 月 24 日
- ⑫ 一柳 剛, 島田 麻衣, 福永 真弓, 山崎 良平, LPS/LOS の分岐酸性コア 3 糖コンジュゲート前駆体の合成, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 2012 年 3 月 24 日
- ⑬ 一柳 剛, 福永 真弓, 田頭 亮哉, 山崎 良平, LOS/LPS の内部コア糖鎖合成に適した Kdo 誘導體合成, 日本糖質学会第 30 回年会, 新潟県長岡市 (ハイブ長岡) 2011 年 7 月 13 日

[その他]

ホームページ等

[http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/yana
gi/](http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/yana
gi/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一柳 剛 (ICHIYANAGI Tsuyoshi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00302240