

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450146

研究課題名(和文)肺炎マイコプラズマ感染診断プローブの開発研究

研究課題名(英文) Design, syntheses and diagnostic applications of beta(1-6)-linked glycolipids (GGLs) as the major cell membrane components of *Mycoplasma pneumoniae*

研究代表者

西田 芳弘 (NISHIDA, Yoshihiro)

千葉大学・融合科学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80183896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マイコプラズマ肺炎菌は非常に小さな細菌で、強い抗原提示をすることなく、ヒト免疫系を逃れて感染を繰り返し行う。そのことが早期診断が難しい理由になっていた。最近、我々は、肺炎マイコプラズマの細胞膜に一对の新規糖脂抗原が存在することを見出し、マイコプラズマGGLsと命名した。本研究では、脂質部位を様々変化したGGLsを合成して、診断プローブとしての有用性を評価した。その結果、合成GGLsを利用した新規診断法を開発することができた。また、GGLs分子の動的挙動を解析した結果、これら細胞膜脂質は細胞膜で自己組織化すること、また、ナトリウムイオンを捕捉する潜在能力をもつことを確認した。

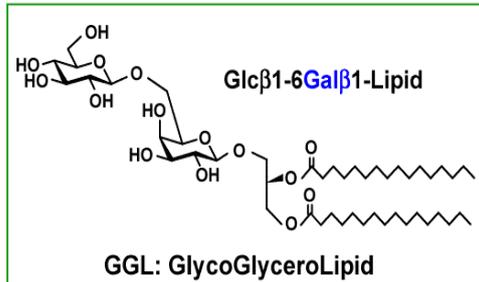
研究成果の概要(英文)：Mycoplasma is one of the simplest bacteria having no rigid cell walls and lipopolysaccharides (LPS). Instead, they utilize either alpha- or beta-glycolipids in cytoplasmic membrane. Also in our preceding studies, we have reported alpha-glycolipid antigens (GGPLs) in *M. fermentans* as well as beta-linked ones (GGLs) in *M. pneumoniae*. In the present study, we applied our glycosylation methods for the library assembly of GGLs homologues carrying variable acyl chains and examined their chemical behaviors. The chemical library involved a deuterium labeled GGL homologue for simultaneous MS detection of natural GGLs. It involved also an acetyl (C2) homologue for the study on molecular dynamics (MD). The assembled chemical library enabled us to elucidate the best GGLs homologue (GGLs C18) for the ELISA diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection and their possibility to make a crown ether-like ionophore around the non-reducing terminal end in their dynamic three dimensional (3D) structures.

研究分野：生物有機化学

キーワード：糖鎖 マイコプラズマ 感染診断 細胞膜 糖脂質 グリコシル化反応 三次元構造 脂質抗原

1. 研究開始当初の背景

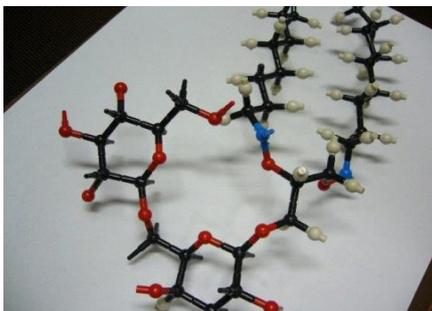
マイコプラズマ肺炎菌は直径 120 ~ 150nm 程度の極めて小さな細菌で、細菌でありながら細胞壁や LPS をもたないことを特徴とする。そのため、強い抗原提示をすることなく、ヒト免疫系を逃れて感染と増殖を繰り返し行う。強い免疫提示をしないために早期診断が難しいと考えられている。[1]



協力研究者である(株)エムバイオテックの松田和洋博士は、肺炎マイコプラズマの細胞膜に、グルコース型とガラクトース型の一対の新規糖脂抗原が存在することを見出し、GGLs (Glyco-Glycerol-Lipids) と命名した。[1,2] GGLsは、リン脂質と同じジアシルグリセロール型の細胞膜脂質であり、β-グルコース、又はβ-ガラクトースを二糖の非還元末端にもつ。この、一見、ありふれた「中性二糖」を細胞膜表面に提示してホストの免疫系を撓乱していると考えられる。

その一方で、GGLs はマイコプラズマ肺炎菌に特有の糖脂質抗原であり、感染の早期診断法の開発に加え、病原性発生機構の解明、抗マイコプラズマ剤の開発に繋がる重要な化合物である。申請者は平成 19 年、松田博士との共同研究で、GGLs の立体を含む全構造を明らかにした。[2] 平成 21-22 年、千葉大学 VBL 研究プロジェクトに参加し、その中で GGLs の化学合成法を確立した。また、合成遺伝子を用いて GGLs 合成酵素の一つをクローニング化することにも成功した。

本研究では、脂質鎖長の異なる各種 GGLs 誘導体を化学的に合成して、診断に最も適した GGLs 誘導体の化学構造を確定する。さらに、GGLs と病原性との関わりやマイコプラズマの生命活動における役割を検証するため、GGLs 分子の動的三次元構造を解析する。



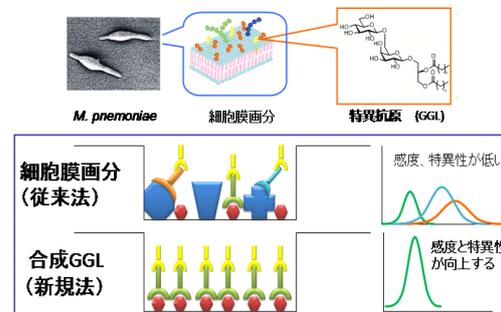
GGLs は、一見、ありふれた構造をもつ中性糖脂質である。しかし、非還元末端にβ1-6結合したグルコース (またはガラクトース) は、脂質部位 (tail 領域) 方向に折り返した立体構造をとると予想される (上図参照)。これが事実であれば、分子の頭部 (head 領域) に、複数の酸素原子がクラウンエーテル様に配置した特異な分子構造を呈することになる。ここに、ナトリウムやカルシウムなど、特定の金属イオンを取り込むことで、GGLs は思いもよらぬ高極性を head 領域に獲得し、細胞膜内で物質輸送などの生物学的役割を演じている可能性がある。

平成 19 年に始まった一連の研究は、(1) 肺炎菌に特有な糖脂質抗原 (GGLs) の発見と構造解明、(2) 合成 GGLs 供給法の確立、(3) 合成 GGLs を用いた早期診断法の開発と、すべてが独自のスキームで進行している。松田博士は、平成 21 年に、日本マイコプラズマ学会の協力を得て、マイコプラズマ関連疾患研究会を立ち上げ、西田らが化学合成した GGLs を用いて新規診断法の開発に着手した。研究会のメンバーは、合成 GGLs を単一抗原に用いた ELISA 診断プレートを試作し、新規診断法としての有効性を検証してきた。

2. 研究の目的

本プロジェクト研究では、次の 2 点を重要課題に掲げた。1 つは、診断における GGLs の脂肪酸部分の役割を明らかにすること。これにより、合成抗原 (GGLs) を用いた新規血清診断法を確立することが可能である (平成 25, 26 年度の目標)。平成 27 年度以降は、マイコプラズマ GGLs の生物学的な意味と病原性との関わりを探るため、水溶液中における三次元構造と動的挙動を明らかにする。

合成糖脂質抗原 (GGL) を利用した
マイコプラズマ感染新規診断法



平成 25,26 年度：従来、肺炎マイコプラズマの感染診断には、PA 法と呼ばれている免疫学的手法が利用されている。菌の外膜脂質成分を抽出したものを、ELISA (エライザ) 法に応用するものであるが、GGLs を初めとして多くの化合物を含むため、特異性と検出感度に問題があり、早期における確定診断に利用できていない。合成 GGLs を用いたマイコプラズマ診断法は、本菌に特有の抗原を用いるため、特異性が高く、感染初期における

IGM 抗体、中期における IgG 抗体を感度よく定量できることがわかってきた。

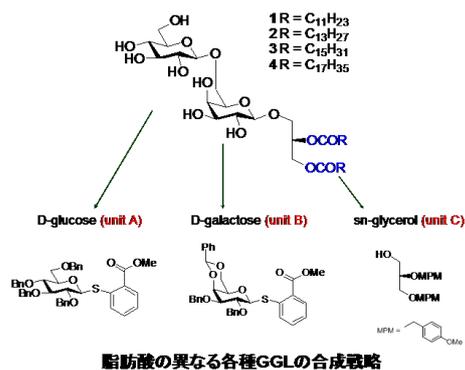
現在、脂肪酸の炭素数 C16 の合成抗原が利用されているが、自然界には炭素数 C18 の同属体が混在しており、脂肪酸部位の最適化が行われていない。平成 25、26 年度に、脂肪酸の炭素数を変えた数種の GGLs 誘導体を合成して、診断プローブに最適な GGLs 構造を明らかにしたい。

平成 27 年度以降： マイコプラズマ種は、化学構造がそれぞれ異なる糖脂質を細胞膜成分に持っている。その一方で、これらマイコプラズマ糖脂質の生物学的役割は解明されていない。GGLs の三次元構造を経験的分子力場解析 (MM2) したところ、1-6 結合した二糖の水酸基と環酸素、ならびに、グリセロール部位のエステル結合に含まれる複数の酸素原子が、クラウンエーテル様に配置する可能性が浮上した。もしこれが事実であれば、GGLs は、特定の金属イオン (鉄、カルシウム、マグネシウム、ナトリウムイオンなど) と複合体を形成して、細胞表面の電荷 (膜電位) を変化させることができる。GGLs が金属イオンを用いた物質輸送に関与する可能性もある。GGLs は、一見、単純な構造をもつ糖脂質ではあるが、これまでの認識を覆すような活性構造を提示する可能性がある。この仮説を、水溶性 GGLs 誘導体を合成して、NMR と MS スペクトル解析を行って、詳細な検証を進めたい。

3. 研究の方法

(1) 平成 25、26 年度：脂肪酸鎖長が異なる各種 GGLs 診断プローブ：化学合成と機能評価

平成 25 年度は、脂肪酸鎖長が異なる一連の GGLs ホモログ (C12-C18) を化学的に合成する。化学合成は、図に示したユニット合成戦略で実施する。GGLs を、(A) 糖非還元末端、(B) 糖還元末端、(C) グリセロール部位に分け、2 度のβ-グリコシル化反応によって GGLs 骨格を構築する。今回設計した 2 つの糖ユニットは、グリコシル化反応で脱離器として働くチオサリチル酸メチルエステルをアグリコンに持ち、適所、水酸基が保護されて



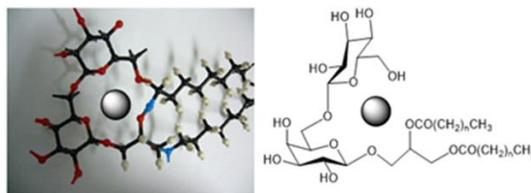
いる。チオサリチル酸糖ドナーは、申請者らが分開発を行った化合物であり、グリコシル

化反応における α と β の選択性を、適切な温度と溶媒を選択することで制御することができる。[3] (C) のグリセロールユニットは、グリコシル化反応後に、鎖長の異なる脂肪酸を導入するため、酸化的に脱離できるメトキシベンジル基 (MPM 基) で保護されている。

平成 26 年度は、合成した化合物の機能評価を、現在、エム バイオテック社と共同で開発中のエライザ (ELISA) 法を用いて実施する。市販されている疎水加工されたマイクロタイタープレートに、合成糖脂質を固定化し、既に得られている GGL モノクロナール抗体を作用させる。抗体結合量をタンパク質の発色試薬で定量する。研究協力者の松田和洋博士 (エム バイオテック社) は、マイコプラズマ学会の支援を得て、肺炎マイコプラズマ菌に感染した患者の血清試料を用いた評価試験を行う準備をすすめている。平成 26 年度には、構造を最適化した合成 GGLs を用いて、感染血清を用いたエライザ試験を実施する。研究協力者の産業技術総合研究所 鶴沢浩隆博士は、人工糖脂質をチップに用いた糖認識タンパク質検出の専門家である。同氏の指導の下、表面プラズモン共鳴装置 (SPR) を用いて、各種合成 GGL とモノクロナール抗体との結合挙動を明らかにする。これら評価試験を通して、診断法プローブとして用いる GGLs の化学構造を最適化することができる。

(2) 平成 27 年度以降：水溶性 GGL 誘導体の合成と NMR 解析

平成 27 年度は、推定される三次元構造を NMR 解析によって実証する。GGLs は、糖部位がグリセロール側に折り返した三次元構造をとることで、複数の酸素原子をクラウンエーテル様に配置することができる。一方、C16 の脂肪酸を持つ GGLs は、水系溶媒で自己組織化するため、NMR 解析が困難である。そこで、脂肪酸部位に疎水性が低いアセチル基をもつ水溶性 GGLs (C2) を新たに合成する。合成は、他の GGLs 誘導体と同様に行なう。NMR の測定は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムをそれぞれ添加した重水中で行い、水素シグナルの変化を観察する。同時に、結合定数、ケミカルシフト、NOE などの NMR 情報から三次元構造を明らかにする。また、MS 分析により、どのような金属イオンと複合体を形成するのかについて検証する。



マイコプラズマ糖脂質GGLは金属イオンと複合体を形成する可能性がある。

4. 研究成果

平成 25 年度～平成 27 年度にわたる研究

の結果、以下のことを明らかにした。

(1) 筆者らが開発した β -グリコシル化反応を用いることで、GGLs のように、これまで化学合成が困難であった β -グリセロ糖脂質が、立体選択的かつ効率的に化学合成できることがわかった。この手法を用いて、脂質部位の脂肪酸を C2 (アセチル) ~C18 (ステアリン酸) まで変化させた GGLs ホモログを化学合成した。

(2) 合成 GGLs を用いて ELISA 診断用プレートを作成した。抗 GGLs モノクロナール抗体との結合を評価したところ、ステアリン酸を導入した GGLs (C18) 並びにパルミチン酸を導入した GGLs (C16) が感染診断に有効であることが判った。

(3) NMR スペクトル法を用いた動的配座解析の結果、GGLs はリン脂質と同じグリセロ型細胞膜脂質であるが、脂質部位の動的挙動が両者間で大きく異なっていた。このことから、GGLs は脂質二重膜でリン脂質と相分離を起こして、自己組織化していると考えられた。

(4) GGLs は、1, 6-結合軸の自由回転によって、多様な回転異性体を与える。すなわち、多様な三次元構造をとることができる。アセチル基を脂質部位にもつ合成 GGLs (C2) を用いた NMR スペクトルと動力学的 (MM2) 計算の結果、水溶液中で、GGLs の二糖部位は還元末端方向に折りたたまれた立体構造をとること、さらに、複数の酸素原子がクラウンエーテル様に配置したイオノフォアを形成できる。

(5) GGLs の立体構造は溶媒などの外部環境によって大きく変動することがわかった。有機溶媒中など、疎水的環境下ではイオノフォアは形成されないことが判った。

(6) 各種イオン化法を用いた MS スペクトル解析で、GGLs はナトリウム (Na^+) イオンに親和性をもつことが判明し、先に推定したイオノフォアの形成と一致する結果となった。マイコプラズマ GGLs は、菌の細胞膜においてイオノフォアの構築に直接かかわる機能分子であり、脂肪酸などの物質移動に重要な役割を演じていると推測された。

<引用文献>

- ① 松田和洋、西田芳弘 「マイコプラズマと糖脂質: マイコプラズマ感染症の予防、診断、そして治療に向けて」 (書名: 科学技術振興機構 CREST 「糖鎖を知る、その素顔と病気への挑戦」、2010 年)
- ② A. Miyachi, A. Miyazaki, Y. Shingu, K. Matsuda, H. Dohi, Y. Nishida, "Synthesis and absolute structures of *Mycoplasma pneumoniae* β -glyceroglycolipid antigens", *Carbohydrate Res.*, **344**, 36-43 (2009).
- ③ H. Dohi and Y. Nishida, "Odorless access to thioglycosides for oligosaccharide synthesis: their Design and advanced procedures for thioglycosylation" *Trends in Glycoscience. & Glycotechnology (TIGG)*, **26 (151)**, 119-130 (2014).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文: 査読有] (計 10 件)

- ① M. Yuan, K. Fukuda, H. Dohi, H. Uzawa, Y. Nishida, "Comparative analyses of helical properties in asymmetric 1,2-diacyl-sn-glycerols by means of circular dichroism and proton NMR spectroscopy: Notable effects of substituting groups at sn-3 position", *Tetrahedron Asymmetry*, **26**, 1138-1144 (2015). (doi:10.1016/j.tetasy.2015.08.012)
- ② K. Fukuda, M. Tojino, K. Goto, H. Dohi, Y. Nishida, M. Mizuno, "A recyclable heavy fluorine tag carrying an allyl alcohol pendant group: Design and evaluation toward applications in synthetic carbohydrate chemistry", *Carbohydrate Research*, **407**, 122-130 (2015). (doi:10.1016/j.carres.2015.02.002)
- ③ Z. Cui, H. Su, J. Jiang, X. Yang and Y. Nishida, "Design, Synthesis and Bioactivity of N-Glycosyl-N'-(5-substituted phenyl-2-furoyl) Hydrazide Derivatives", *International J. Mol. Sci.*, **15**, 6741-6756 (2014). (doi:10.3390/ijms15046741).
- ④ H. Dohi, T. Kanazawa, A. Saito, K. Sato, H. Uzawa, Y. Seto and Y. Nishida, "Bis (β -lactosyl)-[60]fullerene as novel class of glycolipids useful for the detection and the decontamination of biological toxins of the *Ricinus communis* family", *Beilstein J. Org. Chem.*, **10**, 1504-1512 (2014). (doi.org/10.3762/bjoc.10.155).
- ⑤ K. Fukuda, M. Tojino, K. Goto, H. Dohi, Y. Nishida, M. Mizuno, "Preparation of acid-resistant heavy fluorine tags for recycling in synthetic systems", *Journal of Fluorine Chemistry*, **166**, 52-59 (2014). (doi.org/10.1016/j.jfluchem.2014.07.014)
- ⑥ Z. Cui, Jun Ito, H. Dohi, Y. Amemiya, Y. Nishida, "Molecular Design and Synthesis of Novel Salicyl Glycoconjugates as Elicitors against Plant Diseases", *PLOS ONE*, **9 (9)** e108338 (page 1-9) (2014). (doi.org/10.1371/journal.pone.0108338)
- ⑦ Z. Cui, X. Li, Y. Nishida, "Synthesis and bioactivity of novel carvacrol and thymol derivatives containing 5-phenyl-2-furan," *Letters in Drug Design and Discovery*, **11 (7)**, 877-885 (2014). (doi:10.2174/1570180811666140220005252)
- ⑧ H. Dohi & Y. Nishida, "Odorless Access to Thioglycosides for Oligosaccharide Synthesis: Their Design and Advanced Procedures for Thioglycosylation reactions" *Trends in Glycosci. & Glycotech. (TIGG)*, **26**, 119-130 (2014). (<http://dx.doi.org/10.4052/tigg.26.119>).
- ⑨ Y. Harada, E. Garenáux, T. Nagatsuka, H. Uzawa, Y. Nishida, C. Sato, Kitajima,

"Interaction of 70-kDa heat shock protein with glycosaminoglycans and acidic glycopolymers", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453**, 229-234 (2014) (doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.137)

- ⑩ T. Ngatsuka, H. Uzawa, K. Sato, S. Kondo, M. Izumi, K. Yokoyama, I. Ohsawa, Y. Seto, P. Neri, H. Mori, Y. Nishida, M. Saito, E. Tamiya: "Localized surface plasmon resonance detection of biological toxins using cell surface oligosaccharide on glycochips" *ACS Applied Materials & Interfaces*, **5**, 4173-4180 (2013). (doi.org/10.1021/am4002937).

[学会発表] (計 13 件)

- ① 福田和男、宮地彬、松田幸枝、土肥博史、松田和洋、西田芳弘 「質量分析法を用いたマイコプラズマ糖脂質抗原検出」: GlycoTokyo 2015、2015年10月24日、慶応義塾大学(横浜)
- ② 大山加南、板垣恵那、土肥博史、西田芳弘、鶴沢浩隆 「糖コレステロール誘導体の簡便合成法の検討」, GlycoTokyo 2015、2015年10月24日、慶応義塾大学(横浜)
- ③ 福田和男、袁 夢飛、松田幸枝、土肥博史、水野真盛、松田和洋、西田芳弘、「安定同位体標識を利用したマイコプラズマ糖脂質抗原検出」: 第34回日本糖質学会、2015年7月31日-8月2日、東京大学(東京)(要旨集P-164)
- ④ M. Yuan, K. Fukuda, Y. Nishida, S. Matsuda, K. Matsuda, "Synthetic Glycolipid Antigens (GGPLs and GGLs) for diagnosis of Mycoplasma infection diseases (MIDs)" : 第34回日本糖質学会、2015年7月31日-8月2日、東京大学(東京)(要旨集A3-15)
- ⑤ 福田和男、戸治野真美、後藤浩太郎、土肥博史、西田芳弘、水野真盛、「アリル型ヘビーフルオラスタグの合成と応用」、日本化学会 第95春季年会、2015年3月26-29日、日本大学理工学部(船橋)(要旨集2-D6-49)
- ⑥ 田中太輝、鶴沢浩隆、永塚健宏、吉田敏雄、土肥博史、西田芳弘: "Sugar modified silicon nitride chips for the detection of biological toxins", GlycoTokyo 2014 シンポジウム、2014年11月8日、千葉大学松戸キャンパス(松戸)(要旨集56頁P-44)
- ⑦ 福田和男、戸治野真美、後藤浩太郎、土肥博史、西田芳弘、水野真盛、「炭素-炭素結合型ヘビーフルオラスタグを利用した糖鎖合成」、第33回日本糖質学会年会、2014年8月10-12日、名古屋大学(名古屋)(要旨集C5-02)
- ⑧ Y. NISHIDA, "Characterization of Mycoplasma pneumonia glycolipids" 中国広州科学技術院 先端科学技術センター 特別セミナー 2014年5月9日(中国、

広州)

- ⑨ Y. NISHIDA, "Mycoplasma cell-membrane glycolipid antigens: syntheses and possible roles" 香港大学医学部生化学研究部門 特別セミナー 2014年5月6日 香港大学医学部(中国、香港)
- ⑩ H. Dohi, R. Sakurai, M. Tamura, Y. Nishida, "Reactivity of Thioglycosyl Donors Carrying Thiosalicylic Acid Derivatives": 27th International Carbohydrate Symposium, 2014, January 12-17, Bangalore (India).
- ⑪ 土肥博史、尾山知絵、松田幸枝、松田和洋、西田芳弘、「肺炎マイコプラズマに由来する糖脂質抗原の合成研究」: 第32回日本糖質学会年会、2013年8月5-7日、大阪国際交流センター(大阪)
- ⑫ 櫻井理沙、田村真奈美、西田芳弘、土肥博史、「チオサリチル酸誘導体を脱離基に持つグリコシルドナーの反応挙動」: 第32回日本糖質学会年会、2013年8月5-7日、大阪国際交流センター(大阪)
- ⑬ M. Yuan, R. Matsunaga, H. Dohi, S. Matsuda, K. Matsuda, Y. Nishida, "Conformational properties of alpha and beta-glycolipids as Mycoplasma cytoplasmic membrane components" XXII International Symposium on Glycoconjugates, 2013, June 23-28, Dalian, China (Abs No 237)

[図書] (計 2 件)

- ① 西田芳弘 「炭水化物(糖質)」 page 22-42 (書名: 遠藤泰志、池田郁男編集、新版 基礎食品学 アイ・ケイ・コーポレーション)(全体205ページ)(2015年)
- ② 西田芳弘、土肥博史 「グライコナノカプセルの調製と機能評価」 page 80-87 (書名: 技術情報協会編「マイクロナノカプセルの調製、徐放性制御と応用例」)(全体510ページ)(2014年)

[その他] ホームページ等

<https://area34.smp.ne.jp/area/card/5696/IiZVgl/M?S=mbmjt01fo0k>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 芳弘 (NISHIDA, Yoshihiro)

千葉大学大学院・融合科学研究科・教授
研究者番号: 80183896

(2) 研究協力者

- ① エムバイオテック株式会社
・松田 和洋 (MATSUDA, Kazuhiro)
・松田 幸枝 (MATSUDA, Sachie)
- ② 千葉大学大学院・融合科学研究科・博士課程
・袁 夢飛 (YUAN, Mengfei)
・福田 和男 (FUKUDA, Kazuo)
・田中 太輝 (TANAKA, Daiki)
- ③ 千葉大学大学院・融合科学研究科・

准教授

- ・土肥 博史 (DOHI, Hirofumi)
- ④ 産業技術総合研究所・ナノシステム
研究部門・主任研究員
- ・鶴沢 浩隆 (UZAWA, Hirotaka)
- ⑤ 公益財団法人 野口研究所・
糖鎖有機化学研究室・室長
- ・水野 真盛 (MIZUNO, Mamoru)