

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882036

研究課題名(和文) 脂質抗原受容体CD1dの機能解明を目指した共有結合形成型リガンドの開発とその展開

研究課題名(英文) Development of covalent ligands to modulate CD1d protein function

研究代表者

井貫 晋輔 (INUKI, SHINSUKE)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：70736272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多様な免疫調節を担う脂質抗原受容体の機能解析を行うために、ナチュラルキラーT(NKT)細胞を制御する糖脂質抗原受容体CD1dに着目し、受容体タンパク質に選択的共有結合形成可能な共有結合型CD1dリガンドの開発を目指した。報告者らは、既知リガンドである  $\alpha$ -GalCerを基盤とした化合物デザインを行い、共有結合形成能を有する反応性官能基を、アミド基を含むリンカーを介して、リガンドに導入した。合成化合物の一部は、 $\alpha$ -GalCerと比較して、CD1dに対して高親和性を有するとともに、高いサイトカイン誘導能を示した。

研究成果の概要(英文)：We focused on CD1d protein that can control the activation of natural killer T (NKT) cells through the presentation of self and foreign lipids, and planned to develop selective covalent ligands toward CD1d in order to enable the functional analysis and the modulation of CD1d. Based on the known CD1d ligand,  $\alpha$ -GalCer, we designed novel covalent ligands containing an amide group as a linker. Some of the designed ligands showed the higher affinities to CD1d, and increased the cytokine production compared with  $\alpha$ -GalCer.

研究分野：生体分子化学

キーワード：免疫機能解析 生物有機化学 ケミカルバイオロジー 相互作用解析 分子動力学計算

## 1. 研究開始当初の背景

生体防御機構としての免疫は、自然免疫と獲得免疫の二つのシステムの複数のシグナルが複雑に絡み合って連携して働いている。申請者の所属グループでは、免疫機能の解明を目指す一端として、樹状細胞等に存在し T 細胞の分化、活性化を制御する CD1d 受容体に関して、本受容体に対する天然リガンド化合物を中心に合成、解析を行っている。CD1d は細胞内に取り込まれたリガンドと結合すると、細胞膜上に移動し、NKT 細胞上の T 細胞抗原受容体 (TCR) に認識され、様々なサイトカインを誘導する。誘導されるサイトカインは、リガンド構造に依存することが知られているため、サイトカイン誘導を制御する新規 CD1d の探索研究が精力的に行われている。

CD1d の主なリガンドとしては海洋天然物  $\alpha$ -GalCer が知られている。これまでの  $\alpha$ -GalCer 誘導体の構造活性相関研究から、CD1d とリガンドとの複合体安定性がサイトカイン誘導の制御に関わることが示唆されているが、明確な検証は行われていない。(Ovaa, H. *et al. Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, Chavatte, P. *et al. J. Med. Chem.* **2014**.)

## 2. 研究の目的

本研究では、多様な免疫調節を担う脂質抗原受容体の機能解析を行うために、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞を制御する糖脂質抗原受容体 CD1d に着目し、受容体タンパク質に選択的共有結合形成可能な“共有結合型” CD1d リガンドの開発を目指している。共有結合型リガンドは共有結合を介してタンパク質と結合することにより、安定な複合体を形成する。報告者は、“共有結合型” CD1d リガンドを用いて、免疫機能発現に重要な因子の解析を行い、より強力な活性、高い選択性を有する CD1d リガンドの開発を目指した。

## 3. 研究の方法

CD1d と糖脂質リガンド  $\alpha$ -GalCer の複合体 X 線結晶構造を基に、 $\alpha$ -GalCer を基盤とした構造展開を行い、“共有結合型” CD1d リガンドの取得を目指した。特にリガンドのデザインにおいて、分子シュミレーションソフトを用いた解析を行い、共有結合形成可能な反応性官能基の導入位置を探索することとした。また合成したリガンドの共有結合の有無を確認するために、各種分子間相互作用解析法の開発、および質量分析装置を用いた解析を行うこととした。さらに得られたリガンドの NKT 細胞活性化能を調査するために、各種免疫関連細胞を用いたリガンドのサイトカイン誘導能を評価することとした。

## 4. 研究成果

(1) “共有結合型” CD1d リガンドのデザイン：報告されている CD1d と糖脂質リガンド  $\alpha$ -GalCer の複合体 X 線結晶構造に対して分子

シュミレーションソフトを用いた解析を行い、共有結合形成可能な反応性官能基の位置を探索した。またリガンドの合成を簡便にするために反応性官能基導入のためのリンカーとしてアミド基を用いることとした。

(2) “共有結合型” CD1d リガンド誘導体の合成経路の確立：各種共有結合型リガンドの合成ルートの確立を行った。反応性官能基導入のためのリンカーとしてアミド基を用いることで、多様な誘導体を効率的に合成することができた。また、これらのリガンドは両親媒性であるため通常の条件では精製が困難であったが、種々の検討を行った結果、簡便かつ回収率の高い精製法を見出した。

(3) CD1d-リガンド間における分子間相互作用解析法の開発と化合物の評価：リガンドと CD1d 間の共有結合の有無を確認するためにタンパク質-リガンド間の結合親和性を評価する手法の開発を行った。BLI (Bio-Layer Interferometry) 法やリガンド固定型の ELISA 法を応用し、分子間相互作用解析法の開発を行った。開発した解析手法を用いて (2) で合成した化合物をそれぞれ評価したところ、アミド基をリンカーとして有する  $\alpha$ -GalCer 誘導体が  $\alpha$ -GalCer と比較して、高い結合親和性を有することが分かった。

(4) 質量分析装置を用いた共有結合形成の確認：合成リガンドと CD1d 間の共有結合形成の有無を確認するために MALDI-TOFMS を用いた解析を行った。解析の結果、合成リガンドの一部が CD1d の特定のアミノ酸残基と共有結合を介して結合していることを示唆する結果を得た。現在詳細な検討を継続中である。

(5) サイトカイン誘導能の評価：NKT ハイブリドーマ細胞、マウス脾臓細胞を用いて、合成リガンドのサイトカイン誘導能の評価を行った。合成リガンドは、種々のサイトカイン誘導を惹起することが分かった。また、一部のリガンドは、 $\alpha$ -GalCer と比較してより高いサイトカイン誘導能を示した。

(6) 分子動力学計算 (MD 計算) を用いた解析：アミド基をリンカーとして有する  $\alpha$ -GalCer 誘導体が高い活性を示したことから、これらのリガンドと CD1d との結合様式を精査するために分子動力学計算を用いた解析を行った。解析の結果、CD1d の脂質認識部位とリガンド間の相互作用様式において、新たな知見を得ることに成功した。

## 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 2 件)

Shiokawa, Z.; Inuki, S.; Fukase, K.; Fujimoto, Y. Efficient Synthesis of (–)-Hanishin, (–)-Longamide B, and (–)-Longamide B Methyl Ester through Piperazinone Formation from 1,2-Cyclic Sulfamidates. *Synlett* **2016**, 27, 616-620. ( 査読あり ) DOI. 10.1055/s-0035-1560988

Inuki, S.; Sato, K.; Fujimoto, Y. Visible-Light-Mediated Decarboxylative Benzoyloxylation of  $\beta$ -Hydroxy Amino Acids and Its Application to Synthesis of Functional 1,2-Amino Alcohol Derivatives. *Tetrahedron Letters* **2015**, 56, 5787-5790. ( 査読あり ) DOI.10.1016/j.tetlet.2015.09.012

[学会発表](計 19 件)

荒井洋平、太田一平、横山康平、フォンチ、樺山一哉、井貫晋輔、深瀬浩一、藤本ゆかり、免疫活性化能を示す TLR2 リガンド・リポペプチド標識体合成および解析、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 25 日、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学(京都府京田辺市)

佐藤啓介、福山高英、柳日馨、井貫晋輔、藤本ゆかり、光反応を利用したデオキシアミノ糖類の合成研究、2016 年 3 月 24 日、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学(京都府京田辺市)

Toshihiko Aiba, Sae Suehara, Hannah Bernin, Hanna Lotter, Shinsuke Inuki, Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Synthesis and immunomodulatory activity of unique protozoal inositol phospholipids containing long fatty acids, The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 2016 年 1 月 22 日、武田薬品工業研修所(大阪府吹田市)

Shunichi Ishibashi, Shinsuke Inuki, Yukari Fujimoto, Synthetic Study on Cardiolipin Containing Cyclopropane Fatty Acids, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 17 日、Honolulu, USA

Sae Suehara, Toshihiko Aiba, Shou Nakagawa, Masaki Sato, Yuuki Maekawa, Toshiaki Murai, Koichi Fukase, Shinsuke Inuki, Yukari Fujimoto, Synthesis of inositol phospholipids from *Ascaris suum* using regioselective phosphorylation, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin

Societies, 2015 年 12 月 17 日、Honolulu, USA

Yohei Arai, Yuki Kawahara, Kouhei Yokoyama, Shinsuke Inuki, Kazuya Kabayama, Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Fluorescence-labeled lipopeptides as molecular probes for TLR2, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 17 日、Honolulu, USA

Keisuke Sato, Shinsuke Inuki, Yukari Fujimoto, Synthetic Studies on Funiculosin, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 17 日、Honolulu, USA

Shinsuke Inuki, Keisuke Sato, Yukari Fujimoto, Decarboxylative Functionalization of  $\beta$ -Hydroxy Amino Acids via Photoredox Catalysis and Its Application to Synthesis of Functional 1,2-Amino Alcohol Derivatives, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 16 日、Honolulu, USA

Toshihiko Aiba, Sae Suehara, Hannah Bernin, Hanna Lotter, Shinsuke Inuki, Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Synthesis and Immunoregulatory Activity of Lipophosphoglycans as NKT Cell Modulator, The 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, 2015 年 11 月 11 日、リーガロイヤルホテル京都(京都府京都市)

Shinsuke Inuki, Keisuke Sato, Yukari Fujimoto, Decarboxylative Functionalization of  $\beta$ -Hydroxy Amino Acids via Photoredox Catalysis and Its Application to Synthesis of Functional 1,2-Amino Alcohol Derivatives, The 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, 2015 年 11 月 11 日、リーガロイヤルホテル京都(京都府京都市)

柏原瑛美、相羽俊彦、井貫晋輔、藤本ゆかり、Gal( $\alpha$ 1-6)Gal 構造を含有する糖脂質の合成研究、GlycoTOKYO、2015 年 10 月 24 日、慶應義塾大学(神奈川県横浜市)

末原紗英、相羽俊彦、前川侑輝、村井利昭、深瀬浩一、井貫晋輔、藤本ゆかり、*Ascaris suum* 由来イノシトールリン脂質の合成研究、GlycoTOKYO、2015 年 10 月 24 日、慶應義塾大学(神奈川県横浜市)

佐藤啓介、井貫晋輔、藤本ゆかり、Photoredox 触媒を用いたデオキシアミノ糖類の合成研究、GlycoTOKYO、2015 年 10 月 24 日、慶應義塾大学(神奈川県横浜市)

荒井洋平、横山康平、フォンチ、樺山一哉、井貫晋輔、深瀬浩一、藤本ゆかり、自然免疫受容体 TLR2 リガンドの蛍光標識体合成と解析、第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015、2015 年 10 月 15 日、タワーホール船堀(東京都江

戸川区)

Toshihiko Aiba, Sae Suehara, Hannah Bernin, Hanna Lotter, Shinsuke Inuki, Koichi Fukase, Yukari Fujimoto, Synthesis and Biological Activity of Inositol Phospholipid as NKT Cell Modulator, 23rd International Symposium on Glycoconjugates, 2015年9月16日、Split, Croatia

相羽俊彦、末原紗英、Bernin Hannah、Lotter Hanna、井貫晋輔、深瀬浩一、藤本ゆかり、*Entamoeba histolytica* 由来 GPI アンカー部分構造の合成と生物活性、第34回日本糖質学会年会、2015年7月31日、東京大学(東京都文京区)

横山康平、河原佑紀、Qi Feng、荒井洋平、井貫晋輔、藤本ゆかり、樺山一哉、深瀬浩一、自然免疫受容体リガンドの細胞内動態解析に向けて、日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会、2015年6月12日、東北大学(宮城県仙台市)

相羽俊彦、末原紗英、Bernin Hannah、Lotter Hanna、井貫晋輔、深瀬浩一、藤本ゆかり、*Entamoeba histolytica* 由来糖イノシトールリン脂質の合成と免疫調節活性、第14回新規素材探索研究会、2015年6月5日、新横浜フジビューホテル(神奈川県横浜市)

井貫晋輔、藤本ゆかり、Photoredox 触媒を用いた光学活性 1,2-アミノアルコール類の合成法開発、第14回新規素材探索研究会、2015年6月5日、新横浜フジビューホテル(神奈川県横浜市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：化合物又はその塩、ナチュラルキラーT細胞活性化剤、及び医薬組成物

発明者：井貫晋輔、相羽俊彦、平田菜摘、藤本ゆかり

権利者：同上

種類：特許

番号：2016-057416

出願年月日：2016年3月22日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井貫 晋輔 (INUKI, Shinsuke)

慶応義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：70736272