

自然免疫-獲得免疫の連携を担う複合糖質・脂質の合成と機能解明

Synthesis and functional analysis of glyco- and lipid-conjugates responsible for modulation of innate immune- and acquired immune system

(日本糖質学会推薦)

代表研究者 慶應義塾大学 藤本 ゆかり Keio University Yukari FUJIMOTO
協同研究者 慶應義塾大学 井貫 晋輔 Keio University Shinsuke INUKI

Immunomodulation is one of fundamental functions for the protection of living organisms including human, and the understanding of the active structural motifs and their functions is fundamental for development of the application in the medical science. We thus developed the chemical synthetic methods of various natural immunomodulators from microbes and also from human. The immune receptor agonists include the ligands of Nod1/Nod2, CD1d and TLR2. Based on the newly developed chemical methods, we established molecular library of the immunomodulants, and used these compounds for the comprehensive analysis of structure-activity relationships for the further understanding of our environments. The synthesized compounds include inositol phospholipids from a Protozoa (*Entamoeba histolytica*), and from human, for analyzing as CD1d ligands. We demonstrated the detailed structure-activity relationships of unique inositol phospholipids from *E. histolytica* in NKT cell activation, and also for the phospholipids from human. The comprehensive synthesis for the bacterial cell wall peptidoglycan fragment library was also established. We then revealed that unique modification at PGN in *Mycobacteria* weakened the immunoactivation via human Nod1/Nod2. We also successfully developed the synthetic methods for introduction additional functions to the immunestimulatory compounds to regulate their activity, and also for the functional analysis including live-cell fluorescence imaging.

研究目的

免疫機構の制御は、癌や感染症、アレルギー疾患等を含む多くの疾患の理解と治療に繋がることからその解明・展開が期待されている。本研究においては、申請者の確立してきた種々の自然免疫受容体リガンドの合成・機能解析による知見と合成分子ライブラリを基盤とし、自然免疫-獲得免疫の連携を担う複合糖質・脂質の化学合成法開発と機能解析さらには新規複合型分子創製を目指した。そのため、新規構造を持つ自然免疫受容体リガンドを探索、解析、合成するとともに、樹状細胞等に存在しT細胞の分化・活性化を制御するCD1ファミリータンパク質について、特にCD1dの天然リガンド化合物を中心に、合成と解析を行った。また、上記の合成分子群を利用するとともに申請者らが見出した自然免疫リガンドの相乗作用を利用し、感染症や癌等の疾患治療の

基盤となる免疫機能調節可能な複合型分子創製を目指し、複合化分子に分子プローブとしての機能を付加することにより免疫活性化機構の詳細な解析を可能とする分子を開発した。以上の手法を用い、免疫制御機構の理解とともに免疫機構の制御を可能とする分子の発見・創製を目指し研究を進めることとした。

研究経過

自然免疫-獲得免疫機構を制御する外因性・内因性分子についてその構造と合成および機能について解明するため、下記の項目について相互に連携しながら研究を進めた。すなわち、免疫調節活性を持つ腸内粘膜免疫系における細菌由来化合物の解析、外因性あるいは内因性の免疫調節作用を持つ化合物の化学合成と分子プローブを用いた機能解析、獲得免疫

の制御と連携機構解明を目指した複合型分子の創製を行い、複合型分子の合成と細胞内移行に関わる解析を行った。以上の研究により、免疫機構の制御を可能とする分子の発見・創製、および得られた分子を用いた活性化機構解明を目指した。

まず、種々の微生物およびヒト由来の免疫調節作用を持つ複合糖質・脂質の合成を行い、得られた合成化合物を用いた機能解析を目指し、下記の化合物群についての研究を行った。

1) CD1d リガンド：細胞表層の CD1d-リガンド複合体の認識により活性化され T 細胞の分化の制御 (Th1 or Th2) に寄与している NKT 細胞の活性化機構の解析のため、自然界に存在する種々の CD1d のリガンドの探索、合成、機能解析を行った。まず、CD1d の外因性リガンドとして最近見出された原虫 (赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica*) 由来のイノシトールリン脂質(EhPIa, EhPIb) [1]および糖鎖含有構造について、合成手法開発を行いその全合成達成に成功した。また、開発した合成手法を用い、ヒト型イノシトールリン脂質についても合成に成功した。その他のセラミド型を含むその他の天然型リガンドの合成手法開発についても行った。以上で合成した化合物については、IL-2, IL-4, INF- γ 等のサイトカイン誘導活性測定を行い、免疫調節活性についての構造活性相関結果を得た。種々の化合物において Th1 および Th2 の分化バランスに関わるサイトカイン誘導を観測することに成功した。

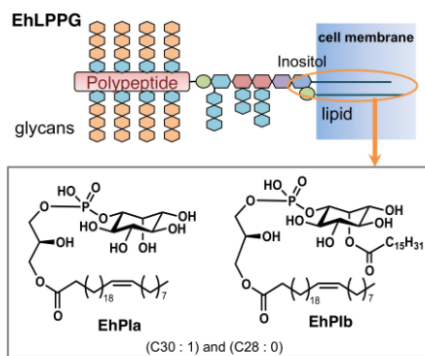


Fig. 1. Structures of EhPIa and EhPIb from *Entamoeba histolytica*.

2) Nod1 および Nod2 リガンド：自然免疫受容体 Nod1 および Nod2 のリガンドである細菌細胞壁成分ペプチドグリカン(PGN) [2]の効率的合成法開発とフラグメント・ライブラリ、アレイ構築および認識タンパク質解析について進め、結核菌特有の修飾基を

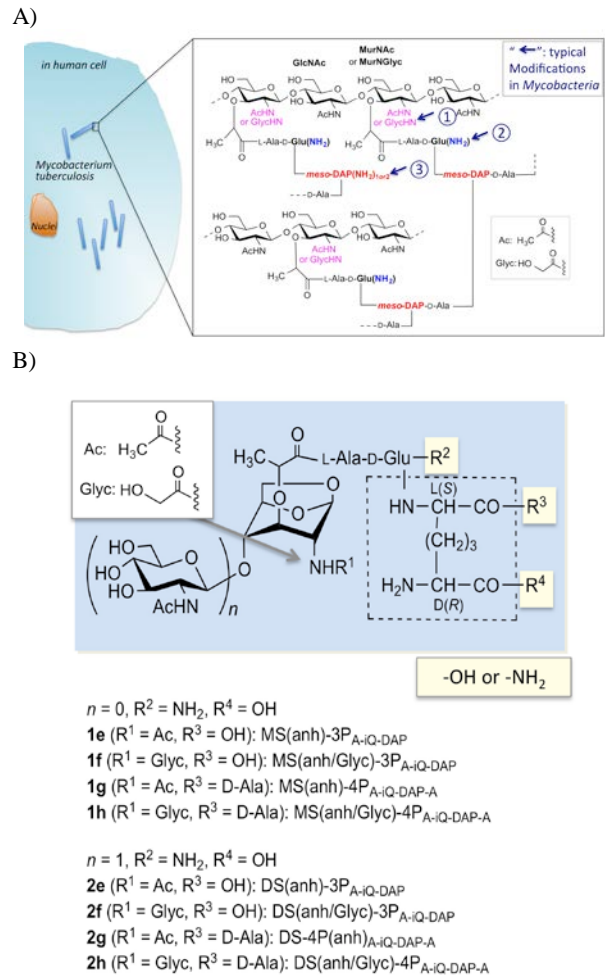


Fig. 2. (A) Schematic structure of *M. Tuberculosis* peptidoglycan. (B) Chemically synthesized *M. Tuberculosis* peptidoglycan fragments.

持つ PGN フラグメント分子群の合成を達成した。結核菌特有の修飾基を持つ化合物群については、ヒト型 Nod1 および Nod2 の活性化能を解析し、修飾基の導入による Nod1 および Nod2 を介した免疫活性化能の解析を行った。また、PGN の化学合成効率化のため、これまで課題が多く報告例の少ない糖ペプチドの固相合成法の開発・展開を行った [3]。こうした種々の合成法で得られた PGN フラグメント・ライブラリを用い、様々な認識タンパク質との結合解析を行うための一つの手法として、炭素基板を用いたアレイ化と解析法の開発を行った。アレイ化については、Lys 含有型 PGN フラグメントの集積化と結合タンパク質解析についての結果を得る事に成功しており、相互作用等への展開も視野に入れ解析を行った。また一方、自然免疫受容体リガンドを複合化し、他の機能性基を導入するための手法検討を、これまで開発した合成手法 [4,5]を基に行った。本手法により、イメージングのための機能性基の導入を行うと

ともに、他の免疫調節成因子の導入を可能とすることとした。特に本研究では、TLR2 リガンドであるリポペプチドを骨格構造として、親水性および疎水性の蛍光基を導入し、活性を保持した複合型構造の分子プローブ創製に成功した。また、得られた蛍光標識リガンドを用いることにより、細胞におけるTLR2 の発現の有無により、リガンドの細胞内への移行あるいは細胞内での集積における挙動の差異を初めて生細胞でのイメージングにより観測することに成功した。

考察

本研究では、種々の微生物およびヒト由来の免疫調節作用を持つ複合糖質・脂質について、主としてCD1d、Nod1/Nod2 および、TLR2、TLR4 リガンドについての天然型分子の解析、合成手法開発と、合成化合物を用いた機能解析を行うとともに、複合型分子を利用した解析への展開を行った。

CD1d リガンドについては、これまであまり多くの詳細な解析例が示されていないイノシトールリン脂質型の構造について、網羅的合成を可能とする化学合成法の開発に成功し、原虫型およびヒト型のイノシトールリン脂質の全合成を行った。得られた化合物を用い、特に脂質部位の違いと活性への影響の解析を行い、新しい知見を得ることに成功した。ヒト型のイノシトールリン脂質においても弱いながらも NKT 細胞活性化に関わる事を示唆する結果を得るとともにジアシルグリセロール部位の立体構造が活性の有無に影響することを初めて明らかとした。

Nod1 および Nod2 リガンドである PGN 部分構造については、糖鎖部位の合成法改良を進めるとともに修飾基導入および標識化・複合化を指向した中間体構築を行った。特異な修飾が多い結核菌型の PGN フラグメント・ライブラリを網羅的に構築し、修飾基の存在によりヒト型 Nod1/Nod2 を介した免疫活性化が低下する傾向を明らかにした。一般的な Lys 含有型 PGN フラグメントのアレイ化と結合タンパク質解析についても行い、PGRP-S との相互作用解析に成功したほか、他のタンパク質の解析にも展開した。

TLR2 リガンドであるリポペプチドについては、主として他の活性基あるいは標識基等の機能性基を複合化するための骨格構造として Pam2CSK4 あるいは Pam3CSK4 を用いた研究を進めた。機能性基を導

入するための手法開発を行うとともに、親水性および棒状の疎水性の蛍光基を導入し活性を保持した複合型構造の分子プローブ創製に成功した。得られた TLR2 活性である蛍光標識リガンドを用い、ヒト細胞株を用い TLR2 発現が無い場合に比較し TLR2 発現が有る場合に、リガンドの細胞内への移行および細胞内での集積が促進される様子を、生細胞でのイメージングにより初めて示すことに成功した。

本研究により、種々の複合脂質および複合糖質型の免疫調節性・化合物ライブラリを得るとともに、標識化・複合化の手法開発に成功し、免疫活性化機構解明に展開しており、特に種々の天然型の自然免疫-獲得免疫の連携に関わるリガンド分子の機能を明らかにすることに成功した。今後、より詳細な機能解析へ発展させる予定である。

参考文献

- 1) Lotter, H., González-Roldán, N., Lindner, B., Winau, F., Isibasi, A., Moreno-Lafont, M., Ulmer, A. J., Holst, O., Tannich, E., Jacobs, T. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000434.
- 2) a) Fujimoto, Y., Pradipta, A. R., Inohara, N., Fukase, K., *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 568-579.
b) Fujimoto, Y., Fukase, K., *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 518-25.
- 3) Kadonaga, Y., Wang, N., Fujimoto, Y., Fukase, K. *Chem. Lett.* **2014**, *43*(9), 1461-1463.
- 4) Fujimoto, Y., Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Katsumoto, M., Seya, T., Suda, Y., Fukase, K. *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 2311-2315.
- 5) a) Fujimoto, Y., Kajiki, Y., Kawahara, Y., Katsumoto M., Fukase, K. *Peptide Science*, **2014**, *2013*, 41-42.
b) Bongat, A. F. G., Saksena, R., Adamo, R., Fujimoto, Y., Shiokawa, Z., Peterson, D. C., Fukase, K., Vann, W. F., Kováč, P. *Glycoconj. J.* **2010**, *27*(1), 69-77.

研究の発表

誌上発表

1. Aiba, T., Suehara, S., Bernin, H., Lotter, H., Inuki, S., Fukase, K., Fujimoto, Y. Synthesis and Biological Activity of Inositol Phospholipid as NKT Cell Modulator. *Glycoconjugate J.* **2015**, *32*, 301.
2. Inuki, S., Sato, K., Fujimoto, Y.,

Visible-light-mediated decarboxylative benzoyloxylation of β -hydroxy amino acids and its application to synthesis of functional 1,2-amino alcohol derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5787-5790

3. Shiokawa, Z., Inuki, S., Fukase, K., Fujimoto, Y., Efficient synthesis of (-)-hanishin, (-)-longamide B, and (-)-longamide B Methyl Ester via piperazinone formation with 1,2-cyclic sulfamidates. *Synlett*, **2016**, *27(04)*, 616-620.
4. Wang, Q., Matsuo, Y., Pradipta, A. R., Inohara, N., Fujimoto, Y., Fukase, K., Synthesis of characteristic Mycobacterium peptidoglycan (PGN) fragments utilizing with chemoenzymatic preparation of meso-diaminopimelic acid (DAP), and their modulation of innate immune responses. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 1013-1023
5. Wang, N., Hirata, A., Nokihara, K., Fukase, K., Fujimoto, Y., Peptidoglycan Microarray as A Novel Tool to Explore Protein-Ligand Recognition. *Biopolymers*. **2016**, *in press*.

口頭発表

1. The Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR) "Bacterial glycoconjugates; chemical synthesis and functional analysis" Yukari Fujimoto (Honolulu, USA, 2014.11.16-19)
2. Asian Chemical Biology Conference (ACBC2014) "Microbial glycoconjugates and lipidconjugates as immunomodulators; Chemical synthesis and biological functions" Yukari Fujimoto (U-Town NUS, Singapore, 2014.12.15-17)
3. The First Yoshida Prize Symposium "Chemistry and Immunomodulation of Microbial Glycoconjugates" Yukari Fujimoto (Kyoto, 2015.1.30)
4. International Mini Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity "Chemistry and Functional Analysis of Immunomodulatory Microbial Glycoconjugates" Yukari Fujimoto (Yokohama, 2015.3.24)
5. The 13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13) "Synthesis and Bio-functional Studies of Immunomodulating LPS Partial Structures." Atsushi Shimoyama, Keisuke Mizote, Yukari Fujimoto, Koichi Fukase (Kyoto, 2015.11.9-13)
6. The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies "Synthesis of immunomodulatory glycoconjugates based on recently developed chemical glycosylation" Yukari Fujimoto (Honolulu, 2015.12.19)
7. The 3rd Mini-Symposium between Keio University and National Tsing Hua University "Microbial Glycoconjugates; Chemistry and Immunomodulatory Functions" Yukari Fujimoto (National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, 2016.3.11)
8. International Conference of Computational Methods in Science and Engineering (ICCMSE 2016) Computational Chemistry (CC) Symposium "Immunomodulatory Microbial Components; Their Structures, Syntheses and Biological Functions" Yukari Fujimoto (Athens, Greece, 2016.3.17-20)
9. 5th RIKEN-Max Planck Joint Research Center Fifth Annual Symposium "Microbial Immunomodulatory Glycoconjugates; Syntheses and Biological Functions" Yukari Fujimoto (Berlin, Deutschland, 2016.4.17-20)
10. Glycoscience Japan-The Netherlands Joint Seminar 2016: Glycobiology in Health and Diseases "Microbial Glycoconjugates; Chemistry and Immunomodulatory Functions" Yukari Fujimoto (Leiden, The Netherlands, 2016.4.19-22)
11. The 16th Akabori Conference "Bacterial cell surface glyco- and lipid-peptide molecules; Synthesis and their immunological functions" Youhei Arai, Ipei Ohta, Kohei Yokoyama, Qi Feng, Qianqian Wang, NIng Wang, Kazumi Tomizawa, Inuki Shinsuke, Kazuya Kabayama, Koichi Fukase, Yukari Fujimoto (六甲山ホテル, Kobe, 2016.5.22-26)
12. 第 12 回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム "免疫を調節する微生物表層由来複合糖質：化合物構造—活性とその展開 藤本ゆかり (東京, 2014.12.4-5)
13. 日本化学会第 95 春季年会(2015)“自然界での生体防御シグナル物質群と複合型分子による免疫制御への展開”藤本ゆかり (船橋, 2015.3.26-29)
14. 新規素材探索研究会 第 14 回セミナー “免疫機

構制御を目指した調節活性分子の探索と創製”

藤本ゆかり (横浜, 2015.6.3)

15. 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー
～分子標的と活性制御～」第 8 回公開シンポジ
ウム “免疫調節に関わる微生物由来分子群:化学
合成を基盤とした機能解析” 藤本ゆかり (仙台,
2015.6.8)
16. 有機合成夏期セミナー「明日の有機合成化学」
“免疫機構調節に関わる信号を伝える細胞表層
分子群:有機合成と機能解析” 藤本ゆかり (大阪,
2015.9.1)
17. 日本化学会 天然物および生物有機化学に関す
る 中 西 シ ン ポ ジ ウ ム 2016 “Microbial
Immunomodulatory Glycoconjugates; Syntheses and
Biological Functions” 藤本ゆかり (京田辺,
2016.3.24)
18. 日本生化学会九州支部例会シンポジウム “微
生物表層由来複合糖質の合成フラグメント・ラ
イブラリ構築と免疫調節機構解析” 藤本ゆかり
(鹿児島, 2016. 5. 14)