

自然免疫を調節する細菌複合糖質の化学



研究ノート

深瀬浩一*

Chemistry of Immunoregulating Glycoconjugates of Bacteria

Key Words : Innate Immunity, Lipopolysaccharide, Peptidoglycan, Glycoconjugate, Toll like receptors

1 はじめに

バクテリアやウイルスなどの微生物から身を守るために、人や動物は免疫という生体防御システムを発達させています。このシステムは、自然免疫系と獲得免疫系から成り立っています。脊椎動物は獲得免疫により、病原体由来分子の記憶に基づいて、病原体を速やかに排除します。しかし、バクテリアやウイルスに初めて遭遇した場合は自然免疫が動かし、種々のセンサー受容体を介して様々な病原体が作り出す特有の分子を感知し、炎症反応を引き起こして、侵入者から身を守ります。続いて侵入者に体する抗体が産生され、獲得免疫により侵入者を排除します。自然免疫反応の鍵となるのが、「Toll様受容体(TLR)」でバクテリアやウイルスに特有の分子構造を認識して、炎症反応を引き起こします。Tollは八エの初期発生において背と腹の形成に関わる受容体に必要な遺伝子として発見されたもので(「Toll」はドイツ語で「すごい」の意味)、1996年には真菌に対する生体防御にも必須であることが明らかにされました。1997年、ヒトにもTollと類似の遺伝子(Toll様受容体:TLR)が存在することをJanewayとMedzhitovが報告しました。TLRは自然免疫に関わるタンパク質ファミリーの1つであり、その起源は古く、昆虫、脊椎動物など生物界に広く見られます。2007年のScience誌において細胞性粘菌が、Toll/in

terleukin-1 receptor (TIR)ドメインを有することが見出され、自然免疫は真核生物に広く存在する生体防御機構であると考えられます。

TLRは獲得免疫の成立にも重要で、後に述べるように生体防御において極めて重要な役割を果たしています。一方TLRの過剰な作用により慢性関節リウマチや全身性エリテマトーデス、心血管障害など、深刻な慢性炎症疾患が引き起こされることが明らかにされました。大阪大学微生物病研究所の審良静男先生は種々のTLRによる病原体の認識や細胞内のシグナル伝達機構を明らかにされるなど自然免疫系の活性化機構を解明され、大きな注目を集めています。

2 細菌由来免疫増強複合糖質の活性本体の解明

自然免疫研究の礎を築いたのが、微生物由来の免疫増強物質に関する研究です。細菌細胞壁ペプチドグリカンやグラム陰性菌のリポ多糖などの細菌複合糖質による免疫増強作用はそれぞれ20世紀中頃、19世紀末というようになかなか古くから知られていました。これらの細菌複合糖質の示す免疫増強作用の物質的な基盤を明らかにしたのが、大阪大学理学部の芝哲夫先生、楠本正一先生、大阪大学歯学部的小谷尚三先生らの共同研究グループです。このグループは1975年にペプチドグリカンの免疫増強活性を示す最小構造がムラミルジペプチド(MDP)という糖とペプチドの複合体であることを明らかにしました。なお同時期に(わずかに早く)フランスのLedererらも同様の結果を発表しています。分子量わずか500程度の小分子が細胞壁全体の活性を表していることは大きな驚きでした。

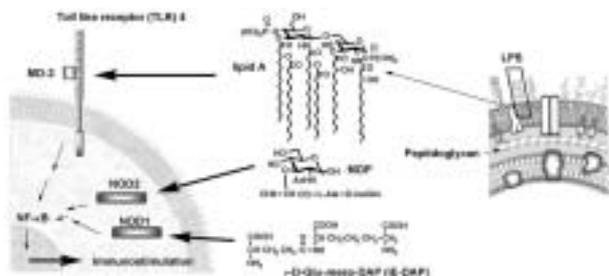
大腸菌のような腸内細菌のリポ多糖(LPS)は、強い免疫増強作用を示すだけでなく、その過剰な作用により強い炎症が引き起こされ重篤な場合はシヨ



* Koichi FUKASE

1960年4月生
大阪大学大学院理学研究科有機化学専攻
博士後期課程(1987年3月修了)
現在、大阪大学・大学院理学研究科・
化学専攻、教授、理学博士、天然物化学
TEL: 06-6850-5388
FAX: 06-6850-5419
E-mail: koichi@chem.sci.osaka-u.ac.jp

ックにより死に到ることから内毒素とも呼ばれます。LPS中の糖脂質であるリピドAが内毒素作用を示すことがWestphalらによって示されていましたが、芝先生、楠本先生は1983～85年にリピドAの構造決定ならびにその合成に成功し、LPSの生物活性はその一部分であるリピドAが担っていることを立証しました¹⁾。



3 活性発現機構解明のための細菌複合糖質の合成研究

このようにして生体は微生物に特徴的な化学構造を厳密に認識して免疫を増強することが明らかにされますが、認識機構については全く不明でした。大阪大学グループはLPSの生合成前駆体であるテトラアシル型リピドAの合成を行い、この化合物がヒトにおいてはLPSのアンタゴニストとして作用することを見出しました。この発見によってLPS受容体の存在が示され、その探索研究が行われました。その結果CD14やLBP (lipopolysaccharide binding protein) などの結合タンパク質が見出されましたが、膜貫通部位を有する真の受容体はなかなか明らかになりませんでした。

そうこうする内に上述のようにTLRが発見され、さらにTLR4がLPSの受容体であることが明らかにされました。なお当初はTLR2がLPSの受容体であるとも報告されましたが、後にこれはLPSに混入していたリポタンパク質の影響であることがわかり、審良先生のノックアウトマウスを用いた検証や我々の合成リピドAを用いた検証によりTLR4がLPS受容体であることが確認されました。一方、三宅らはTLR4の結合タンパク質としてMD2を見出し、MD2がシグナルの伝達に必須であることを明らかにし、我々の合成リピドAを用いてMD2が直接の認識に関わっていることが明らかにされました。

我々は、LPS受容体の探索を目的として、リピドAの一位リン酸基とアノマー炭素の間にエチレング

リコールが挿入されたホスホノキシエチル (PE) 類縁体がリピドAと同等の活性を示すことから、不安定なグリコシルリン酸を持たないPE-類縁体について放射性標識体の合成を検討していました。そのため効率的な合成法ならびに精製法を確立するなど大変な努力を要してようやく合成に成功しましたが(図1)、TLR4受容体の探索には間に合いませんでした。しかし標識体を用いてTLR4-MD2とリピドAが複合体を形成することが明確に示されました。またアンタゴニストのTLR4-MD2への結合量は、活性型である大腸菌型ヘキサアシルリピドAの結合量の約2倍であることが明らかになりました。これは二つのTLR4-MD2が大腸菌リピドA一分子に結合して二量化し、活性化と細胞内へのシグナル伝達が起こることを示しています。一方アンタゴニストはTLR4-MD2と1:1で結合するので、TLR4-MD2を活性化しないものと考えています¹⁾。2007年には、アンタゴニストであるテトラアシルリピドAとMD2の共結晶のX線結晶解析が行われ、MD2の3次元構造とアンタゴニストとの結合様式が解明されました(図2)²⁾。

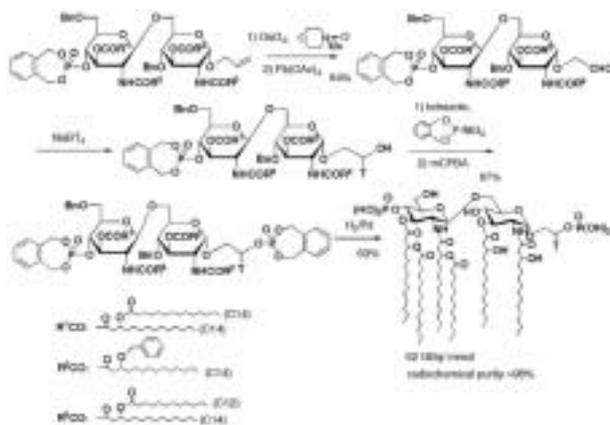


図1. リピドA放射性標識類縁体の合成

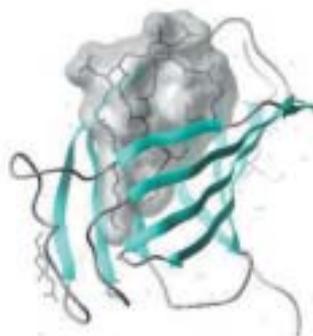


図2. テトラアシルリピドAが結合したMD2の立体構造

LPS ではリピドA は Kdo と呼ばれる酸性糖を介して多糖部と結合しています。我々は Kdo 二残基がリピドA に結合した Re 変異株 LPS を合成し、Kdo 残基が活性を増強すること、すなわち TLR4-MD2 はリピドA に加え、Kdo 部も認識することを見出しました¹⁾。ペスト菌は27℃で生育するとヘキサシルリピドA 構造を発現するが、哺乳類の体温である37℃ではアンタゴニストであるテトラシルリピドA を発現します(図2)。我々はそのLPSの生物活性に興味を持ち、テトラシルリピドA に Kdo が2残基結合したLPSを合成したところ、この化合物もテトラシルリピドA と同様にアンタゴニスト作用を示しました。ペスト菌LPSのアンタゴニスト作用が、感染初期の自然免疫反応を阻害し、ペスト菌の病原性に影響を与えているものと考えられます。最近37℃においてもヘキサシルリピドA を発現する変異ペスト菌が感染能を失うことが見出され、病原体の感染阻止における自然免疫の重要性が明らかにされました³⁾。ヘリコバクター・ピロリ菌は胃に生息し、胃潰瘍の原因となる細菌で、胃癌の発生にも繋がるということが報告されています。我々は最近、そのリピドA と Kdo 残基の結合した Kdo-リピドA の合成に成功し、これらがアンタゴニスト作用を示すことを明らかにしました(図3)⁴⁾。寄生菌のLPSも宿主の自然免疫から逃れるように進化したのだと考えられます。我々は以上の他にも様々なリピドA や類縁体のライブラリーを合成し、活性発現に重要な構造要因や活性発現機構の解析を行っています⁵⁾。

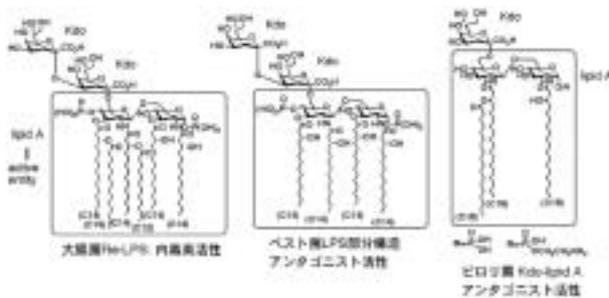


図3. 種々の細菌のLPS部分構造と生物活性

ペプチドグリカン (PGN) はN-アセチルグルコサミンとムラミン酸が交互に結合した糖鎖が網目状に架橋された巨大分子です。上述のようにPGNの活性発現に必要な最小構造はムラミルジペプチド

(MDP) であることが当研究室で見出されていましたが、その活性発現機構は最近まで未知でした。我々は未開拓の領域であったPGNフラグメントの合成研究を行い(図4)、ミシガン大学の猪原らと協力して受容体とその認識構造の探索を行いました。その結果PGN受容体候補である toll like receptor 2 (TLR2) は、PGNの基本骨格を認識しないと結論し⁶⁾、細胞内のNOD2がPGNの受容体であり、その最小認識構造がMDPであることを明らかにしました^{6,7)}。なおNOD2の変異によりその機能が失われるとクローン病になりやすいことが示されています。

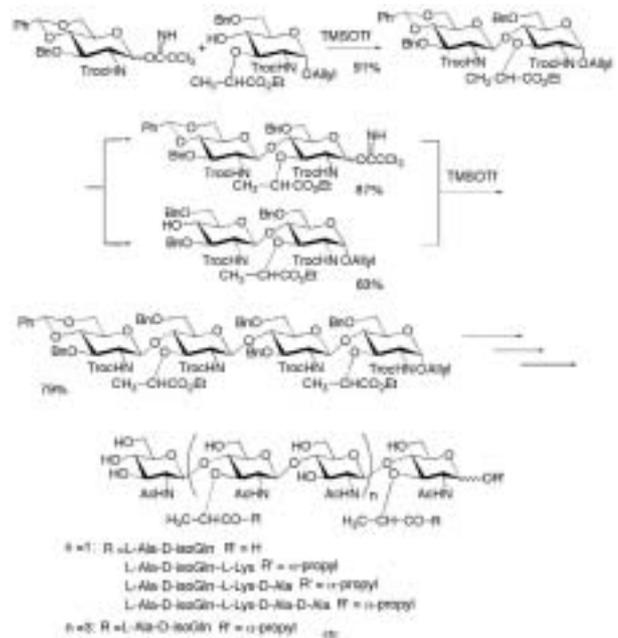


図4. ペプチドグリカン部分構造の合成

一方NOD1についても猪原らとの共同研究により、NOD1はグラム陰性菌PGNに特有のジペプチド構造 -D-Glu-meso-diaminopimelic acid(iE-DAP)を認識して免疫系を活性化することを明らかにしました⁸⁾。iE-DAPが免疫増強作用を示すことは藤沢薬品によって明らかにされていましたが、その受容体を特定したことになります。さらに強力なアゴニストを求めて探索を進め、iE-DAPの数百倍の活性を有するtetradecanoyl-iE-DAPを見出しました。in vivoにおけるNOD1の役割を明らかにするために、この化合物を作用させたところNOD1の刺激によってケモカインの誘導ならびに抗体産生の増強は見られるが、TLRとは異なり炎症性のサイトカイン

を誘導しないことが明らかになりました⁹⁾。NOD1は腸管などの粘膜上皮細胞において高度に発現しており、TLRが働くよりも先に生体防御に関わっているのだと思われます。

NOD1の機能が欠損した人は喘息になりやすいように、自然免疫に関わる受容体は、アレルギー、自己免疫疾患、癌などと密接に関わっています。これらの解析に自然免疫を調節する化合物は有用であるし、それらを用いて自然免疫受容体の機能を制御することで、抗腫瘍、抗アレルギー、あるいはワクチン作用の増強など新たな免疫療法の開発につながるものと期待されます。

以上のように我々の研究室では以前から、医学・生物学との境界領域において、生物活性分子が関与する生命現象を生体との相互作用に基づいて解明するという研究領域を開拓してきました。この領域は国際的に大きな潮流となって発展しており、その一部はケミカルバイオロジーとして注目されています。我々はこれまで同様に生命化学の基盤となる研究を展開し、新天地を開拓していくと同時に、独創的で個性豊かな後進を育成したいと考えています。

参考文献

- 1) Kusumoto, S.; Fukase, K. *Chem. Rec.* **2006**, *6*, 333-343.
- 2) Ohto, U.; Fukase, K.; Miyake, K.; Satow, Y. *Science* **2007**, *316*, 1632-1634.
- 3) Montminy, S. W.; Khan, N.; McGrath, S.; Walkowicz, M. J.; Sharp, F.; Conlon, J. E.; Fukase, K.; Kusumoto, S.; Sweet, C.; Miyake, K.; Akira, S.; Cotter, R. J.; Goguen, J. D.; Lien, E. *Nature Immunol.* **2006**, *7*, 1066.
- 4) Fujimoto, Y.; Iwata, M.; Imakita, N.; Shimoyama, A.; Suda, Y.; Kusumoto, S.; Fukase, K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6577-6581.
- 5) Fujimoto, Y.; Adachi, Y.; Akamatsu, M.; Fukase, Y.; Kataoka, M.; Suda, Y.; Fukase, K.; Kusumoto, S. *J. Endotoxin Res.* **2005**, *11*, 341.
- 6) Inamura, S.; Fujimoto, Y.; Kawasaki, A.; Shiokawa, Z.; Woelk, E.; Heine, H.; Lindner, B.; Inohara, N.; Kusumoto, S.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 23.
- 7) Inohara, N.; Ogura, Y.; Fontalba, A.; Gutierrez, O.; Pons, F.; Crespo, J.; Fukase, K.; Inamura, S.; Kusumoto, S.; Hashimoto, M.; Foster, S. J.; Moran, A. P.; Fernandez-Luna, J. L.; Nunez, G. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5509.
- 8) Chamailard, M.; Hashimoto, M.; Horie, Y.; Masumoto, J.; Qiu, S.; Saab, L.; Ogura, Y.; Kawasaki, A.; Fukase, K.; Kusumoto, S.; Valvano, M. A.; Foster, S. J.; Mak, T. W.; Nunez, G.; Inohara, N. *Nature Immunol.* **2003**, *4*, 702.
- 9) Masumoto, J.; Yang, K.; Varambally, S.; Hasegawa, M.; Tomlins, S. A.; Qiu, S.; Fujimoto, Y.; Kawasaki, A.; Foster, S. J.; Horie, Y.; Mak, T. W.; Nunez, G.; Chinnaiyan, A. M.; Fukase, K.; Inohara, N. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 203.

