



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Synthetic and biomedical studies on bacterial endotoxin lipid A

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2014-04-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小川, 祐示 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2352

氏名(本籍)	小川 祐 示 (岐阜県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第11号
学位授与年月日	平成6年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Synthetic and biomedical studies on bacterial endotoxin lipid A
審査委員	主査 岐阜大学 教授 長谷川 明 副査 岐阜大学 教授 木 曾 眞 副査 信州大学 教授 柴 田 久 夫 副査 岐阜大学 教授 原 徹 夫 副査 静岡大学 教授 碓 水 泰 市

論文の内容の要旨

グラム陰性菌の細胞壁外膜に局在するリポ多糖(LPS)は内毒素の主成分として知られ、多彩な生物活性を発現する。近年、ウェストファール等はその活性がリピドA画分に集約されることを発表し、その後の研究から、リピドAと呼ばれるグルコサミンが β -1,6-結合した2糖のC-1及びC-4位にリン酸基がC-2,3,2',3'位に β -ヒドロキシ脂肪酸やそのアシルオキシ脂肪酸がエステル体あるいは酸アミド体として導入した化合物であることが合成化学的に証明された。さらにその活性(様々な毒性、発熱性、免疫薬理活性、抗がん性など)がリピドAの非還元サブユニット構造にも強く発現されることが見出された。リピドAの非還元末端側単糖誘導体の一種であるGLA-60、すなわち2-デオキシ-2-[(3R)-3-ヒドロキシテトラデカナミド]-4-O-ホスホノ-3-O-[(3R)-(3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル)]-D-グルコースは全般的に強い内毒素類似の免疫賦活活性を発現するにもかかわらず、発熱性やマウスに対する致死毒性が極めて低いことが見いだされ、生体に不利な毒性と有利な活性の解離の可能性を示した。

本研究ではこのGLA-60をリード化合物としてリピドA単糖誘導体の免疫調節剤としての医薬品への応用の可能性について探る目的で、GLA-60の構造とその活性相関について研究を行った。

まず結合する脂肪酸の鎖長についての基礎的知見を得るために系統的に炭素数を変化させた各種の同族体を合成し、生物活性を検討した。この結果、脂肪酸の鎖長がリピドAの持つ免疫賦活活性発現に直接大きな影響を与える因子であると同時に、各活性によってその効果的な鎖長が若干異なることが見いだされ、鎖長と活性の関係の重要性が立証された。

次に導入する脂肪酸の種類を検討を行った。一番目に、天然に見いだされるリピドAの中には極微量の2-ヒドロキシ脂肪酸が存在するものがある。そこで2-ヒドロキシ脂肪酸の影響を調査する目的でGLA-60のC-2,3位に2-ヒドロキシ脂肪酸を導入した化合物を合成した。導入した脂肪酸の炭素数は10,12,14,16に変化させた。これら合成した化合物の生物活性は、幾つかの化合物には僅かに免疫刺激活性が保持されていたが、GLA-60に比べると全般に低い活性しか発現しなかった。これにより3-ヒドロキシ脂肪酸の活性発現因子としての重要性が示された。二番目に、GLA-60のC-3位に結合するテトラデカノイルオキシテトラデカノイル基がエステル結合型分岐脂肪酸であることに着目し、このエステル結合型分岐脂肪酸と活性との関係について検討した。エステル結合型分岐脂肪酸と同様に高い親油性をもつ置換基としてアルキル分岐脂肪酸を選定し、エステル結合型分岐脂肪酸に換えてアルキル分岐脂肪酸を導入した化合物を合成した。導入した脂肪酸はC-2,C-3で分岐した二種類を、更に炭素鎖長も10,12,14,16の各鎖長の組み合わせとした。これら化合物の構造活性相関について検討を加えた結果、C-2,3分岐脂肪酸共に幾つかの化合物ではリード化合物としたGLA-60よりも強い免疫刺激活性が確認され、活性発現には必ずしもエステル結合型分岐脂肪酸が必要ではなく、活性によってはC-2あるいはC-3アルキル分岐脂肪酸を導入した方がよい結果を与えることを見いだした。又アルキル分岐脂肪酸は生体内において酵素による加水分解を受けることはなく興味深い。更に2-アシルオキシ脂肪酸を導入した化合物の場合は全般に低い活性しか発現しなかったが、アルキル分岐脂肪酸の場合、C-2分岐でも高い活性を発現した点が注目される。

脂肪酸の導入位置に関する研究のためにグルコサミンのC-1,2,3位にそれぞれ1本ずつの脂肪酸を導入した化合物の合成を行った。これらの化合物には有意な活性の発現は観察されず、GLA-60類縁体では、活性発現のためにC-2,3位に合計3本の脂肪酸が導入されることが最も効果的であることが判明した。

GLA-60のC-4位に導入されたリン酸基は化学的に不安定である。そこでC-6位水酸基と積極的に環化させることにより不安定なリン酸基を安定化させた4,6-サイクリックリン酸化化合物の合成法を確立すると共に、数種類の化合物を合成した。

以上、本研究で得たGLA-60をリード化合物とした類縁体の合成と生物活性の評価により内毒素成分リピドA関連化合物を新しいタイプの免疫調節剤として医薬品へ応用するための貴重な構造活性相関の情報が得られたことは、今後の開発研究に貢献するものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

グラム陰性菌の細胞壁外膜に局在するリポ多糖は内毒素（エンドトキシン）の主成分として知られ、多彩な生物活性を発現する。その化学構造は親水性多糖部分と疎水性糖脂質（リピドA）から構成されるが、菌種によって分子多様性であり、そのエンドトキシン活性も異なる。1980～1984年ウェストファール一派により、その活性（毒性、発熱性、免疫増強活性、感染防御活性、抗腫瘍性など）がリピドA部分に集約されることを発表した。

一方芝等による全合成により、この事実が証明された。またリピドAの非還元単糖部分にも免疫増強性、抗がん作用等有用活性が強く発現するにもかかわらず、毒性が極端に減少することが見出され、多様な生物活性が化学構造により解離できる可能性が示唆された。

本研究は、上記の研究過程で化学合成されたGLA60（低毒性化合物）をリード化合物とする構造活性相関に関する研究である。GLA60の化学構造は、2-デオキシ-2-[(3R)-3-ヒドロキシテトラデカナミド]-4-O-ホスホノ-3-O-[(3R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル]-D-グルコースである。すなわちグルコサミンのアミノ基に3-ヒドロキシ酸がアミド結合し、3位水酸基にアシルオキシ脂肪酸が、4位水酸基にリン酸がそれぞれエステル結合した化合物である。以下の順に研究を進めた。1) 結合する脂肪酸の鎖長についての基礎的知見を得るために系統的に炭素数を変化させた同族体を合成し、生物活性を検討した。その結果、脂肪酸の鎖長がリピドAの持つ免疫増強活性に直接大きな影響を与える因子であり、炭素数14を最適とし、16となると活性を失った。2) 脂肪酸の種類を検討を行った。一番目に、2-及び3-ヒドロキシ脂肪酸を選び、炭素数は10, 12, 14, 16に変化させた。活性が最も強かったのはC-14の3-ヒドロキシ酸であり、2-ヒドロキシ酸はほとんど活性を示さなかった。これにより3-ヒドロキシ脂肪酸の活性発現因子としての重要性が示された。ついでC-3位にはアシルオキシ脂肪酸がエステル結合しているが、それをアルキル分岐脂肪酸に変化させ、分岐の場所をC-2, -3とし、その炭素鎖長も10, 12, 14及び16の各鎖長の組み合わせとした。C-2, 3分岐脂肪酸共に合計炭素数30を中心とする数種類の化合物にリード化合物よりも強い免疫増強活性が確認され、活性発現には天然エステル結合型分岐脂肪酸が必要でないことが判明した。またアルキル分岐脂肪酸は生体内において酵素による加水分解を受けることはなく興味深い。なお2-アシルオキシ脂肪酸を導入した化合物の場合は全般に低い活性しか発現しなかったが、アルキル分岐脂肪酸の場合、C-2分岐でも高い活性を発現した点は注目される。3) 脂肪酸の導入位置を決定するために、グルコサミンのC-1, 2, 3位にそれぞれ1本ずつの脂肪酸を導入した化合物の合成を

行った。これらの化合物には何ら活性が発現せず、活性発現のためにはC-2, 3位に合計3本のそれぞれ炭素数14を持つアルキル鎖長が導入されることが最も効果的であることが判った。4) GLA60のC-4位導入されたリン酸エステルは化学的に不安定である。そこでC-6位水酸基と脱水環化させることにより安定化させるとともに、C-4位リン酸エステルの効果を検討した。その結果、サイクリックリン酸エステルの方が活性が強く発熱性が減少することが判明した。

以上、本研究はリピドA非還元末端サブユニット類縁体合成と生物活性の評価により内毒素成分リピドAの活性と毒性の解離の可能性、新しいタイプの免疫調節剤への応用のための貴重な情報を提供するものであり、今後の医薬品開発研究に貢献すること大である。よって本論文は博士(農学)学位論文として十分な価値があるものと認める。