

所 属 生物機能応用科学 専攻 氏 名 小島 久毅

審査委員 田口 寛, 今井 邦雄, 久松 眞, 稲垣 穰

論文題目 Development of Analytical Method and its Application for Lipopolysaccharide
(リポ多糖の分析手法の開発と応用)

(要旨本文)

大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性菌の外膜構成成分であるリポ多糖 (LPS) は、リピド A、R-コア糖鎖、および O-抗原多糖の三つの部分構造から構成されている。

いっぽう、腸内細菌科の LPS では、リピド A 部分の構造はほぼ共通であるのに対して、R-コアと O-抗原多糖の構造は菌種により様々で、これらが免疫応答の抗原になる他、バクテリオファージにとっては宿主を選択するためのレセプターになる。バクテリオファージ ϕ X174 は、O-抗原多糖を持たない R 型菌に選択的に感染することから、レセプターとして重要なのは R-コア糖鎖部分であることが知られている。近年稲垣らは、 ϕ X174 を構成する 4 種類のタンパク質 (F, G, H, J) の内 G, H および F タンパク質を遺伝子工学的な方法で調製し、蛍光および円二色性スペクトルの変化を調べることにより、それらと LPS との相互作用を定量的に解析した。しかし、R-コア糖鎖部分にはリン酸やエチルアミノリン酸がさまざまな数や位置で結合しており、それら非定量的な置換基の寄与の評価を行うためには、それらを正しく知るための新たな分析方法が必要であると考えた。

本研究では、まず大腸菌 C 株の LPS に着目し、それをアルカリおよび酸で限定加水分解して、O-脱アシル LPS、O, N-脱アシル LPS、PS を調製した。質量分析計でそれら LPS 誘導体の骨格糖鎖ならびに非定量的な置換基を解析することに成功し、簡便な LPS 誘導体の成分分析方法を確立した。様々な質量分析計を使用した中で、イオン化部から検出部の距離が最も短いシングル四重極質量分析計 (ESI-Q-MS) が高感度で分析ができることが分かった。リン酸残基はこれまで最大で 7 個であると思われていたが、中には 9 個ものリン酸残基を持つ分子種が存在することが判明し、2 個が主流であるとされていた KDO についても 3 残基目を含む分子種が存在することが確認でき、ESI-Q-MS を用いた本分析により LPS の多様性を明確に示すことに成功した。

つぎに、クロマトグラフィーによる LPS の多様性の分析方法を開発した。LPS 誘導体に対して順相、逆相、逆逆相系等のカラムを用いる HPLC 分析を検討した結果、イオン交換カラム、とくに四級アンモニウム系の HiTrapQ カラムで O, N-脱アシル LPS、PS の分析に対して良好な結果を得た。しかし、それに比べて O-脱アシル LPS は、荷電残基が多いためカラムから溶出しなかった。そこで、HPLC 分離分析の改良法として、逆相イオンペア HPLC 法を開発した。イオン交換 HPLC 法は、単純なオン/オフモードでの分離法であるため、各成分間の分離が不十分であった。いっぽう、逆相イオンペア HPLC 法では、荷電残基の数の違いを疎水性の違いに変換することにより、各成分間の分離エネルギー差が大きくなり、分離を著しく改善することができた。

LPS 誘導体は UV 吸収を持たないため、それらの検出には、ポストカラム蛍光誘導体化法を採用した。ここでは、糖鎖構造に含まれるシスジオール構造選択的に反応が進行する、過ヨウ素酸/タウリンの反応系を使用し、高感度に目的成分を分析することに成功した。また、移動相を揮発性のものに変更したうえで、質量分析計 (MS) の選択的イオン検出法 (SIM) を使用することにより、さらなる高感度分析化に成功した。

また、より少量で分析が可能であるキャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) でも分析方法を開発した。HPLC 法では一般に 1 回の分析に対して数 μ L のサンプルが必要であるが、CZE では分離度は逆相イオンペア HPLC 法には及ばないもののサンプルの消費量は 1 回の分析に際し、数 nL で済む点が、LPS 誘導体の分離分析に対して大きな利点になった。また、MS との接続も良好で、化合物の分離・同定に成功した。とくに、CZE による分離の後、MS に導入する前に加える浸出液の組成、pH をそれぞれ工夫することにより、さらなる高感度化に成功した。

最後に、LPS 分析の応用として、ワイドポア (300 Å) C18 カラムを用いた逆相イオンペアサイズ排除クロマトグラフィーで、多型として存在する LPS を 1 本のピークとしてまとめて検出することにも成功した。これは、簡便な総エンドトキシンの定量分析法として特許出願を行った。

本方法は現有の生化学的な方法（リムルス試験）に比べて、検出感度は数 100 倍劣るものの、その操作は極めて簡便であり、それゆえに再現性にも優れるため、その応用もまた期待される。

以上、これらの分析方法を上手く組み合わせることにより、LPS の分析がより精密に行なえることを本研究で明らかにした。今後は、LPS 関連化合物と ϕ X174 をはじめとする LPS 結合タンパク質との相互作用解析などにこれらの方法が発展・応用されることが期待される。