内毒素の活性部位

“リピド A”の構造と合成

19 世紀の末頃、コレラ菌やチフス菌の菌体内に動物に発熱や死をもたらす毒素が存在することが見いだされ、ジフテリア毒素のように培養液中に放出される“外毒素 (exotoxin)”に対して“内毒素 (endotoxin)”と呼ばれるようになった。内毒素は $0.01 \mu\text{g/kg}$ の微量でウサギに明確な発熱をもたらすほど強い活性を有するが、研究が進むにつれて有害な作用だけでなく、我々にとって有益な、きわめて多様な作用のあることもわかってきた。たとえば、内毒素を注射することによって腫瘍が出血壊死する抗腫瘍活性、B細胞やマクロファージを活性化する免疫増強活性、インターフェロン、プロスタグランジン産生を誘導する作用などが知られている。このようなわけで、内毒素による死や発熱を防ぐ対策に止まらず、これを医療に応用することをめざした研究が行われてきたのは当然のことと言える。一方、内毒素は実は病原菌だけに限らず、非病原性の腸内細菌を含むグラム陰性菌に共通に広く分布していることも明らかになった。このことから予想できるように、内毒素は消化管中ではまったく活性を示さず、血管系に入ってはじめて作用を発揮するのも興味深い。

内毒素の化学的本体の研究は 1930 年頃から次第に進んできた。まずグラム陰性菌の表層に存在するリポ多糖が内毒素そのものであることが明らかにされた。そして

- 1: $\text{RCO}, \text{R}'\text{CO} = \text{acyl}$
- 2: $\text{RCO} = \text{tetradecanoyl},$
 $\text{R}'\text{CO} = (R)\text{-3-hydroxytetradecanoyl}$

図 1 リピド A の旧推定構造 1 とその合成類縁体

1954 年に西独の Westphal と Lüderitz は、リポ多糖を弱い酸性条件で処理すると構成成分である多糖部と糖脂質の間の結合が容易に加水分解され、その糖脂質部分にはほとんどの内毒素活性があることを示した。これは内毒素研究におけるきわめて画期的な発見であり、彼らがこの時に糖脂質に与えた“リピド A”という名称が現在でもそのまま使われている。彼らの説に対して、当初は多糖部分の役割を強調する研究者からの反論が多かったが、多糖を欠く変異菌のリポ多糖も内毒素活性を示すことなどから、次第にその正当性が認められてきた。

リピド A の化学構造研究も Westphal 一派によって進められてきた。彼らはサルモネラをはじめ多くの菌について調べた結果、 $\beta(1-6)$ 結合したグルコサミンジサッカリドの 1 位と 4' 位にリン酸が、3, 4, 6' 位の水酸基と 2 つのアミノ基には種々の脂肪酸が結合した 1 式をリピド A の構造として提出した (図 1)。3' 位の水酸基は多糖が結合していた位置と考えられた。その後 Khorana のグループも 1 の構造を追認している。脂肪酸成分としては、内毒素に特徴的な (R)-3-ヒドロキシテトラデカン酸が最も多く、このほか $\text{C}_{12} \sim \text{C}_{16}$ 程度のノルマル脂肪酸も含まれているが、それらの組成は菌種によって多少異なっている。

さて、ここでリピド A の不均一性について触れておく必要がある。実は、一つの菌のリピド A でも、脂肪酸組成の異なる成分やリン酸残基に別のアミノアルコール、アミノ糖が結合したものが混在していると言われ、全体として複雑な混合物である。しかも、同一分子内に親油性部と親水性部を持つ性質上、精製が困難であって、これまでリピド A の成分が単一の化学物質として単離されたことは一度もなかった。上記の推定構造式 1 は混合物のままの試料を用いた分析や分解反応の結果導かれたもので、アシル基の正確な数や結合位置はわかっていなかった。

以上が 1979 年頃のリピド A 研究の状況であった⁽¹⁾。すなわち、リピド A が内毒素活性の本体であること、その構造が 1 式で表わされることがほぼ受け入れられていたが、いずれもまだ確実に証明されたわけではなかった。意地悪い見方をすれば、たとえば 1 以外のまったく別の物質が混入して、それが内毒素活性 (の一部) を発現しているという可能性も完全に否定できていなかった。筆者らはこのような状況にこそ合成的手法が貢献で

きると考えて、リピドAの合成研究を開始したのである。

合成を開始した時には、筆者らは脂肪酸の種類や結合様式が厳密に天然物と一致していなくても、1式に相当する化合物には内毒素活性が現われるものと期待していた。そこでアシル基の種類と数、リン酸エステルの有無などが活性に及ぼす影響を系統的に調べようと計画し、共通の中間体から多くの類縁体を合成できるように、まずジサッカリドを合成し、これに順次N-アシル、O-アシル基、各リン酸残基を導入する経路を選んだ。

まず予備実験を兼ねて、1のすべてのアシル基をテトラデカノイルとした構造を目標として合成経路を確立したのち、次に内毒素特有の3-ヒドロキシテトラデカノイル基を有する化合物をめざした。このヒドロキシ酸はキラル炭素を持つが、幸い阪大蛋白研泉研究室の協力を得て、修飾ラネーニッケル触媒を用いる3-ケト酸エステルのエナンチオ面区別還元によって、光学的に純粋な天然型(R)-配置の酸を多量に得ることができたので、これを用いて種々の類縁体を合成した。

得られた合成品の生理活性を調べたところ、テトラデカノイル基のみを有するものや、3-ヒドロキシアシル基があってもリン酸残基のない誘導体は、まったく内毒素活性を示さなかったが、アミノ基に3-ヒドロキシアシル基が結合した1,4'-ビスリン酸エステル(2)と1-モノリン酸エステル体に、初めて発熱原性や毒性などの作用が認められた。しかし、その強さは天然リピドAにくらべてわずか1/1000程度に過ぎず、また溶解度などの物性においても合成品と天然物にはかなりの違いがあった(1-3)。

この結果から、内毒素活性を有する化合物を化学的に合成できるという望みが大きくなった反面、これまで標的としていた1の構造は正しいのだろうか、1式に基づいてこれ以上アシル基の組み合わせを変えても天然物に匹敵する強い活性の合成品は得られないのではないか、という危惧が生じてきた。筆者らが以上の合成研究を順次発表すると、国内外の数グループからも同じくリピドAの合成をめざした報告が出され、今後激しい競争になることが予想された。しかし、系統的な合成と活性試験の結果から、推定構造に疑問を持っているのは幸いにも筆者らのグループだけのものであったので、ここで腰を

据えて天然リピドAの構造を自分たちの手で再検討し、アシル基の種類や結合位置のはっきりした合成標的構造を確定しようと考えた。

構造研究は西独のLüderitzらのグループと共同で行ない、材料として不均一性の少ない大腸菌Re変異種のリピドAの供給を受けて、まず純粋な成分を単離することをめざした。分離に先立って、化学的に不安定なグリコシル位のリン酸残基を酸によって除去し、残ったリン酸残基をメチルエステル化すると取り扱いが容易になり、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで主成分3をほぼ純粋に単離することができた。分析の結果、3はグルコサミン2モル、リン酸1モルに対して3-ヒドロキシテトラデカン酸4モル、ドデカン酸およびテトラデカン酸各1モル、計6モルの脂肪酸を含むことがわかった。

次にNMRによる構造解析を行なった。天然リピドAの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは不均一性と会合のためにきわめてブロードで、有益な情報を与えないが、リン酸残基をエステル化し、分画精製した3ではシグナルの分離がかなりよくなった。互いに重なり合ったシグナルも、360 MHzでシフト相関2Dスペクトルを測定することによってほぼすべて帰属することができ、さらにアセチル化によるシフトや上記の分析結果を総合すると次の結論が得られた。

① グルコサミン β (1-6)ジサッカリド4'-リン酸エ

3: X = PO(OCH₃)₂, Y = H

4: X = Y = PO(OH)₂

図2 確定した大腸菌リピドAの構造4とその誘導体

ステル構造には間違いはない。

② アシル基はこの骨格構造の2つのアミノ基と3, 3' 位の水酸基に結合している。

③ 4モルの3-ヒドロキシ酸のうち2モルはその水酸基に他の脂肪酸が結合した3-アシルオキシ型になっている。

すなわち、ジサッカリド上のアシル基の位置は、1式では遊離となっていた3'位を含む4箇所、逆に4, 6'位は遊離であることになり、1の推定式がここに訂正された⁽³⁾。続いて、化学反応とFD-MSを組み合わせることによって各アシル基の位置を決定し、化合物3の構造

が図2の通りであること、ひいては元の大腸菌リピドAの構造が4であることを明らかにできた⁽⁴⁾。

なお、Takayama からもネズミチフス菌のリピドA成分を丹念に TLC で分離し、FAB-MS によって単一な各成分の脂肪酸組成を調べていたが、続いて NMR でアシル基の位置を推定して同じ構造式を提出している⁽⁵⁾。

いよいよ新しい推定構造に基づいて合成を行なうことになったが、4に先立って構造のより簡単なリピドA生合成前駆体の合成を企てた。サルモネラ菌の変異種から

Bzl = $C_6H_5CH_2$, Bz = C_6H_5CO , Allyl = $CH_2=CH\cdot CH_2$,
 $R^1CO = (R)-3\text{-hydroxytetradecanoyl}$, $R^2CO = (R)-3\text{-benzyloxytetradecanoyl}$

図3 リピドA生合成前駆体5の合成

TCEC = CCl_3CH_2OCO , R^1CO と R^2CO = 図3と同じ, $R^3CO : (R)-3\text{-tetradecanoyloxytetradecanoyl}$, $R^4CO : (R)-3\text{-dodecanoyloxytetradecanoyl}$

図4 大腸菌リピドA 4とその誘導体の合成

単離されたこの前駆体は、4モルの3-ヒドロキシテトラデカン酸のみを含み、ノルマル脂肪酸を欠くにもかかわらず、ほとんどの内毒素活性を有していることが報告されていた。そのアシル基の結合位置は決定されていなかったが、筆者らの得た上述の知見をあてはめると、この生合成前駆体は5の構造を持つと考えられる。詳しい合成経路は略するが、図3に示す2つの単糖成分を縮合させ、順次目的の位置に(R)-3-ベンジルオキシテトラデカノイル基を導入したのち、リン酸化、脱保護を経て5を得ることに成功した。この合成品は致死毒性のほか、さまざまな活性試験において天然の生合成前駆体とまったく同等の活性を示し⁽³⁾、これによってアシルジサッカリドリン酸エステル構造が内毒素活性の本体であることがはじめて疑問の余地なく証明できた。

この成果に勢いを得て、次にいよいよ完全な天然型リビドA4の合成に取り組んだ。この構造はこれまでのものと違って両グルコサミン残基に結合しているアシル基がそれぞれ異なっている。そのため、合成にあたってはかなり方針を変える必要があった。今回は目的を天然物の合成にしぼり、最終生成物に必要なアシル基と4'位リン酸残基を単糖段階で導入しておく経路を選んだ。ただし、グリコシルドナーのアミノ基に結合した3-アシルオキシアシル基はグリコンド結合形成の段階でβ-脱離によって4'-アシル基に変化してしまうので、このN-アシル基だけはあとで導入することにした。まず図4に示す経路で4'-モノリン酸エステルを合成したところ、そのジメチルエステル体は先に大腸菌から単離した3とTLC, 360 MHz ¹H-NMRで完全に一致し、筆者らの推定構造が正しかったことを証明できた。これは天然リビドAの成分と合成化合物を直接比較し、同定した最初の例である。続いて、合成経路に少し変更を加え、筆者らの開発したブチルリチウム-ホスホクロリデート法で1位をリン酸化して、ついに天然型リビドA4の合成も達成することができた⁽⁴⁾。得られた合成品の生物活性は予想通り上述の生合成前駆体より強く、天然リビドAとまったく等しいことがごく最近明らかになった。

以上、リビドA研究の歴史から最新の情勢までを筆者らの合成研究を中心に述べてきた。一世紀にわたる内毒素研究の長い歴史において、得られた医学、生化学的研

究の成果は膨大であるが、これまでは研究者によって用いた菌体材料やリポ多糖、リビドA調製法に差があり、そのために生物活性測定の結果が混乱していることもしばしばであった。しかし、今や化学合成によって内毒素活性を有する単一純粋な物質を得ることができるようになった。今後はそのような合成化合物を“標準品”として使うことによって、混乱を避け、従来不可能であった作用機構の細かい解析ができるようになるだろう。また、種々の構造類似体を合成することによって、構造変化が化合物の物性と生物活性にもたらす影響を調べることも可能となった。

さらに筆者らが期待しているのは、構造-活性相関の研究から進んで、内毒素の有用な作用を残して毒性を抑えた化合物を得ることである。すでに旧構造式1に関連して合成した物質の中には、毒性を示さずに免疫増強活性を有するものが得られているし、岐阜大・長谷川らは4の非還元末端側に相当する2-N,3-O-ジアシルグルコサミン4-モノリン酸エステルに同様の作用があると発表している⁽⁶⁾。文字通り“毒を薬に”というのもあながち夢ではなさそうに思える。

このように考えると、リビドAの構造決定と合成は決して研究のゴールではなく、これによって内毒素研究に一つの転機をもたらす新しいスタートであると言える。化学と生命化学の境界領域における研究の発展を期待したい。

我々の研究はMax-Planck免疫生物学研究所Lüderitz博士、阪大歯学部小谷尚三教授、北里研究所本間遜教授を中心とする各グループをはじめ、多くの医学者、生化学者の協力があってはじめて可能となったものである。これらの方々に対する心からの感謝を表わして稿を閉じたい。

- 1) 本間 遜(監修): “内毒素——その構造と活性”, 医歯薬出版, 1983.
- 2) L. Anderson & F. Unger (ed.): “Bacterial Lipopolysaccharides”, ACS Symposium series 231, American Chemical Society, 1983.
- 3) 芝 哲夫, 楠本正一: 有機合成化学協会誌, 42, 507 (1984).
- 4) M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusumoto & T. Shiba: *Proc. Japan Acad.*, 60, Ser. B, in press.
- 5) K. Takayama, N. Qureshi & P. Mascagni: *J. Biol. Chem.*, 258, 12801 (1983).
- 6) M. Matsuura, Y. Kojima, J. Y. Homma, Y. Kubota, A. Yamamoto, M. Kiso & A. Hasegawa: *FEBS Lett.*, 167, 226 (1984).

(楠本正一, 芝 哲夫, 大阪大学理学部)