

海綿質リボ多機異種抗原に関する研究

—モノクローナル抗体を用いた解析と化学構造—

横 田 俊 一

①

緑膿菌リポ多糖関連抗原に関する研究

—モノクローナル抗体を用いた解析と化学構造—

横田 伸一

目次

第1章 序	1
第2章 緑膿菌LPSの outer core 部位のモノクローナル抗体による解析	6
2-1. 序	6
2-2. 材料と方法	6
2-3. 結果	10
2-4. 考察	17
第3章 ガラクトサミンヌロン酸含有O-抗原多糖の化学構造とガラクトサミンヌロン酸残基を認識するヒトモノクローナル抗体	23
3-1. 序	23
3-2. 緑膿菌 IID 1008 (G型) のO-抗原多糖の構造	24
3-2-1. 材料と方法	24
3-2-2. 結果	26
3-2-3. 考察	39
3-3. 緑膿菌 IID 1001 (A型) のO-抗原多糖の構造	44
3-3-1. 材料と方法	44
3-3-2. 結果	45
3-3-3. 考察	59
3-4. L-ガラクトサミンヌロン酸残基を認識するヒトモノクローナル抗体	63
3-4-1. 材料と方法	63
3-4-2. 結果	64
3-4-3. 考察	71
第4章 緑膿菌の微量リポ多糖成分D-ラムナンの構造	74
4-1. 序	74
4-2. 材料と方法	74
4-3. 結果	76
4-4. 考察	93
第5章 結語	97
References	98
謝辞	104

Abbreviations:

LPS, lipopolysaccharide;

NMR, nuclear magnetic resonance;

ELISA, enzyme-linked immuosorbent assay;

GLC/MS, gas-liquid chromatography/mass spectrometry;

CFU, colony forming unit;

GalNA, galactosaminuronic acid;

GalNACA, N-acetylgalactosaminuronic acid;

GalNFoA, N-formylgalactosaminuronic acid;

GalNACA(amido), N-acetylgalactosaminuronamide;

GalNFoA(amido), N-formylgalactosaminuronamide;

QuiNac, N-acetylquinovosamine;

QuiNACH<sub>2</sub>, N-acetylquinovosaminitol;

Rha, rhamnose;

RhaH<sub>2</sub>, rhamnitol;

BacN, bacillosamine;

Bac(NAc)<sub>2</sub>, 2,4-di-N-acetylbacillosamine;

Bac2BtoH4Nac, 2-N-(3-hydroxybutanoyl)-4-N-acetylbacillosamine;

Hep, heptose;

KDO, 2-keto-3-deoxyoctonic acid.

## 第1章 序

緑膿菌は、環境に常在するグラム陰性菌であり、通常は病原性を示すことはない。しかしながら、癌・火傷・免疫抑制剤投与・外科手術後等の免疫能の低下した患者[1-3]や、嚢胞性繊維症(Cystic fibrosis)・びまん性汎細気管支炎(DPB)等の基礎疾患をもつ患者[4, 5]に対して日和見感染を引き起こす。更に、緑膿菌は抗生物質に対する耐性頻度も高いことから、その感染症は慢性化し易くしばしば致死性である[6, 7]。以上の観点から、緑膿菌感染症の治療には抗生物質を用いた化学療法に代わるもの、または併用されるものとして免疫療法に関心が向けられている。免疫療法にはワクチンによる能動免疫、免疫グロブリン製剤による受動免疫がある。従来の免疫グロブリン製剤のうち、ウシ、ウマ等の動物を免疫して調製した抗血清は高力価のものが得られるが、異種蛋白であることからアナフィラキシーショックやアレルギーなどの重篤な副作用を起こす可能性があるため、細菌感染症治療剤としては限界がある。また現在用いられている献血者の血液から分画・精製されたヒト免疫グロブリン製剤は、力価が低い、ロット差が大きい、供給源に限界があり安定した大量生産が困難である、AIDS、肝炎ウイルス等の混入によるバイオハザードの危険性があることなどが問題となっている。

以上の観点から、ヒトモノクローナル抗体の感染症治療剤としての応用が盛んに研究されている。緑膿菌に対してもヒトモノクローナル抗体が作製され、その感染症治療効果が検討されている[8-12]。しかしながら、強い感染治療能を有する抗体は緑膿菌の十数種存在する血清型に特異的なものに限られ、全ての緑膿菌に対応するには多種の抗体が必要となる。この欠点を克服するために、多くの研究者は緑膿菌のうちで臨床分離度の高い血清型を5から7種類程度選択し、これらの血清型特異抗体を混合したカクテル剤として緑膿菌感染症に対応しようとしている[9-11]。

本研究において筆者は、緑膿菌の血清型を越えて存在する感染防御抗原の検索と感染症治療への応用を目的として、緑膿菌表層のリポ多糖抗原もしくはそれに類似した多糖抗原について化学構造の決定とモノクローナル抗体(治療剤への応用の観点から主としてヒトモノクローナル抗体)による解析をおこなった。

リポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)は、グラム陰性菌の細胞表層(外膜)の主要な構成成分の一つであり、細菌内毒素活性とO-抗原(熱安定性抗原)活性の2つの側面をもつ糖脂質である。腸内細菌では、LPS分子はO-抗原多糖、コアオリゴ糖、リビド

Aの3部位から成り立つ[13]。緑膿菌のLPSも類似の分子構造をもつことが知られている(図1)[14]。(i)O-抗原多糖は、その菌株の主たる熱安定性抗原の本体であり、O-血清型を担う部位である。O-抗原多糖は、一般に1-7糖残基から成る繰返し単位がつながった多糖鎖であり、O-血清型毎に特徴的な糖組成、糖配列を有しており、抗原決定基を形成している。緑膿菌のO-血清型分類は古くから多くの研究者によって行われており、現在ではそれらの間の血清学的対応関係も明確にされ、欧米においては、LiuらによるInternational antigenic typing scheme (IATS) [15]、もしくはHabsの分類[16]が、日本においては本間のアルファベット表記を用いた分類(1976年)[17, 18]、東欧においてはLanyi等の分類[19, 21]が、広く受け入れられている。表1に、各血清型分類の対応関係を示す[20, 21]。一方、緑膿菌O-抗原多糖の化学構造の研究は、ここ10年間に飛躍的に進歩し、大半の血清型の標準株について化学構造が明らかにされつつある[22]。緑膿菌のO-多糖の特徴としては、アミノ糖に富む組成であり、種々の珍しいアミノ糖が同定されており、天然において緑膿菌でしか見いだされていないものも少なくない。(ii)コアオリゴ糖は、O-抗原多糖とリポドAの中間に位置する10糖残基程度の領域である。コアは更にinnerとouterに分けられる。inner coreは2-ケト-3-デオキシオクトン酸(KDO)とヘプトースからなる領域で、詳細な化学構造にはheterogeneityが認められるが、化学構造、抗原性の両面でグラム陰性菌LPSにおいて比較的共通性の高いと考えられている部位である[23, 24]。一方、outer coreは、大腸菌やサルモネラ菌で数種のタイプが知られている[25]のみで構造研究や、共通性に関する系統的な研究は殆どないのが現状である。緑膿菌のLPSのouter core部位については、いくつかの菌株において組成分析がなされ、共通成分としてD-グルコース、L-ラムノース、D-グルコサミン、L-アラニンが認められており[14]、菌株による変化が少ないと考えられている。しかしながらそれらの組成比は菌株毎で異なることから、構造の多様性が示唆されているにとどまり、詳細な化学構造の検討も数例[26, 27]しかない。(iii)リポドAはグルコサミンの2糖、りん酸及び脂肪酸を主成分とする糖脂質で、細菌内毒素としての種々の活性を担っている部位であり、多くのグラム陰性菌LPSで共通の構造を有することが知られている[13, 25]。

著者は、この複雑で多様性のある緑膿菌のリポ多糖抗原についてO-血清型を越えた共通抗原の検索を化学構造とモノクローナル抗体を用いた免疫学的性質の両面から検討した。更に、モノクローナル抗体については、緑膿菌感染症治療剤への応用を鑑みて、主としてヒトモノクローナル抗体を作製し、性状を解析した。

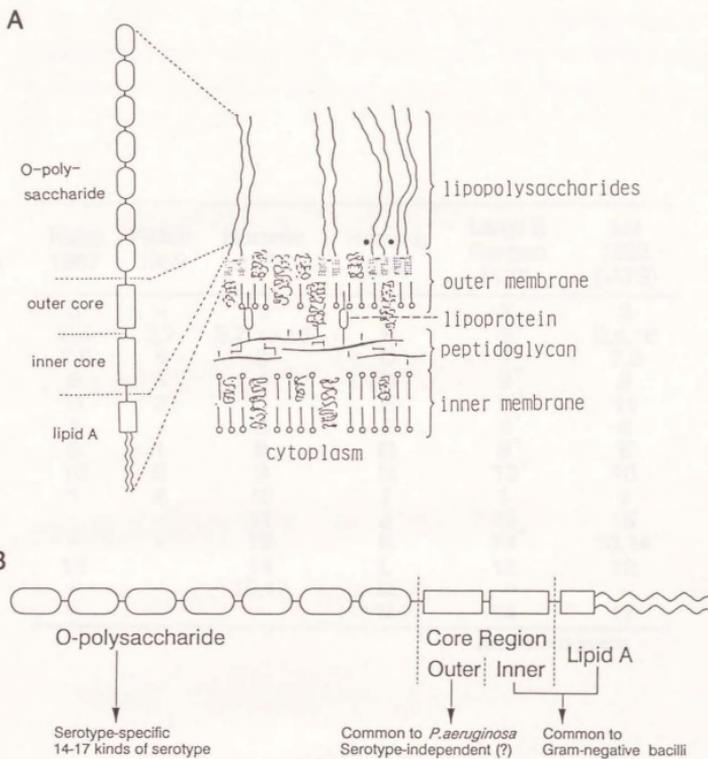


図1. グラム陰性菌の表層構造(A)及びリポ多糖(LPS)(B)の一般構造の模式図

表1. 緑膿菌の各種血清型分類の血清学的な対応関係 (文献19, 20)

Habs 1957	Fisher 1969	Homma 1974	Homma 1976	Lanyi & Bergan 1978	Liu 1983 (IATS)
3	-	1	A	3	3
2,5	3,7	2,7,13,16	B	2*	2,5,16
7,8	6	3	C	7*	7,8
9	-	4	D	9*	9
11	2	5	E	11*	11
4	-	6	F	4*	4
6	1	8	G	6*	6
10	5	9	H	10*	10
1	4	10	I	1	1
-	-	11	J	15	15
-	-	12	K	13*	13,14
12	-	14	L	12	12
-	-	15,17	M	-	-
-	-	-	N	14	17

\* several subgroups

本論文の第2章では、緑膿菌共通抗原として期待されるLPSコア部位のヒトモノクローナル抗体による解析。第3章では、いくつかの血清型のO-抗原多糖に共通して存在するガラクトサミノロン酸に着目し、ガラクトサミノロン酸含有O-抗原多糖の構造決定と該残基を特異的に認識するヒトモノクローナル抗体の作製について。第4章では、緑膿菌の共通多糖抗原と考えられるLPS標品中の微量成分D-ラムナンの単離と化学構造の決定について述べる。

## 第2章 緑膿菌リポ多糖のouter core部位を認識するヒトモノクローナル抗体

### 2-1. 序

第1章でも述べたが、緑膿菌LPSのO-抗原多糖のつけ根に存在するオリゴ糖部位、outer coreには構成成分として共通に、D-グルコース、L-ラムノース、D-ガラクトサミン、L-アラニンを含むことが報告されている。一方、それらの組成比は株ごとに異なっており、outer core部位の構造の多様性が示唆されている[14]。しかしながら、本部位の詳細な化学構造の解析は数例[26, 27]しか報告がなく、構造の共通性・多様性に関する体系的な研究は全く無いのが現状である。本章では、菌株や血清型毎による変化が比較的少ない部位であると考えられ、緑膿菌共通抗原として期待されるLPSのouter core部位を認識するヒトモノクローナル抗体を作製し、エпитープの同定と共に該部位の抗原性における共通性について検討した。2種のヒト抗outer coreモノクローナル抗体の緑膿菌臨床分離株への結合性を検討した結果、outer core部位は、血清型を越えた抗原性を有する部位であるが、緑膿菌全般に共通ではなく多様性のあること。その多様性はO-血清型とある程度の相関があること。また抗outer core抗体のうち、あるものについては緑膿菌感染症に対して高い治療効果を持つことを明らかにした[28]。

### 2-2. 材料と方法

#### 菌株

緑膿菌中間血清型別標準株[17, 18]は、東京大学医科学研究所より入手した。緑膿菌PAC1株及びPAC1R株(Habs血清型O3)とそれら由来のLPSに欠損をもつ変異株[27]はDr. P. M. Meadow (University College of London) より分与を受けた。緑膿菌臨床分離株は、住友製薬研究所蔵の株を用いた。血清型はマウスモノクローナル抗体、メイ・アッセイ緑膿菌[29] (明治製薬) を用い、スライド凝集法によって決定した。緑膿菌はハート・インフュージョン寒天培地もしくはハート・インフュージョン液体培地 (日水製薬) で37℃で培養した。

#### LPSの調製

対数増殖後期まで培養した緑膿菌の菌体をアセトンで脱脂、乾燥させた。菌体からのLPS抽出は、Smooth型の菌株からはWestphalとJannの方法[30]に従った。即ち、菌体を45%フェノールで70℃、15分間処理して水層に抽出した。これをCetavionで脱核酸した後、

エタノール沈澱をLPS標品とした。rough型の菌株，M型菌株からのLPSの抽出は、UchidaとMizushimaの方法[31]に従った。即ち、(1)  $MgCl_2$ /Triton X-100の熱処理による蛋白の変性、(2) EDTA/Triton X-100によるLPSの可溶化、(3)  $MgCl_2$ によるLPSの沈澱、(4) エタノール沈澱の4段階による抽出を行った。緑膿菌以外のグラム陰性菌由来のLPSは、List Biochemical Laboratories Inc.もしくはRibi Immunochem Research Inc.より購入した。

#### ヒトモノクローナル抗体産生細胞株の樹立

ヒト末梢血リンパ球は、緑膿菌抗原に高い抗体価をもつ健康人から得たヘパリン処理血液(100 ml)をフィコール密度勾配(Mono-poly resolving medium; Flow Laboratories Inc.)を用いて調製した。得られたリンパ球を0.2% pokeweed mitogen (Gibco), 非働化(56°C, 30分)した20% (vol/vol) ウシ胎児血清 (HyClone), 0.05 mg/ml ビルビン酸ナトリウム, 0.15 mg/ml オキザロ酢酸, 0.2 U/ml ウシインシュリン, 30  $\mu$ g/ml ヒトトランスフェリン,  $5 \times 10^{-8}$  M 2-メルカプトエタノール, 0.0002% (wt/vol) 緑膿菌ホルマリン死菌 IID 1001 (血清型A) 及びIID 1020 (G), 100 U/ml ペニシリンG (明治製薬), 50  $\mu$ g/ml 硫酸ストレプトマイシン (明治製薬) を含む RPMI-1640培地 (日水製薬) で 37°C, 湿度 100%, 5%  $CO_2$ の条件下、 $2.0 \times 10^6$  cells/mlの細胞濃度で6日間培養した。in vitro感作したPBLをヒトマウスヘテロミエロマ SHM-D33と3:1の比になるように混合し、融合操作を行った。SHM-D33株 (ATCC CRL1668) [32]はDr. N. N. H. Teng (Stanford University) より分与を受けた。細胞融合は、OiとHertzenbergのポリエチレングリコール (PEG) 法[33]に従った。PEG溶液は、45% (wt/vol)のPEG4000 (Merck), 10% (vol/vol)のジメチルスルフォキシドをPBSに加熱、溶解したものである。融合細胞は、15% 牛胎児血清添加Iscove改変Eagle培地 (日水製薬) を基本培地とし、添加物として  $5 \times 10^{-8}$  M 2-メルカプトエタノール, 100 U/ml ペニシリンG, 50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを添加した培地で96穴プレートで培養した。ハイブリドーマの選択は先の培地に100  $\mu$ M ヒポキサンチンと1  $\mu$ g/ml アザセリン[34]を添加した培地で行った。96穴プレートでの培養には、BALB/cマウスの脾細胞と腹腔浸出細胞をフィーダー細胞として用いた。緑膿菌に対する特異抗体価は、ハイブリドーマの培養上清をELISAに供して検出した。最初、血清型標準株A (IID 1001), B (IID 1002), M (IID 5018)の菌体サスペンションの混合したもの, E (IID 1030), G (IID 1020), I (IID 1010)の混合物, またはハート・インフュージョン・ブロー (非特異的に結合する抗体を除くため) の3種の抗原吸着ブレイ

トを用いて特異抗体のスクリーニングを行った。前2者のプレートで陽性であったウェルの細胞を拡大し、AからMまでの本間血清型別標準株18株それぞれを用いてリアッセイを行った。クローニングは、限界希釈法によった。

#### ELISA

抗体の結合特異性とtiterの測定は、ELISA法によった。菌体吸着プレートは以下の方法で作製した[35]。緑膿菌菌体のPBS懸濁液( $A_{600} = 0.2$ )を96穴ポリビニルマイクロプレート(Falcon)に50  $\mu$ lずつ分注し、700xgで15分間遠心する。2% グルタルアルデヒドを分注し、室温で15分間インキュベートして菌体を固相表面に固定する。PBSで洗浄後、3% 牛血清アルブミン(BSA)のPBS溶液を分注、4°C、一夜放置し、抗原の吸着していない固相表面をブロッキングする。プレートを洗浄後、減圧下で乾燥させ、アッセイに用いた。LPS吸着プレートは以下の方法で作製した[36]。LPSを25  $\mu$ g/mlの濃度で炭酸緩衝液(15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 30 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 3 mM  $\text{NaN}_3$ ; pH 9.6)に溶解したものを96穴マイクロプレートに分注し、4°Cで一夜インキュベートする。LPS溶液を捨てた後、3% BSAのPBS溶液にて、4°Cで一夜、もしくは37°Cで2時間インキュベートでブロッキングした。溶液を捨てた後、減圧乾燥させた。抗原吸着プレートは、-20°Cで保存した。

抗原吸着プレートを0.05% Tween 20含有PBS(PBST)で洗浄した後、試料(抗体溶液)を分注、37°Cで2時間インキュベートした。プレートをPBSTで洗浄した後、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識したアフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgGもしくはIgM抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories)のPBST溶液を分注し、37°Cで2時間インキュベーションした。プレートをPBSTで洗浄後、基質として sodium p-nitrophenylphosphateを3 mg/mlの濃度で10% エタノールアミン緩衝液(pH 9.1; 0.1 mg/ml  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 mg/ml  $\text{NaN}_3$ を含有)に溶解したものを分注し、室温で15分間インキュベーションした。405 nmの吸光度をTitertek Multiskan (Flow Laboratories)で測定した。

ELISAによる競合反応は、モノクローナル抗体溶液(1  $\mu$ g/ml)と同容量の競合物質溶液とを混和し、37°Cで1時間インキュベートした。反応混液を上記の方法に従ってELISAに供した。

#### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とWestern blotting

試料を30 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 6.8), 1.5% SDS, 5% グリセロール, 2.5%

2-メルカプトエタノール、0.005% プロモフェノールブルー中で100°C、5分間加熱する。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)はLaemmliの方法[37]に従って、10-20%グラジエントゲルプレート(第一化学薬品)を用いた。電気泳動の後、LPSをゲルからPVDF膜(Millipore Corp.)に電氣的にトランスファーした[38]。フィルターを2%カゼイン(PBS溶液)でブロッキングした後、モノクローナル抗体溶液(1 μg/ml)に浸し、37°Cで2時間インキュベートする。PBSTで洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgM抗体溶液に浸し、37°Cで2時間インキュベートする。発色基質は、0.5 mg/mlの濃度でsodium 5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphateを前出のジエタノールアミン緩衝液(pH9.1)に溶解したものをを用いた。ゲル上のLPSはBio-Rad silver stain kit (Bio-Rad)を用い、銀染色法によって検出した。

#### 菌体凝集

緑膿菌の懸濁液( $A_{600} = 0.1$ )を96穴マイクロプレートに50 μlずつ分注し、そこに2倍希釈系列をとった抗体溶液を50 μl添加する。4°Cで一夜放置した後、凝集を観察した。

#### 感染治療効果

5%ムチン(Difco)に懸濁した種々の菌量の緑膿菌(0.2 ml)を4週齢のICRマウス(♂, 一群10匹)の腹腔内に感染させた。1時間後に、モノクローナル抗体(0.2 ml)を腹腔内に投与した。コントロール群については10 μg/headのBSAもしくはヘテロミエロームSHM-D33の培養上清を投与した。1週間後の生残率から、菌の50%致死量(LD<sub>50</sub>)を算出した[39]。

#### その他

イムノグロブリンクラスとL鎖の決定は、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgGもしくはIgM抗体、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトλ鎖もしくはκ鎖抗体(Tago Inc.)を2次抗体として用いてELISA法により決定した。Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS; pH7.2)の組成は、1 lあたりNaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 gである。メチル-L-ラムノシドは、L-ラムノースを1% HCl含有メタノール中で100°C、4時間反応させて得た[40]。

## 2-3. 結果

### 抗緑膿菌ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

特異抗体産生ハイブリドーマの出現頻度を上げるために、緑膿菌菌体表層抗原に対する抗体価の高いドナーをELISA法によって選択し、そのドナーから得たヒト末梢リンパ球をin vitroでpokeweed mitogenと緑膿菌のホルマリン死菌にて感作した。得られた感作リンパ球をヒトマウスヘテロミエローマ SHM-D33とPEG法で細胞融合を行った。4週間後にハイブリドーマの生育が観察されたウェルについて、その培養上清中の特異抗体価を緑膿菌菌体を固相抗原としたELISA法でスクリーニングした。

その結果、特異抗体の中で血清型別を越えて結合する2クローンが得られた。MH-4H7は、IgM ( $\mu$ ,  $\lambda$ )、FK-2E7はIgM ( $\mu$ ,  $\kappa$ )であった。各細胞株を $10^8$  cells/mlの濃度で植え込み、3日間培養したときの抗体産生量は、両クローンとも10から20  $\mu$ g/mlであった。

これらのヒトモノクローナル抗体の本間血清型別標準株に対する結合性を表2に示す。MH-4H7は、A, F, G, H, K型株に、FK-2E7は、A, D, E, F, G, I, L型株に対して特異的な結合を示した。

### Western blottingによる解析

抗体の認識部位を検討するために、精製LPS標品を用いてWestern blottingを行った。図2-Aは、LPSをSDS-PAGEしたものを銀染色したものである。LPS分子のO-抗原多糖部分の分子量の不均一性に起因するladder状もしくはsmear状の広い範囲のバンドが認められた。一方、MH-4H7によるプロットの結果(図2-B)、ELISAで結合の認められたA型、G型株由来のLPSでは低分子量の領域に特異的に結合が認められた。しかしELISAと同様にB型株では特異的な結合を全く認めなかった。同様に、FK-2E7の結果(図2-C)もELISAで結合性の認められた菌株(A型、G型)でのみ特異的に低分子量のLPSに対する結合が認められた。この結果は、この2種の抗体のエピトープが少なくともO-抗原多糖上ではなくコアもしくはリビドAにあることを示唆している。

### エピトープの同定

MH-4H7, FK-2E7のエピトープとして重要に関与している糖残基を同定するため、緑膿菌PAC1R由来のLPSに欠損部位をもつ一連の変異株に対する結合性を検討した。これらの標準株については詳細な化学構造が決定されており[27]、それらを表3に示した。PAC1R株はHabs血清型O3(本間血清型A型に対応する[21])に属すると報告されている。MH-4H7及

表2. 緑膿菌LPSコアヒトモノクローナル抗体 MH-4H7, FK-2E7 の緑膿菌本間血清型別標準株に対する結合性

結合活性は緑膿菌菌体を固相抗原としたELISAによって、405 nmの吸光度で表した。

Strain	Sero-type	Binding activity ( $A_{405}$ )	
		MH-4H7	FK-2E7
IID 1001	A	1.78	1.07
IID 1002	B	0	0
IID 1007	B	0	0
IID 1013	B	0	0
IID 5004	B	0	0
IID 1021	C	0	0
IID 1004	D	0	1.60
IID 1130	E	0	0.62
IID 1006	F	1.77	1.28
IID 1008	G	1.88	0.76
IID 1020	G	1.98	1.70
IID 1009	H	1.33	0
IID 1010	I	0	1.86
IID 1011	J	0	0
IID 1012	K	1.80	0
IID 5141	L	0	1.72
IID 5018	M	0	0
IID 1015	M	0	0

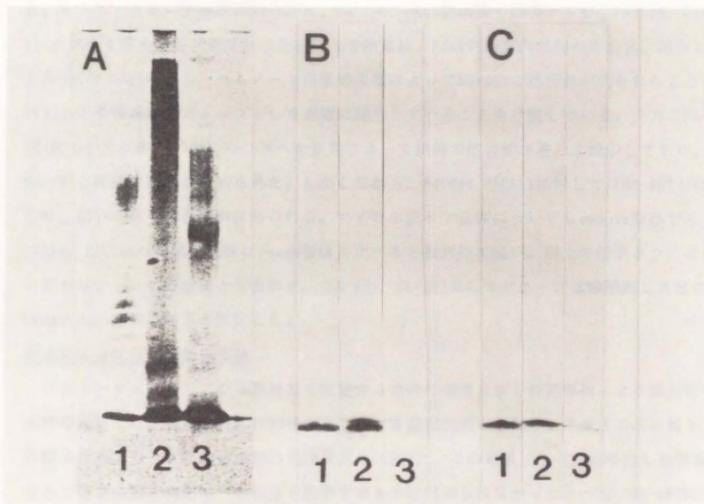


図2. 緑膿菌LPS標品のSDS-PAGE及びWestern blotting分析

LPS標品(5  $\mu$ g)を10-20% acrylamide gradient gelを用いたSDS-PAGEに供した。ゲル上のLPSは銀染色によって検出した(A)。更に、LPSをPVDFフィルターに転写後、MH-4H7(B)、FX-2E7(C)によるイムノブロットを行った。LPSはIID 1001(A型)(lane 1)、IID 1020(G型)(lane 2)、IID 1002(B型)(lane 3)由来のものを用いた。

びFK-2E7の結合性をこれらの菌体を固相抗原としたELISA法で検討した。また、A型特異的なマウスモノクローナル抗体Mei-assay Aを比較対照とした。その結果(表3)、血清型特異的なモノクローナル抗体Mei-assay Aは、smooth型株であるPAC1R及びPAC609に対して強く、semirough型株のPAC608には相対的に弱く結合した。一方、rough型のPAC557、PAC556、PAC611に対しては全く結合性を示さず、菌体表面のO-抗原の量との相関を認めた。ヒトモノクローナル抗体MH-4H7は、PAC608、PAC557に強く結合するが、PAC556、PAC611には全く結合性を示さなかった。以上の結果は、PAC557からPAC556への変異、即ちLPSのouter core中のL-ラムノース残基の欠損によってMH-4H7の結合性が失われたことを示し、この残基がエпитープとして重要に関与していることを示唆している。一方、FK-2E7についてはPAC557からPAC556への変異によって抗体の結合性が著しく減少しており、MH-4H7と同様の現象が認められた。しかしながら、PAC556、PAC611に対してはMH-4H7とは異なり、弱いながら結合性が認められる。いずれの抗コア抗体についてもsmooth型株であるPAC1R、PAC609への結合活性はrough型株に比べると相対的に弱い。以上の結果とウェスタンブロットティングの結果とを合わせ、MH-4H7、FK-2E7共にエпитープは緑膿菌LPSのouter core部位にあると推定した。

#### 単糖による抗原結合阻害実験

エпитープに関与している糖残基を推定するために単糖及びその誘導体による結合阻害活性を検討した。緑膿菌IID 1020株由来LPSを固相抗原としたELISAの系に種々の単糖を添加したときの抗体の結合活性を見た(表4)。この結果、FK-2E7は検討した単糖のうちで有意に抗体の菌体への結合を阻害するものは認められなかった。一方、MH-4H7についてはL-ラムノース及びメチル-L-ラムノシド( $\alpha$ アノマーを90%含有する標品)で特異的な阻害活性を認めた。50%の結合阻害の認められる濃度( $ID_{50}$ )は、それぞれ100 mM、15 mMであった。以上の結果とPAC1R株由来の変異株への結合性からMH-4H7のエピトープとしてLPS outer core中のL-ラムノース残基もしくはその近傍が重要に関与していると推定した。

#### 緑膿菌以外のグラム陰性菌由来のLPSに対する交差反応

MH-4H7及びFK-2E7の種々の菌由来のLPSに対する結合性を緑膿菌IID 1020菌体を固相抗原としたELISA系にLPSを添加して結合阻害活性でみた。その結果(図3)、検討したLPSのうちでFK-2E7と交差反応するものは全く認められなかった。一方、MH-4H7は、大腸菌026:B6由来LPSに対して比較的強く、大腸菌055:B5由来LPSには弱いながら交

表3. ヒトモノクローナル抗体 MH-4H7, FK-2E7の緑膿菌 PAC1R株由来のLPSに欠損部位をもつ一連の変異株に対する結合性コアの構造は文献[27]によった。(O-Ag)はO-抗原多糖の繰り返し単位を表す。

Strain	Chemo-type	LPS core structure	Binding activity ( $A_{405}$ )		
			MH-4H7	FK-2E7	Mei-assay A
PAC1R	S	$\begin{array}{c} \text{Glc Rha Glc} \\   \quad   \quad   \\ (\text{O-Ag})_n - \text{Glc-GalN-Hep-KDO-KDO} \\   \\ \text{Ala} \end{array}$	0.25	0.15	1.24
PAC609	S	$\begin{array}{c} \text{Glc Rha} \\   \quad   \\ (\text{O-Ag})_n - \text{Glc-GalN-Hep-KDO-KDO} \\   \\ \text{Ala} \end{array}$	0.28	0.18	1.12
PAC608	SR	$\begin{array}{c} \text{Glc Rha Glc} \\   \quad   \quad   \\ (\text{O-Ag})_1 - \text{Glc-GalN-Hep-KDO-KDO} \\   \\ \text{Ala} \end{array}$	1.11	1.48	0.40
PAC557	R	$\begin{array}{c} \text{Glc Rha Glc} \\   \quad   \quad   \\ \text{Glc-GalN-Hep-KDO-KDO} \\   \\ \text{Ala} \end{array}$	1.13	1.62	0.02
PAC556	R	$\begin{array}{c} \text{Glc Glc} \\   \quad   \\ \text{Glc-GalN-Hep-KDO-KDO} \\   \\ \text{Ala} \end{array}$	0.02	0.38	0.03
PAC611	R	$\begin{array}{c} \text{Glc-GalN-Hep-KDO-KDO} \\   \\ \text{Ala} \end{array}$	0.04	0.20	0.06

表4. 単糖によるMH-4H7の緑膿菌11D 1020株由来LPSに対する結合の阻害  
 緑膿菌11D 1020株より調製したLPSを固相抗原としたELISAの系に、単糖を添加してMH-4H7の結合に対する阻害活性を検討した。Methyl-L-rhamnosideは $\alpha$ 体を90%含有する標品。

Sugar	Concentration (mM)	Residual activity (%)
L-Rhamnose	50	62
	500	15
Methyl-L-rhamnoside	50	24
	500	0
L-Fucose	500	103
D-Fucose	500	100
D-Quinovose	500	105
D-Mannose	500	99
D-Galactose	500	96
D-Glucose	500	103
N-Acetyl-D-galactosamine	500	96
N-Acetyl-D-glucosamine	500	100
D-Glucuronic acid	500	94

LPS

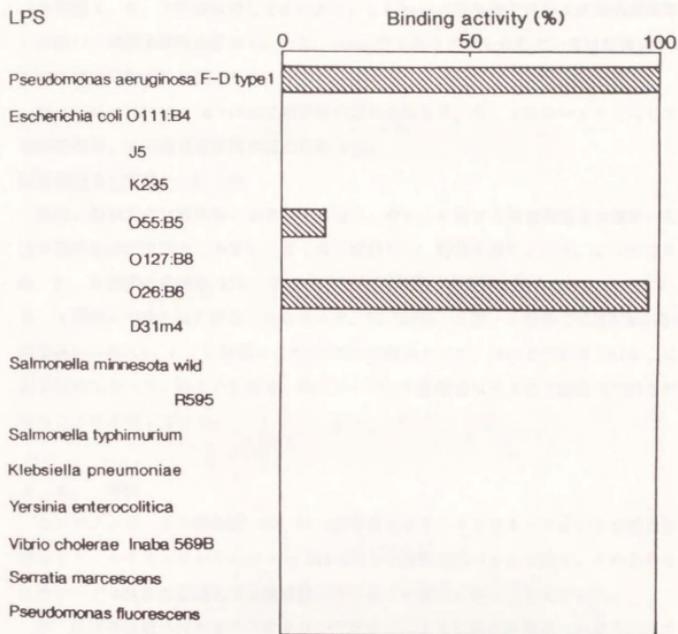


図3. ヒトモノクローナル抗体MH-4H7の種々のグラム陰性菌由来LPSに対する交差反応性

緑膿菌11D 1020株(G型)の菌体を固相抗原としたELISAの系にLPS(50  $\mu$ g/ml)を添加して、その阻害活性(%)をMH-4H7に対する結合活性とした。

差反応を認めた[41]。

#### 感染治療効果と生菌凝集活性

MH-4H7及びFK-2E7のマウス実験的感染症における治療効果と生菌凝集能を検討した(表5)。マウス腹腔内感染系において、MH-4H7はELISAで結合の認められた緑膿菌菌株(血清型A, G, H型株に対して0.01から1  $\mu$ g/headの投与量で有意な感染治療効果、更には強い生菌凝集活性を認めた。一方、rough型であると考えられているM型株については有意な感染防御活性は認めなかった[39]。

FK-2E7については、in vitroで結合性の認められたE, G, I型株いずれに対しても感染治療効果、生菌凝集活性共に認めなかった。

#### 緑膿菌臨床分離株への結合性

臨床分離頻度の比較的高い血清型を選択し、それらに属する緑膿菌臨床分離株への結合性を菌体を固相抗原としたELISA法で検討した。結果を表6に示す。MH-4H7はA, F, G, H, K型株に高頻度(57から86%)で、また約半数のM型株に結合した。一方、B, C, E, I型株には全く結合性を示さなかった。FK-2E7は、E型, I型株には約90%の高頻度で、M型株には約50%、A, G型株には約30%の株が結合するが、他の血清型株とはほとんど結合を認めなかった。以上の結果は、両クローンとも血清型による結合頻度の片寄りが存在することを示唆している。

#### 2-4. 考察

ヒトモノクローナル抗体MH-4H7, FK-2E7を産生するハイブリドーマをヒト末梢血リンパ球とヒトマウスヘテロミエロマ SHM-D33との細胞融合によって得た。これらのヒトモノクローナル抗体の認識抗原は緑膿菌LPSのコア部位にあることを示した。

O-抗原多糖鎖の付け根に位置するコア部位に対する抗体の緑膿菌への結合活性を決定づける、あるいは影響を与える要因として以下の2つが考えられる。(i)LPS分子のコア部位に抗体のエピトープが存在するか否か、(ii)エピトープ自身は存在しているがそれが細胞表面上にどの程度露出しているか、の2点である。MH-4H7, FK-2E7同様に、菌体を固相抗原としたELISAで全く結合性の見られなかった菌株については、前者のカテゴリーに属すると考えられる。その例であるIID 1002株(B型)では、ウェスタンブロットングの結果でいずれの分子量のLPS分子とも結合が認められないことからエピトープ自体が存在しないことを示唆している。一方、後者のカテゴリーに属する例は、表3に

表5. ヒトモノクローナル抗体 MH-4H7, FK-2E7 のマウス実験的感染症に対する治療効果及び、菌体凝集活性  
 凝集活性は緑膿菌菌体 (ca.  $5 \times 10^8$  CFU/ml) を凝集させる最少抗体濃度で表した (n.d.:  $>25 \mu\text{g/ml}$ )。  
 Protection ratio =  $LD_{50}(\text{monoclonal antibody treated})/LD_{50}(\text{control})$ 。

MAb	Challenge dose ( $\mu\text{g}/\text{head}$ )	Challenge strain (serotype)	Agglutinating activity ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	LD <sub>50</sub> (CFU)		Fold protection
				Control	MAb treated	
MH-4H7	0.1	SP6788 (G)	0.94	$3.0 \times 10^4$	$3.2 \times 10^5$	11
	0.1	SP9792 (G)	0.94	$5.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	32
	1.0	SP6783 (A)	0.47	$4.0 \times 10^5$	$3.2 \times 10^6$	8.0
	1.0	SP7514 (H)	0.94	$1.5 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$	4.4
	1.0	SP6764 (M)	15	$2.8 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$	1.0
FK-2E7	1.0	SP9757 (E)	n.d.	$1.2 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	1.2
	1.0	SP10046 (I)	n.d.	$1.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	0.9
	1.0	SP6788 (G)	n.d.	$2.3 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	0.8

表6. ヒト抗緑膿菌LPSコアモノクローナル抗体MH-4H7, FK-2E7の各種血清型緑膿菌臨床分離株に対する結合性と血清型との相関  
各菌株の菌体を固相抗原としたELISAにおいて405 nmの吸光度が0.2以上のものを結合陽性とした。

Sero- type	Number tested	Number of binding-positive		Existence of L-Rhamnose in O-antigen
		MH-4H7	FK-2E7	
A	21	15	7	+
B	28	0	0	-
C	8	0	0	-
E	24	0	22	-
F	7	6	1	+
G	23	20	8	+
H	16	10	0	+
I	23	0	21	-
K	4	3	0	+ <sup>b</sup>
M	22	10	10	? <sup>b</sup>
NT <sup>a</sup>	6	1	2	? <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Non-typable.

<sup>b</sup>Strains of serotype M are rough-natured.

<sup>c</sup>Structure of LPS has not been known yet.

に示したMH-4H7の結合性が非常に弱いPAC1R, PAC609株である。即ち、MH-4H7のエピトープの存在するコア部位の構造は同一であり、長いO-多糖鎖が欠損している点のみが異なることが示されている[27]変異株PAC608(semi-rough type), PAC557(rough type) に対しては強い結合活性が認められる。この結果は、MH-4H7の菌体への結合が高分子量のO-多糖鎖による立体障害によって妨害されているものと考えられる。同様の結果が、FK-2E7にもあてはまる。また、ウェスタンブロットティングの実験においてMH-4H7, FK-2E7共に、より分子量の小さいLPS分子に対して強く結合する実験事実も、先の仮説を支持するものである。

緑膿菌LPSのコアの多様性については、LPSコア部位に特異的なマウスモノクローナル抗体[42]、ウサギ抗血清[43]が異なる血清型の緑膿菌菌株と反応する、しかしながら全ての緑膿菌の菌株に反応するわけではないという実験事実から推測されているに過ぎなく、この部位の多様性に関する体系的な研究は行われていない。本論文においては、約180株の緑膿菌標準株及び臨床分離株に対する抗体の結合性を検討した(表6)。その結果、LPSコアを特異的に認識するヒトモノクローナル抗体MH-4H7及びFK-2E7は血清型を越えて多くの緑膿菌菌株と結合するが、全ての緑膿菌には結合せず血清型によるかたよりが認められた。この結合性はLPSコア部位の多様性を反映しており、緑膿菌LPSのコア部位は、構成成分的には非常に類似しているもののその化学構造には多様性があると考えられる。更には、LPSコアの構造の多様性と血清型との間の相関性を示唆するものであると考える。一方、同じ血清型に属する株でも抗コア抗体が結合する株としない株とがあり、同一血清型株間でコア構造に多様性があると考えられる。MH-4H7で認識されるエピトープ、即ちある特定の化学構造はA, F, G, H, K, M型菌株のLPSのouter coreに高頻度で発現しており、FK-2E7が認識するエピトープはE, I型株に高頻度に、A, G, M型株の一部にも発現していることを示唆している。A, G, M型株で、MH-4H7とFK-2E7の両方の抗体が結合する株が認められていることから、両抗体のエピトープは相補的ではないと考えられる。

更に、MH-4H7についてはPAC1R株由来の変異株との結合性(表3)と単糖による結合性阻害の実験からLPSのouter core中のL-ラムノース残基がエピトープとして重要に関与していると推定した。L-ラムノースはLPS outer coreの共通成分として知られており、MH-4H7の結合性はコアのL-ラムノース残基もしくはその周辺部位の化学構造の多様性を反映していると考えられる。MH-4H7は血清型A, F, G, H, K, M型の株に高頻度で結

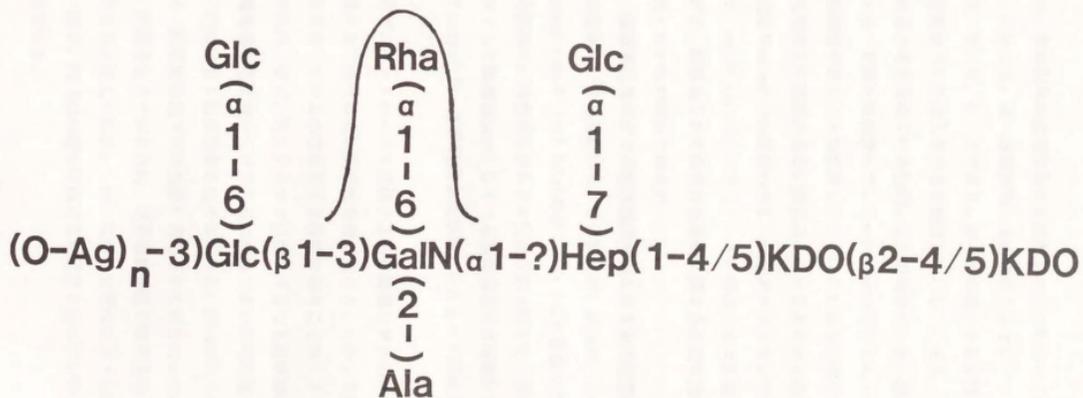


図4. ヒトモノクローナル抗体MH-4H7の緑膿菌 PAC1R株 LPS における推定エピトープ

合するが、それ以外の血清型株には検討した限り結合する株は1株も認められなかった。興味深いことには、O-抗原多糖の構成成分としてL-ラムノースを含有している血清型はA, F, G, H, K, Nであり、MH-4H7の結合する血清型と非常によい相関がある。但し、N型株については入手できず検討していない。また、M型株はO-抗原をもたないラフ型であると考えられている[18]。以上の現象は、O-抗原多糖におけるL-ラムノースの存在とO-多糖とは独立しているouter core部位のL-ラムノース残基の近傍の化学構造とに相関性のあることを示唆している。このような相関性に関する解釈として、ひとつには生合成機構上の問題がある。例えば、L-ラムノースの生合成中間体の合成酵素もしくはO-抗原やouter core部位へのL-ラムノーストランスフェラーゼ等の共有や相互関係によって、outer coreのL-ラムノースの構造自体に影響を与えている可能性がある。しかしながら、緑膿菌LPSの生合成機構に関する研究は殆どなく、以上の推定を支持する情報は全くないのが現状である。

また、緑膿菌以外のグラム陰性菌由来のLPSとの交差反応では、唯一、MH-4H7が大腸菌O26:B6由来LPSと反応した。この結果は、MH-4H7, FK-2E7共にエピトープが、共通性の高いinner coreやlipid Aには存在しないことの傍証であると考えられる。MH-4H7で認められた大腸菌O26:B6由来LPSとの交差反応に関して、詳細については文献41に譲るが、類似の例として緑膿菌Lanyi O4（本間血清型Gに対応）と大腸菌O26との交差反応を1973年にLanyiらが、加熱死菌を免疫原にしたウサギ抗血清を用いた研究で確認している[44]。

本研究で、モノクローナル抗体による緑膿菌LPSのコア部位を解析した結果、O-血清型を越えた共通性の高い抗原性を有すること、しかしながら全ての緑膿菌菌株が同様のコア構造を有しているのではなく多様性のあることがヒトモノクローナル抗体の結合性から示唆された。更に、抗LPSコア抗体のうちでも菌体凝集活性のあるMH-4H7はマウス実験的緑膿菌感染症においてM型以外の菌株で高い治療効果を認めた[39]。一方、凝集能のないFK-2E7には全く治療効果を認めなかった。MH-4H7についてはマウス腹腔マクロファージと補体（緑膿菌吸取マウス血清）共存下におけるopsonophagocytosis活性と感染治療効果により相関を認めており[39]、緑膿菌感染症治療効果の作用機序としてオプソニン効果が重要であると考えられる。しかしながらM型株のようにMH-4H7のオプソニン効果の認められない菌や、FK-2E7の様に抗体自身が活性を持たない場合など、原因を解明すべき課題も残されている。

### 第3章 ガラクトサミノロン酸含有O-抗原多糖の構造とガラクトサミノロン酸残基を認識するヒトモノクローナル抗体

#### 3-1. 序

緑膿菌のO-抗原多糖の構成成分にはアミノウロン酸, ジアミノウロン酸, 2-アミノ-2, 6-ジデオキシヘキソース, シアル酸様のアミノ糖等の種々の珍しいアミノ糖が見いだされている[22]。これらアミノ糖のうち天然においては緑膿菌にしか報告のないものも多く、抗原決定基として重要であると考えられる。著者らは、先に緑膿菌の本間血清型別標準株について、それぞれのO-抗原多糖の構成成分を検討した。その結果、ガラクトサミノロン酸を4種の血清型別(A, G, H, K)に認めていた[45-48]。更に、G, H, K型では他にキノボサミンとラムノースを構成成分として検出し、これら同じ構成成分からなるO-多糖の詳細な化学構造の違いと抗原決定基に興味もたれた。著者は、G型標準株(11D 1008) [45], A型標準株(11D 1001) [46]についてO-抗原多糖を分離・精製し、詳細な化学構造を検討した。更に、A型・H型に交差反応するヒトモノクローナル抗体を樹立し、この抗体が、L体のガラクトサミノロン酸残基をエピトープとすること、及びA型・H型両方の血清型別株に対して感染治療効果を示すことを明らかにした[49]。

### 3-2. 緑膿菌 IID 1008 株 (G型) の O-抗原多糖の構造

#### 3-2-1. 材料と方法

##### LPS と O-抗原多糖の調製

対数増殖後期まで培養した緑膿菌の菌体をアセトンで脱脂、乾燥させた。LPS の抽出は Westphal と Jann の方法 [30] に従い、45% フェノールを用い 70°C、15 分処理によって水層に抽出した。LPS 標品を 1% 酢酸、100°C、90 分間加水分解した。加水分解物から遠心分離とクロロホルムとの分配によってリビド A を除去した。得られた水溶性画分を 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  で平衡化した Sephadex G-50 カラムに供した [50]。得られた多糖画分を更に DEAE-Sephacel 陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。DEAE-Sephacel カラムは、5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.4) で平衡化し、0 M から 1 M の NaCl 直線濃度勾配によって溶出した。多糖は、中性糖とアミノ糖の比色定量で検出した。多糖は、0.1 M の NaCl 濃度で溶出され、水に対して透析した後、これを O-多糖標品とした。

##### 脱 N-ホルミル化とスミス分解

O-多糖標品 (30 mg) を 5 ml の 0.1 M HCl で 100°C、80 分間処理する。1M NaOH で中和後、透析した。この処理によって脱 N-ホルミル化した多糖が得られる。脱 N-ホルミル化多糖を、0.1 M  $\text{NaIO}_4$ 、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で 4°C、3 日間暗所で反応させる。反応後、過剰の  $\text{NaIO}_4$  をエチレングリコールによって壊し、 $\text{NaBH}_4$  で還元後、透析する。得られた多糖を、0.5 M HCl で 25°C、5 日間加水分解する。スミス分解生成物は、Cellulofine GCL-25m カラムクロマトグラフィーを繰り返し行うことにより、分画精製した。Cellulofine GCL25-m (生化学工業) カラムクロマトグラフィー ( $\phi$  1 cm x 147 cm) は、50 mM ピリジン/酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。

##### O-多糖のアルカリ分解

O-多糖標品 (30 mg) を 5 ml の 0.1 M NaOH/0.5 M  $\text{NaBH}_4$  で 37°C、24 時間インキュベートする。反応後、酢酸によって中和し、生成物は Cellulofine GCL-25m カラムクロマトグラフィーを繰り返し、分画、精製した。

##### カルボキシル基の還元

多糖中の遊離のカルボキシル基の還元は、Tayler と Conrad の方法 [51] によった。試料 10 mg に 10 mg の 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (半井化学) を添加し、10mM HCl に pH 4.8 に保ちながら、室温で 90 分間反応させる。その後、1M  $\text{NaBH}_4$  で 37°C、

12時間インキュベートして、還元する。透析による脱塩の後、完全に還元するため同様の操作を2回、もしくはそれ以上繰り返す。オリゴ糖の還元の場合は、先と同様のcarbodiimide/NaBH<sub>4</sub>処理を2回繰り返す。脱塩は、過剰のNaBH<sub>4</sub>を酢酸で壊し、Dowex 50 (H<sup>+</sup>型)陽イオン交換カラムに通した後、ほう酸はメタノールとともに減圧下で蒸発させる。更に生成物を、Cellulofine GCL25-mカラムクロマトグラフィーで精製した。

#### 分析方法

<sup>1</sup>H-NMRおよび<sup>13</sup>C-NMRはJeol FX-500とFX-100スペクトロメーター(日本電子)をそれぞれ用いた。スペクトルの測定は、重水中で、多糖は80°C、オリゴ糖は25°Cで測定した。<sup>1</sup>H-NMRでは、内部標準としてsodium 3-trimethylsilylpropanesulfate ( $\delta = 0$  ppm)を、<sup>13</sup>C-NMRでは、外部標準としてメタノール ( $\delta = 50.15$  ppm)を使用した。旋光度は、JASCO DIP-360旋光計(日本分光)を用い、水溶液中、室温で測定した。中性糖は、ラムノースを標準物質としたフェノール/硫酸法[52]、およびトリメチルシリル誘導体として、ガスクロマトグラフィーによって定量した。ガスクロマトグラフィーは、5% SE-52/Chromosorb WAWカラムを用いてShimadzu Gas Chromatograph GC-7AG(島津製作所)でおこなった[53]。アミノ糖とアミノ酸は、試料を4 M HClで100°C、4時間加水分解後、柴田アミノ酸自動分析機によって定量した[54,55]。全アミノ糖の量は、試料を2 M HClで100°C、2時間の加水分解により脱N-アシル化した後、グルコサミンを標準としてTsujiraの方法[56]によって定量した。遊離のアミノ基をもつアミノ糖残基の定量は酸加水分解をせずに直接Tsujiraの定量法を用いた。ウロン酸残基のアミド置換の量は、試料を2 M HClで100°C、2時間加水分解によって遊離したアンモニアをAkamatsuらの方法[57]によって定量した。この加水分解条件では、ヘキサミン、N-アセチルヘキサミンからは遊離のアンモニアは検出されなかった。アミノ糖のN-アセチル化は、試料を2% 無水酢酸/8% トリエチルアミンで25°C、90分反応させた。完全にN-アセチル化するためこの操作を2回繰り返す。生成物はCellolofine GCL25-mカラムクロマトグラフィーによって精製した。下降式濾紙クロマトグラフィーは、東洋No. 50濾紙上で、1-ブタノール/ピリジン/水(6:4:3, by vol.) (溶媒A)もしくは1-ブタノール/酢酸/水(2:1:1, by vol.) (溶媒B)を用いた。高圧濾紙電気泳動は、東洋No.50濾紙で、ピリジン/酢酸/水(35:5:960, by vol., pH5.8) (緩衝液A)もしくは、ギ酸/酢酸/水(25:78:897, by vol., pH1.9) (緩衝液B)でおこなった。

### 3-2-2. 結果

#### O-多糖の化学組成

得られた IID 1008株のO-多糖標品を酸加水分解後、ガスクロマトグラフィー及びアミノ酸分析機による分析の結果、ラムノース、グルコース、ガラクトサミンヌロン酸、ガラクトサミン、キノボサミン、アラニンがそれぞれ180, 110, 170, 45, 30, 40 nmol/mg乾燥重量検出された。更に、アミノ酸分析機のクロマトグラムでアンモニアが溶出される付近に大量のニンヒドリン陽性物質が検出された。Tsuji等の比色定量による全アミノ糖量は、2800 nmol/mgであると算出された。酸加水分解において遊離のアミノ糖が低収量であることは、ウロン酸残基（この場合はガラクトサミンヌロン酸）の酸抵抗性[55]によるもの、即ちアミノ酸分析機で検出された未知物質は、ガラクトサミンヌロン酸を含有するオリゴ糖であると考えられる。そこで、O-多糖標品のカルボキシル基の還元を行った。還元操作後の分析結果、遊離のガラクトサミンヌロン酸及び未知のニンヒドリン陽性物質の量に殆ど変化はなく、ガラクトサミンが僅かながら増えた(110 nmol/mg)だけであった。遊離のカルボキシル基の滴定およびアミド体となっているアンモニアの比色定量の結果、多糖標品中に遊離カルボキシル基は660 nmol/mg、アミド体は、1600 nmol/mg含まれていると推定した。この結果は、多糖中にウロン酸残基がラムノース残基の2倍量存在することを示唆している。更に、O-多糖中のガラクトサミンヌロン酸残基はアミド化されていることによって、carbodiimide/NaBH<sub>4</sub>法による還元抵抗性を示していると考えられる。

#### O-多糖のNMRスペクトル分析

nativeのO-多糖の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(図5-A)は、複雑なパターンを示し、アノマー領域等の解析は不可能であった。この現象は、カルボキシル基が不均一にアミド化されていることで、多糖全体の立体構造が不均一になっていることに起因していると考えられる。この<sup>1</sup>H-NMRスペクトルからは6-デオキシ糖の6位のメチル基2残基( $\delta = 1.24$  ppm)、アセトアミド基のメチル基2残基( $\delta = 1.98-2.08$  ppm)に由来するプロトンのピークが観察された。更に特徴的なピークとして、 $\delta = 8.16$  ppmに1残基分のホルミル基のシグナルが見かけ上ダブレットとして観察された。ピークの割れる原因は、おそらくアミド置換の不均一性によるものと考えられる。2.10から2.25 ppmの領域にシグナルが認められないことは、このO-多糖にはO-アセチル基が存在しないことを示している。

以上の帰属は、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル(図5-B)の結果からも支持される。このスペクトルにおいて、4本のanomeric carbon [120.0 ppm, 99.41 ppm (2C), 95.73 ppm]、2本

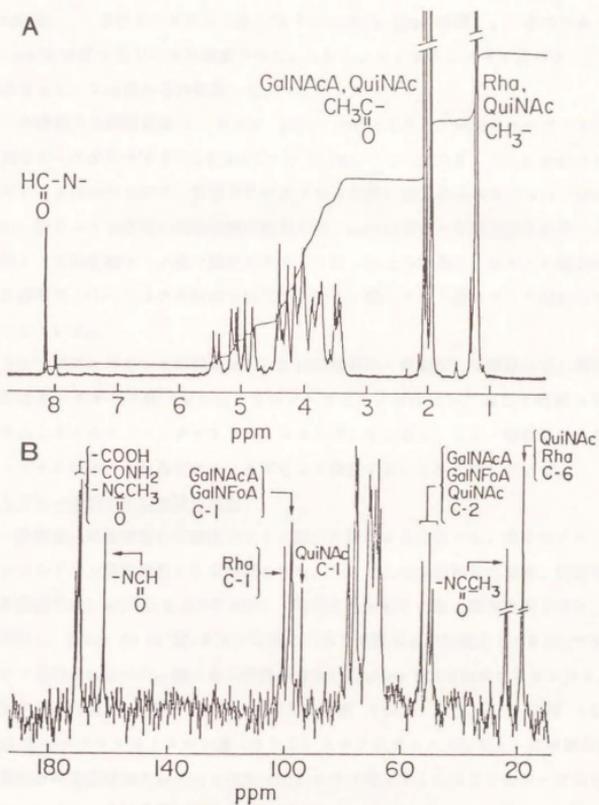


図5. IID 1008株O-多糖標品の<sup>1</sup>H-NMR (A) 及び<sup>13</sup>C-NMR (B) スペクトル

の6-デオキシ糖のメチル基[17.85 ppm, 17.47 ppm]、3本の窒素原子に結合した炭素原子[53.34 ppm, 50.75 ppm, 49.46 ppm]、13本の酸素原子に結合した炭素原子[67から80 ppmの領域]、4本のカルボキシル基[173.7から176.0 ppmの領域]、一本のホルミル基[165.8 ppm]に対応するピークが観察された。しかし、ヒドロキシメチル基やO-アセチル基に対応するピークは認められなかった。

O-多糖標品を弱酸処理(0.1 M HCl, 100°C, 80分)すると、NMRスペクトル中のホルミル基のピークが消失する( $^1\text{H-NMR}$ の $\delta = 8.16$  ppm,  $^{13}\text{C-NMR}$ の $\delta = 165.8$  ppm)のみで、その他のピークはnativeのO-多糖のスペクトルとの違いは認められなかった (data not shown)。脱ホルミル化後の比色定量の結果では、nativeのO-多糖標品中の全アミノ糖含量の約1/3の遊離アミノ基の露出が認められた。以上の結果は、ホルミル基がnativeのO-多糖中で、O-エステル結合ではなく、アミノ糖のアミノ基にアミド結合していることを示している。

以上のNMRスペクトルの結果は、IID 1008株のO-多糖が、4糖繰り返し構造をもち、2残基の6-デオキシ糖(おそらくラムノースとキノボサミン)及び3残基のアミノ糖(おそらくキノボサミンとガラクトサミヌロン酸)を含有し、アミノ糖残基のうち2残基がN-アセチル体、1残基がホルミル体として存在することを示唆している。

#### ニンヒドリン陽性の未知物質の同定

O-多糖標品の強酸加水分解後のアミノ酸分析機による分析では、大半のアミノ糖は未知のニンヒドリン陽性物質として回収された。そこでこの未知物質の単離、同定を試みた。O-多糖標品(30 mg)を4 M HClで100°C, 4時間加水分解した後、蒸発乾固させた。これを水に溶解し、Dowex 50 (H<sup>+</sup>型)カラムに供し、水で溶離する中性画分と2 M HClで溶離する陽イオン性画分に分けた。陽イオン性画分をCellulofine GCL-25mカラムクロマトグラフィーに供すると(図6)、画分I-IVに対応して3糖(OS1, 13 mg), 2糖(OS2, 2.5 mg)及びガラクトサミヌロン酸(OS3)とキノボサミン(OS4)の単糖が得られた。中性糖画分の主成分はラムノースであった。オリゴ糖OS1とOS2をN-アセチル化した後、カルボキシル基の還元を行った。カルボキシル還元OS1は、酸加水分解後の分析から、ガラクトサミン(ガラクトサミヌロン酸由来)とキノボサミニトール(還元端のキノボサミン由来)をモル比約2:1で含んでいた。一方OS2は同じ成分を等モル含んでいた。カルボキシル基還元OS1をスミス分解すると、ガラクトサミン、スレオサミニトール(おそらくC3置換のN-アセチルキノボサミニトール由来)、グリセロール(非還

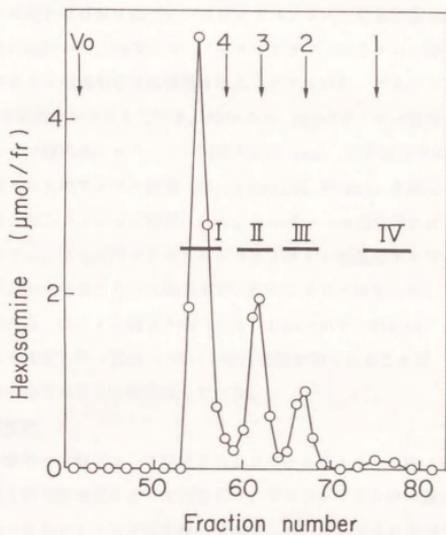


図6. O-多糖標品の強酸加水分解由来オリゴ糖の分離

O-多糖標品(20 mg)の強酸加水分解物をDowex 50 (H<sup>+</sup>型)カラムクロマトグラフィーに供して陽イオン性画分を得た。この画分をCellulofine GCL-25mカラム(1x147 cm)に供した。各フラクション(1 ml)についてアミノ糖を比色定量し、横棒で示した部分をブールした。矢印1, 2, 3, 4は各々N-アセチルグルコサミンの単糖, 二糖, 三糖, 四糖の溶出位置を示す。

元端ガラクトサミン由来)が等モル得られる。アルカリ加水分解(3 M NaOH, 100°C, 2時間)によって脱N-アセチル化した後のスミス分解の結果、グリセロール(非還元端ガラクトサミン及びC 3置換のキノボサミニートール由来)とスレイトール(C 4置換のガラクトサミン由来)がモル比2:1で得られた。以上の結果から、カルボキシル還元OS 1は、GalNAc(1-4)GalNAc(1-3)QuiNAcH<sub>2</sub>であると推定した。

N-アセチル化したOS 1の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルの結果を表7に示す。他のスペクトルのデータとの比較から、内側のN-アセチルガラクトサミノン酸残基のC 4とN-アセチルキノボサミン残基のC 3に帰属されるシグナルはO-グリコシル化された影響で各々約8 ppm低磁場側にシフトしている。92から100 ppmのアノマー領域にはN-アセチルガラクトサミノン酸残基のαアノマー炭素(99.66 ppm, 2C)と還元端のN-アセチルキノボサミン残基のαとβのアノマー炭素(92.11 ppmと95.87 ppm, 2本のシグナルあわせて1C)に帰属される3本のシグナルが観察された。カルボキシル基還元OS 1の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルデータでは、2つのN-アセチルガラクトサミン残基のアノマー水素のシグナルの結合定数が3-4 Hzであることから両残基がα配向であると決定した。

以上の結果から、OS 1の構造はGalNA(α1-4)GalNA(α1-3)QuiN、OS 2はGalNA(α1-3)QuiNであると推定した(図9)。OS 1が好収量で得られることは、この3糖がO-多糖の主鎖骨格の一部であることを示唆している。

#### 構成糖の絶対配置

O-多糖の酸加水分解によって単離されたガラクトサミノン酸(OS 3)とラムノースの絶対配置を旋光度測定によって決定した。ガラクトサミノン酸はN-アセチル体、ラムノースはメチルラムノシドに変換して測定した。N-アセチルガラクトサミノン酸(OS 3, 多糖中にN-アセチル体で存在している側),  $[\alpha]_D^{25} +25.8^\circ$ , cf.  $[\alpha]_D^{29.0} +29.0^\circ$  [58]; メチルラムノシド,  $[\alpha]_D^{60} -60.0^\circ$ , cf.  $[\alpha]_D^{67.2} -67.2^\circ$  [59]であった。更に、多糖中でN-ホルミル体として存在するガラクトサミノン酸とキノボサミンはN-アセチル化したOS 2を酸加水分解してそれぞれの単糖を得、N-アセチル体に変換した後、旋光度を測定した。N-アセチルガラクトサミノン酸(多糖中にN-ホルミル体として存在している側),  $[\alpha]_D^{24} +24.4^\circ$ , cf.  $[\alpha]_D^{29.0} +29.0^\circ$  [58]; N-アセチルキノボサミン,  $[\alpha]_D^{11} +11.1^\circ$ , cf.  $[\alpha]_D^{15.8} +15.8^\circ$  [60]。以上の結果、N-アセチル体、N-ホルミル体いずれのガラクトサミノン酸残基共D体、キノボサミンはD体、ラムノースはL体であると決定した。

表7. OSI誘導体の $^{13}\text{C}$ -NMR及び $^1\text{H}$ -NMRスペクトルのシグナル帰属結果

$^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルにおいては更にアセトアミド基のメチル炭素 (23.28 ppmと23.42 ppmに各1 C) 及びカルボキシル基, アセトアミド基のカルボニル炭素 (174-176 ppmに5 C) が観察されている。

$^{13}\text{C}$ -NMR of <i>N</i> -acetylated OSI							
Sugar residue	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
	ppm						
Nonreducing terminal GalNAcA	99.66	50.52	67.78	70.59	71.36	-	
Inner GalNAcA	99.66	50.78	68.17	78.64	72.94	-	
Reducing terminal QuiNAc	{(α-form)	92.11	50.82	80.28	77.38	71.94	17.83
	{(β-form)	95.87	54.07	81.87	77.52	72.29	18.83

$^1\text{H}$ -NMR of carboxyl-reduced OSI				
Signal (ppm)	Multiplicity	J value (Hz)	Integral	Assignment
1.22	d	6.43	3H	QuiNAcH <sub>2</sub> (6-CH <sub>3</sub> )
2.04	s	-	6H	GalNAc (NAc)
2.08	s	-	3H	QuiNAcH <sub>2</sub> (NAc)
5.01	d	3.41	1H	α-GalNAc (H-1)
5.20	d	3.91	1H	α-GalNAc (H-1)

#### 脱N-ホルミル化O-多糖のスミス分解

先に述べたように、O-多糖を弱酸処理(0.1 M HCl, 100°C, 80分)することにより多少の分子量の低下は認められるものの、ほぼ選択的に脱N-ホルミル化ができる。nativeのO-多糖が過ヨウ素酸で酸化されないのに対して、脱N-ホルミル化多糖は、過ヨウ素酸感受性となる。脱N-ホルミル化O-多糖のスミス分解物はCellulofine GCL-25mカラムクロマトグラフィーによって4種の断片(I-IV)が得られる(図7)。画分I, IIの生成物をリクマトグラフィーで精製し得られた主要なスミス分解生成物をS1, S2とした。S1とS2を酸加水分解した後、分析した結果、S1, S2共ラムノース, キノボサミン, ガラクトサミノロン酸, 2,3,4-trihydroxybutanoic acid及び未知物質Xが検出された(表8)。2,3,4-trihydroxybutanoic acid残基は、脱N-ホルミル化されたガラクトサミノロン酸残基のC2とC3間の酸化的解裂によって生じたものと考えられる。未知物質Xはアミノ酸分析機のクロマトグラム上でガラクトサミノロン酸の少し前に溶出された。S1の酸加水分解物から、緩衝液Aでの高圧濾紙電気泳動とCellulofine GCL-25mでのゲル濾過によって未知物質Xを単離した。N-アセチル化, カルボキシル基還元した後の分析の結果より、XをGalNA(1-3)-2,3,4-trihydroxybutanoic acidと推定した。未知物質Xはガラクトサミノロン酸のグリコシド結合が酸加水分解抵抗性を示すために生じたもので、表8の各成分の定量値はXの生成によって低く見積もられていると考えられる。未知物質Xの量を考慮に入ると、S1, S2ともに等モルのラムノース, キノボサミン, ガラクトサミノロン酸, 2,3,4-trihydroxybutanoic acidからなると推定した。

S1とS2をスミス分解するとキノボサミン残基だけが消失する。この結果は、S1, S2の非還元端はキノボサミン残基、還元端は3置換の2,3,4-trihydroxybutanoic acid残基であることを示唆している。S1, S2のカルボキシル基還元後の分析では、いずれもガラクトサミンの出現は認められず、カルボキシル基への置換基の存在が示唆された。一方、S1の2,3,4-trihydroxybutanoic acid残基はスレイトールに変換されたが、S2の方は変化が認められなかった。更に、S1とS2のアミド体の窒素を定量した結果、ラムノース1モルに対してS1では1モル、S2では2モル含有していた。S1とS2の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの結果は、すべての糖残基がα結合であることを示していた(ラムノース, δ = 5.25 ppm, J<sub>1,2</sub> = 1.41 Hz, 1H; N-アセチルキノボサミン, δ = 5.11 ppm, J<sub>1,2</sub> = 3.76 Hz, 1H; N-アセチルガラクトサミノロン酸, δ = 4.99 ppm, J<sub>1,2</sub> = 3.42 Hz, 1H)。

以上の結果、S1とS2の構造はそれぞれ、QuiNAc(α1-3)Rha(α1-3/4)GalNAc(amido)

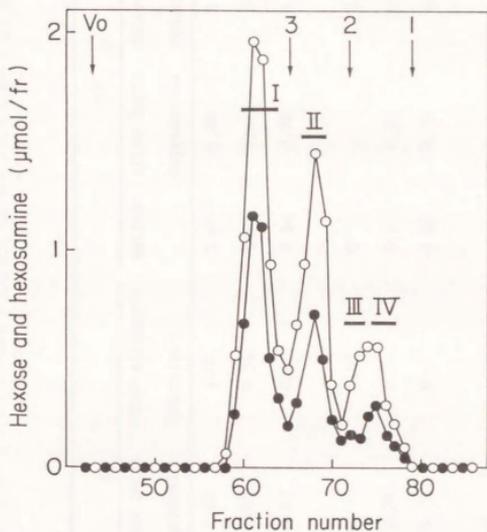


図7. 脱N-ホルミル化したO-多糖標品のスミス分解物のCellulofine GCL-25 $\mu$ ゲルクロマトグラフィーによる分離

脱N-ホルミル化O-多糖標品(22 mg)をNaIO<sub>4</sub>で酸化し、更にNaBH<sub>4</sub>で還元した。透析内液を0.5 M HClで25°C、5日間処理し、生成物を図と同じ方法でゲル濾過を行った。各フラクションの中性糖(●)及びアミノ糖(○)量を分析し、横棒で示したフラクションをプールのした。

表8. スミス分解の主要生成物の分析

図7で得られた画分 I, II から精製したスミス分解由来主要オリゴ糖(S1, S2)、更にはS1, S2のスミス分解物, カルボキシル基還元生成物の分析を行った。各オリゴ糖を酸加水分解の後、ニンヒドリン陽性物質はアミノ酸分析機にて、アミド体の窒素はアンモニアとしてAkamatsuの方法[57]にて、その他は、ガスクロマトグラフィーによって定量した。データはラムノースを1.00としてモル比で表してある。

Component	S1			S2		
	Native	After Smith degradation	After carboxyl-reduction	Native	After Smith degradation	After carboxy-reduction
Rhamnose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Quinovosamine	0.89	trace	0.95	0.94	trace	0.97
Galactosamin=uronic acid	0.66	0.83	0.92	0.84	0.74	0.84
Galactosamine	0	0	0.01	0	0	0
Compound X	0.33	0.26	0	0.24	0.22	0.20
2,3,4-Trihydroxy=butanoic acid	0.65	0.72	0	0.80	0.75	0.78
Threitol	0	0	1.07	0	0	0
Amide-form nitrogen	1.00	n.d.*	n.d.	2.13	n.d.	n.d.

\* n.d., not determined.

( $\alpha$ 1-3)-2,3,4-trihydroxybutanoic acidとQuiNAc( $\alpha$ 1-3)Rha( $\alpha$ 1-3/4)GalNAcA(amido)( $\alpha$ 1-3)-2,3,4-trihydroxybutanamideであると決定した。これらの断片はO-多糖の繰り返し単位から、図9に示すように生じたものと考えられる。画分IIIとIV中の主成分は、それぞれGalNAcA-2,3,4-trihydroxybutanoic acid, QuiNAc-Rhaであり、S1とS2を弱酸加水分解(0.5 N HCl, 25°C, 2日)すると画分III, IVと同様の断片を与えることから、S1, S2が更に分解されて生じたものと推定した。

#### O-多糖のアルカリ分解

C4位に置換を受け、カルボキシル基がエステル化されているウロン酸残基を含有する多糖は、アルカリ処理によって $\beta$ 脱離を起こして断片化する[61]。その際、4,5-不飽和のウロン酸残基を非還元端にもつ特徴的な断片を生ずる。同様の $\beta$ 脱離がC4置換のウロン酸のアミド体でも起こると予想し、O-多糖のアルカリ処理を試みた。O-多糖標品をアルカリ処理(0.1 M NaOH/0.5 M NaBH<sub>4</sub>, 37°C, 24時間)すると、4種ないしそれ以上のアミノ糖含有オリゴ糖断片が生成する(図8)。生成物をCellulofine GCL-25mゲルクロマトグラフィーで分画、精製し、主要な画分をF1からF4とした。主要な断片F1及びF3では、UV吸収( $\lambda_{max}$ =230 nm,  $\epsilon$ =4100)が観察されることから、4,5-不飽和のウロン酸残基の存在が示唆された。

F1の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルのシグナルの帰属結果を表9に示す。5.98 ppm (doublet,  $J_{4,5}$ =2.7 Hz)の特徴的なシグナルは、4,5-不飽和ウロン酸残基の4位の水素と考えられる。8.16 ppmのシグナルが消失していることは、アルカリ処理の際にN-ホルミル基が脱離したことを示している。遊離のアミノ基をもつヘキサミンの定量結果(表10)も、アルカリ処理によるN-ホルミル基の脱離を示唆している。NMRスペクトルの結果と組成分析の結果(表10)、F1は等モルのラミニトール、N-アセチルキノボサミン、ガラクトサミノロン酸及び4,5-不飽和ウロン酸残基からなっていると推定した。しかしながら、酸加水分解後の組成分析ではF1とF3はこれらの構成成分を整数比では与えない。アミノ糖の値が低いのは、ガラクトサミノロン酸とキノボサミンの間のグリコシド結合が、酸抵抗性であるために殆どがGalNA( $\alpha$ 1-3)QuiNなる2糖(OS2)として回収されるためである。更には、F1, F3の加水分解物において比色定量及びアミノ酸分析機上で、4,5-不飽和ウロン酸が検出されないのは、おそらく不飽和ウロン酸残基が酸に対して非常に不安定であることによるものと考えられる。

UVスペクトルのデータを含む分析結果及びゲル濾過上の溶出位置から見積もった分子

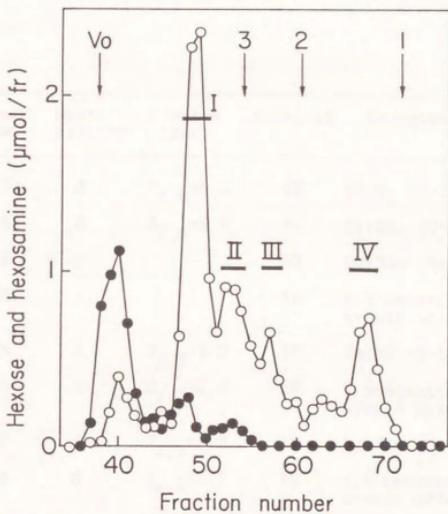


図8. O-多糖のアルカリ分解生成物の分離

O-多糖標品(30 mg)を5 mlの0.1 M NaOH/0.5 M NaBH<sub>4</sub>で37°C, 1日処理する。酢酸で中和後、反応液を図2と同様の条件でCellulofine GCL-25mカラムクロマトグラフィーに供した。

●は中性糖, ○はアミノ糖の定量値を示す。横棒で示したフラクションをプールし、同一のカラムのリクロマトグラフィーによって精製した。

表9. O-多糖のアルカリ分解断片 (F1) の<sup>1</sup>H-NMRの帰属

Signal (ppm)	Multi-plicity	J value (Hz)	Integral	Assignment
1.261	d	$J_{5,6}=6.1$	3H	RhaH <sub>2</sub> (6-CH <sub>3</sub> )
1.263	d	$J_{5,6}=6.1$	3H	QuiNAc (6-CH <sub>3</sub> )
1.99	s	-	3H	QuiNAc (NAc)
2.08	s	-	3H	4,5-unsaturated uronic acid (NAc)
5.05	d	$J_{1,2}=3.2$	1H	GalNA (H-1)
5.18	d	$J_{1,2}=2.7$	1H	4,5-unsaturated uronic acid (H-1)
5.47	d	$J_{1,2}=3.9$	1H	QuiNAc (H-1)
5.98	d	$J_{4,5}=2.7$	1H	4,5-unsaturated uronic acid (H-4)

表10. アルカリ分解断片の分析

アルカリ分解断片 F 1 から F 4 を図8の画分 I から IV よりそれぞれ精製した。各々のオリゴ糖断片について、全アミノ糖量及び遊離のアミノ基をもつアミノ糖は比色定量によって、ニンヒドリン陽性物質はアミノ酸分析機で、ラムノース及びラミニトールはガスクロマトグラフィーによって定量した。データはラミニトールを1.00としたモル比で表してある。同定できなかったニンヒドリン陽性物質 compound Y及びOS 2の量についてはアミノ酸分析機上の発色率をグルコサミンの2倍として算出した。高圧濾紙電気泳動は緩衝液AもしくはB(材料と方法の項参照)を用いた。電気泳動の移動度はグルコサミンを1.00とした。

Component		F1	F2	F3	F4
Total hexosamine		2.03	2.01	1.15	0.93
Hexosamine with free amino groups		1.12	1.07	0.02	0.02
Rhaminitol		1.00	1.00	1.00	1.00
Quinovosamine		0.28	0.32	1.13	0.85
Galactosaminuronic acid		0.20	0.22	0	0
OS2 (GalNA-QuiN)		0.75	0.65	0	0
Compound Y		0.29	trace	0	0
Mobility in paper electrophoresis					
<sup>m</sup> GlcN	pH6.0	-0.45	0.00	0.01	0.01
	pH1.9	0.25	0.39	0.41	0.01

量からこれらのアルカリ分解断片の構造を以下の様に推定した。F1, 4,5-unsaturated uronosyl-GalNAc-QuiNAc-RhaH<sub>2</sub>; F2, GalNAc-QuiNAc-RhaH<sub>2</sub>; F3, 4,5-unsaturated uronosyl-QuiNAc-RhaH<sub>2</sub>; F4, QuiNAc-RhaH<sub>2</sub>。F2とF4は、それぞれF1とF3から更に分解を受けて生じたものであると考えられる。更にこれらの断片を高圧濾紙電気泳動によって分析した。カルボキシル基とアミノ基が両方荷電した状態の中性条件、カルボキシル基がプロトネーションしている酸性条件における泳動度(表10)からF1はカルボキシル基2残基とアミノ基1残基をもつと考えられる。F2及びF3はカルボキシル基1残基、アミノ基1残基、F4は電荷のある官能基をもたないと推定した。先の推定構造と考え合わせるとアルカリ処理によって、N-ホルミル基更にはアミド基の脱離が生じていると推定した。アミド基の脱離については、遊離のカルボキシル基ではこの弱いアルカリ処理条件ではβ脱離が起こるとは考え難く、多糖の断片化の後で脱離すると考えられる。

また、両ガラクトサミヌロン酸残基がβ脱離を受け易いことから、両残基の置換位置はC3位ではなくC4位であると推定した。

void画分に溶出された画分については、更にSephadex G-50でゲル濾過したところ2つの画分に分かれた、分子量約2000の位置に溶出された比較的分子量の画分を分析するとコアの構成成分であるガラクトサミン、アラニン、グルコース、ラムノースが検出され、O-多糖鎖部分の分解によって残ったコア部分であると推定した。もうひとつのvoid付近に溶出された高分子量の画分を分析すると、90%以上がラムノースであり、O-抗原多糖とは別種の多糖であると考えられる(詳細は第4章にて述べる)。

### 3-2-3. 考察

本節において、本間血清型別G型の標準株11D 1008由来O-抗原多糖の化学構造決定について述べた。図9に示すように、O-多糖標品を強酸加水分解、アルカリ分解、及び脱N-ホルミル化した多糖のスミス分解によって得られオリゴ糖断片の分析結果及び<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMRスペクトルからその全構造を以下のように推定した。

-4)GalNAcA(amido)(α1-4)GalNPOA(amido)(α1-3)QuiNAc(α1-3)Rha(α1-;

本多糖の特徴としては以下の点が挙げられる。

(1)アミノウロン酸のグリコシド結合が非常に酸抵抗性であることから通常の組成分析では、真の組成比は得られず、ラムノース以外はほとんどがGalNA(α1-4)GalNA(α1-3)QuiN(OS1)として回収される。

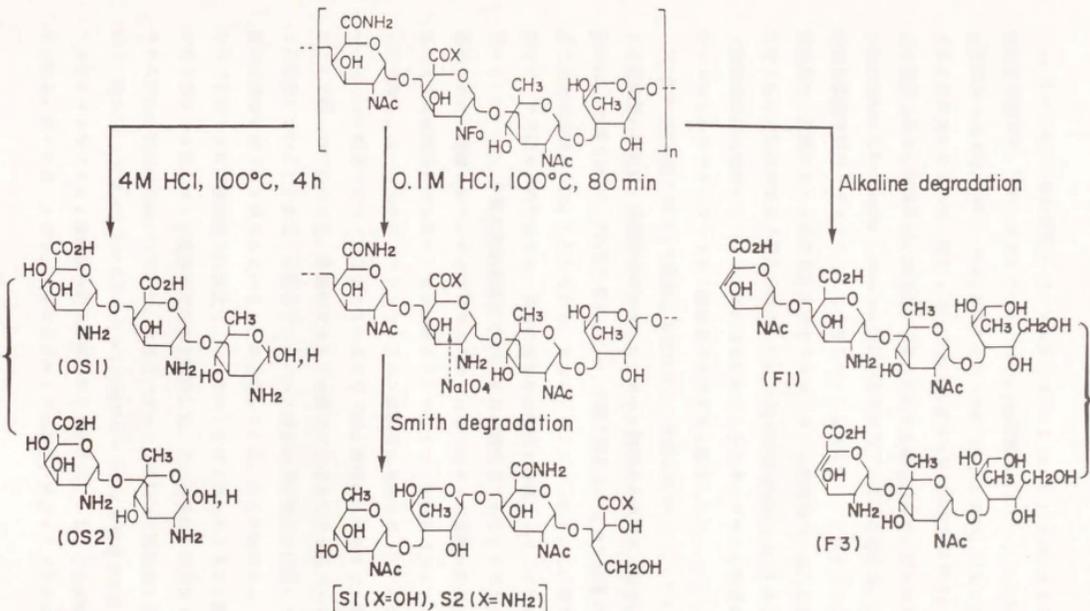


図9. 緑膿菌11D 1008株 (G型) 由来のO-抗原多糖の酸分解, スミス分解, アルカリ分解  
 "X" represents OH or NH<sub>2</sub> group.

(2) N-ホルミル基の存在 ( $^1\text{H-NMR}$ では $\delta = 8.15, 8.17$  ppmの2本のピークがほぼ同程度の強さで、 $^{13}\text{C-NMR}$ では $\delta = 165.8$  ppmに観察された。)。このN-ホルミル基は弱酸(0.1 M HCl, 100°C, 80分)でもアルカリ条件(0.1 M NaOH, 37°C, 24時間)でも脱離することが見いだされた(図9)。N-ホルミル基は天然での存在は非常に少なく緑膿菌では本報告にあるG型菌株[45, 62, 63], C型に対応する菌株[64]で、更にはエルシニア菌の4-formamido-4,6-dideoxy-L-mannose [65]が報告されているのみである。N-ホルミル基の結合位置は脱N-ホルミル化した多糖のスミス分解物がN-アセチルキノボサミンを非還元端に、遊離のアミノ基を有するガラクトサミノロン酸残基の2位, 3位で酸化的開裂を受けたことに由来すると考えられる2,3,4-trihydroxybutanoic acid もしくはそのアミド誘導体を還元端側にもつオリゴ糖が得られたことからキノボサミン残基の非還元端側にN-ホルミルガラクトサミノロン酸残基が存在すると推定した。

(3) ウロン酸残基へのアミド置換。本菌株のO-多糖中のガラクトサミノロン酸残基に対する置換基の存在は、多糖中のガラクトサミノロン酸のカルボキシル基がcarbodiimide/ $\text{NaBH}_4$ による還元に対して抵抗性を示すこと、多糖が温和なアルカリ処理で容易に断片化することから示唆された。しかしながら、NMRスペクトルの結果からは置換基に相当する様なピークは認められなかった。多糖の酸加水分解後の遊離アンモニア量は繰り返し単位当たり1.5モルで、多糖の酸塩基滴定では0.5モルの酸性基(おそらくカルボキシル基)が認められた。遊離したアンモニアはカルボキシル基へのアミド置換に由来すると推定した。またスミス分解断片ではN-アセチルガラクトサミノロン酸残基は全てアミド化されているのに対し、N-ホルミルガラクトサミノロン酸残基に由来する 2,3,4-trihydroxybutanoic acid 残基ではアミド化されているオリゴ糖と遊離のカルボキシル基のものがほぼ1:1で得られていること。多糖のアルカリ分解ではほぼ全てのラムノースがラミニトールに変換していることから、多糖中でラムノース残基の還元端側に位置しているウロン残基のほぼ全てがアミド化されていることを示唆している。以上の結果から、N-アセチルガラクトサミノロン酸残基のほぼ全て、N-ホルミルガラクトサミノロン酸残基の約半分のカルボキシル基がアミド化されていると推定した。この結果は、NMRスペクトルのシグナルがnon-stoichiometricであり、複雑なパターンは不均一な置換基に起因するものであり、特に $^1\text{H-NMR}$ におけるN-ホルミル基のピークが2本観察されることはN-ホルミルガラクトサミノロン酸残基の約50%がアミド化されていることを反映していると考えられる。N-ホルミルガラクトサミノロンアミドの同定、及びアミド化されたウロン酸残

基のアルカリ感受性は本報告が始めてである。

(4)本菌株のO-多糖中にはO-アセチル基は存在しない。<sup>1</sup>H-NMRにおいては2.10から2.25 ppm領域に、<sup>13</sup>C-NMRでは20.0から22.0 ppmの領域にO-アセチル基の特徴的なメチル基のシグナルは認められなかった。

本報告と前後して、本間血清型Gと血清学的に対応関係にある各種血清型標準株のO-抗原多糖の構造がKnirel等によって報告された[62, 63]。それらの比較を表11に示す。報告のある6菌株ともに構成成分及び糖配列に関しては一致している。しかしながら詳細な化学構造には違いが認められる。即ち、(1)N-アセチルガラクトサミンヌロン酸残基のO-アセチル基の有無、(2)N-ホルミルガラクトサミンヌロン酸残基のO-アセチル基の有無、(3)N-ホルミルガラクトサミンヌロン酸残基のアミド置換の割合(0から100%)、(4)キノボサミン残基のコンフィギュレーション( $\alpha$ ,  $\beta$ )、(5)ラムノースの置換位置(2位, 3位)である。本論文で述べた本間G型はLanyi 04a, 4cのO-多糖とN-ホルミルガラクトサミンヌロン酸残基のアミド置換の有無以外の化学構造は全く同一である。これらの多糖間の免疫学的異同には興味もたれる。また、G型のO-抗原多糖には同一血清型の中で化学構造に非常に多様性のあることが示された。

表 1 1. 緑膿菌 IID 1008 株 (本間血清型 G 型) 由来 O-抗原多糖の構造及び、それと血清学的に対応関係にある血清型標準株由来 O-抗原多糖の構造 [62, 63] との比較

Serotype	Possible structure
Homma G (IID 1008)	$\rightarrow 4)D\text{-GalNAcA}(\text{amido})(\alpha 1\rightarrow 4)D\text{-GalNFoA}(\text{amido})_{0.5}(\alpha 1\rightarrow 3)D\text{-QuiNAc}(\alpha 1\rightarrow 3)L\text{-Rha}(\alpha 1\rightarrow$
Lanyi O4a, c	$\rightarrow 4)D\text{-GalNAcA}(\text{amido})(\alpha 1\rightarrow 4)D\text{-GalNFoA}(\alpha 1\rightarrow 3)D\text{-QuiNAc}(\alpha 1\rightarrow 3)L\text{-Rha}(\alpha 1\rightarrow$
Lanyi O4a, b	$\rightarrow 4)D\text{-GalNAcA}(\text{amido})(\alpha 1\rightarrow 4)D\text{-GalNFoA}(\text{amido})_{0.1}(\alpha 1\rightarrow 3)D\text{-QuiNAc}(\alpha 1\rightarrow 2)L\text{-Rha}(\alpha 1\rightarrow$ $\uparrow 3$ OAc
Lanyi O4a, d	$\rightarrow 4)D\text{-GalNAcA}(\text{amido})(\alpha 1\rightarrow 4)D\text{-GalNFoA}(\text{amido})_{0.2}(\alpha 1\rightarrow 3)D\text{-QuiNAc}(\beta 1\rightarrow 3)L\text{-Rha}(\alpha 1\rightarrow$ $\uparrow 3$ OAc
Habs O6	$\rightarrow 4)D\text{-GalNAcA}(\text{amido})(\alpha 1\rightarrow 4)D\text{-GalNFoA}(\alpha 1\rightarrow 3)D\text{-QuiNAc}(\alpha 1\rightarrow 3)L\text{-Rha}(\alpha 1\rightarrow$ $\uparrow 3$ OAc
Fisher 1	$\rightarrow 4)D\text{-GalNAcA}(\text{amido})(\alpha 1\rightarrow 4)D\text{-GalNFoA}(\text{amido})(\alpha 1\rightarrow 3)D\text{-QuiNAc}(\alpha 1\rightarrow 2)L\text{-Rha}(\alpha 1\rightarrow$ $\uparrow 3$ OAc

### 3-3. 緑膿菌 IID 1001 (A型) のO-抗原多糖の構造

#### 3-3-1. 材料と方法

##### LPSとO-多糖の調製

3-2-1節に従って、脱脂菌体(20 g)よりLPSを抽出した。LPS標品(900 mg)を酢酸加水分解後、得られた水溶性画分のSephadex G-50及びDEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィーによって精製した。200 mgのO-多糖標品を得た。

##### 脱O-アセチル化

O-多糖標品(180 mg)を10 mlの5% トリエチルアミンで50°C, 3時間処理した。反応後、Dowex 50 (H<sup>+</sup>型)カラムに通し、水に対して透析した。これを、脱O-アセチル化多糖標品(164 mg)とした。

##### フッ化水素分解

脱O-アセチル化O-多糖標品(30 mg)を3 mlの5% フッ化水素で25°C, 24時間処理した。エアフラッシュによって蒸発乾固した後、生成物をCellulofine GCL-25mカラムクロマトグラフィーによって分画した。オリゴ糖画分は、リクロマトグラフィーによって精製した。

##### スミス分解

脱O-アセチル化O-多糖標品(60 mg)を0.1 M NaIO<sub>4</sub>/0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で4°Cで4日間遮光して反応させた。過剰のNaIO<sub>4</sub>をエチレングリコールで壊し、1 M NaBH<sub>4</sub>で還元した。生成物を透析、凍結乾燥した(40 mg)。NaIO<sub>4</sub>酸化多糖の一部を5% フッ化水素で25°C, 24時間もしくは、0.5 M HClで20°C, 2日間処理する。得られたスミス分解物は、Cellulofine GCL-25mカラムクロマトグラフィーで分画、精製した。

##### メチル化分析

メチル化分析は、CiucanuとKerekの方法[66]に従った。試料をCH<sub>3</sub>I (0.1 ml)と粉末状にしたNaOH (10 mg)を含む0.5 mlのジメチルスルフォキシド溶液中、激しく攪拌しながら25°Cで10分間反応させる。メチル化物は、多糖については透析により、オリゴ糖についてはクロロホルムで抽出することにより、脱塩した。完全にメチル化するため、同じ操作をもう一度繰り返した。メチル化物を、2 M HClで100°C, 18時間加水分解し、N-アセチル化の後、NaBD<sub>4</sub>で還元をおこなった。得られた、メチル化アルジトールは、過アセチル化後、GLC/MSによって分析した。

### 質量分析

マススペクトロメトリーは、Jeol JMS-DX300 (日本電子) を用い、イオン化電圧70 eVで測定した。GLC/MSでは、1% OV-17/Gas Chrom Qカラムを用いた。

### その他

D-3-hydroxybutanoic acidは3-hydroxybutyrate dehydrogenase (Boeringer-Mannheim) を用いてD,L-3-hydroxybutanoic acid (東京化成) を標準物質として、酵素的に比色定量した[67]。還元糖は、ParkとJohnsonの方法[68]に従いグルコサミンを標準物質として定量した。

### 3-3-2. 結果

#### O-多糖のNMRスペクトル分析

nativeのO-多糖標品の<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルには、強度比にstoichiometryのない多数のシグナルが観察された。(図10-A, 11-A)。<sup>1</sup>H-NMRにおける2.15から2.20 ppmの領域、<sup>13</sup>C-NMRにおける20.1から20.5 ppmの領域にO-アセチル基のメチル基と考えられるシグナルが認められる。これらのシグナルがnon-stoichiometricであることは、多糖鎖のO-アセチル置換が部分的であることを反映していると考えられる。

それに対して、脱O-アセチル化O-多糖の<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル(図10-B, 11-B)は、stoichiometricなパターンを示し、多糖が規則的な繰り返し単位をもっていることを示唆している。脱O-アセチル化O-多糖の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルには、3残基のメチル基(1.21, 1.22, 1.26 ppm, doublet, J= 6 Hz), 3残基のアセトアミド基(1.97, 1.99, 2.04 ppm, singlet), 1残基のメチレン基(2.37 ppm, multiplet), 4つのアノマープロトン(4.54ppm, doublet, J<sub>1,2</sub>= 8.8 Hz; 4.90 ppm, pseudo-singlet; 5.25 ppm, doublet, J<sub>1,2</sub>= 3.6 Hz; 5.29 ppm, doublet, J<sub>1,2</sub>= 3.4 Hz)が観察された。化学シフトと結合定数の値から、多糖鎖は2残基のα結合糖残基(5.25, 5.29 ppm), 1残基のβ結合糖残基(4.54 ppm), 更に同定不能な1残基(4.90 ppm)の4糖繰り返し構造であると推定した。同一標品の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル(表12)では、2残基の6-デオキシ糖のメチル基(17.7, 18.2 ppm), 1残基のカルボキシル基(174.6 ppm), 3残基のアセトアミド基(23.1-23.5 ppm, メチル基; 175.2-175.4 ppm, カルボキシル基), 4残基のアノマー残基(98.3, 2C; 100.5; 103.3 ppm), 4個の窒素に結合した炭素原子 (50.3, 55.2, 56.5,

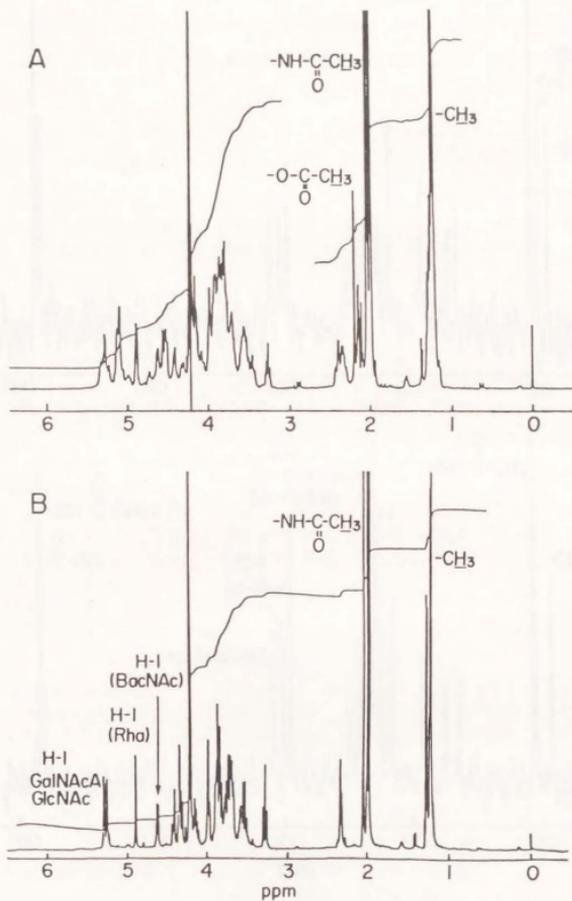


図10. IID 1001株由来O-多糖標品(A)及び脱O-アセチル化したO-多糖標品(B)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

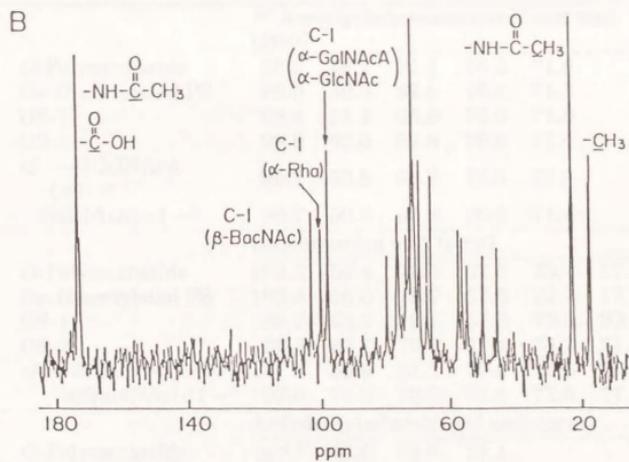
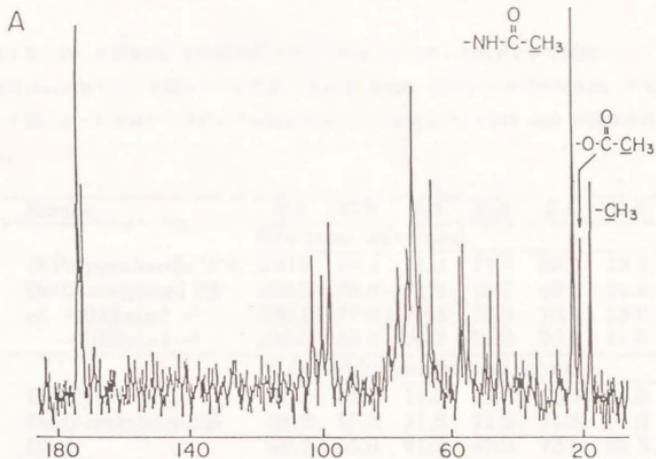


図11. IID 1001株由来O-多糖標品(A)及び脱O-アセチル化したO-多糖標品(B)の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル

表12. O-多糖及び、その誘導体の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルのシグナル帰属

表以外にアセトアミド基のメチル炭素 (22.4-23.4 ppm) 及び、カルボキシル基、アセトアミド基、3-ヒドロキシブタノイル基のカルボニル炭素 (172.5-176 ppm) が観察されている。

Sample	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Rhamnose unit (ppm)						
<i>O</i> -Polysaccharide (PS)	100.5	76.5	71.8	73.5	69.6	18.2
De- <i>O</i> -acetylated PS	100.5	76.4	71.8	73.7	69.6	18.2
cf. →2)Rha(α1→ <sup>a</sup>	100.1	77.6	70.8	73.2	70.7	18.0
→3)Rha(α1→ <sup>a</sup>	102.0	68.1	76.7	71.3	70.2	17.8
<i>N</i> -Acetylglucosamine unit (ppm)						
<i>O</i> -Polysaccharide	98.2	54.7	71.8	71.3	72.3	66.9
De- <i>O</i> -acetylated PS	98.2	55.2	71.8	71.2	71.8	67.3
OS-1	98.7	55.6	71.2	69.2	72.9	61.6
cf. Me-α-GlcNAc <sup>b</sup>	98.9	54.4	72.0	70.8	72.5	61.4
<i>N</i> -Acetylgalactosaminuronic acid unit (ppm)						
<i>O</i> -Polysaccharide	98.2	49.4	71.1	76.3	71.8	
De- <i>O</i> -acetylated PS	98.3	50.3	69.6	76.4	71.3	
OS-1	99.4	51.1	68.6	76.8	71.8	
OS-2	99.6	50.5	67.8	70.6	71.4	
cf. →4)GalNAc(α1→ <sup>b</sup>	99.7	50.8	68.2	76.6	72.9	
GalNAc(α1→ <sup>b</sup>	99.7	50.5	67.8	70.6	71.4	
Bacillosamine unit (ppm)						
<i>O</i> -Polysaccharide	103.3	56.4	79.5	57.5	73.4	17.7
De- <i>O</i> -acetylated PS	103.4	56.5	79.7	57.5	72.7	17.7
OS-1	86.3	63.7	79.1	57.3	73.5	20.8
OS-2	86.3	63.7	79.5	57.4	73.2	21.0
cf. →3)QuiNAc(β1→ <sup>a</sup>	103.2	55.5	81.1	77.0	72.5	17.4
→3)Qui4NAc(β1→ <sup>c</sup>	103.0	74.3	79.2	57.4	72.5	17.8
3-Hydroxybutanoic acid unit (ppm)						
<i>O</i> -Polysaccharide	n.d. <sup>d</sup>	46.0	65.8	23.1		
De- <i>O</i> -acetylated PS	n.d.	46.1	65.9	23.1		
OS-1	172.7	39.2	73.4	22.0		
OS-2	172.5	39.8	74.0	22.0		
3-Hydroxybutanoic acid	180.0	44.8	66.2	23.5		

<sup>a</sup>Data from Ref. 62. <sup>b</sup>Data from Ref.45. <sup>c</sup>Data from Ref. 69. <sup>d</sup>not determined.

57.5 ppm)そして12個の酸素に結合した炭素原子(66-82 ppmの領域)が観察された。

これらのNMRの結果は、血清学的に対応するHabs O3のO-多糖で報告されている構成成分[70,71]、L-ラムノース、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-L-ガラクトサミノロン酸、2,4-ジアシル(アセチル及び3-ヒドロキシブタノイル)-2,4,6-トリデオキシ-D-グルコース(N, N'-ジアシルバシロサミン)と一致する。類似の糖成分で得られているスペクトルデータをもとに、 $^{13}\text{C}$ -NMRのシグナルの帰属を試みたのが表12である。さらには、 $^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMRにおける3-ヒドロキシブタン酸残基の特徴的なシグナルは、脱O-アセチル化のアルカリ処理においても変化のないことは、この残基がアミド形で結合していることを示唆している。表に示した多糖の分析値も、これらの仮説を支持している。また、proton-coupled  $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル[72]では、3個の $\alpha$ 結合糖残基(97.94 ppm, 2C,  $J_{c,H}=172, 175$  Hz; 99.54 ppm, 1C,  $J_{c,H}=172$  Hz)と1個の $\beta$ 結合糖残基(102.36 ppm, 1C,  $J_{c,H}=162$  Hz)が観察された。

#### 糖組成分析

nativeのO-多糖を4 M HCl, 100°Cで1から24時間と時間を変えて加水分解した後、成分をアミノ酸分析機、ガスクロマトグラフィー、高圧濾紙電気泳動、ペーパークロマトグラフィーによって分析した。その結果(表12)、ラムノース、グルコサミン、3-ヒドロキシブタン酸がほぼ等モルと少量のコア成分であるグルコース、ガラクトサミン及びリン酸が検出された。NMRスペクトルデータから予測されたガラクトサミノロン酸とバシロサミンは、他の成分に比較すると少量しか検出されなかった。一方、未知のニンヒドリン陽性物質(compound Z)が、アミノ酸分析機上でアンモニアとリジンの間の位置に溶出された。発色率をグルコサミン換算とするとcompound Zの量は、そのグルコサミンとほぼ等量であった。

compound Zを単離するために、約10 mgのnativeのO-多糖を4 M HClで100°C, 4時間加水分解して、生成物をCellulofine GCL-25mゲル濾過で分画した。compound Zは、 $K_d = 0.43$ の位置に溶出された。濾紙電気泳動上では、負極側に泳動した(緩衝液A(pH5.8)では $m_{c1,eN} = 0.68$ , 緩衝液B(pH1.9)では $m_{c1,eN} = 1.13$ )。N-アセチル化後、compound Zを酸加水分解しても、少量のガラクトサミノロン酸とバシロサミンが認められただけで、ほとんどがcompound Zとして回収され、酸加水分解抵抗性を示す糖残基の存在が示唆された。一方、N-アセチル化、カルボキシ基還元したcompound Zはガラクトサミン(ガラクトサミノロン酸由来)とバシロサミニトールと思われるニンヒドリン陽性物質を与えた。以

表13. IID 1001由来O-多糖標品及び、その誘導体の化学組成

数字はnmol/mg乾燥重量で表してある。バシロサミンの値はアミノ酸分析機上でグルコサミンと同じ発色率として計算している。

Compound	Content in			
	native O-PS (PS I)	O-deacetylated O-PS (PS II)	carboxyl reduced PS II	periodate oxidized PS II
Rhamnose	692	675	648	40
Glucose	138	132	127	101
Alanine	51	50	44	48
Galactosamin- uronic acid	184	186	87	249
Glucosamine	621	642	629	23
Galactosamine	48	42	339	43
Compound X	791	775	195	598
Bacillosamine	+ <sup>a</sup>	+	125	49
3-Hydroxy- butanoic acid	642	653	637	603
Glycerol	0	0	0	582

a ; present but not determined

上の結果、compound ZはGalNA-BacNの2糖であると推定した。

脱O-アセチル化O-多糖をcarbodiimide/NaBH<sub>4</sub>処理すると、ガラクトサミンが約300 nmol/mg、バシロサミンが約125 nmol/mg増加した(表13)。一方、ガラクトサミノロン酸、compound Zの減少が認められた。しかしながら5回の還元操作を繰り返しても、ガラクトサミノロン酸からガラクトサミンへの変換は約50%と完全にはできない。還元が完全にいかない原因としては、立体障害、カルボキシル基へのアミド置換等が考えられる。ガラクトサミノロン酸残基の酸抵抗性による不完全な加水分解[45, 55]とバシロサミンの分解によって、本菌株のO-多糖の定量的な分析が不可能となっていると考えられる。

#### 構成成分の単離と性状解析

O-多糖標品(20 mg)を4 M HClで100°C, 1時間加水分解した後、生成物をDowex 50 (H<sup>+</sup>型)カラムによるイオン交換クロマトグラフィーに供した。水, 0.33 M HCl, 2 M HClのstepwiseの溶出によって3つの画分(Fr. 1からFr. 3)に分画した。ラムノース(6.2 μmol)は、溶媒Aでの濾紙クロマトグラフィーでFr. 1より単離した。グルコサミン(6.0 μmol)とガラクトサミノロン酸(2.6 μmol)は、Fr. 2(モノアミノ糖画分)からCellulofine GCL-25mゲル濾過によって分離、調製した。Fr. 3はCompound Zとジアミノ糖を含有しており、緩衝液Aでの濾紙電気泳動によってジアミノ糖を単離した(m<sub>0.125</sub> = 1.66)。収量は非常に低く、還元糖として約1 μmolであった。

単離した各単糖の絶対配置を旋光度測定によって決定した。ラムノースはメチルラムノシド(αアノマーを90%含有)に変換したものについて旋光度を測定した。メチルラムノシド,  $[\alpha]_D -47.0^\circ$ , cf. メチル-L-ラムノシド,  $[\alpha]_D -47.1^\circ$  [40]; グルコサミン塩酸塩,  $[\alpha]_D +57.9^\circ$ ; ガラクトサミノロン酸塩酸塩,  $[\alpha]_D -110.5^\circ$ , cf. L-ガラクトサミノロン酸塩酸塩,  $[\alpha]_D -113^\circ$  [48, 70]。以上の結果、ガラクトサミノロン酸はD-体、グルコサミンはD-体、ラムノースはL-体であると決定した。ジアミノ糖については定量的な値をだすだけの量が得られなかったが、非常に強い右旋性を示したことからD-体であると推定した。

ジアミノ糖を濾紙電気泳動によって精製し、N-アセチル化後メチル化してGLC/M Sで分析した。フラグメンテーションパターンは, methyl-3-O-methyl-2,4-(N,N-dimethyl)diacetoamido-2,4,6-trideoxyhexapyranosideのものと考えられた。更に、O-多糖のスミス分解によって得られたオリゴ糖OS3の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの結果(表14)、ジアミノ糖残基の結合定数J<sub>2,3</sub>, J<sub>3,4</sub>, J<sub>4,5</sub>が約11 Hzと非常に大きな値を示した。この結果

は、ジアミノ糖がglucoコンフィギュレーションであることを示している。従って、この糖は2,4-ジアミノ-2,4,6-トリデオキシ-D-グルコピラノース(バシロサミン)であると推定した。

#### メチル化分析

脱O-アセチル化後、カルボキシル基を還元したO-多糖のメチル化分析をCiucanuとKerekの方法にしたがっておこなった。酸加水分解、アルジトールアセテートに変換した後、試料をGC/LMSで分析した。1,2,5-tri-O-acetyl-3,4-di-O-methylrhaminitol, 1,5,6-tri-O-acetyl-3,4-di-O-methyl-2-N-methylacetamido-2-deoxyglucitol 及び、1,4,5-tri-O-acetyl-3,6-di-O-methyl-2-N-methylacetamido-2-deoxygalactitol (ガラクトサミンヌロン酸由来)が主要なピークとして観察された。しかしながら、バシロサミン由来と思われる誘導体は全く認められなかった。また、多糖の還元が完全でないため、定量的な結果は得られなかった。

以上の結果から、O-多糖鎖は、2置換のラムノース、6置換のグルコサミン、4置換のガラクトサミンヌロン酸及び3置換のバシロサミンからなる直鎖の多糖である考えられる。推定した結合位置は、脱O-アセチル化O-多糖の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル(表12)で見られるそれぞれの残基のグリコシレーションによる $\alpha$ 効果の結果とも一致している。

#### O-多糖のフッ化水素分解

脱O-アセチル化O-多糖(30 mg)を55%フッ化水素で25°C、24時間処理後、Cellulofine GCL-25mカラムクロマトグラフィーで分画すると、3つの画分(Fr. I-III)が得られる。分析の結果、Fr. Iは、O-多糖断片とコアオリゴ糖の混合物であった。Fr. IIIは、ラムノースの単糖と少量のグルコースを含んでいた。主生成物であるFr. IIはリクロマトグラフィーによって精製し、非還元性のアミノ糖含有断片OS1(約18 mg)を得た。

多糖ではカルボキシル基の還元が完全にはいかなかったのに対し、OS1は、carbodiimide/NaBH<sub>4</sub>処理によって完全に還元された。カルボキシル基還元OS1を酸加水分解するとグルコサミン、ガラクトサミン(ガラクトサミンヌロン酸由来)及び3-ヒドロキシブタン酸が等モル検出された。それに加えて、バシロサミニトールではなく、バシロサミンが少量検出された。このオリゴ糖をメチル化分析すると、非還元端のグルコサミンと4置換のガラクトサミンが認められた。OS1の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルには、3本のアノマープロトンのシグナルが観察された(5.25 ppm,  $J_{1,2} = 3.91$  Hz; 5.32 ppm,  $J_{1,2} = 5.7$  Hz;

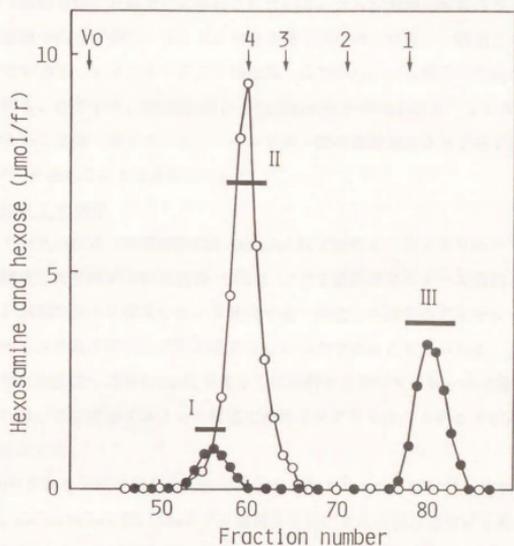


図12. 脱O-アセチル化したO-多糖のHF分解生成物のクロマトグラフィー

脱O-アセチル化O-多糖標品(30 mg)を3 mlの55% HFで25°C, 24時間処理する。生成物をCellulofine GCL-25mカラム(1x147 cm)でゲル濾過した。1 mlずつフラクションを集め、アミノ糖量(○)及び中性糖量(●)を定量した。横棒で示したフラクションをブールし、リクロマトグラフィーによって精製した。矢印1, 2, 3, 4は各々N-アセチルグルコサミンの単糖, 二糖, 三糖, 四糖の溶出位置を示す。

5.36 ppm,  $J_{1,2} = 3.42$  Hz)。このスペクトルデータは2つの糖残基、おそらくはガラクトサミンとグルコサミン残基、が $\alpha$ 結合であることを示唆している。5.32 ppmのシグナルは、おそらくバシロサミン残基に由来するものと考えられるが、多糖と同様にスミス分解断片OS3 (表14)の $^1\text{H-NMR}$ ではバシロサミンのアノマーのシグナルは、約4.54 ppm (結合定数8 Hz以上)に検出されている。フッ化水素分解断片OS1の化学シフトと結合定数の大きな差は、OS1における還元端のバシロサミン残基とそれにN-アシル結合している3-ヒドロキシピタン酸残基との間のbicyclic構造の形成によるものと予想した。即ち、OS1は、GlcNAc( $\alpha$ 1-4)GalNAc( $\alpha$ 1)のunitにN-アシルバシロサミン残基の、おそらくは還元端が3-ヒドロキシピタン酸の水酸基によって分子内アセタール結合でブロックされていると推定した。

#### O-多糖のスミス分解

脱O-アセチル化O-多糖標品(20 mg)を $\text{NaIO}_4$ で酸化し、生じたアルデヒドを $\text{NaBH}_4$ で還元した。酸化した多糖の分析の結果(表13)、C2置換のラムノース残基とC6置換のグルコサミン残基の大半が消失した。多糖繰り返し単位1単位分のグリセロールは6-置換のグルコサミン残基の酸化的分解の結果生じたものであると考えられる。更に、 $\text{NaIO}_4$ 酸化多糖を酸加水分解後ただちに $\text{NaBH}_4$ で還元して分析するとグリセロールの量はほぼ倍量となった。これは、C2置換ラムノース残基に由来するグリセルアルデヒドが還元されて生じたものと推定した。

$\text{NaIO}_4$ 酸化多糖を2種の異なる方法で酸加水分解を行った。55% フッ化水素で25°C、24時間処理後、Cellulofine GCL-25mでゲル濾過すると、アミノ糖を含有する非還元性のオリゴ糖(OS2(9 mg))のシングルピークが認められた。一方、0.5 M HClで20°C、3日間処理し、 $\text{NaBH}_4$ 還元後、Cellulofine GCL-25mでゲル濾過を行った場合には、還元端にグリセロールが結合したオリゴ糖OS3(5 mg)が得られた。

#### OS2とOS3の同定

カルボキシル基を還元したOS2を分析するとグルコサミン、ガラクトサミン、3-ヒドロキシピタン酸が等モル、及び少量のバシロサミンが認められた。一方、OS3では、OS2で検出された成分の他にグリセロールがガラクトサミンとほぼ等モル認められた。グリセロール残基は図14に示すようにC2置換のラムノース残基のC1からC3に由来しているものと考えられる。カルボキシル基を還元したOS2、OS3のスミス分解、メチル化分析の結果、いずれもガラクトサミン残基を非還元端にもつと決定した。

カルボキシル基を還元し、過メチル化したOS 2とOS 3の質量スペクトルを図13に示す。最も高分子量のマスイオンピークは、OS 2で $m/z$  559、OS 3で $m/z$  692であり、図13に示した推定構造の計算値と一致する。 $m/z$  250以上の領域においては、 $m/z$  260のピークのみが共通である。このピークは過メチル化N-アセチルヘキソサミン、おそらくはガラクトサミンヌロン酸に由来するN-アセチルガラクトサミンに相当し、該残基がこれらのオリゴ糖の非還元端に位置することを示唆している。この結果は、カルボキシル基還元前のOS 2、OS 3の $^1\text{H-NMR}$  (表14)、 $^{13}\text{C-NMR}$  (表12)のデータとも一致する。

カルボキシル基還元OS 2のマススペクトルにおける $m/z$  283のマスイオンはバシロサミンと3-ヒドロキシブタン酸からなるビシクロ体のフラグメントに、更に $m/z$  170はこのビシクロ体のフラグメントから脱離したバシロサミン残基のC 4からC 6の部分に由来すると推定した。この $m/z$  170のマスイオンが出現したことは、バシロサミン残基のC 4のアミノ基がアセチル基で置換されていて、3-ヒドロキシブチリル基ではないことを示唆している。カルボキシル基還元OS 3のマススペクトルに認められる $m/z$  580と $m/z$  574は分子量693のオリゴ糖からジ-O-メチルグリセロール部分が酸素原子あるなしの状態ですれぞれ脱離したものと考えられ、還元端にグリセロール残基のあることを示唆している。

また、OS 3を55% フッ化水素 (25°C, 24時間) で処理すると、グリセロールの脱離をともなってOS 2に変換した。

OS 2の $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータ (表12) では、非還元端の $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミンヌロン酸残基に相当するシグナルが得られている。一方、OS 2のバシロサミン残基と3-ヒドロキシブタン酸残基に帰属されるシグナルのうちのいくつかはOS 1と同様に異常な化学シフト値を示した。OS 2、OS 3について、デカップリングを含めた $^1\text{H-NMR}$  スペクトル分析から、全てのピークについて帰属を行った (表14)。OS 2とOS 3で大きく異なるのは、バシロサミン残基及び3-ヒドロキシブタン酸残基に由来するピークである。一方、N-アセチルガラクトサミンヌロン酸残基にはほとんど違いは認められず、 $\alpha$ 結合のgalactoコンフィギュレーションであることを確認した。OS 3のスペクトルにおいてバシロサミン残基は、アノマープロトンの化学シフトと結合定数の値から $\beta$ グリコシド結合であり、 $J_{2,3}$ 、 $J_{3,4}$ 、 $J_{4,5}$ の値が大きいことからglucoコンフィギュレーションであると考えられる。以上の結果より、OS 3の構造を図2示すようにGalNAcA( $\alpha$ 1-3)BacNBtOH4NAc( $\beta$ 1-2)glycerolであると推定した。

フッ化水素断片のOS 1、OS 2については、 $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルでは、バシロサ

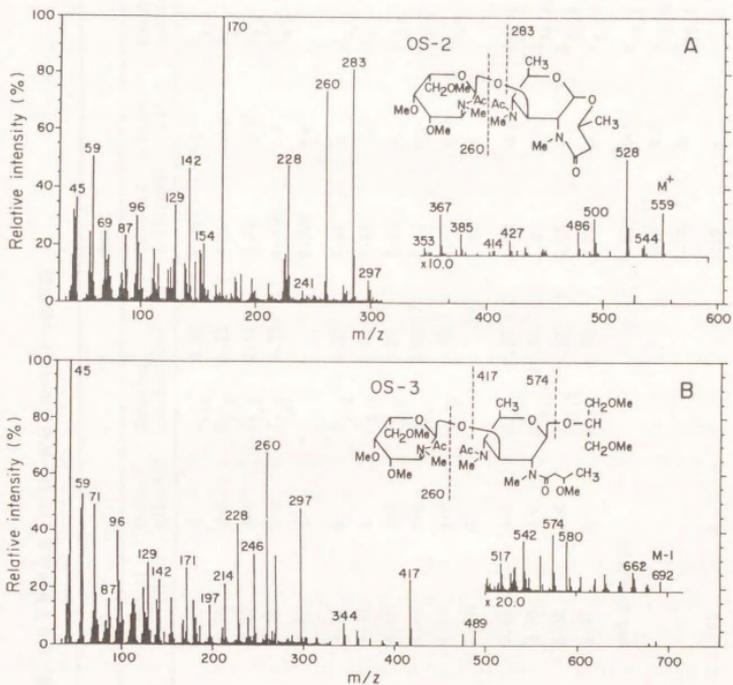


図13. IID 1001株 $\alpha$ -多糖のスミス分解生成物OS2, OS3のカルボキシル基還元/過メチル化誘導体の質量スペクトル及び推定フラグメンテーション質量スペクトルは、イオン化電位70 eVのEI法による。

表14. スミス分解由来オリゴ糖, OS2及びOS3の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの帰属

Compound	OS2		OS3				
Residue	Proton (Integral)	Chemical shift (ppm)	Multi-plicity	Coupling constant (Hz)	Chemical shift (ppm)	Multi-plicity	Coupling constant (Hz)
GalNA	H-1	5.20	d	J <sub>1,2</sub> 3.90	5.22	d	J <sub>1,2</sub> 3.91
	H-2	4.16	d-d	J <sub>2,3</sub> 11.23	4.15	d-d	J <sub>2,3</sub> 11.23
	H-3	3.92	d-d	J <sub>3,4</sub> 3.42	3.83	d-d	J <sub>3,4</sub> 2.93
	H-4	4.32	d-d	J <sub>4,5</sub> 1.47	4.304	~d	J <sub>4,5</sub> ~0
	H-5	4.37	d		4.298	~s	
BacN <sub>2</sub>	H-1	5.36	d	J <sub>1,2</sub> 5.37	4.55	d	J <sub>1,2</sub> 8.30
	H-2	4.53	t	J <sub>2,3</sub> 5.37	3.88	d-d	J <sub>2,3</sub> 11.23
	H-3	4.43	d-d	J <sub>3,4</sub> 6.84	3.83	t	J <sub>3,4</sub> 11.23
	H-4	4.35	d-d	J <sub>4,5</sub> 2.93	3.61	~t	J <sub>4,5</sub> 11.72
	H-5	4.09	q-d	J <sub>5,6</sub> 6.83	3.57	q-d	J <sub>5,6</sub> 6.35
	H-6 (3H)	1.24	d		1.22	d	
3-Hydroxybutyryl	H-2	2.32	d-d	J <sub>2a,3</sub> 9.28	2.29	d-d	J <sub>2a,3</sub> 8.79
	H-2 <sup>a</sup>	2.70	d-d	J <sub>2a,2b</sub> 17.58	2.36	d-d	J <sub>2a,2b</sub> 14.16
	H-3	4.26	q-d-d	J <sub>2b,3</sub> 4.89	4.17	m	J <sub>2b,3</sub> 4.40
	H-4 (3H)	1.30	d	J <sub>3,4</sub> 6.35	1.22	d	J <sub>3,4</sub> 6.35
Glycerol	H-1 <sup>a</sup>	not detected			3.63	d-d	J <sub>1a,2</sub> 5.38
	H-1 <sup>b</sup>				3.69	d-d	J <sub>1a,1b</sub> 12.21
	H-2				3.76	m	J <sub>1b,2</sub> 4.40
Acetamidomethyl	(3H)	2.01	s		1.97	s	
	(3H)	2.04	s		2.03	s	

ミン残基のシグナルが脱O-アセチル化O-多糖のシグナルに比較して、C 1は17 ppm高磁場側に、C 2は7.7 ppm低磁場側にシフトしていた(表12)。また、3-ヒドロキシシブタン酸残基についてはC 3が低磁場側に8.1 ppm、C 2が高磁場側に6.3 ppmとそれぞれ3位の水酸基に対する置換による $\alpha$ 効果、 $\beta$ 効果による影響と考えられるシグナルのシフトが認められた。OS 1及びOS 2が非還元性のオリゴ糖であることからパシロサミン残基と2位のアミノ基に置換している3-ヒドロキシシブタン酸残基との間で図14に示すようなアセチル結合を含む環状構造を形成していると推定した。OS 2の $^1\text{H-NMR}$ におけるパシロサミン残基に由来するプロトンシグナルの化学シフト及び結合定数の大きな変化は、パシロサミン残基が通常のグルコピラノースの立体構造にはないことを示唆している。パシロサミン残基における3-ヒドロキシシブタン酸の結合位置については立体構造的により安定な6員環と7員環からなるbicyclic構造をとりうる2位のアミノ基に置換していると考えられる。この推定は、先の質量スペクトルの結果からも支持される。一方、4位のアミノ基に3-ヒドロキシシブタン酸が結合している場合、予想されるbicyclic構造は、6員環と9員環である。

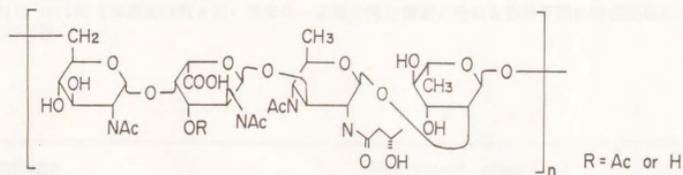
Xnirel[71]らは、本間A型と血清学的に対応関係にあるHabs 03及びLanyi 01のO-多糖で、パシロサミンの4位に3-ヒドロキシシブタン酸が結合していると報告している(表15)。この場合、O-多糖のフッ化水素分解によって、N, N'-ジアシルパシロサミンを還元糖としてもつオリゴ糖が生成している[71]。

#### O-アセチル基の結合位置

$^1\text{H-NMR}$  (図10)、 $^{13}\text{C-NMR}$ のデータ(図11, 表12)よりnativeのO-多糖には、繰り返し単位あたり約1モルのO-アセチル基が認められた。nativeのO-多糖と脱O-アセチル化したものの $^{13}\text{C-NMR}$ を比較すると、脱O-アセチル化することによって、ガラクトサミヌロン酸残基のC 3のシグナルが1.5 ppm高磁場側へ、C 2が0.9 ppm低磁場側へそれぞれシフトしていることから、この多糖のO-アセチル基はメインにはガラクトサミヌロン酸残基の3位に結合していると推定した。更に、nativeのO-多糖では、ラムノース残基が完全に酸化されないこと(125 nmol/mgのラムノースが検出される、一方、脱O-アセチル化後は40 nmol/mg)から、ラムノース残基も部分的(約20%)にO-アセチル化されていると考えられる。

### 3-3-3. 考察

本間血清型A型の標準株であるIID 1001由来のLPSのO-抗原多糖の化学構造は、血清学的に対応関係にあるHabs 03等の血清型標準株由来のO-抗原多糖[71]との比較では、化学構造上も非常に酷似しており、糖組成や糖配列については一致している(表15)。しかしながら、詳細な化学構造には違いが認められる。それは、(1)O-アセチル基の存在とその位置、(2)L-ラムノース残基の結合位置の違い、(3)バシロサミン残基のN-アシル置換基の違いである。本研究によって明らかにした本間血清型A由来のO-多糖の構造はKnirel等の報告[71]にあるHabs血清型O3とはほぼ同様の構造であり、唯一の違いはN-アシル基の置換にある。即ち、本報告のIID 1001由来O-多糖中では、2位のアミノ基が3-ヒドロキシブチリル基で4位がアセチル化されていると認められる。一方、Habs 03由来O-多糖ではその逆で4位のアミノ基が3-ヒドロキシブタノイル化されていると報告している。更に表に挙げてある他のO-多糖についても比較すると、Wokatsch 013のO-多糖のバシロサミン残基は、2位、4位のアミノ基がともにアセチル化されている。また、Lanyi 01は、Habs 03のO-多糖とはL-ガラクトサミン酸残基のO-アセチル基が欠損している点だけが異なり、バシロサミン残基の4位のアミノ基が3-ヒドロキシブチリル化されていると報告されている。また、Habs 03、Lanyi 01のO-多糖をフッ化水素分解によって還元糖としてバシロサミンを還元端にもつオリゴ糖を得ている。それに対して本報告では、A型のO-抗原多糖を55%フッ化水素で分解して非還元性のオリゴ糖OS1(図12,14)が高収率で与えられることを示した。NaIO<sub>4</sub>酸化したO-多糖をフッ化水素分解しても非還元性の2糖OS2が得られた。オリゴ糖OS1及びOS2の<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル分析、質量スペクトル分析の結果から、バシロサミン残基と3-ヒドロキシブタン酸残基の間で環状構造を形成し、図14に示すようなbicyclic構造を推定構造として結論した。一方、スミス分解で得られた断片OS3では、<sup>1</sup>H-NMR、質量スペクトルの結果などからバシロサミン残基は多糖中にあるようにmonocyclic構造をしていると推定した。更に、OS3を55%フッ化水素処理すると高収率でbicyclic構造と考えられるOS2に変換した。従って、OS2及びOS1は、バシロサミン残基のC1のアグリコンと窒素原子に結合している3-ヒドロキシブチリル基の水酸基が置き代わったことにより生じたものであると推定した。また、3-ヒドロキシブチリル基がバシロサミン残基の2位のアミノ基に結合していることによって、この分子内の環形成反応がおこり易いものと考えられる。これらの推定は、OS2、OS3の質量スペクトルの結果(図13)か



*O*-deacetylation

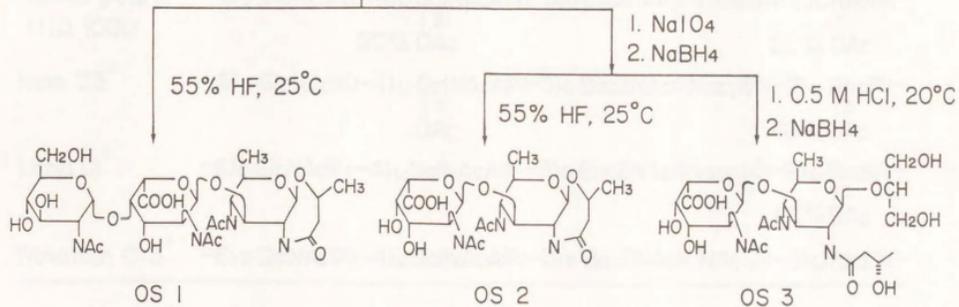


図14. IID 1001由来O-抗原多糖及びHF分解、スミス分解により生じるオリゴ糖断片の構造  
"R" represents Ac or H.

表15. 緑膿菌11D 1001株(本間血清型A型)由来O-抗原多糖の構造とそれと血清学的に対応関係にある血清型標準株のO-抗原多糖の構造[71]の比較

Serotype	Proposed structure
Homma group A (11D 1001)	$-6)\text{-D-GlcNAc}(\alpha 1-4)\text{-L-GalNAcA}(\alpha 1-3)\text{-D-Bac2NAcy14NAc}(\beta 1-2)\text{-L-Rha}(\alpha 1-$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ 3 \\ \text{OAc} \end{array}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ 3 \\ \text{OAc} \end{array}</math> </div> </div>
Habs O3*	$-6)\text{-D-GlcNAc}(\alpha 1-4)\text{-L-GalNAcA}(\alpha 1-3)\text{-D-Bac2NAc4NAcy1}(\beta 1-2)\text{-L-Rha}(\alpha 1-$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ 3 \\ \text{OAc} \end{array}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ 3 \\ \text{OAc} \end{array}</math> </div> </div>
Lanyi O1*	$-6)\text{-D-GlcNAc}(\alpha 1-4)\text{-L-GalNAcA}(\alpha 1-3)\text{-D-Bac2NAc4NAcy1}(\beta 1-2)\text{-L-Rha}(\alpha 1-$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ 3 \\ \text{OAc} \end{array}</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \\ 3 \\ \text{OAc} \end{array}</math> </div> </div>
Wokatsch O13*	$-6)\text{-D-GlcNAc}(\alpha 1-4)\text{-L-GalNAcA}(\alpha 1-3)\text{-D-Bac2NAc4NAc}(\beta 1-3)\text{-L-Rha}(\alpha 1-$

らも支持される。

本多糖標品において、脱O-アセチル化後にcarbodiimide/NaBH<sub>4</sub>法によってガラクトサミノロン酸残基のガラクトサミンへの還元は部分的にしかならなかった(5回の還元操作の繰り返しで約50%しか還元されない)。ところが一方、OS1, OS2, OS3などのオリゴ糖では2回の還元操作で完全にカルボキシル基は還元される。また、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルではカルボキシル基への置換基に由来するようなシグナルが認められない。O-多糖標品中にはアミド体で存在しているアンモニアは検出されない(data not shown)。更に、カルボキシル基にエステルやアミドの置換基の存在する場合に認められるアルカリ処理(0.1 M NaOH, 37°C, 24時間)でのβ脱離による断片化[45, 61]は全く認められない。以上の結果、多糖中のガラクトサミノロン酸残基のカルボキシル基の還元に対する抵抗性はカルボキシル基への置換によるものではないと考えられる。この還元に対する抵抗性は、おそらく多糖鎖における何らかの立体障害によるものと考えられる。

3-4. N-アセチル-L-ガラクトサミンuron酸残基を認識するヒトモノクローナル抗体

### 3-4-1. 材料と方法

ヒトモノクローナル抗体の作製, ELISAの方法は第2章に従った。

#### O-多糖・コアオリゴ糖画分の調製

第2章の方法に従って調製したLPS標品からWilkinsonとGalbraithの方法[50]でO-多糖及びコアオリゴ糖画分を調製した。LPSを1%酢酸で100°C, 90分処理し、inner core中のケトシド結合を選択的に加水分解する。遠心とクロロホルムによる分配によってリピドAを除く、得られた水溶性画分を50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で平衡化したSephadex G-50カラムでゲル濾過した。糖画分の溶出は、フェノール/硫酸法によって知った。O-多糖画分( void volume付近に溶出)とコアオリゴ糖画分をプールし、凍結乾燥した。O-多糖画分は更にDEAE-Sephacelクロマトグラフィーによって精製した。

#### O-多糖の化学修飾

(1) 脱O-アセチル化[48]。 O-多糖標品を0.1 M NaOHで37°C, 16時間処理する。HClで中和後、生成物を脱イオン水に対して透析, 凍結乾燥し、脱O-アセチル化O-多糖標品とした。

(2) 過ヨウ素酸酸化[46]。 脱O-アセチル化O-多糖を0.1 M NaIO<sub>4</sub>/0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH5.0)中で4°C, 4日間遮光して反応させる。過剰のNaIO<sub>4</sub>をエチレンジグリコールで壊した後、反応混液にNaBH<sub>4</sub>を添加し、還元する。透析, 凍結乾燥の後、得られた生成物をNaIO<sub>4</sub>酸化O-多糖標品とした。

(3) カルボキシル基還元[48]。 脱O-アセチル化O-多糖標品をTaylorとConradの carbodiimide/NaBH<sub>4</sub>法[51]によって還元した。

#### ガラクトサミンuron酸含有オリゴ糖

ガラクトサミンuron酸含有オリゴ糖は、嘉屋俊二博士(北海道大学)より分与を受けた。L-GalNAcA(α1-3)D-QuiNAcおよびD-GalNAcA(α1-3)D-QuiNAcは、それぞれIID 1009株(H型), IID 1012(K型)由来のO-多糖からフッ化水素限定分解により調製したものである。O-多糖標品を55%フッ化水素で、30°C, 24時間処理し、生成物をCellulofine GCL-25mゲル濾過によって分画、精製した[47, 48]。

## その他

イムノグロブリンのサブクラスの決定には、Human IgG 1-4 EIA COMBI KIT (The Binding Site Ltd.)を用いた。

### 3-4-2. 結果

#### ヒトモノクローナル抗体TS-3G2

健康人より得た血液(100 ml)より、Ficol密度勾配法で末梢血リンパ球 ( $1.1 \times 10^8$  細胞)を調製した。リンパ球を0.02% pokeweed mitogen (GIBCO), 緑膿菌ホルマリン死菌 (IID 1001 (A型), IID 1002 (B型) 各0.0002%)を含む15% 牛胎児血清添加RPMI-1640培地で6日間培養, 感作した。in vitro感作したリンパ球をヒトマウスヘテロミエローム SHM-D83とPEG法により細胞融合した。融合細胞はヒポキサンチン, アザセリンの存在下で選択をおこなった。特異抗体の産生は緑膿菌菌体を吸着させたプレートを用いたELISA法によって検出した。この実験で、4個の異なる特異性をもつハイブリドーマが得られた。

そのうちのひとつTS-3G2 [IgG ( $\gamma 1, \kappa$ )]は、表16に示すように本間血清型標準株のA型, H型の両方の菌体に特異的に結合し、他の株には全く結合しなかった。一方、血清型特異的なマウスモノクローナル抗体Mei-assay A (A型特異的), Mei-assay II (H型特異的)はそれぞれ対応する血清型株との特異的な反応しか認められなかった。TS-3G2の結合特異性を更に約180株の臨床分離株を用いてELISA法で検討した。TS-3G2は、検討したA型株20株, H株15株の全てに結合した。しかしながら、B, C, E, F, G, I, K, M型株(それぞれ約20株ずつ)には全く結合は認められなかった。以上の結果は、ヒトモノクローナル抗体TS-3G2が、A型, H型に特異的に交差反応することを示している。

#### TS-3G2の認識部位

モノクローナル抗体TS-3G2の認識部位を決定するために、IID 1001株及びIID 1009株由来LPS標品よりO-多糖画分とコアオリゴ糖画分を調製した。LPS標品を弱酸加水分解後、水溶性画分をSephadex G-50でゲル濾過するとvoid volume付近にsmooth型LPSに由来するO-多糖画分が溶出し、低分子量画分にはrough型及びsemirough型LPS由来のコアオリゴ糖画分が得られた。O-多糖画分については、更にDEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィーで精製したものをを用いた。図15に示すようにTS-3G2のA, H型株に菌体に対する結合は、各々のO-多糖画分によって強く阻害された。一方、コアオリゴ糖画分においては殆ど阻害活性を認めなかった。図15-Aで若干認められる弱い結合活性はコア画分に

表16. ヒトモノクローナル抗体TS-3G2及び、血清型特異的マウスモノクローナル抗体

Mei-assay A, Mei-assay IIの緑膿菌本間血清型標準株への結合特異性

結合活性は菌体を固相抗原としたE L I S A法における405 nmの吸光度で表した。

Mei-assay A, IIは、緑膿菌群別用試薬Mei-assay中の抗体を用いた。

Strain	Serotype	Binding activity ( $A_{405}$ )		
		TS-3G2	Mei-assay A	Mei-assay H
IID 1001	A	0.80	0.51	0
IID 1002	B	0	0	0
IID 1007	B	0	0	0
IID 1013	B	0	0	0
IID 5004	B	0	0	0
IID 1021	C	0	0	0
IID 1004	D	0	0	0
IID 1130	E	0	0	0
IID 1006	F	0	0	0
IID 1008	G	0	0	0
IID 1020	G	0	0	0
IID 1009	H	0.62	0	0.82
IID 1010	I	0	0	0
IID 1011	J	0	0	0
IID 1012	K	0	0	0
IID 5141	L	0	0	0
IID 5018	M	0	0	0
IID 1015	M	0	0	0

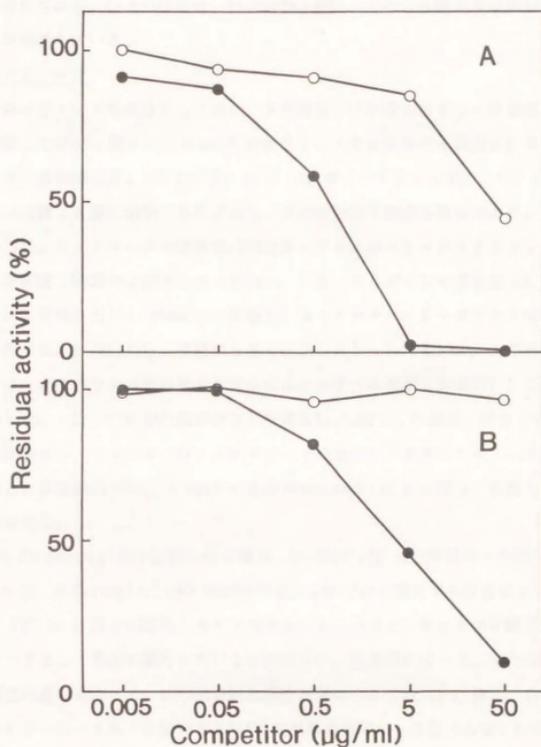


図15. ○-多糖画分(●)及びコアオリゴ糖画分(○)によるヒトモノクローナル抗体TS-3G2の緑膿菌菌体に対する結合の阻害

(A) IID 1001株(A型)由来の各々の画分をIID 1001株の菌体を固相抗原としたELISAの系に添加し、阻害活性を見たもの。縦軸はTS-3G2の残存活性(%)。(B) IID 1009株(H型)由来の各画分をIID 1009株菌体を固相抗原としたELISAの系に添加したもの。

semirough型のコア、即ちO-多糖鎖を1単位もしくは数単位持つものが混入しているためであると考えられる。以上の結果は、TS-3G2がA型、H型O-多糖の共通部分を認識していることを示唆している。

#### TS-3G2のエピトープ

TS-3G2のエピトープを決定するために、A型株及びH型株由来のO-多糖更にはそれらを化学修飾した標品に対するTS-3G2の結合性をELISAにおける競合反応で検討した。使用したO-多糖標品は、IID 1001株、NCTC 8505株（いずれもA型）、IID 1009株（H型）及びIID 1012株（K型）由来のものであり、すべての化学構造は既知であり、表18に示した[46-48, 71]。モノクローナル抗体TS-3G2はN-アセチル-L-ガラクトサミンuron酸残基を有する多糖と特異的に結合した（表18）。一方、カルボキシル基を還元し、L-ガラクトサミンに変換したIID 1009のO-多糖や、N-アセチル-D-ガラクトサミンuron酸残基を含有するIID 1012のO-多糖には全く結合しなかった（表17）。A型株のO-多糖については、カルボキシル基の還元が完全にはいかず（本章第2節参照）、この実験には供さなかった。一方、IID 1001由来のO-多糖をNaIO<sub>4</sub>酸化した標品、即ち（本章第2節表参照）6置換のN-アセチル-D-グルコサミン残基及び2置換のラムノース残基が酸化され消失した多糖標品では、TS-3G2との結合がnativeのIID 1001株O-多糖と同程度の強度で認められた。

更に、L-GalNAc(α1-3)D-QuiNAcの2糖は、TS-3G2のIID 1009株菌体への結合を有意に阻害した。一方、D-GalNAc(α1-3)D-QuiNAcでは5 μmol/mlの濃度でも阻害は全く認められなかった。（図16）。以上の結果、N-アセチル-L-ガラクトサミンuron酸残基がTS-3G2のエピトープとして重要に関与していると推定した。血清型によって、また同じ血清型でも化学構造の違いによって、TS-3G2の結合活性が異なった（表17）。特に、D-パシロサミン残基がジ-N-アセチル体であるNCTC 8505株由来のO-多糖（A型）に対する結合強度が最も高かった。

IID 1001株のO-アセチル基（O-多糖のN-アセチル-L-ガラクトサミンuron酸残基の3位の約80%及び、ラムノース残基の水酸基の約20%に置換）を脱離させた標品では、nativeの標品と比較して約10倍TS-3G2への結合活性が上昇した。一方、IID 1009株のO-多糖の場合、ラムノース残基の2位に結合しているO-アセチル基を脱離させると結合活性は1/10となった。

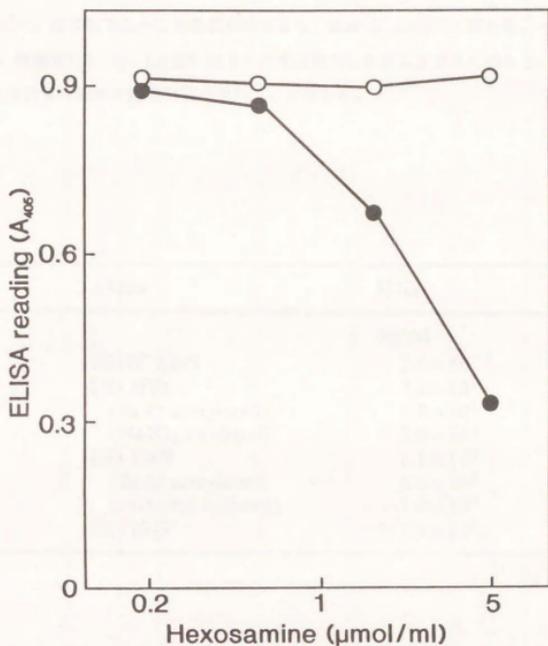


図16. ガラクトサミンヌロン酸含有オリゴ糖によるTS-3G2の緑膿菌IID 1009株に対する結合の阻害

L-GalNAcA(α1-3)D-QuiNAc (●), D-GalNAcA(α1-3)D-QuiNAc (○) はそれぞれIID 1009株 (H型), IID 1012 (K型) のO-多糖標品のHF分解物から精製した。オリゴ糖の量は、全アミノ糖の比色定量によって求めた。各オリゴ糖標品をIID 1009株菌体を固相抗原としたELISAの系に添加して阻害活性を求めた。

表17. 緑膿菌血清型A, H, K型株由来のO-多糖及び、その誘導体に対するTS-3G2の結合性

TS-3G2のO-多糖標品及びその誘導体に対する結合性をELISAによる競合反応によって検討した。各多糖標品の2倍希釈系列をとり、抗体(1  $\mu$ g/ml)と混和後、インキュベートする。緑膿菌IID 1001 (A型) 菌体を固相抗原としたELISAに供した。結合活性は、50%の結合阻害を認めた阻害物質の量(ID<sub>50</sub>)で表した。

Strain	ID <sub>50</sub>
	ng/ml
NCTC 8505	$2.6 \times 10^{-1}$
IID 1001	$7.2 \times 10^2$
(de-O-acetylated)	$6.8 \times 10^1$
(NaIO <sub>4</sub> oxidized)	$9.0 \times 10^2$
IID 1009	$1.1 \times 10^3$
(de-O-acetylated)	$6.8 \times 10^3$
(carboxyl reduced)	$> 1.0 \times 10^5$
IID 1012	$> 1.0 \times 10^5$



表19. ヒトモノクローナル抗体TS-3G2のマウス実験的緑膿菌感染症に対する治療効果  
 マウス腹腔に緑膿菌を感染させた1時間後に、TS-3G2を0.5  $\mu$ g投与した。1群10匹で、  
 コントロール群に対してはヘテロミエローマ SHM-D33の培養上清を投与した。6日後の生  
 残率を観察した。

Serotype	Strain	Challenged dose of bacteria	Survival rate after administration with	
			none	TS-3G2
		CFU/mouse	%	
A	sp 6818	$2.1 \times 10^4$	10	100
		$1.1 \times 10^5$	0	90
H	sp 6783	$9.5 \times 10^5$	10	100
	sp 6896	$3.5 \times 10^5$	50	100
	sp 7532	$1.8 \times 10^6$	10	80
		$1.1 \times 10^6$	30	80

### 緑膿菌感染治療効果

TS-3G2の感染治療効果を実験的マウス緑膿菌感染症（腹腔内感染系）を用いて検討した。マウスにA型もしくはH型臨床分離株を感染させ、1時間後にTS-3G2を腹腔内投与した。TS-3G2を0.5  $\mu$ g/head投与することにより有意にマウスの生存率を上昇させた。感染治療活性はA型に対する方が、H型に対するよりも強いと考えられる（表19）。

### 3-4-3. 考察

緑膿菌本間血清型AとH型に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体TS-3G2をヒト末梢血リンパ球とヒトマウスヘテロミエローマとの細胞融合によって得た。本抗体が、両血清型のO-抗原多糖の共通部分を認識していることを示した。A型に分類されるO-抗原多糖の化学構造は3-3節でIID 1001株由来の多糖について述べた。一方、異なる部分構造をもつNCTC 8505株のO-多糖の構造はKnirelらにより報告されている[71]。H型標準株のIID 1009株由来のO-多糖の化学構造も明らかにされており、血清学的に対応関係にある他の血清型分類の標準株のO-多糖と同一の糖配列を有していることが報告されている[48]。表18に主なA型、H型及びD体のガラクトサミンuron酸を含有するK型株（IID 1012）のO-抗原多糖[47]の構造を示す。A型、H型に共通な糖成分として、天然には他にその存在が報告されていないN-アセチル-L-ガラクトサミンuron酸を含有している。まず、TS-3G2のエピトープとしてN-アセチル-L-ガラクトサミンuron酸残基が関与していると予想した。

本実験では、TS-3G2のエピトープを決定するために、ガラクトサミンuron酸を含有するO-多糖標品、更にこれらO-多糖標品を化学修飾した誘導体に対するモノクローナル抗体の結合性を検討した。まず、TS-3G2が、L-GalNAc( $\alpha$ 1-3)D-QuiNAcの2糖に特異的に結合すること、IID 1009株のO-多糖のL-ガラクトサミンuron酸残基のカルボキシル基を還元することにより全く結合しなくなること、から、TS-3G2のエピトープとしてL-ガラクトサミンuron酸残基が必須であると推定した。更に、IID 1001株由来のO-多糖をNaIO<sub>4</sub>酸化によって、L-ラムノース残基とN-アセチル-D-グルコサミン残基を壊した多糖に対してTS-3G2は十分な結合活性をもつことから、これらの残基はエピトープにあまり関与していないと推定した。NCTC 8505とIID 1001の2種のA型O-多糖とH型O-多糖に対するTS-3G2の結合活性はかなり異なる（表17）。この違いはL-ガラクトサミンuron酸残基の還元端側に位置する6-デオキシヘキソサミン残基の違いによるものと考えられる。

6-デオキシヘキソサミン残基は、NCTC 8505, IID 1001, IID 1009株のO-多糖において、それぞれ、[-3Bac(NAc)2( $\beta$ 1-], [-3)Bac2NBtOH4Nac( $\beta$ 1-], [-3)QuiNac( $\alpha$ 1-]であり、この順番でTS-3G2のアフィニティーが高くなっている。O-血清型のサブグループの決定基として知られているO-アセチル基の有無も、TS-3G2のアフィニティーに影響している。即ち、IID 1001株のO-多糖では、L-ガラクトサミノ酸残基のC 3位の80%とL-ラムノース残基の20%に結合しているO-アセチル基をはずすことによりTS-3G2の結合強度が約10倍上昇した。一方、IID 1009株のO-多糖では、L-ラムノース残基のC 2位の70%に結合しているO-アセチル基をはずすと結合強度は約1/7に減少した。O-多糖鎖における部分的なO-アセチル基置換は、多糖の立体構造の不均一性の原因となっていることが、NMRスペクトルの結果から示唆されている[本章3-3節, 46]。この部分的O-アセチル基の置換によるO-多糖の繰返し構造における立体構造の不均一性が、おそらく抗原決定基の構造に影響を与えているものと考えられる。

ヒトモノクローナル抗体TS-3G2は実験的マウス緑膿菌感染症において、A, H型菌の両方に対して高い治療効果を認めた。A型菌に対する治療効果の方が、H型菌に対するよりも強い傾向が認められた。この結果は、*in vitro*でのTS-3G2の結合強度の違い、即ちO-多糖鎖へのアフィニティーの差を反映しているものと考えられる。

本章において筆者は、緑膿菌LPSのO-抗原多糖に存在するさまざまな珍しいアミノ糖成分のうち、4つ血清型(A, G, H, K型)に共通して存在するガラクトサミノロン酸に着目し、その詳細な化学構造を検討した。その結果、血清型によってD体とL体、N-アセチル基とN-ホルミル基、カルボキシル基へのアミド置換の存在、O-アセチル基の存在等、ひとつの糖成分をとってもさまざまなvariationのあることが示された。従って、共通糖成分の存在だけから、異なる血清型に交差反応するモノクローナル抗体の可能性を議論することは難しいと考えられる。その中で、1例ではあるが本章で述べたヒトモノクローナル抗体TS-3G2は、A, H型緑膿菌に交差反応し、そのエピトープとして両血清型のO-抗原多糖の共通成分であるN-アセチルL-ガラクトサミノロン酸残基が重要な関与していると推定した。更に、本抗体はA, H型株両方で高い感染治療効果を示した。以上の結果から、異なる血清型に属するO-抗原多糖の化学構造上の共通部位が感染防御抗原となりうる可能性が示された。

## 第4章 緑膿菌の微量リポ多糖成分D-ラムナンの構造

### 4-1. 序

近年、O-血清型別とは無関係に多くの緑膿菌菌株と交差反応性を示す多糖抗原が幾つか報告されており、その広い分布から、緑膿菌感染症に対する有望なワクチンとして期待される[40, 73-75]。1985年に沢田らは、約80%の緑膿菌臨床分離株と反応するマウスモノクローナル抗体E87を樹立したことを報告しており、免疫原として用いたIF0 3080株(血清型M)のリポ多糖標品より単離されたラムノースを主成分とする多糖が抗原であると推定している[73]。一方、著者は緑膿菌IID 1008株(本間血清型G標準株)のO-多糖鎖を選択的に断片化することにより、微量のラムノースが多糖画分に回収されることを見いだしている[本論文第2章, 45]。本章では、IID 1008株及びIF0 3080株由来のラムノース含有多糖の化学構造を検討し、その結果、多糖がD-ラムナンを主鎖に持つことを明らかにした。更にこのD-ラムナンがE87抗体の認識抗原であることを示した。またE87抗原の分布について、酵素学的な側面からも若干の検討を試みた[76]。

### 4-2. 材料と方法

#### ラムナンの調製

緑膿菌IID 1008株のLPS及びO-多糖の調製は第3章に示した。得られたO-多糖標品(400 mg)を40 mlの0.1 M NaOH/0.2 M NaBH<sub>4</sub>溶液で37°C, 24時間処理した。酢酸で中和した後、50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で平衡化したSephadex G-50ゲル濾過に供した。void付近に溶出されたラムノースに富む多糖画分をDEAE-Sephacelカラムクロマトグラフィーに供した。平衡化は5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH7.4)で、溶出は0から0.3 M NaClのグラディエントで行った。得られた多糖を、更に50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で平衡化したSephacryl S-200クロマトグラフィーで精製した。ラムナン標品の収量は12 mgであった。

緑膿菌IF0 3080株のラムノース含有多糖標品[72]は、河村隆博士(帝人・生医研)より分与を受けた。

#### リポDに結合したラムナンの調製

IID 1008株由来リポ多糖標品(780 mg)を75 000xg, 4°C, 3時間遠心する[77]。得られた沈殿(175 mg)を50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, 0.3% デオキシコール酸ナトリウム, 0.02% Na<sub>2</sub>Sからなるバッファーに溶解し、同じバッファーで平衡化したSephacryl S-300カラム

(1.5 x 100 cm)に供した[78]。低分子量の画分をプールし、最終濃度が0.5 MとなるようにNaClを添加して、10倍量のエタノールで沈殿させる。沈殿を水に溶解後、水に対して透析、凍結乾燥してラフ型リポ多糖画分とした(110 mg)。このラフ型リポ多糖画分を、10 mlの0.1 M NaOH/0.2 M NaBH<sub>4</sub>溶液で37°C、24時間処理する。酢酸で中和後、水に対して透析する。透析内液を50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で平衡化したSephacryl S-200カラムクロマトグラフィーに供して、脱O-アセチル化リポ多糖Aに結合したラムナン標品を得た(3.3 mg)。

#### スミス分解

ラムナン標品(4 mg)を0.5 mlの0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)に溶解した0.1M NaIO<sub>4</sub>で、4°C、暗所で3日間処理する。反応後、過剰のNaIO<sub>4</sub>をエチレングリコールで壊した後、生成物を1M NaBH<sub>4</sub>で還元し、透析する。得られたNaIO<sub>4</sub>酸化多糖を0.5 M HCl, 20°C、3日間加水分解する[79]。反応混液を蒸発乾固させた後、酸加水分解によって生じたグリコシルグリセルアルデヒドをNaBH<sub>4</sub>で還元する。スミス分解生成物をCellulofine GCL-25mゲルクロマトグラフィーで分画、精製した。

#### メチル化分析

メチル化は、CiucanuとKerekの方法[66]に従った。ラムナン標品(2 mg)を0.1 ml CH<sub>3</sub>I, 20 mgの粉末状にしたNaOH, 0.5 mlのジメチルスルフォキシド中で激しく攪拌しながら25°C、10分間反応させる。過メチル化したラムナンを90% 甲酸で100°C、16時間加水分解し、得られた部分メチル化糖をアルジトールアセテートとしてGLC/MSで分析した。GLCは、1% OV-17カラムを用いて160°Cで行った。

#### GDP-マンノースを基質としたGDP-ラムノース合成酵素活性の測定

緑膿菌菌体を0°C、10 kHzで音波破砕機によって壊した。得られたホモジェネートを20 000 x g、40分間遠心し、その上清を更に100 000 x g、90分間遠心した。得られた上清を粗酵素標品とした。GDP-マンノースからGDP-ラムノースへの変換は、以下のよう  
にアッセイした。反応混液(30 μl)は、粗酵素標品(20-100 μg蛋白)、0.1 mM GDP-[<sup>14</sup>C]-D-mannose (5 000 cpm/nmol: Amersham Corp.; Sigma Chemical Co.)、3 mM NADPH、50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.8)からなる。37°C、30分インキュベート後、0.02 M HClを添加、100°C、15分加熱して反応を停止した。NaOHで中和後、Dowex 50(H<sup>+</sup>型)及びDowex 1(acetate型)を詰めた小カラムに通して脱塩した。得られた中性糖画分を1-ブタノール/ピリジン/水(6:4:3, vol/vol/vol)の溶媒系を用いた濾紙クロマトグラフィーに供した。標準物質としてのせたラムノースの位置に相当する部分を切り出し、液体シンチレーション

ンカウンターにて放射活性を測定した。標準条件における1分間あたり1 nmolのGDP-ラムノースの生成を1酵素単位とした[76]。

#### その他

ELISAの方法は第2章に、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、旋光度の測定、中性糖およびアミノ糖の定量、その他のクロマトグラフィーの方法は第3章に示した。りん酸の定量は、Lowryらの方法[80]、KDOの定量は、WeissbachとHurwitzの方法[81]に従った。メチルラムノシドは、1% HCl含有メタノール中で100°C、4時間処理して調製した（この標品は90%の $\alpha$ アノマーを含んでいる）[40]。Octyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia)カラムクロマトグラフィーは、Fischerらの方法[82]に従った。

### 4-3. 結果

#### ラムナンの単離と化学組成

11D 1008株由来のO-多糖をアルカリ分解後、Sephadex G-50カラムクロマトグラフィーに供すると、図17に示すようにコアオリゴ糖(fraction II)と4,5-不飽和ウロン酸残基を非還元端に有するO-多糖断片(fraction III)に加えてラムノースに富む多糖(fraction I)が得られる。この画分をDEAE-Sephacel及びSephacryl S-200カラムクロマトグラフィーにより精製し、ラムナン標品とした。ラムナンは、DEAE-Sephacelで約90 mM NaClの濃度で溶出し(図18-A)、Sephacryl S-200カラムでは分子量約12 000の単一のピークを示した(図18-B)。

ラムナン標品は、ラムノース、未知の中性糖(compound X)、キシロース、グルコース、ガラクトサミン、アラニン、りん酸をそれぞれ2 654、275、85、172、40、42、165 nmol/mg乾燥重量含有していた。compound Xは、ガスクロマトグラフィーによって、トリメチルシリル誘導体では、trimethylsilyl- $\alpha$ -rhamnoseに対する相対保持時間が0.84、0.88及び0.95(minor peak)として、アルジトールアセテートではper O-acetylramninitolに対する相対保持時間が0.78として検出された。更に、ラムナン標品中にはLPSのコアの特徴的な成分であるガラクトサミン、グルコース、アラニン及びりん酸[14]を含有している。この結果は、ラムナン標品はラムナン鎖とLPSに由来するコア部位とから成ることを示唆している。ラムナン標品のイオン交換クロマトグラフィー上での陰イオンの性質(図18-B)はりん酸基によるものと考えられる。

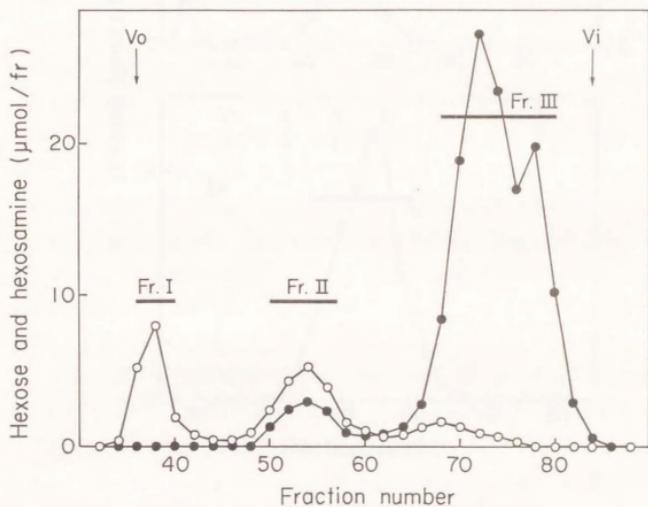


図17. O-多糖標品のアルカリ分解生成物のSephadex G-50カラムクロマトグラフィーによる単離

O-多糖標品を0.1M NaOH/0.2M NaBH<sub>4</sub>で37°C, 24時間処理する。中和後、生成物を50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で平衡化したSephadex G-50カラム(2.6x100 cm)クロマトグラフィーに供した。各フラクション(5 ml)の中性糖(○)及びアミノ糖(●)含量を定量した。横棒で示したフラクションをブールした。

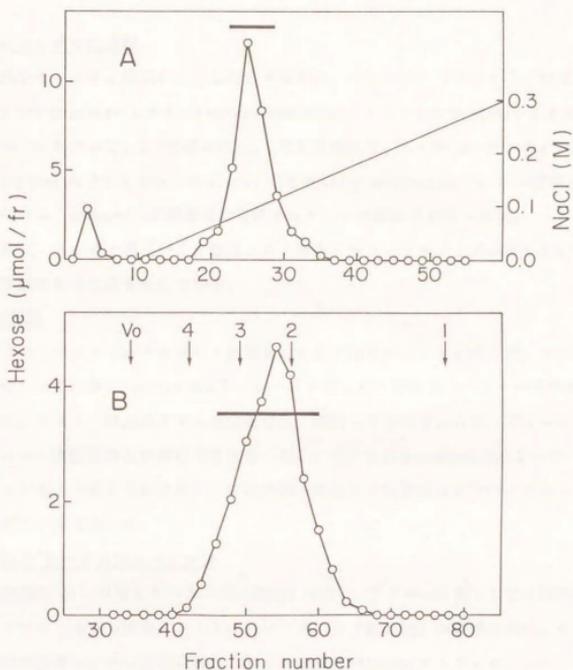


図18. ラムナン標品のDEAE-Sephacel及びSephacryl S-200カラムクロマトグラフィー

(A) O-多糖標品のアルカリ分解によって得られたラムノースに富む多糖(図17, Fr. I)を5 mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH7.2)で平衡化したDEAE-Sephacelカラム(1 x 2.5 cm)に供した。まず先の緩衝液、更にNaClのlinear gradientで溶出した。各2 mlのフラクションを集め、中性糖含量を定量した。プールしたフラクションを横棒で示した。

(B) DEAE-Sephacelクロマトグラフィーによって得られた画分を更にSephacryl S-200カラム(1.5 x 100 cm)ゲル濾過に供した。カラムは、50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ で平衡化した。各フラクション(2.5 ml)を集め、中性糖含量を定量した。矢印1, 2, 3, 4は、各々グルコース及びデキストランT-10, T-20, T-40の溶出位置を示す。横棒で示したフラクションをプールし、ラムナン標品とした。

### ラムナン標品のメチル化分析

過メチル化したラムナン標品から得られたアルジトールアセテートのGLC/MS分析では、1,2,5-tri-O-acetyl-3,4-di-O-methylrhaminitolと1,3,5-tri-O-acetyl-2,4-di-O-methylrhaminitolがモル比1:2.2で得られた。それに加えて、1,3,5-tri-O-acetyl-2,4-di-O-methylxylositolと1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitolが少量検出された。しかしながら、compound Xの誘導体に対応するピークは認められなかった。

以上の結果は、ラムナン標品がC2置換とC3置換のラムノピラノシドがモル比1:2からなる直鎖の多糖をもつことを示している。

### compound Xの同定

compound Xのアルジトールアセテート誘導体GLC/MSによって分析した。その結果を図19に示す。その結果、compound Xは3-O-メチル-6-デオキシヘキソースであることが示された。ラムナン標品のメチル化分析では、部分メチル化された6-デオキシヘキソースはラムノース誘導体しか検出できなかった。このことからcompound Xは3-O-メチルラムノースであると考えられるが、この化合物の純品が十分量得られないことから、これ以上の特定はできなかった。

### ラムナン標品の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

ラムナン標品の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(図20)では、アノマー水素として3本のsinglet様のシグナル(各1Hの強度)と1本の弱いシグナル(約0.3H)が観察された。これらアノマー水素の非常に小さい結合定数はこれらの糖残基がmannnoコンフィギュレーションであることを示唆している。これらのシグナルは全て4.9 ppmより低磁場に存在することから、<sup>4</sup>C<sub>1</sub>コンフォメーションの $\alpha$ -結合であると考えられる[83,84]。4.96 ppmと5.04 ppmのシグナルは-3)Rha( $\alpha$ 1-の、5.20 ppmは-2)Rha( $\alpha$ 1-のアノマー水素と帰属した[79,83-85]。1.27, 1.30及び1.31 ppm(各3H, doublet,  $J_{s,s'} = 6.35$  Hz)のシグナルはラムノース残基の3個のメチル基に帰属した。5.13(0.3H)及び3.45 ppm(約1H)のマイナーなシグナルは3-O-メチル-6-デオキシヘキソース残基のアノマーとメチルエーテル基にそれぞれ帰属した。

### ラムノースの絶対配置

ラムナン標品の酸加水分解物から単離、精製したラムノースは、メチルラムノシドの変換[40]後の旋光度のデータからD-体であると決定した。ラムナン標品由来のメチルラムノシド,  $[\alpha]_D +47.8^\circ$ , cf. メチル-L-ラムノシド( $\alpha$ -アノマーを90%含有),

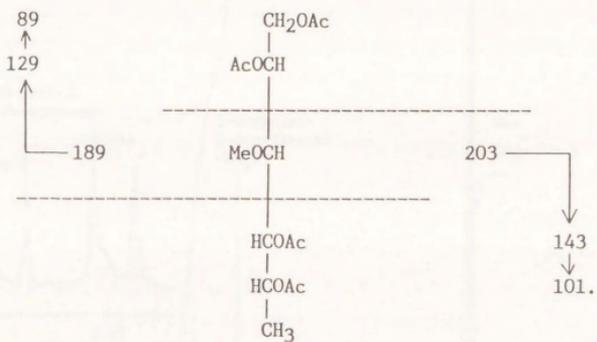


図19. Compound Xのマススペクトルにおけるフラグメンテーション・パターン

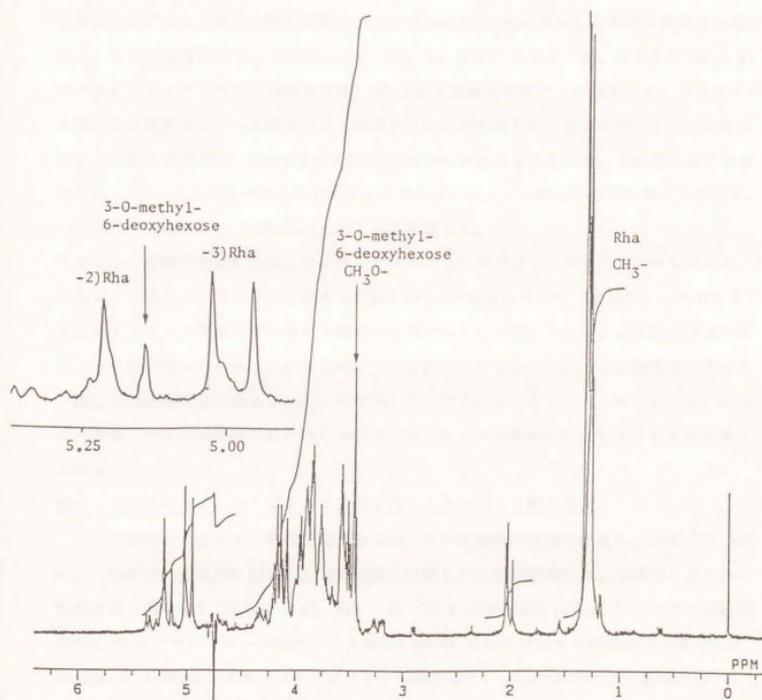


図20. IID 1008株由来のラムナン標品の500 MHz  $^1\text{H}$ -NMRスペクトル

$[\alpha]_D -47.1^\circ$ 。

ラムナン標品の旋光度,  $+75.0^\circ$ , は $\alpha$ -D-ラムナンの計算値,  $+81.9^\circ$  [83,86], とよい一致をみた。

#### ラムナン標品のスミス分解

ラムナン鎖の繰返し配列を決定するためにラムナン標品のスミス分解を行った。材料と方法の項に示した通り分解生成物をCellulofine GCL-25mカラムによるゲル濾過で分画すると、2つの中性糖のピークが得られる(図21)。表20に示すように、主要断片(peak 2)はラムノースとグリセロールがモル比2:1からなる非還元性のオリゴ糖である。グリセロールは、C2置換ラムノース残基のC1からC3に由来するものであると考えられる。従って、この断片の構造は、Rha(1-3)Rha(1-2)glycerolであると決定した。この結果とメチル化分析,  $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果とを合わせ、ラムナン鎖の繰返し単位の構造を、 $-3)\text{Rha}(\alpha 1-3)\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Rha}(\alpha 1-$ であると推定した。

マイナーな断片(peak 1)は、3-O-メチル-6-デオキシヘキソース、キシロース、ラムノース及びエリスリトールをモル比約7:2:1:1で含有していた(表20)。エリスリトールはおそらくC4置換のグルコース残基に由来するものと考えられる。この断片については、十分量が得られなかったのでこれ以上の検討は行わなかったが、この結果よりラムナン標品中の微量成分である3-O-メチル-6-デオキシヘキソース、キシロース、グルコースは、ラムナン主鎖の繰返し単位とは独立にオリゴ糖鎖を形成しているものと考えられる。

#### 脱O-アセチル化されたリポドAに結合したラムナン鎖の単離と分析

LPS標品からラムナン鎖を単離するため、LPS標品の分画を試みた。まず、75 000 x g, 3時間もしくは100 000 x g, 6時間遠心分離した。沈澱画分には、出発のLPSから乾燥重量で各々24% (75 000 x g), 48% (100 000 x g)が回収された。それぞれの沈澱画分を0.3%のデオキシコール酸ナトリウムと1 mMのEDTAを含有する緩衝液で平衡化したSephacryl S-300カラムクロマトグラフィーに供すると、smooth型のリポ多糖画分(Fr. I)とrough型のリポ多糖画分(Fr. II)が得られた(図22)。75 000 x gの沈澱画分をゲル濾過して得られたrough型リポ多糖画分(図22-B, Fr. II)には、リポドAの基本成分であるグルコサミンが460 nmol/mg乾燥重量含まれているのに対して、出発物質のLPS標品には175 nmol/mgであった。以上の結果は、rough型LPSが75 000 x gの遠心によって優先的に沈澱として回収されることを示している。更には、ラムナン標品の特徴的な成

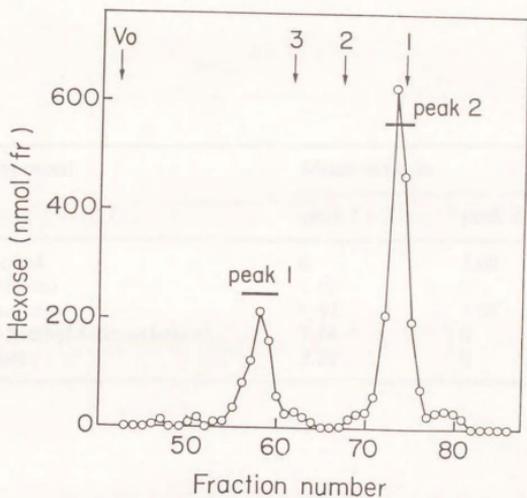


図 2 1. ラムナン標品のスミス分解生成物のゲル濾過による分離

ラムナン標品(4 mg)のスミス分解生成物を50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ で平衡化したCellulofine GCL-25mカラム(1x100 cm)に供した。各1 mlのフラクションを集め、中性糖含量を測定した。矢印1, 2, 3はそれぞれ $\alpha$ 1-4結合グルコースの二糖, 四糖, 六糖の溶出位置である。

表20. ラムナン標品のスミス分解生成物の分析

スミス分解生成物は、図21に示すようにCellulofine GCL-25mゲル濾過によってpeak 1及び、peak 2を得た。これらを酸加水分解後、ガスクロマトグラフィーによって分析した。データはpeak 1はエリスリトールを、peak 2はグリセロールを1.00とした。

Component	Molar ratio in	
	peak 1	peak 2
Glycerol	0	1.00
Erythritol	1.00	0
Rhamnose	0.97	1.98
3-O-Methyl-6-deoxyhexose	7.14	0
Xylose	2.24	0

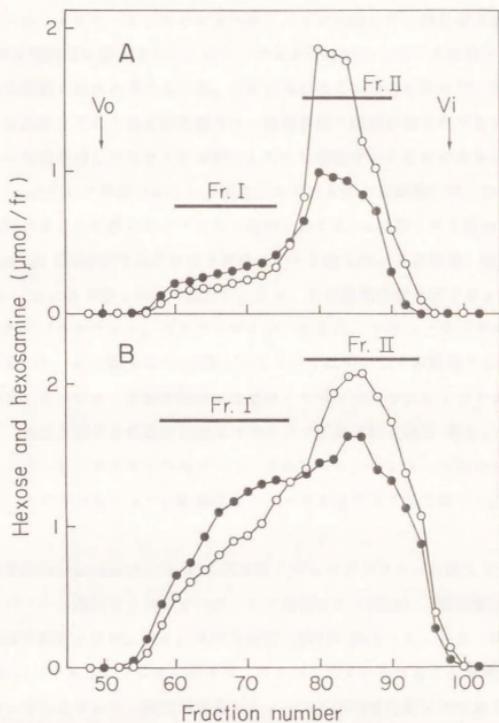


図22. LPS標品の75 000xg (A), 100 000xg (B) 超遠心、及びSephacryl S-300クロマトグラフィーによる分画

リポ多糖標品を4℃で、75 000xg, 3時間もしくは100 000xg, 6時間遠心する。得られた沈澱を50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3% デオキシコール酸ナトリウム, 1 mM EDTA及び0.02% NaN<sub>3</sub>を含有する緩衝液で平衡化したSephacryl S-300カラム(1x100 cm)に供した。2 mlずつフラクションを集め、中性糖(○)及び(●)アミノ糖含量を定量した。横棒で示したフラクションをプールした。

分である3-O-メチル-6-デオキシヘキソースが出発LPS標品中の量の72%がこのrough型リポ多糖画分に回収された。即ち、ラムナンの結合したリポ多糖がこのrough型リポ多糖画分に濃縮されたと考えられる。しかしながらこの画分にはまだ、短いO-多糖鎖をもつLPS由来と考えられる相当量のO-抗原多糖の成分が含まれており、更にクロマトグラフィーを繰り返してもラムナン結合LPSを精製することはできなかった。

そこで、rough型LPS画分をO-多糖標品からラムナンを単離したときと同様の条件でアルカリ処理することを試みた。アルカリ処理を施したrough型LPS画分を透析後、透析内液をSephacryl S-200カラムクロマトグラフィーに供した。その結果、分子量約18 000と4 500のFr. AとBが得られた(図23)。Fr. Bは典型的なリビドAとコアオリゴ糖の構成成分であるグルコサミン、ガラクトサミン、KDO、アラニン及びグルコースを含有しており(表21)、この画分はrough型LPSもしくは短いO-多糖鎖をもったsmooth型LPSに由来したコアオリゴ糖が結合した脱O-アセチル化されたリビドAであると推定した。Fr. AはリビドAの成分に加えてラムナン標品と同じ成分 即ち、ラムノース、3-O-メチル-6-デオキシヘキソース、グルコース、キシロース及びコアの成分を含有していた。この画分をラムナン結合脱O-アセチル化リビドAと推定し以下の実験を行った。

この画分をOctyl-Sepharose CL-4Bの疎水性クロマトグラフィーに供したところラムナンは40%プロパノール濃度で1本のピークとして溶出され(図24)、脂肪酸が共有結合していることが示された。また、Fr. Aの分析値(表21)からラムノースとグルコサミンのモル比は約140:1であり、リビドAがグルコサミン2分子からなることを考慮すると、リビドAに結合しているラムナン鎖におけるラムノースの平均重合度は70であると考えられ、ラムナン標品のゲル濾過上での分子量12 000(図18-B)とよい一致をみた。更に、Fr. Aを1%酢酸、100°C、90分間加水分解し、生成物をSephacryl S-200カラムに供したところ、ラムナン標品と同様の分子量(約12 000)と化学組成をもつ多糖鎖として回収された。以上の結果は、ラムナン鎖が通常のLPSと同様コアオリゴ糖を介してリビドAと共有結合していることを示唆している。更にその結合様式は、酸に不安定なグリコシド結合、おそらくはKDO残基を介しているものと考えられる。

#### IFO 3080株由来のラムノース含有多糖との構造比較

Sawadaらの報告[72]では、約80%の緑膿菌に存在する共通抗原を認識するマウスモノクローナル抗体E87を緑膿菌 IFO 3080株を免疫原として作製している。更に彼らは、IFO 3080

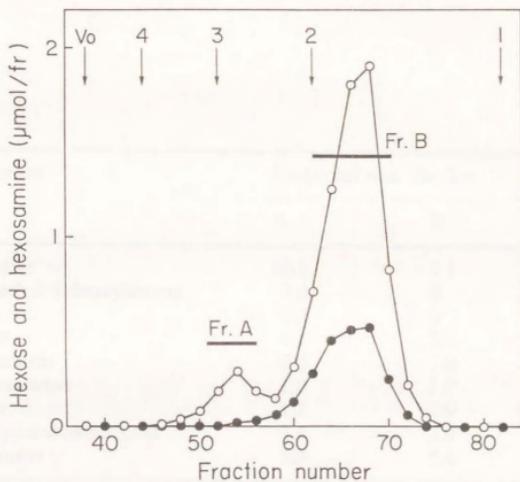


図23. rough型LPS画分のアルカリ処理生成物のSephacryl S-200カラムクロマトグラフィー

rough型LPS画分を0.1 M NaOH/0.2 M NaBH<sub>4</sub>で37°C, 24時間処理後、透析した。得られた透析内液を50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で平衡化したSephacryl S-200カラム(1.5x100 cm)に供した。2.5 mlずつフラクションを集め、中性糖(○)及びアミノ糖(●)を定量した。横棒で示したフラクションをプールした。Fr. Aをリクロマトグラフィーで精製し、(脱O-アセチル化した)リビドA結合ラムナン標品とした。矢印記号は、図18(B)に準ずる。

表21. rough型LPS画分のアルカリ処理により得られた脱O-アシル化LPSの分析  
 図23で得られたFr. A, Fr. Bをリクロマトグラフィーによって精製し、酸加水分解  
 後組成分析を行った。データはガラクトサミンを1.00としたモル比で表してある。グルコ  
 サミンの値は、アミノ酸分析機上のグルコサミンとグルコサミンりん酸の和である。

Component	Molar ratio in fraction	
	A	B
Rhamnose	68.7	1.1
3-O-Methyl-6-deoxyhexose	7.4	0
Xylose	2.2	0
Glucose	4.6	3.3
Glucosamine	2.0	2.0
Galactosamine	1.0	1.0
Alanine	1.2	0.9
3-Deoxyoctulosonic acid	2.4	2.9
Phosphorus	5.0	5.4

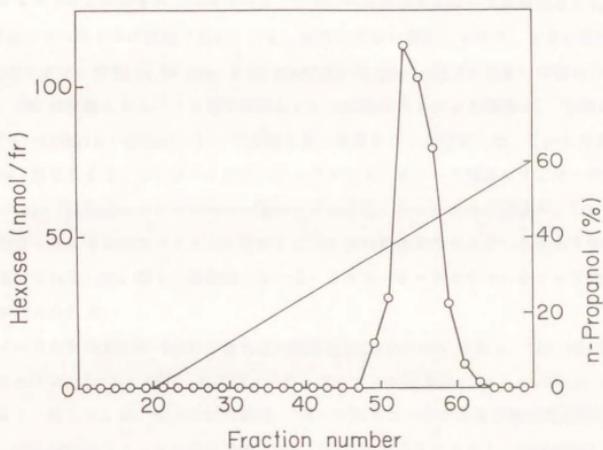


図24. (脱O-アセチル化)リポドA結合ラムナンのOctyl-Sepharose CL-4Bカラムクロマトグラフィ

(脱O-アセチル化した)リポドA結合ラムナン標品(図Fr. A)を0.5 M NaCl含有0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)で平衡化したOctyl-Sepharose CL-4B(0.8x2 cm)に供した。カラムを先の緩衝液で洗浄(10 ml)後、0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)(10 ml)更に、0から60%(v/v)のn-プロパノールのlinear gradientで溶出した。フラクション(1 ml)を集め、中性糖を分析した。

株からラムノースを主成分とする多糖を得ており、該多糖がE87抗体の認識抗原であると推定している。

そこで、IFO 3080株由来のラムノースを主成分とする多糖とIID 1008株由来のD-ラムナンの構造の比較を行った。IFO 3080株のラムノース含有多糖をガスクロマトグラフィーで分析するとIID 1008株のラムナンと同様に主成分はラムノースで、更に微量成分として3-O-メチル-6-デオキシヘキソース、グルコース及びキシロースが検出された。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの比較(図25)でも、両者は非常に類似しており、3本の見かけ上singletのアノマー水素(4.96 ppm, 5.02 ppm及び5.20 ppm; 各1Hの強度)が認められる。従って、IFO 3080株のラムノース含有多糖もIID 1008株のラムナンと同様に、主鎖は、-3)Rha( $\alpha$ 1-3)Rha( $\alpha$ 1-2)Rha( $\alpha$ 1-, なる繰り返し単位をもつと推定した。しかしながら、5.13 ppm(おそらくは、3-O-メチル-6-デオキシヘキソース残基のアノマー水素)及び3.45 ppm(同残基のメチルエーテル基のメチル水素)のシグナルの強度が、IID 1008株由来のD-ラムナンのスペクトルに比較してIFO 3080株由来のラムノース含有多糖の方が弱く観察されている。即ち、両標品で3-O-メチル-6-デオキシヘキソースの含量に違いが認められる。

ラムノース含有多糖(IFO 3080)の旋光度の測定値は $[\alpha]_D^{20} = +84^\circ$ であり、IID 1008株由来のD-ラムナン、 $[\alpha]_D^{20} = +75^\circ$ 、および $\alpha$ -D-ラムナンの計算値、 $[\alpha]_D^{20} = +82^\circ [83, 86]$ に非常によく一致している。以上の化学組成、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及び旋光度の測定の結果から、IFO 3080のラムノース含有多糖とIID 1008株由来のD-ラムナンはほぼ同じものであると結論した。

#### ラムナン鎖のマウスモノクローナル抗体E87に対する結合性

IFO 3080株由来のD-ラムノース含有多糖とIID 1008株のD-ラムナンの免疫学的な相同性を確かめるために、ELISAによる競合反応を用いてE87抗体に対する結合性を検討した。E87抗体の結合する緑膿菌PA01株を固相抗原としたELISAの系に、IFO 3080株、IID 1008株由来のラムナン及びL-ラムノースの単糖を競合物質として添加した。その結果(図26)、IID 1008株由来のD-ラムナンは、IFO 3080株のラムノース含有多糖とほぼ同程度にE87抗体のPA01菌体への結合を阻害した。また、L-ラムノースの単糖では全く阻害を認めなかった。以上の結果、どちらの多糖ともE87抗体に特異的に結合し、免疫学的な違いは認められなかった。

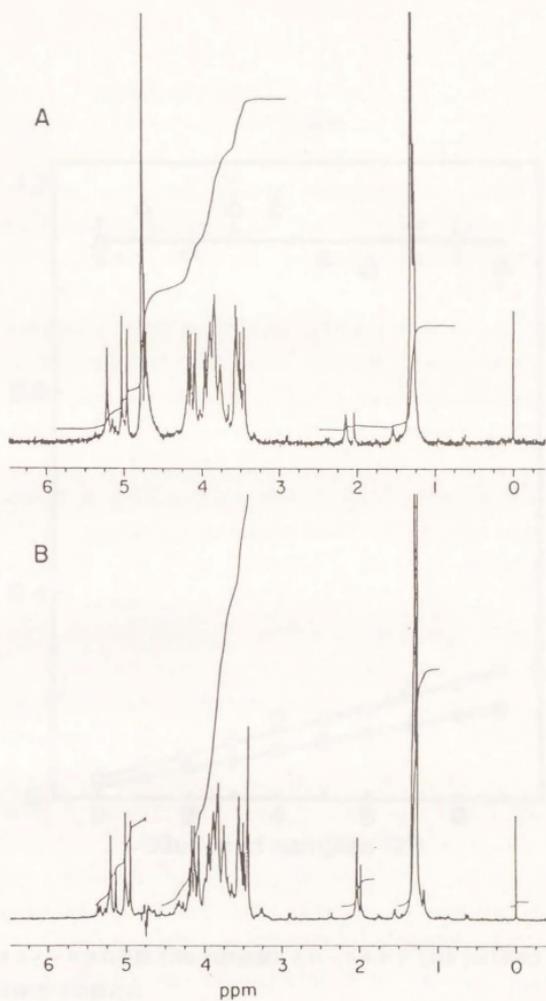


図25. IF0 3080由来ラムノース含有多糖とIID 1008由来D-ラムナンの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの比較

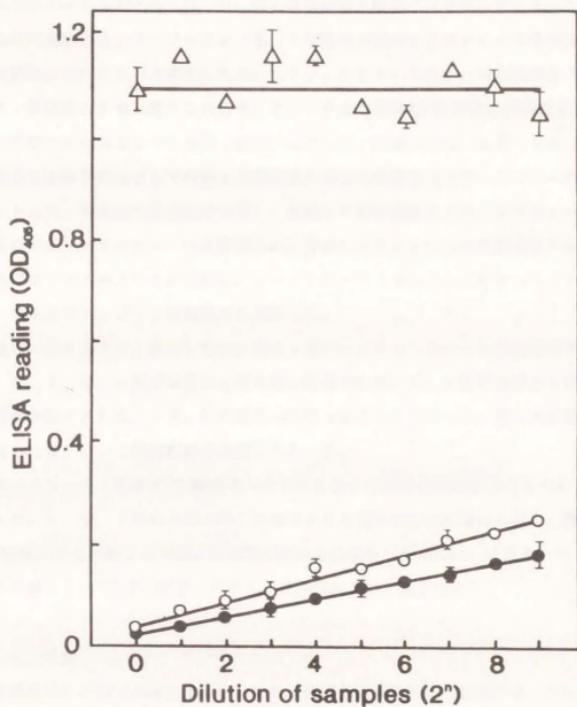


図26. ラムノース含有多糖 (IFO 3080由来) とD-ラムナン (IID 1008由来) のモノクローナル抗体E87との結合性

緑膿菌PA01菌体を固相抗原としたELISAの系に競合物質としてラムノース含有多糖 (●) (ラムノース量として0.1 mM), D-ラムナン (○) (0.1 mM) 及びL-ラムノース (10 mM) それぞれを2倍希釈系列にて添加して、阻害活性をみた。

#### GDP-ラムノース合成酵素活性の分布とE87抗原の存在

IID 1008株のホモジェネートの100 000 x g上清画分にGDP-D-マンノースからGDP-ラムノース（おそらくは、D-体）を生成する酵素活性を見いだした。このラムノース合成酵素活性は、D-ラムナン（もしくは他の未知のD-ラムノース含有多糖）の生成に関与しているものと考えられる。そこで、GDP-ラムノース合成酵素活性とD-ラムナンを抗原とすると考えられるモノクローナル抗体E87の結合性の相関性を検討した。本間血清型AからMまでの13株（表23）について、菌体のホモジェネートの100 000 x g上清画分を粗酵素標品として材料と方法の項に示した条件でGDP-マンノースとインキュベートした。生成物を弱酸加水分解し、遊離した糖を濾紙クロマトグラフィーで分離した。基質のマンノースとラムノースが得られ、生成したラムノースの放射活性を測定した。この系ではラムノースのみが生成し、タロメチロース（ラムノースの4-エピマー）や他の6-デオキシヘキソースは検出されなかった。

表22に示すように、検討した13株中9株にGDP-ラムノース合成活性が認められた。D、G、I、K、L及びM型の6株で強い酵素活性が、A、F及びH型の3株では弱い酵素活性が検出された。一方、他の株では活性は認められなかった。各々の反応で得られた生成した糖について絶対配置は検討しなかった。

モノクローナル抗体E87の結合スペクトルを各々の菌体を固相抗原としたELISAで検討した。C、E、J型の3株を除く9株でE87抗体の結合が認められた。酵素活性とE87抗体の結合の強さとの間には相関が認められなかったものの、GDP-ラムノース合成酵素の分布とE87抗体の結合スペクトルは非常に一致を認めた。

#### 4-4. 考察

緑膿菌IID 1008（本間血清型G）のO-抗原多糖を選択的に分解することによって得られたD-ラムナン標品は以下の3個のユニットから成ると考えられる。約70残基のD-ラムノースから成るラムナン鎖、通常のLPSと同様のコアオリゴ糖、更に7残基の3-O-メチル-6-デオキシヘキソース、2残基のキシロース、1残基のラムノース、1残基のグルコースから成るオリゴ糖である。しかしながら、D-ラムナン鎖は、通常のO-抗原多糖と同様にコアオリゴ糖に共有結合していると考えられるが、3-O-メチル-6-デオキシヘキソースを含有するオリゴ糖部位を含めてそれら相互の結合様式は明らかではない。LPS標品中のラムナン鎖の結合したLPSは、主要成分である長いO-多糖鎖を

表 2 2. 緑膿菌各種血清型株におけるGDP-rhamnose合成酵素活性の分布とマウスモノクローナル抗体E87に対する結合活性の比較

酵素活性は1分間あたりのGDP-rhamnose 1 nmolの生成を1 unitとした。表中の数値はmg蛋白あたりのmilliunitで表してある。抗体の結合活性は緑膿菌菌体を固相抗原としたELISA法における405 nmの吸光度で表した。 n.d.: not detected

<u>P. aeruginosa</u>	Sero- type	Enzyme activity	Binding
IID 1001 (ATCC 27577)	A	26	0.3
IID 1002 (ATCC 27588)	B	nd	0.1
IID 1003 (ATCC 27579)	C	nd	0
IID 1004 (ATCC 27580)	D	110	0.8
IID 1005 (ATCC 27581)	E	nd	0
IID 1006 (ATCC 27582)	F	20	0.4
IID 1008 (ATCC 27584)	G	410	0.3
IID 1009 (ATCC 27585)	H	25	0.5
IID 1010 (ATCC 27586)	I	610	0.5
IID 1011 (ATCC 27587)	J	nd	0
IID 1012 (ATCC 27588)	K	210	0.4
IID 1014 (ATCC 27590)	L	540	0.1
IPO 3080	M	380	1.5

もつsmooth型LPSから75 000xgの超速心とデオキシコール酸含有緩衝液を用いたゲル濾過によって分離することができた(図22)。この結果は、主要成分であるO-多糖鎖とD-ラムナン鎖が同一のLPS分子に結合しているものではないことを示唆している。

1985年、Sawadaらは緑膿菌IFO 3080の菌体を免疫原として、多くの緑膿菌臨床分離株(約80%)と交差反応するマウスモノクローナル抗体E87を得ている[72]。この報文でE87抗体の認識抗原はラムノースを主成分として含有する多糖であると報告している。今回、緑膿菌共通抗原と予想されるIFO 3080株から得られたラムノース含有多糖についても化学構造の検討を行った結果、IID 1008と同じD-ラムナン鎖: -3)D-Rha( $\alpha$ 1-3)D-Rha( $\alpha$ 1-2)D-Rha( $\alpha$ 1-を主鎖とする多糖であることが明らかとなった。3-O-メチル-6-デオキシヘキソース等の微量成分の含量はIFO 3080由来の標品の方が少ないという違いは認められたが、いずれの株由来のD-ラムナンも同程度の強さでE87抗体に結合性を示し、D-ラムナン鎖が緑膿菌共通抗原と考えられるE87抗原の本体であると推定した。

L-ラムノースは緑膿菌に広く認められる糖成分として、本間血清型別A, F, G, H, K型のO-抗原多糖[22]、LPSコア部位の共通した構成成分[14]、菌体外に見いだされた緑膿菌共通抗原と考えられる多糖[74, 75]、低分子量の糖脂質(ラムノリピド等)[87]に見いだされている。一方、D-ラムノースは、現在までにいくつかの植物病原細菌、*Xanthomonas campestris* [88], *Pseudomonas cerasi* [79], *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* [83], *Pseudomonas cerasi* [89], 土壌細菌GS株[90]でしか見いだされていない珍しい糖である。本研究は緑膿菌の多糖成分としてD-ラムノースが見いだされたはじめての例である。そこで、D-ラムノースの緑膿菌での分布を酵素学的に検討した。D-ラムノースの生合成研究は、土壌細菌GS株(ATCC 19241)で報告されているのみである[90, 91]。この菌株においてはGDP-D-ラムノースとGDP-D-タロメチロース(ラムノースの4エピマー)がGDP-D-マンノースからGDP-4-ケト-D-ラムノースを経由して立体化学非選択的なketoreductaseによって生成することが示されている。今回、緑膿菌の可溶性画分にGDP-D-マンノースからGDP-ラムノース(おそらくはD-体)を誘導する酵素活性を見いだした。このGDP-ラムノース合成系では、GDP-タロメチロースは生成せず、立体選択的な変換が起こっているものと推定される。生成したGDP-ラムノースの絶対配置を含めこれ以上の合成酵素に関する検討は行わなかった。しかしながら、GDP-ラムノース合成酵素活性の分布とE87抗体の結合性には非常に相関が認められ、D-ラムナンが緑膿菌共通多糖抗原として広く分布していること

が示唆された。

近年、緑膿菌に広く分布する多糖抗原がいくつか報告されている。Sawada等の報告しているE87抗体の認識抗原であるラムノースに富む多糖[72]、Kocharovaらの報告しているL-ラムノース、D-リボース、D-グルコースがモル比2:1:1から成る多糖[75]及びD-マンノース、D-グルコース、L-ラムノースがモル比3:1:1から成る多糖[74]、更にはムコイドの本体であるアルギン酸[92, 93]等が挙げられる。

本論文においては、Sawadaらの報告しているE87抗原の実体がD-ラムナンであると推定した。D-ラムナンはO-抗原多糖の結合して入るLPS分子と同様にコア部位を介してリピドAに共有結合していることが示唆された。しかしながらD-ラムナンの含量は非常に低い(11D 1008株ではO-抗原多糖の約3%)のために、LPSもしくはO-多糖標品のどちらの状態でも単離精製することは困難である。O-多糖をもたないと考えられるIFO 3080株や、O-多糖を選択的に分解できる一部の血清型株[40, 72, 94]で単離されてきているのみである。本論文では、E87抗体の結合性ととも、D-ラムノース合成酵素活性の分布からD-ラムナンがE87抗原の本体であり緑膿菌共通多糖抗原であることを示した。

最近、McGroartyとその共同研究者[77, 95, 96]は緑膿菌LPS中のO-抗原とは免疫学的に異なるポピュレーション(A-band LPS)を単離し、このA-band LPSとE87抗体が反応し、170株の緑膿菌菌株に広く存在することを報告した。A-band LPSの多糖部分の化学構造に関する知見はないが、化学分解することなしにO-抗原多糖の結合したLPS(B-band LPS)と分離した点で注目される。この知見は、E87抗体の認識抗原に関する研究に大きな助けを与えると考える。

## 第5章 結語

緑膿菌LPSの研究は、大腸菌、サルモネラ菌について多くの研究がなされていると言えるだろう。O-抗原多糖については未知の糖残基の存在や多くの糖成分が不安定、更にグリコシド結合が酸抵抗性であることなど、他の糖質に比較して構造研究は困難であったが、本論文を含め多数の研究者によって研究され、機器分析の技術発展とあいまってここ10数年の間に飛躍的に進歩し、ほぼ決着のついた感がある。しかしながら、一方でLPSの他の部位、即ちLPSのコア部位等に関してはコア抗原の精製の煩雑さや純粋な抗コア抗血清を得ることが難しいことから、多くの菌株を用いた体系的な研究は全くなされていなかった。また、本研究によって明らかにされた緑膿菌共通抗原E87の本体であるD-ラムナンなどの微量成分は、主要O-抗原多糖からの分離精製は困難であり、これまで研究の対象となったことが殆どなかった。

本論文において筆者は、化学的手法と機器分析を駆使した糖鎖の化学構造決定、モノクローナル抗体による解析を行った。その結果、第3章では異なる血清型に属するO-抗原多糖の化学構造上の共通部位を見だし、その共通部位に対するモノクローナル抗体が複数の血清型株に対して治療効果を有する可能性を示した。第2章においては緑膿菌LPSのouter core部位に多様性のあること、またそれがO-血清型と相関のあることを示した。即ち緑膿菌LPSコアの免疫型(血清型)分類のプロトタイプとでも言うべきものを示した。今後、多くの菌株でのコアの化学構造が明らかにされ、いわゆる化学型、血清型の対応関係を検討することが残された課題と言えよう。一方で、コア構造とO-血清型との相関に関して、例えば生合成中間体や合成酵素の共有等、生合成経路の面からの解明にも興味もたれる。

第4章では、緑膿菌共通抗原多糖であると考えられるD-ラムナンについてその性状を明らかにした。筆者がD-ラムナンを同定した後も、幾種かの緑膿菌共通多糖が発見されており[74, 75, 95, 96]、それらの存在様式(LPS様か、夾膜様か)、生物活性、感染防御抗原としての有効性など興味深い課題を残している。これらの多糖が感染防御抗原として働くとするれば、その広い共通性から、O-抗原多糖に変わるワクチンとしてあるいは抗体療法法の標的抗原としての応用が期待される。

## References

1. Botzenhart, K. & Ruden H. (1987) Antibiot. Chemother. 39, 1-15.
2. Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983) Rev. Infect. Dis. 5, 279-313.
3. Pruitt, B. A. Jr. (1974) J. Infect. Dis. 130, S8-S13.
4. Hoiby, W. & Olling, S. (1977) Acta Path. Microbiol. Scand. C5, 107-114.
5. Homma, H., Yamanaka, A., Tanimoto, H., Tamura, M., Chijimatsu, Y., Kira, S. & Izumi, T. (1983) Chest 83, 63-69.
6. Lowbury, E. J. & Jones, R. J. (1975) in Resistance of Pseudomonas aeruginosa (Brown, M. R. W. ed.), pp. 237-269, Wiley, London.
7. Flick, M. R. & Cluff, L. E. (1976) Am. J. Med. 60, 501-508.
8. Sawada, S., Kawamura, T., Masuho, Y. & Tommibe, K. (1985) J. Infect. Dis. 152, 965-970.
9. Sawada, S., Kawamura, T. & Masuho, Y. (1987) J. Gen. Microbiol. 133, 3581-3590.
10. Suzuki, H., Okubo, Y., Moriyama, M., Sasaki, M., Matsumoto, Y. & Hozumi, T. (1987) Microbiol. Immunol. 31, 959-966.
11. Zweerink, H. J., Gammon, M. C., Hutchison, C. F., Jackson, J. J., Lombardo, D., Miner, K. M., Puckett, J. M., Sewell, T. J. & Sigal, N. H. (1988) Infect. Immun. 56, 1873-1879.
12. Hector, R. F., Collins, M. S. & Pennington J. E. (1989) J. Infect. Dis. 160, 483-489.
13. Luderitz, O., Tanamoto, K., Galanos, C., McKenzie, G. R., Brade, H., Zahringer, V., Rietschel, E. T., Kusumoto, S. & Shiba, T. (1984) Rev. Infect. Dis. 6, 428-431.
14. Wilkinson, S. G. (1983) Rev. Infect. Dis. 5, S941-949.
15. Liu, P. V., Matsumoto, H., Kusama, H. & Bergan, T. (1983) Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 256-264
16. Habs, L. (1957) Z. Hyg. Infectiouskr. 144, 218-228.
17. Homma, J. Y. (1976) Jpn. J. Exp. Med. 46, 329-336.
18. Homma, J. Y. (1982) Jpn. J. Exp. Med. 52, 317-320.
19. Lanyi, B. (1966/1967) Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 13, 295-318.

20. Stanislavsky, E. S., Dmitriev, B. A., Lanyi, B. & Joo, I. (1985) Acta Microbiol. Hung. 32, 3-37.
21. Lanyi, B. & Bergan, T. (1978) in Methods in Microbiology, vol. 10 (Bergan, T. & Norris, J. R., eds) pp. 93-168. Academic Press, Inc. Ltd., London.
22. Knirel, Y. A., Vinogradov, E. V., Kocharova, N. A., Paramonov, N. A., Kochetkov, N. K., Dmitiev, B. A., Stanislavsky, E. A. & B. Lanyi (1988) Acta Microbiol. Hung. 35, 3-24.
23. Bráde, H., Brade, L. & Rietschel, E. Th. (1988) Zbl. Bakt. Hyg. A 268, 151-179.
24. Brade, H. & Galanos, C. (1983) Infect. Immun. 42, 250-256.
25. Luderitz, O., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E. T. & Shaw, H. D. (1982) Curr. Top. Membr. Transp. 17, 79-151.
26. Drewry, D. T., Symes, K. C., Gray, G. W & Wilkinson, S. G. (1975) Biochem. J. 149, 93-106.
27. Rowe, P. S. N. & Meadow, P. M. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 329-337.
28. Yokota, S., Ochi, H., Ohtsuka, H., Kato, M. & Noguchi, H. (1989) Infect. Immun. 57, 1691-1696.
29. Yoshida, K., Kimura, F., Uchida, K., Kawaharajo, K., Koizumi, N., Nakajima, S. & Nagaoka, K. (1989) J. Pharmacobio-Dyn. 12, 398-404.
30. Westphal, O. & Jann, K. (1965) Methods Carbohydr. Chem. 5, 83-91.
31. Uchida, K. & Mizushima, S. (1987) Agric. Biol. Chem. 51, 3107-3114.
32. Teng, N. N. H., Lam, K. S., Riera, F. C. & Kaplan, H. S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7308-7321.
33. Oi, V. T. & Hertzberg, L. A. (1980) in Selected Methods in Cellular Immunology, (Mishel, B. B. & Shiigi, S. M., eds) pp. 351-372, Freeman, San Francisco.
34. Foug, S. K. H., Sasaki, D. T., Grumet, F. C. & Engleman, E. G. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7484-7488.
35. Cunningham, M. W. & Russell, S. M. (1983) Infect. Immun. 42, 531-538.
36. Pollack, M., Raubitschek, A. A. & Larrick, J. W. (1987) J.

Clin. Microbiol. 79, 1421-1430.

37. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685.
38. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Sci. USA 76, 4350-4354.
39. Terashima, M., Uezumi, I., Tomio, T., Kato, M, Irie, K., Okuda, T., Yokota, S. & Noguchi, H. (1991) Infect. Immun., in press.
40. Yokota, S., Kaya, S., Sawada, S., Kawamura, T., Araki, Y. & Ito, E. (1987) Eur. J. Biochem. 167, 203-209.
41. Yokota, S., Kaya, S. & Noguchi, H. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 68, 245-248.
42. Hancock, R. E. W., Mutharia, L. M., Chan, L., Darveau, R. P., Speert, D. P. & Pier, G. B. (1983) Infect. Immun. 42, 170-177.
43. Fomsgaard, A., Conrad R. S., Galanos, C., Shand, G. H. & Hoiby, N. (1988) J. Clin. Microbiol. 26, 821-826.
44. Lanyi, B., Voros, S. & Adam, M. H. (1973) Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 20, 249-254.
45. Yokota, S., Kaya, S., Kawamura, T., Araki, Y. & Ito, E. (1986) J. Biochem. 99, 1551-1561.
46. Yokota, S., Kaya, S., Araki, Y. & Ito, E. (1987) J. Biochem. 104, 671-678.
47. Kaya, S., Araki, Y. & Ito, E. (1989) J. Biochem. 105, 29-34.
48. Kaya, S., Araki, Y. & Ito, E. (1989) J. Biochem. 105, 35-38.
49. Yokota, S., Ochi, H., Uezumi, I., Ohtsuka, H., Irie, K. & Noguchi, H. (1990) Eur. J. Biochem. 192, 109-113.
50. Wilkinson, S. G. & Galbraith, L. (1975) Eur. J. Biochem. 52, 331-343
51. Taylor, R. L. & Conrad, H. E. (1972) Biochemistry 11, 1383-1388.
52. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K. Rebers, P. A. & Smith, F. (1956) Anal. Chem. 28, 350-356.
53. Kaya, S., Yokoyama, K., Araki, Y. & Ito, E. (1984) J. Bacteriol. 158, 990-996.
54. Amano, K., Hazama, S., Araki, Y. & Ito, E. (1977) Eur. J. Biochem. 75, 512-522.

55. Yoneyama, T., Koike, Y., Arakawa, H., Yokoyama, K., Sasaki, Y., Kawamura, T., Araki, Y., Ito, E. & Takao, S. (1982) J. Bacteriol. 149, 15-21.
56. Tsuji, A., Kinoshita, T. & Hoshino, M. (1969) Chem. Pharm. Bull. 17, 217-218.
57. Akamatsu, S. (1952) J. Biochem. 39, 203-210.
58. Fisher, E., Bergmann, M. & Rabe, A. (1920) Chem. Ber. 2362-2388.
59. Darakas, E., Hultburg, M., Leontein, K. & Lonngren, J. (1982) Carbohydr. Res. 103, 176-180.
60. Morel, C. L. (1958) Helv. Chim. Acta 41, 1501-1504.
61. Inoue, Y., Nagasawa, K. & Iwashita, T. (1984) Carbohydr. Res. 131, 285-300.
62. Knirel, Y. A., Vinogradov, E. V., Shashkov, A. S., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K., Stanislavski, E. S. & Mashilova, G. M. (1985) Eur. J. Biochem. 150, 541-550.
63. Vinogradov, E. V., Knirel, Y. A., Shashkov, A. S. & Kochetkov, N. K. (1987) Carbohydr. Res. 170, C1-C4.
64. Knirel, Y. A., Kocharova, N. A., Shashkov, A. S., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K., Stanilavsky, E. S. & Mashilova, G. M. (1987) Eur. J. Biochem. 163, 639-652.
65. Caroff, M., Bondle, D & Perry, M. (1984) Eur. J. Biochem. 139, 195-200.
66. Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984) Carbohydr. Res. 131, 209-217.
67. Bergmeyer, H. U., Grassel, M. & Walter, H.-E. (1983) in Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed. (Bergmeyer, H. U., ed.) vol. 3, pp. 226-228, Verlag Chemie, Weinheim.
68. Park, J. T. & Johnson, M. J. (1949) J. Biol. Chem. 181, 149-151.
69. L'vov, V. L., Shashkov, A. S., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K., Jann, B. & Jann, K. (1984) Carbohydr. Res. 126, 103-109.
70. Tahara, Y. & Wilkinson, S. G. (1983) Eur. J. Biochem. 134, 299-304.
71. Knirel, Y. A., Vinogradov, E. V., Shashkov, A. S., Wilkinson, S. G., Tahara, Y., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K., Stanislavsky, E. S. & Mashilova, G. M. (1986) Eur. J. Biochem. 155, 659-669.

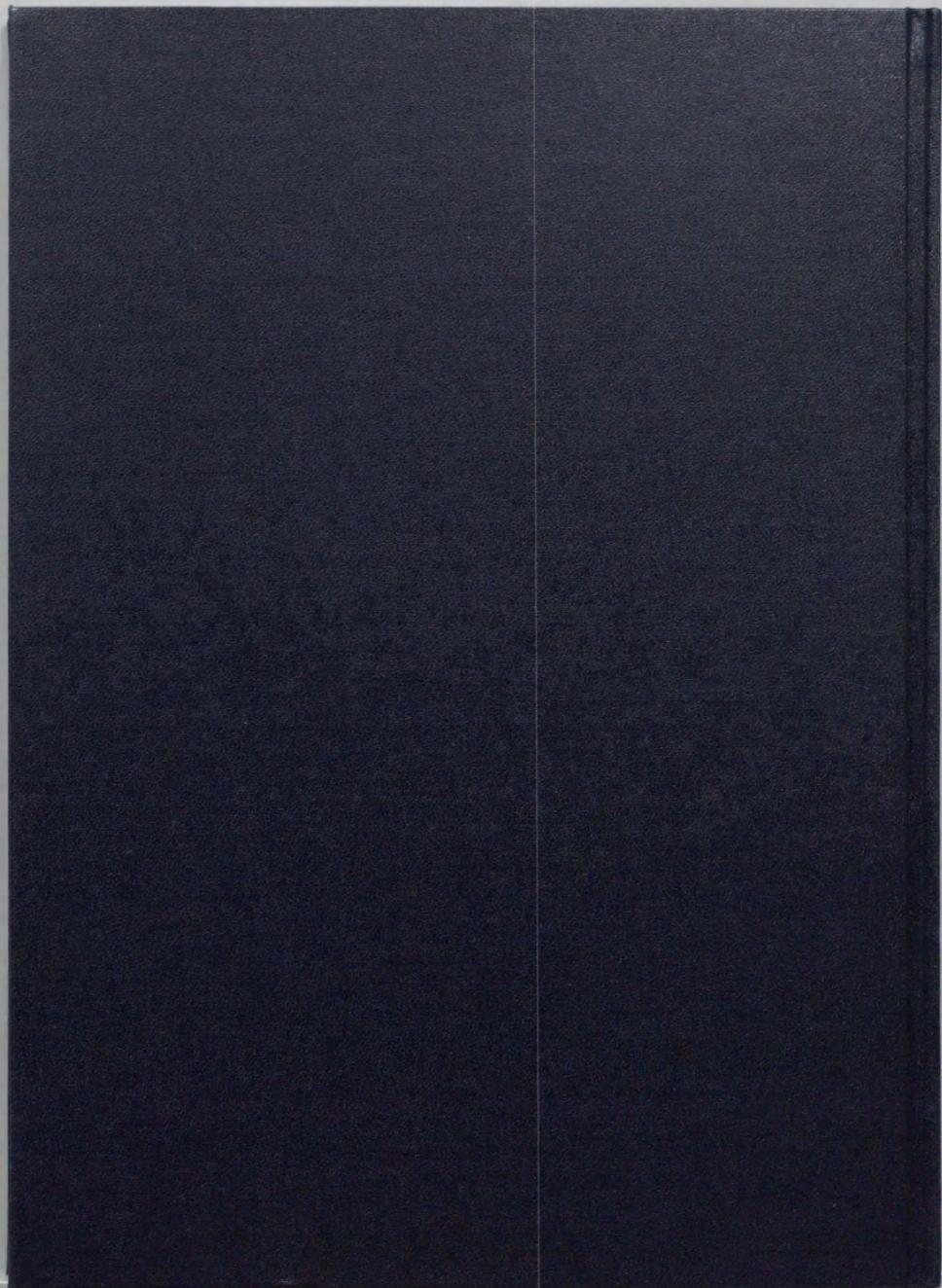
72. Bock, K. & Pedersen, C. (1974) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 293-297.
73. Sawada, S., Kawamura, T., Masuho, Y. & Tomibe, K. (1985) J. Infect. Dis. 152, 1290-1299.
74. Kocharova, N. A., Knirel, Y. A., Kochetkov, N. K. & Pier, G. B. (1988) J. Biol. Chem. 263, 11291-11295.
75. Kocharova, N. A., Hatano, K., Shashkov, A. S., Knirel, Y. A., Kochetkov, N. K. & Pier, G. B. (1989) J. Biol. Chem. 264, 15569-15573.
76. Yokota, S., Kaya, S., Araki, Y., Ito, E., Kawamura, T. & Sawada, S. J. Bacteriol. 172, 6162-6164.
77. Burton, A. J. & Carter, H. E. (1975) Biochemistry 3, 411-418.
78. Rivera, M., Bryan, L. E., Hancock, R. E. W. & McGroaty, E. J. (1988) J. Bacteriol. 170, 512-521.
79. Knirel, Y. A., Shashkov, A. S., Dmitriev, B. A., Kochetkov, N. K., Kasyanchuk, N. V. & Zakharova, I. Y. (1980) Bioorg. Khim. 6, 1851-1859.
80. Lowry, O. H., Roberts, N. R., Leiner, K. W., Wu, M.-L. & Farr, A. L. (1954) J. Biol. Chem. 207, 1-17.
81. Weissbach, A. & Hurwitz, J. (1959) J. Biol. Chem. 234, 705-709.
82. Fischer, W., Koch, H. U. & Haas, R. (1983) Eur. J. Biochem. 133, 523-530.
83. Smith, A. R. W., Zamze, S. E., Munro, S. M., Carter, K. J. & Hignett, R. C. (1985) Eur. J. Biochem. 149, 73-78.
84. Dutton, G. G. S. & Mackie, K. L. (1977) Carbohydr. Res. 55, 49-63.
85. Bebault, G. M., Dutton, G. G. S., Funnel, N. A. & Mackie, K. L. (1978) Carbohydr. Res. 63, 183-192.
86. Klyne, W. (1950) Biochem. J. 47, xli-xlii.
87. Leisinger, T. & Margraff, R. (1979) Microbiol. Rev. 43, 422-442.
88. Hickman, J. & Ashwell, G. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1424-1428.
89. Knirel, Y. A., Zdorovenko, G. M., Shashkov, A. S., Mamyan, L. M., Yakovleva, L. M., Solyanic, L. P. & Zakharova, I. Y. (1988) Bioorg. Khim. 14, 82-91.

90. Markovitz, A. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2091-2098.
91. Winkler, N. W. & Markozitz, A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5868-5876.
92. Linker, A. & Jones, R. S. (1964) Nature 204, 187-188.
93. Linker, A. & Jones, R. S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3845-3851.
94. Kocharova, N. A., Knirel, Y. A., Kochetkov, N. K. & Stanislavsky, E. S. (1988) Bioorg. Khim. 14, 701-703.
95. Lam, M. Y. C., McGroarty, E. J., Kropinski, A. M., MacDonald, L. A., Pedersen, S. S., Hoiby, N. & Lam, J. S. (1989) J. Clin. Microbiol. 27, 962-967.
96. Rivera, M. & MaGroarty, E. J. (1989) J. Bacteriol. 171, 2244-2248.

## 謝辞

本研究の機会を与えてくださり、ご指導を賜りました住友化学工業株式会社宝塚総合研究所生命工学研究所 野口浩主任研究員並びに細胞工学研究室の皆様（2章及び3章4節）、北海道大学理学部化学科 伊藤英治名誉教授、荒木義雄助教授、嘉屋俊二博士（3章2、3節及び4章）に深く感謝申し上げます。

また、学位取得にあたりご指導を賜りました東京大学薬学部名取俊二教授に感謝申し上げます。





Inches  
Centimeters

# KODAK Color Control Patches

© The Tilted Company, 2000

## Kodak

LICENSED PRODUCT

Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

# Kodak Gray Scale

**C** **Y** **M**

© Kodak, 2007 THE KODAK

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19