

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

| | |
|----------------|---|
| 研究課題名 | 免疫機構を制御する微生物由来化合物の化学合成と機能解析および新規制御分子の創製 |
| 研究機関・ 部局・職名 | 大阪大学・大学院理学研究科・准教授 |
| 氏名 | 藤本ゆかり |

1. 当該年度の研究目的

免疫機構を制御する微生物由来化合物について下記の目的で研究を行う。すなわち、細菌の分泌性免疫刺激物質の解析については、特に腸内の *Clostridium* 菌等に含まれる自然免疫を活性化する天然 Nod1 および Nod2 リガンド解析を行う。また、免疫を活性化する分子として、細菌細胞壁成分ペプチドグリカンの効率的合成法開発・ライブラリ構築を行うとともに、他の微生物由来糖脂質として、特異な活性を持つ化合物の合成を進める。また、確立した合成法を基盤として機能解析のため分子プローブとして用いる標識化合物を合成する。獲得免疫の制御を目指した複合型分子については合成を行い構造と活性についての知見を得ることを目指す。

2. 研究の実施状況

下記のそれぞれの項目について研究を実施した。すなわち、**細菌の分泌性免疫刺激物質の解析**については、これまでにプログラムで得られた知見に基づき発展的に展開中であり、腸内の *Clostridium* 菌等に含まれる自然免疫を活性化する天然 Nod1 および Nod2 リガンド解析を行った。**細菌細胞壁成分ペプチドグリカンの化学合成**については、種々の効率的合成法開発を行った。結核菌特有の構造に着目し液相法での合成法開発を行うとともに、引き続きペプチドグリカンの部分構造であるフラグメントについて網羅的な化合物ライブラリを構築し、四糖構造を中心としたマイクロアレイのプロトタイプ作成に成功した。これらの手法により数種のペプチドグリカンを認識するタンパク質の結合・認識構造を明らかにし、今後同時に多くの解析が可能となると考えている。また、Nod1 蛍光標識体および光親和性標識体を用い、Nod1 とリガンドの直接結合解析の手法確立を行った。また、他の微生物由来糖脂質として、寄生性細菌 (*Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*) 由来リポ多糖部分構造分子群の合成の成功に基づき、特異な活性を持つことが予想される GlcN3N 構造の糖を骨格構造として有するリポ多糖部分構造について合成法検討を行った。糖水酸基の直接的アミノ化法を検討し、GlcN3N 構造を含む二糖構造合成の基盤となる方法を確立した。赤痢アメーバ *E. histolytica* 由来イノシトールリン脂質の合成法について、選択的なリン酸化法の開発を行うとともに細菌特有の脂質構造の化学合成法開発を行い、全合成に向けて種々の合成的課題の解決を図った。**獲得免疫の制御を目指した複合型分子の開発**についても進め、複合化の手法の開発・合成をおこなうとともに活性化機構解析のための手法開発を行った。

3. 研究発表等

| | |
|----------------------|---|
| <p>雑誌論文 計7件</p> | <p>(掲載済み一査読有り) 計6件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Fujimoto, Y.</u>, Pradipta, A. R., Inohara, N., Fukase, K., Peptidoglycan as Nod1 ligand; Fragment structures in the environment, chemical synthesis, and their innate immunostimulation. <i>Nat. Prod. Rep.</i> 2012, 29, 568-579. 2. <u>Fujimoto, Y.</u>, Shimoyama, A., Suda, Y., Fukase, K., Synthesis and immunomodulatory activities of <i>Helicobacter pylori</i> lipophilic terminus of lipopolysaccharide including lipid A. <i>Carbohydrate Research</i>, 2012, 356, 37-43. 3. Iwasaki, T., Higashikawa, K., Reddy, V. P., Ho, W. W. S., <u>Fujimoto, Y.</u>, Fukase, K., Terao, J., Kuniyasu, H., Kambe, N., Nickel-butadiene catalytic system for the cross-coupling of bromoalkanoic acids with alkyl grignard reagents: A practical and versatile method for preparing fatty acids. <i>Chem. Eur. J.</i>, 2013, 19, 2956-2960. 4. <u>Fujimoto, Y.</u>, Shimoyama, A., Saeki, A., Kitayama, N., Kasamatsu, C., Tsutsui, H., Fukase, K., Innate immunomodulation by lipophilic termini of lipopolysaccharide; synthesis of lipid A from <i>Porphyromonas gingivalis</i> and other bacteria and their immunomodulatory response. <i>Mol. BioSyst.</i>, 2013, 9, 987-996. 5. <u>Fujimoto, Y.</u>, Pradipta, R. A., Hashimoto, M., Kan, S., Shigehisa, H., Fukase, K., Peptidoglycan as innate immunomodulator; chemical synthesis of its fragments, immunostimulatory activities, and natural Nod1 ligand structures in the environments/fermented food. <i>Peptide Science</i>, 2013, 2012, 97-98. 6. Wang, N., Huang, C.-y., Hasegawa, M., Inohara, N., <u>Fujimoto, Y.</u>, Fukase, K., Glycan sequence-dependent Nod2 activation investigated with chemically synthesized bacterial peptidoglycan fragment library. <i>ChemBioChem</i>, 2013, 14, 482-488. <p>(掲載済み一査読無し) 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>藤本ゆかり</u>、次世代免疫アジュバント開発-微生物由来の自然免疫活性をもつ分子群とワクチンへの展開、未来材料、エヌ・ティー・エス、2012, 12(11), 13-21. <p>(未掲載) 計0件</p> |
| <p>会議発表 計29件</p> | <p>専門家向け 計29件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 第13回関西グライコサイエンスフォーラム (大阪 2012.5.19) 認識タンパク質探索・解析を目指した細菌細胞壁ペプチドグリカン・フラグメントライブラリ構築 王寧、黄正元、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一 2. The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012) (Madrid, Spain 2012.6.22-27) Peptidoglycan as Nod1 ligand; Fragment structures in the environment, chemical synthesis, and their innate immunostimulation <u>Y. Fujimoto</u>, A. R. Pradipta, M. Hasegawa, N. Inohara, K. Fukase 3. The 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012) (Madrid, Spain 2012.6.22-27) Microfluidic glycosylation for efficient synthesis of biofunctional glycans. K. Fukase, K. Tanaka, <u>Y. Fujimoto</u>, Y. Uchinashi, A. Shimoyama 4. 第47回天然物化学談話会 (熊本 2012.7.4-6) 免疫活性物質ペプチドグリカンフラグメントの新規固相合成法の開発 角永悠一郎、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一 5. 第47回天然物化学談話会 (熊本 2012.7.4-6) シクロプロパン環含有脂肪酸を有する複合脂質の合成研究 高松正之、浅田沙織、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一 6. 第47回天然物化学談話会 (熊本 2012.7.4-6) Entamoeba histolytica由来NKT細胞刺激作用を有するイノシトールリン脂質の合成研究 相羽俊彦、佐藤昌紀、梅垣大地、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一 7. The Second Asian Chemical Biology Conference ACBC2012 (沖縄 2012. 7. 4-6) Synthesis and biological analysis of molecular probes for elucidation of the Nod1-immunostimulating mechanism of peptidoglycan K. Fujiki, M. Hasegawa, N. Inohara, <u>Y. Fujimoto</u>, K. Fukase 8. The Second Asian Chemical Biology Conference ACBC2012 (沖縄 2012. 7. 4-6) |

- Immunomodulation and receptor recognition of chemically conjugated lipo- and glycopeptide Y. Kajiki, M. Katsumoto, T. Seya, N. Inohara, Y. Fujimoto, K. Fukase
9. 第39回有機反応懇談会 (大阪 2012.8.3) *Entamoeba histolytica* 由来NKT細胞刺激作用を有するイノシトールリン脂質の合成研究 相羽俊彦、佐藤昌紀、梅垣大地、藤本ゆかり、深瀬浩一
 10. 第39回有機反応懇談会 (大阪 2012.8.3) シクロプロパン環含有脂肪酸を有する複合脂質の合成研究 高松正之、浅田沙織、藤本ゆかり、深瀬浩一
 11. 第31回 日本糖質学会年会 (鹿児島 2012.9.17-20) 多様性指向型経路による寄生菌リピド A の合成と免疫調整活性 来山直弘、下山敦史、佐伯昭典、生地哲平、藤本ゆかり、深瀬浩一
 12. Endotoxin and Innate Immunity: Past, Present, and Future” Joint Symposium of Satellite Symposium of the 12th International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting (IEIIS2012) & International Symposium on NEXT program (Osaka 2012.10.18) Immunoregulatory microbial compounds; Chemical synthesis, functional analysis, and new regulatory-molecule complex, Synthesis and Biofunction of Innate Immunostimulating Glycoconjugates from Bacteria Y. Fujimoto
 13. International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012) (Tokyo 2012.10.23-26) Peptidoglycan as Nod1/Nod2 ligand; Chemical synthesis and its innate immunostimulation Y. Fujimoto, A. R. Pradipta, N. Wang, A. Kawasaki, Y. Kadonaga, M. Hasegawa, N. Inohara, K. Fukase
 14. International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012) (Tokyo 2012.10.23-26) Synthesis and biological analysis of molecular probes for elucidation of the Nod1-immunostimulating mechanism of peptidoglycan K. Fujiki, M. Hasegawa, N. Inohara, Y. Fujimoto, K. Fukase
 15. The 4th Asian Communication for Glycobiology and Glycotechnology (ACGG) (South Korea 2012.10.28-31) Synthesis and Biofunctions of Nod1/Nod2 Ligands from Peptidoglycan; Innate Immunostimulatory Glycoconjugates of Bacteria Y. Fujimoto
 16. The Twelfth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-12) (Kyoto 2012.11.12-16) Synthesis and Biofunctions of Nod1/Nod2 ligands from peptidoglycan; Innate Immunostimulatory glycoconjugates of bacteria Y. Fujimoto, A. R. Pradipta, N. Wang, A. Kawasaki, Y. Kadonaga, M. Hasegawa, N. Inohara, K. Fukase
 17. The Twelfth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-12) (Kyoto 2012.11.12-16) Synthesis of peptidoglycan fragment library for analysis of receptor recognition N. Wang, C. Huang, Y. Fujimoto, K. Fukase
 18. The Twelfth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-12) (Kyoto 2012.11.12-16) Synthesis of immunoadjuvant complex containing peptidoglycan partial structures Y. Kajiki, M. Katsumoto, T. Seya, N. Inohara, Y. Fujimoto, K. Fukase
 19. 第49回ペプチド討論会 (鹿児島県 2012.11.7-9) Peptidoglycan as Innate Immunomodulator; Chemical Synthesis of Its Fragments, Immunostimulatory Activities, and Natural Nod1 Ligand Structures in Fermented Food Y. Fujimoto, A. R. Pradipta, M. Hashimoto, S. Kan, H. Shigehisa, K. Fukase.
 20. 第32回有機合成若手セミナー「明日の有機合成を担う人のために」 (神戸 2012.11.22) ペプチドグリカン・フラグメントライブラリ構築と受容体認識解析 王 寧、黄 正元、藤本ゆかり、深瀬浩一
 21. 第32回有機合成若手セミナー「明日の有機合成を担う人のために」 (神戸 2012.11.22) 複合糖質のヘキソース6位水酸基の選択的酸化法の開発と標識化・複合化への展開 向坂菜摘、王 寧、加治木泰範、藤本ゆかり、深瀬浩一
 22. 第32回有機合成若手セミナー「明日の有機合成を担う人のために」 (神戸 2012.11.22) 古細菌 *Methanococcus voltae* の鞭毛部分フラジェリンのN-結合型糖鎖の合成研究 生地哲平、藤本ゆかり、深瀬浩一
 23. 日本化学会第93春季年会(2013) (滋賀県草津 2013年3月22日-25日) 細菌細胞壁ペプチドグリカンのフラグメント構造ライブラリ/アレイ作成と認識タンパク質による被認識構造の探索 王 寧、平田晃義、軒原清史、藤本ゆかり、深瀬浩一
 24. 日本化学会第93春季年会(2013) (滋賀県草津 2013年3月22日-25日) ペプチドグリカンフラ

様式19 別紙1

| | |
|----------------------------------|---|
| | <p>グメント構造を利用した免疫アジュバント 加治木泰範、猪原直弘、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一</p> <p>25. 日本化学会第93春季年会(2013) (滋賀県草津 2013年3月22日-25日) GlcN3N 構造を有するリピド A の合成研究 増井誠二、生地哲平、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一</p> <p>26. 日本化学会第93春季年会(2013) (滋賀県草津 2013年3月22日-25日) Synthesis of Mycobacterium peptidoglycan (PGN) fragments containing diaminopimelic acid (DAP) 王 倩倩、松尾裕介、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一</p> <p>27. 日本化学会第93春季年会(2013) (滋賀県草津 2013年3月22日-25日) 複合糖質のヘキソース6位水酸基の選択的酸化法の開発と標識化・複合化への展開 向坂菜摘、王寧、加治木泰範、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一</p> <p>28. 日本化学会第93春季年会(2013) (滋賀県草津 2013年3月22日-25日) <i>Entamoeba histolytica</i> 由来NKT 細胞刺激作用を有するイノシトールリン脂質合成 相羽俊彦、佐藤昌紀、梅垣大地、岩崎孝紀、神戸宣明、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一</p> <p>29. 日本化学会第93春季年会(2013) (滋賀県草津 2013年3月22日-25日) 細菌由来カルジオリピンの合成研究 高松正之、浅田早織、<u>藤本ゆかり</u>、深瀬浩一</p> <p>一般向け 計0件</p> |
| <p>図書 計1件</p> | <p>1. <u>藤本ゆかり</u>、下山敦史、佐伯昭典、來山直弘、生地哲平、隅田泰生、筒井ひろ子、三宅健介、深瀬浩一、寄生性細菌 <i>H.pylori</i> および <i>P. gingivalis</i> リピドAの化学合成と免疫調節活性、エンドトキシン・自然免疫研究 15、-飛躍する自然免疫研究-、筒井ひろ子、小谷穰治、谷徹、横地高志 監修、医学図書出版株式会社 (東京) , p7-15, 2012</p> |
| <p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p> | <p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p> |
| <p>Webページ (URL)</p> | <p>大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next</p> <p>大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</p> <p>藤本ゆかり (Yukari FUJIMOTO, Ph.D.) - 大阪大学大学院理学研究科 http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/fukase/fujimoto/</p> |
| <p>国民との科学・技術対話の実施状況</p> | <p>1) 第7回女子中高生のための関西科学塾 (2012/10/22 大阪大学) 中学生対象 10名 「カフェインの単離」</p> <p>2) 日本化学会高校生のための「実験教室」 (2013/3/24 立命館大学) 高校生対象 計 60名 「“眠気を覚ます”物質を単離する」</p> <p>3) 21世紀懐徳堂だより(大阪大学の社会学連携事業について広報誌、小中学生向けの紹介等)への掲載 「1/3000」 “大阪大学に約 3,000 人いる研究者をできる限り紹介していくシリーズ <u>藤本ゆかり</u>准教授” (2012/6月)</p> |
| <p>新聞・一般雑誌等掲載 計1件</p> | <p>11月29日付け日刊工業新聞 「阪大・米シガン大 Nod1 免疫活性化物質 構造解析に成功」</p> |
| <p>その他</p> | |

4. その他特記事項

2012年10月 The Alois Nowotny 賞 受賞 (International Endotoxin & Innate Immunity Society)

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

| | ①交付決定額 | ②既受領額 (前年度迄の 累計) | ③当該年度受 領額 | ④(=①-②- ③)未受領額 | 既返還額(前 年度迄の累 計) |
|------|-------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| 直接経費 | 121,000,000 | 40,292,000 | 65,433,000 | 15,275,000 | 0 |
| 間接経費 | 36,300,000 | 12,087,600 | 19,629,900 | 4,582,500 | 0 |
| 合計 | 157,300,000 | 52,379,600 | 85,062,900 | 19,857,500 | 0 |

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

| | ①前年度未執 行額 | ②当該年度受 領額 | ③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く) | ④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入 | ⑤当該年度執 行額 | ⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額 | 当該年度返還 額 |
|------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 直接経費 | 0 | 65,433,000 | 0 | 65,433,000 | 65,430,828 | 2,172 | 0 |
| 間接経費 | 5,597,486 | 19,629,900 | 0 | 25,227,386 | 20,411,064 | 4,816,322 | 0 |
| 合計 | 5,597,486 | 85,062,900 | 0 | 90,660,386 | 85,841,892 | 4,818,494 | 0 |

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

| | 金額 | 備考 |
|---------|------------|---------------------------|
| 物品費 | 59,317,241 | 多光子励起レーザー走査型顕微鏡、実験器具、試薬等 |
| 旅費 | 1,542,030 | 研究成果発表旅費(国際糖質学会(Madrid)等) |
| 謝金・人件費等 | 2,654,436 | 派遣技術職員人件費 |
| その他 | 1,917,121 | 学会参加費、学会誌投稿料 |
| 直接経費計 | 65,430,828 | |
| 間接経費計 | 20,411,064 | |
| 合計 | 85,841,892 | |

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

| 物品名 | 仕様・型・性能 等 | 数量 | 単価 (単位:円) | 金額 (単位:円) | 納入 年月日 | 設置研究機関 名 |
|---------------------|------------------------|----|--------------|--------------|-----------|-------------|
| クボタ遠心機 | クボタ マイクロ 冷却遠心機3740 | 1 | 947,719 | 947,719 | 2013/2/6 | 大阪大学 |
| 多光子励起レーザー走 査型顕微鏡 | オリンパス(株)製 FV1200MPE | 1 | 52,447,500 | 52,447,500 | 2013/2/19 | 大阪大学 |
| | | | | | | |