

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成14年度採択研究代表者

鈴木 康夫

(静岡県立大学・薬学部 生化学教室 教授)

「ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用」

1. 研究実施の概要

本研究が目指すものは、「ウイルス感染における機能的グライコミクスの推進とこれによる創薬への応用」である。ここで取り上げる「創薬」には、「抗ウイルス薬、ウイルスセンサーなどを含む診断薬、ウイルス吸着素材などの開発基盤の創製」が含まれる。本研究により、今まで申請者が開拓してきた「糖鎖ウイルス学」領域の我が国および世界における拡充も目指す。研究対象とするウイルスは、いずれも、学術的、社会的に重要であり、有効な治療法が早急に解決されなければならないものに限定する。すなわち、極めて変異を起こしやすく地球規模の感染者を出しているウイルス（インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、HIV）、熱帯熱性ウイルス（デングウイルス）、幼児・高齢者に感受性の高いウイルス（パラインフルエンザウイルス、インフルエンザウイルス）を取り上げた。

研究推進は代表者のグループを含めて5つのグループにより行われる。本研究は平成14年11月から開始された。平成14年度は研究計画の立ち上げ、また実験遂行に必要な機器の選定・購入作業から開始した。さらに、上記共同研究開始に当たり、先ず班員が持つ技術・成果および今後の研究計画の発表・討論会を静岡県立大学で行い、班員間の共同作業を円滑に行う体制を作った。

平成14年度は、研究始動という状況であったが班員一丸となって下記の成果を得ている。

- 1) インフルエンザウイルス研究：①インフルエンザウイルスの宿主である発育鶏卵しょう尿膜から、調べた全てのインフルエンザウイルス株（ヒトおよびその他の動物、トリ、ヒト、ブタ、ウマA型およびB型ウイルス）と結合出来る全く新しいシアロスフィンゴ糖脂質（ガングリオシド）を発見した。微量成分であるが、質量分析、NMR解析、酵素処理などにより、本分子は同一分子内にシアル酸2-3ガラクトースおよびシアル酸2-6ガラクトースの両末端を持つユニークなガングリオシドであることが判明した（第23回日本糖質学会発表, 2002）。極微量でウイルスの感染を阻止することから、本ガングリオシドは自然界における真のレセプターとして、画期的抗インフルエンザ薬開発へのシードとして期待される。②ウイルス糖鎖性レセプター研究の一環として脳炎を

起こすJCウイルスのシアロ糖鎖受容体の精密構造を解明した(J. Virol., 76, 12992, 2002)。③インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ(糖鎖受容体破壊酵素)スパイクはウイルスが感染細胞から出芽する際必須な役割を持つ。今回、これが、ウイルスの宿主域決定因子として、さらに病原性を規定する因子として機能する新事実を発見した(*FEBS Lett.* In press)。④これに関連して、同スパイク遺伝子解析から、1957年に発生したアジア風邪の原因ウイルス(H2N2)のノイラミニダーゼのこの性質は、1968年に現れた新しい遺伝子再集合体である香港風邪ウイルスH3N2には受け継がれたが、1971年以降に現れた同じ亜型のウイルス(H3N2)に受け継がれていないこと発見し、インフルエンザ流行の機構に新しい概念を導入出来た(第50回日本ウイルス学会、Glyco XVII発表)。さらに、⑤硫酸化スフィンゴ糖脂質がウイルスノイラミニダーゼスパイクの機能を抑制することを見だし(Options for Control of Influenza V, 2003発表、*FEBS Lett.* 投稿中)、ウイルス感染細胞におけるウイルス構成分子の交通、アセンブリーに深く関わる可能性を明らかにした。⑥インフルエンザウイルス感染初期における宿主細胞の応答を調べた結果、ストレス応答キナーゼであるp38 MAPKおよびERKを介するシグナル応答が機能し、これがウイルスの宿主侵入機構に関与することを見いだした(Options for Control of Influenza V、第76回日本生化学会、2003発表予定)。⑦蛍光シアル酸プローブを用いた細胞内シアリダーゼ活性を*in situ*に測定する技術を開発した。⑧シアル酸の3位炭素にF(フッ素)導入したシアル酸含有ホスファチジルエタノールアミン(3-F-シアリルホスファチジルエタノールアミン)は、ウイルスの感染初期および後期のいずれをも強力に阻止できることを見出した(*Glycobiology.*, 12 (3), 183, 2002)。⑩インフルエンザウイルス糖鎖受容体破壊酵素機能阻害糖鎖ポリマーを見いだした(投稿中)。

- 2) パラインフルエンザウイルス研究: パラインフルエンザウイルスのシアロ糖鎖受容体破壊酵素(ノイラミニダーゼ)を特異的に阻害する新規シアル酸誘導体を合成し、この阻害剤に抵抗性のウイルスクローニングに成功した。これにより、本ウイルスの受容体破壊酵素機能の新しい展開が可能となった。
- 3) デングウイルス研究: デングウイルスはカをベクターとし唯一ヒトを最終宿主とするウイルスである。ヒト宿主細胞である赤芽球系細胞からデングウイルスと特異的且つ強力に結合するガングリオシドを発見し、単クローンとの反応性からその糖鎖構造はラクトサミン構造を有するparagloboside ($\text{Gal } \beta \text{ 1-4(3)GlcNAc } \beta \text{ 1-3Gal } \beta \text{ 1-4Glc } \beta \text{ 1-1' Cer}$)と同定した(日本薬学会第123年会発表)。本結合性糖脂質の糖鎖部分(オリゴ糖分子)は、デングウイルスの宿主細胞への感染を阻害することから、この糖脂質分子がデングウイルス受容体として機能している可能性が示された。この誘導体は新規な抗デング薬として開発が期待される。さらに、本ウイルスが宿主受容体へ結合する上で必須なスパイク(E糖タンパク質)のクローニングに成功し、その発現系を確立した。これにより、NMRやX線結晶解析によるリガンド-レセプター間の分子認識機構の研究が可能となった。

- 4) 糖鎖関連遺伝子改変によるウイルス感染防御機構の解析：①免疫系、神経系に特異的に発現するCD57/HNK-1 糖鎖のウイルス感染における役割を *in vitro* で解析するため、CD57/HNK-1糖鎖の強制発現細胞を作成した。②生体レベルでのCD57/HNK-1糖鎖を介したウイルス感染を解析するための基礎的情報として、神経系以外の各種臓器におけるCD57/HNK-1糖鎖発現の詳細を解析した結果、腎臓における発現が確認された。腎臓では非硫酸化型のCD57/HNK-1糖鎖がN-型糖鎖上に発現していることが明らかとなった（第24回日本糖質学会発表予定，2003）。③CD57/HNK-1糖鎖の生合成酵素であるGlcAT-P遺伝子欠損マウスは脳内の大部分のCD57/HNK-1糖鎖が欠損しているもののわずかにその残存が確認された（蛋白質核酸酵素48(8)，934, 2003）。そこで本糖鎖の完全欠損マウスの作成を目指し、もう一つの生合成律速酵素であるGlcAT-S遺伝子欠損マウス作製のターゲティングベクターの作成に成功した。
- 5) 糖鎖とウイルスタンパク質の三次元構造、両者の相互作用様式の解析、およびウイルス、宿主が発現している糖鎖構造の迅速決定：インフルエンザウイルスヘマグルチニンと受容体シアロ糖鎖との動的3次元構造を転移核オーバーハウザー効果により解析する準備（NMR解析法の確立）、ウイルスヘマグルチニンの調製を行った。また、ウイルスおよび宿主細胞の全N-グリコシド型糖鎖を解析するHPLCマッピング技術を確立した。
- 6) ナノ糖鎖クラスターによるウイルス阻害剤およびウイルス検出剤の創製：Ru錯体の α -グルコース末端に鶏卵から取り出したインフルエンザウイルス受容体シアロオリゴ糖鎖が1個及び2個転移したルテニウム複合体（(YDS)-Ru conjugate）を化学的に創製した。この物質がインフルエンザウイルスと結合すると特異的に蛍光が減少することを発見した（*Chem. Commun.*，1250, 2003、特許出願）。これを用いたウイルスセンサーの開発が期待される。特定位置硫酸化複合糖質の化学合成法を確立し、インフルエンザウイルス糖鎖受容体破壊酵素機能阻害糖鎖ポリマーを見いだした（投稿中）。
- 7) 糖鎖機能解析によるHIV感染の制御：HIV感染のコレセプター（ケモカインレセプターCCR5とCXCR4、更にGPR1など）に置ける糖鎖の役割を解明するためにN結合型糖鎖付加部位に変異を入れたコレセプター GPR1を作成しが、HIV-1感染に余り強い影響を与えなかった。また、HIV-1感染におけるプロテオグリカンの関与を検討するため、syndecan-1, syndecan-2, syndecan-4, およびglypicna-1遺伝子をクローニングし、その発現ベクターを作成し、更にK562細胞などHIV-1抵抗性の細胞に導入しつつある。今後、HIV-1の感染実験で検討する。ヒトでは発現されていない α galactosyltransferaseの遺伝子をネコ、マウス、ブタなどからクローニングした。糖鎖末端のシアル酸は、HIV-1の感染性に抑制的な影響を与えることが報告されている。遺伝子の導入により、糖鎖末端にgalactoseが増えることが期待されるので、そのウイルス感染への影響を検討する。HTLV-Iを用いた実験では、予想に反してむしろその感染性が抑制されるデータが得られたので、更にHIV-1で解析できる系を開発している。
- 8) 糖鎖機能解析によるデングウイルス感染の制御：デングウイルスの宿主細胞であるカの細胞株（ヒトスジシマカ培養細胞クローンC6/36）の大量培養法をマイクロビーズ回転

培養の応用により確立した。これにより、デングウイルス受容体の解析のための十分な試料（カ細胞、グラムレベル）の確保が可能となった。ヒト樹状細胞をヒト末梢血液から安定的に誘導・供給することが可能になったことにより、樹状細胞にデングウイルスが効率的に感染することを証明し、ヒト細胞トロピズムの分子機構解析に新展開をもたらした。本ウイルスの糖鎖を持つ2つの蛋白（EとPrM）のうちPrM蛋白の遺伝子に変異を挿入した人工デングウイルスを作製しその生物学的性状を検査したところ、樹状細胞における高い増殖性とサイトカイン刺激能を持つ事が判明した（JVIに投稿中）。蚊におけるデングウイルス受容体の解析、その組織分布を分子レベルで解析するため、ウイルスベクターである熱帯シマカの大量培養の準備をすすめている。

2. 研究実施体制

（1）鈴木・ウイルス感染グライコミクスグループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 康夫（静岡県立大学・薬学部・薬学科、教授）
- ② 研究項目：ウイルス感染における機能グライコミクスの推進

（2）岡・糖鎖関連遺伝子改変グループ

- ① 研究分担グループ長：岡 昌吾（京都大学・大学院・薬学研究科、助教授）
- ② 研究項目：CD57/HNK-1糖鎖関連遺伝子改変によるウイルス感染防御機構の解析

（3）加藤・構造解析グループ

- ① 研究分担グループ長：加藤 晃一（名古屋市立大学・院・薬学研究科、教授）
- ② 研究項目：糖鎖とウイルスタンパク質の三次元構造、両者の相互作用様式の解析、およびウイルス、宿主が発現している糖鎖構造の迅速決定

（4）小林・ナノ糖鎖クラスターグループ

- ① 研究分担グループ長：小林 一清（名古屋大学・院・工学研究科、教授）
- ② 研究項目：ナノ糖鎖クラスターによるウイルス阻害剤およびウイルス検出剤の創製

（5）星野・HIV感染における糖鎖機能解析グループ

- ① 研究分担グループ長：星野 洪郎（群馬大学・医学部、教授）
- ② 研究項目：糖鎖機能解析によるHIV感染の制御

（6）森田・糖鎖機能によるデングウイルス感染の制御

- ① 研究分担グループ長：森田 公一（長崎大学・熱帯医学研究所・病原体解析部門・分子構造解析分野、教授）
- ② 研究項目：糖鎖機能解析によるデングウイルス感染の制御