

「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 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

本研究のキーワードは「ウイルス感染」、「機能的グライコミクス」、「創薬」である。本研究では、変異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、インフルエンザウイルス）を取り上げている。平成15年度では、感染の場（宿主細胞への受容・侵入、宿主細胞からの出芽、宿主間伝播、病原性発現など）における糖鎖の新しい役割を解明し、数種の新しいウイルス感染阻止分子を開発した。すなわち、1）インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ（NA）スパイクの新機能の発見、2）トリ、ヒトインフルエンザウイルスのシアロ糖鎖受容体認識特異性・宿主間伝播機構解析および感染における糖鎖合成遺伝子群の解析、3）全てのA亜型、B型インフルエンザウイルスに対する新受容体ガングリオシドの発見、部分構造解析、4）スペイン風邪インフルエンザウイルス粒子の再生と受容体糖鎖認識特異性の解明、5）インフルエンザウイルス粒子スパイク糖タンパク質糖鎖の構造解明と宿主依存性修飾、6）デングウイルスの宿主（ヒトおよびカ）細胞上の糖鎖受容体の発見と部分構造解析、7）インフルエンザウイルスの吸着、出芽の両者を阻止する新シアロ糖鎖、全ての型（A亜型、B型）の感染を阻止出来るウイルス受容体シアロ糖鎖発現ポリマー、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン3量体受容体結合ポケット結合性新シアロ糖鎖含有環状ペプチド(Tailored blockerと命名)などの創製、ウイルス検出センサー、インフルエンザ、パラインフルエンザウイルスシアリダーゼ阻害糖鎖分子など、創薬に繋がる数種の新糖鎖分子の開発、などを進めた。今後さらに、本研究を発展させ、創薬への実現をはかる。また、糖鎖と創薬に関するシンポジウム（「新しい糖鎖研究：ポストゲノム創薬のターゲットとして」於：静岡県立大：平成15年5月9日）を企画・実行し、数種の糖鎖関連国際会議（International Meeting on Glycovirolgy- VIRUSES AND GLYCANS- 6/15～18(03); Glyco-Neurobiol.-Glycolipids, Glycoproteins and other Glycoforms 2/8～11(04)、台北；Interlec 21：5/23～28(04)、湘南国際村；Sialobiology 2004：7/27～30(04)、スコットランド、他）の組織委員（日本側代表を含む）を務めた。

2. 研究実施内容

研究目的、方法：「ウイルス感染」、「グライコミクス」、「創薬」を融合させた新たな科学領域を開拓・確立する。そのために、ウイルスにおける糖鎖の役割やウイルスと宿主（細胞）との様々な相関における糖鎖の役割を解明し、その成果を創薬へと先駆的に応用する。具体的には、ウイルスの変異、流行、進化と糖鎖、病原性発現と糖鎖、ウイルスの宿主細胞受容体への吸着・侵入、増殖、細胞内交通、ウイルス構成分子のパッケージング、出芽などの感染過程における糖鎖、感染宿主細胞の応答と糖鎖、ウイルスの宿主域・宿主間伝播と糖鎖など、様々な角度から研究を進めた。ウイルス学、糖鎖生物学の手法に加えて、様々な新規糖鎖プローブの創製、新しい糖鎖分子認識解析法の開発、遺伝子変異ウイルス粒子の創製、糖鎖合成遺伝子群解析なども導入した。

結論：1) インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ糖タンパク質スパイク (NA) の新機能の発見：NAは、ウイルスの宿主域決定、世界流行起因抗原、ウイルスの増殖性に関わる新機能を持つことを発見した。主に腸管感染するカモウイルスのNAは、気道感染するヒトやブタウイルスのNAとは異なり、酸性環境で安定なこと、1957年に世界流行したヒトH2N2型ウイルス（アジア風邪）と1968年に出現したH3N2型ウイルス（ホンコン風邪）は、カモ由来ウイルスに類似したlow-pH安定性を保持していること、酸性安定性は、344Arg→Lysと466Phe→Leuへのわずか2つのアミノ酸置換に起因すること、NAの酸性安定性は、ウイルスの増殖性に関係していることを見いだした。さらに、1971年以降のH3N2株NAは、ホンコン風邪ウイルス株NAを受け継いだのではなく、低pH安定性を示さないH2N2株NAを受け継いでいた。これから、H3N2型ウイルスが、出現後、短期間でH2N2型ウイルスと再びヒトの中で遺伝子交雑したことが判明し、ウイルスの世界流行における新たなNAの役割を見いだした。2) トリ、ヒトインフルエンザウイルスのシアロ糖鎖受容体認識特異性相違・宿主間伝播機構および感染における糖鎖合成遺伝子群の解析：トリおよびヒトインフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）が認識する受容体シアロ糖鎖は異なることを発見。これにより、高病原性トリインフルエンザウイルスとそれに感染したヒトウイルスHAの特異性調査が可能となった。また、マイクロアレーによる解析から、糖鎖合成遺伝子群（ST6GalNAcII、B4GalT7）、および誘導遺伝子群（MBP、Syndecan-4）がインフルエンザウイルス感染特異的に誘導されることを見いだした。3) 全てのA亜型、B型インフルエンザウイルスに対する新糖鎖受容体、トリおよびヒトインフルエンザウイルス受容体ガングリオシドの発見：分子内にトリ、ヒト、ウマ、ブタなどから分離される全てのインフルエンザウイルスに結合するガングリオシド（共通レセプター）を発見、精製し、部分構造を明らかにした。さらに、トリ、ウマインフルエンザウイルスに特異的な受容体として、シアリルパラグロボシド（NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer）を同定、ヒトインフルエンザウイルス受容体の単離にも成功した。4) スペイン風邪インフルエンザウイルス粒子の再生と受容体糖鎖認識特異性の解明：1918年に世界流行し2000万人以上の死者を出したスペイン風邪インフルエンザウイルス遺伝子からウイルス粒子を再生し、その高い病原性、受容体認識特異性を初めて明らかにした（論文投稿中）。5) インフルエンザウ

ウイルス粒子スパイク糖タンパク質糖鎖の構造解明と宿主依存性修飾：インフルエンザウイルスA/Memphis/1/71 (H3N2)には、高マンノース型糖鎖に加えて複合型糖鎖や混成型糖鎖が存在すること、その多くは硫酸化されていること、その組成は宿主により修飾を受けることを見いだした。6) デングウイルスの宿主（ヒトおよびカ）細胞上の糖鎖受容体の発見と部分構造解析：ウイルス感受性の細胞（ヒト赤芽球細胞、カ由来腸管細胞）からデングウイルス結合性糖鎖分子の単離・同定（スフィンゴ糖脂質）、その構造を解明した。昆虫細胞から得られた糖脂質は未報告の新規糖脂質分子であった（特許出願申請済み）。ヒト赤芽球細胞由来の糖脂質のオリゴ糖鎖による感染阻止作用を発見、このオリゴ糖鎖をクラスター状に有する新規化合物（デンドリマー）を開発、その阻害効果を調べた結果、ウイルスの宿主細胞への結合阻害活性を見出した。デングウイルスに感受性の実験動物は無い。そこでマウスに感染可能な日本脳炎ウイルスの遺伝子にデングウイルスのPrM-E蛋白遺伝子を挿入したキメラウイルスの作成に成功した。これにより、デングウイルス感染阻害剤の個体レベルでの評価試験が可能になった。7) 創薬への応用：6位硫酸化N-アセチルグルコサミン（6-sulfo-GlcNAc）は、シアル酸と高い分子相同性を持つこと、シアリダーゼの阻害分子として機能する可能性を見いだした。そこで、種々の置換基を導入した6-sulfo-GlcNAcを分子設計し、化学合成した結果、優れたインフルエンザウイルスシアリダーゼ活性阻害分子を見いだした。また、インフルエンザウイルスの吸着、出芽の両者を阻止する新シアロ糖鎖、全ての型（A亜型、B型）の感染を阻止出来るインフルエンザウイルス受容体シアロ糖鎖発現ポリマー、インフルエンザウイルスのHA 3量体受容体結合ポケットへ精密にはまり込み感染を阻止する新しいシアロ糖鎖発現環状ペプチド(Tailored blockerと命名)などを創製した。インフルエンザウイルス検出センサー、パラインフルエンザウイルスHN 阻害糖鎖分子の創製など、創薬に繋がる数種の新糖鎖分子の開発に成功した。8) 付随的成果：モンシロチョウ幼虫のアポトーシス誘導毒素（pierisin-1）に対する受容体が糖脂質であることを発見、その糖鎖構造を解明した。シガ毒素に対する糖鎖性受容体の大腸上皮細胞上の分子分布を明らかにした。

3. 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とウイルス感染における糖鎖遺伝子群の解析

(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

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Chao-Tan Guo, Xue-Long Sun, Osamu Kanie, Kennedy Francis Shortridge, Takashi Suzuki, Daisei Miyamoto, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Chi-Huey Wong, and Yasuo Suzuki: An O-glycoside of sialic acid derivative that inhibits both hemagglutinin and sialidase activities of influenza viruses. *Glycobiol.*, 12, 183-190 (2002)
- Rika Komagome, Hirofumi Sawa, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Shinya Tanaka, Walter J. Atwood, Kazuo Nagashima: Oligosaccharides as receptor for JC virus. *J. Virol.*, 76, 12992-13000 (2002)
- Kazuhide Totani, Takeshi Kubota, Takao Huroda, Takeomi Murata, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kazukiyo Kobayashi, Hisashi Ashida, Kenji Yamamoto, and Taichi Usui: Chemoenzymatic synthesis and application of glycopolymers containing multivalent sialyloligosaccharides with a poly(L-glutamic acid) backbone for inhibition of infection by influenza viruses. *Glycobiol.* 13, 315-326, (2003)
- Shinji Kojima, Teruaki Hasegawa, Takahiro Yonemura, Ken Sasaki, Kenji Yamamoto, Yutaka Makimura, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki,

and Kazukiyo Kobayashi: Ruthenium complexes carrying a disialo complex-type oligosaccharide: enzymatic synthesis and its application to a luminescent probe to detect influenza viruses.

Chem. Comm. 11, 1250–1251, (2003)

- Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, and Yasuo Suzuki: A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases.
FEBS Lett. 543, 71–75, (2003)
- Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Daisuke Nishinaka, Masanori Murakami, Satoshi Fujii, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, Yu-Teh Li and Yasuo Suzuki: Inhibition of influenza A virus sialidase activity by sulfatide.
FEBS Lett. 553, 355–359, (2003)
- Takashi Ohta, Nobuaki Miura, Naoaki Fujitani, F Nakajima, Kenichi Niikura, Guo Chan-Ten, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kenji Monde, and Shin-Ichiro Nishimura: Glycotentacles: Synthesis of cyclic glycopeptides toward a tailored blocker of influenza virus hemagglutinin.
Angew. Chem. Int. Ed. 42, 5186–5189, (2003)
- Yuko Matsushima-Hibiya, Masahiko Watanabe, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, Yasuo, Suzuki, Takeshi Kasama, Takashi Kanazawa, Kotaro Koyama, Takashi Sugimura, Keiji Wakabayashi: Identification of glycosphingolipid receptors for pierisin-1, a guanine-specific ADP-ribosylating toxin from the cabbage butterfly.
J. Biol. Chem. 278, 9972–9978, (2003)
- Masahiro Nagaya, Jun Kobayashi, Noriko Takahashi, Koichi Kato, and Tetsuro Yoshimura Two-dimensional High Performance Liquid Chromatography Mapping of Sugar Chains Demonstrated the Biantennary, Complex *N*-Glycan Addition to the Recombinant Glycoprotein Produced by Baculovirus-Infected *Antheraea pernyi* Insect Cells.
Journal of Insect Biotechnology & Sericology 72, 79–86 (2003)
- Yasuyuki Imai, Takashi Fukui, Khota Kurohane, Daisei Miyamoto, Yasuo Suzuki, Tomoyuki Ishikawa, Yousuke Ohno, Masaki Miyake: Restricted Expression of Shiga Toxin Binding Sites on Mucosal Epithelium of Mouse distal colon.
Infection and Immunity, 71, No.2, 985–990 (2003).
- Bai Y, Soda Y, Izawa K, Tanabe T, Kang X, Tojo A, Hoshino H, Miyoshi H, Asano S, Tani K. Effective transduction and stable transgene expression in

human blood cells by a third-generation lentiviral vector.

Gene Ther. 10, 1446-1457 (2003).

- Kusagawa S, Imamura Y, Yasuoka A, Hoshino H, Oka S, Takebe Y.
Identification of H1N1 type 2 subtype B transmission in East Africa.. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003, 19, 1045-1049.
- Kazunori Oishi, Shingo Inoue, Tsuyoshi Kuramoto, Shozaburo Onizuka, Mariko Saito, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita, and Tsuyoshi Nagatake: Association of dengue virus type-specific IGG on platelets is specific for the acute phase in an imported Japanese patient with secondary dengue virus infection. *J. J. Trop. Med. Hygn.* Vol. 31:223-225 (2003).
- Kazunori Oishi , Shingo Inoue, Maria T.D.D.Cinco, Efren M. Dimaano , Maria T.P. Alera , Jhoe A.R Alfon, Ferdinand Abanes, Deu J.M.Crus, Ronald R.Matias, Hiromi Matsuura, Futoshi Hasebe, Susumu Tanimura, Atsushi Kumatori, Kouichi Moirta, Filipinas F. Natividad, and Tsuyoshi Nagatake : Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J. Med. ViroL.* 71:259-264 (2003).
- Shingo Inoue, Kouichi Morita, Matias R.R., Tuplano J.V., Resuello R.R.G., Candelario J.R., Cruz D.J.M., Mapua C.A., Futoshi Hasebe, Akira Igarashi, and Natividad F.F. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *J. Med. Primatol.*, 32:89-94 (2003).
- Daisuke Ogawa, Kenichi Shikata, Koichi Honke, Shinichi Sato, Mitsuhiro Matsuda, Ryo Nagase, Atsuhito Tone, Shinichi Okada, Hitomi Usui, Jun Wada, Masayuki Miyasaka, Hiroto Kawashima, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki, Naoyuki Taniguchi, Yukie Hirahara, Keiko Tadano-Aritomi, Ineo Ishizuka, Thomas F. Tedder, and Hirofumi Makino: Cerebroside sulfotransferase deficiency ameliorates L-selectin-dependent monocyte infiltration in the kidney after ureteral obstruction. *J. Biol. Chem.* 279(3), 2085-2090 (2004).
- Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Takehiko Saito, Guo Chan-Ten, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, and Yasuo Suzuki: Evolutional analysis of human influenza A virus N2 neuraminidase genes based on the transition of the low-pH stability of sialidase activity. *FEBS. Lett.* 557, 228-232 (2004).
- Kenji Sasaki , Yoshihiro Nishida, Mikie Kambara, Hirotaka Uzawa, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, and Kazukiyo Kobayashi: Design of

N-acetyl-6-sulfo-beta-d-glucosaminide-based inhibitors of influenza virus sialidase.

Bioorg. Med. Chem. 12 (6), 1367-1375 (2004).

Kiyoshi Ikeda, Satoru Kitani, Kazuki Sato, Takashi Suzuki, Chika Hosokawa, Yasuo Suzuki, Kiyoshi Tanaka, and Masayuki Sato: 2 β ,3 β -Difluorosialic acid derivatives structurally modified at the C-4 position: synthesis and biological evaluation as inhibitors of human parainfluenza virus type 1.

Carbohydr. Res. 339, 1367-1372 (2004)

- Motohiro Shimizu, Shigeki Furuya, Yoko Shinoda, Junya Mitoma, Tadashi Okamura, Ichiro Miyoshi, Noriyuki Kasai, Yoshio Hirabayashi, Yasuo Suzuki: Functional analysis of mouse 3-phosphoglycerate dehydrogenase (*phgdh*) gene promoter in developing brain.

J. Neuroscience Res., 76, 623-632 (2004).

- S. Kakuda, S. Oka, T. Kawasaki: Purification and characterization of two recombinant human glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate in *Escherichia coli*.

Protein Expr. Purif. 35 (1), 111-119 (2004).

- Hong Thi Cam Thai, Mai Quynh Le, Cuong Duc Vuong, Manmohan Parida, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus.

J. Clin. Microbiol. 42, 1956-1961(2004).

- Phan Thi Nga, Maria del Carmen Parquet, Vuong Duc Cuong, Shao-Ping Ma, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Yoshihiro Makino, Masahiro Takagi, Vu Sinh Nam and Kouichi Morita. Shift in JEV genotype circulating in northern Vietnam: Implication for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia.

Journal of General Virology. 85, 1625-1631 (2004).

- Manmohan Parida, Guillermo Posadas, Shingo Inoue, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita. Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus.

J. Clin. Microbiol. 42, 257-263 (2004).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：国際特許2件（CREST研究期間累積件数：4件）