「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

本研究は、糖鎖生物学、糖鎖遺伝子、ウイルス学、糖鎖の有機化学合成、糖鎖の構造解 析などの専門家が一丸となって、「創薬を指向する糖鎖ウイルス学」分野を創生する目的で、 「ウイルス感染」、「糖鎖機能」、「創薬」をキーワードとして発足した。平成17年度もこれ に沿った研究を推進した。特に、1)アジア、ヨーロッパに拡散しつつある高病原性トリ インフルエンザウイルスのヒトへの伝播機構、ウイルス受容機構に関わる糖鎖ウイルス学 研究、2)トリインフルエンザウイルスがひとーヒト間伝播を可能とする変異を高感度で 監視する新しい簡便法の開発、3)インフルエンザウイルス受容体破壊酵素(ノイラミニ ダーゼ)の全く新しい機能(トリ、ヒトを区別する宿主域決定因子、ウイルス増殖性など) の発見、4)インフルエンザウイルスの感染分子機構、5)本研究で解明されたデングウ イルス受容体糖鎖を担持する合成デンドリマーの動物レベルでの感染阻害の発見、6)ウ イルス、宿主細胞、ウイルス感染阻害候補物質などが発現する糖鎖の多次元HPLC法やNMR法 による迅速決定、7) 高いワクチン効果を持つ糖鎖欠失エイズウイルスの弱毒化のメカニズ ムの解析と、有効で安全なワクチン開発の基盤の構築、8) 重篤な感染症の原因ウイルス (HIV-1、HTLV-I、HCV、HBV) について、新たに開発した定量法を用いたウイルスの細胞侵 入機構の解析と、糖鎖に関連した抗ウイルス剤の開発、9)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、10)ヒトパラインフルエンザウイルスの受 容体結合領域の分子構造の解明などを中心とした研究が進んだ。今年度の特徴として、現 在流行している高病原性トリインフルエンザウイルスの受容体シアロ糖鎖認識研究に見ら れる、よりリアルタイムな研究の進展、細胞レベルから進んで、動物レベルに有効な抗ウ イルス剤の開発研究など、より応用的、実用的研究が行われたことが挙げられる。今後さ らに、本研究を発展させ、創薬への実現をはかる。

### 2. 研究実施内容

研究目的、方法:「糖鎖機能」、「ウイルス感染」、「創薬」を融合した新科学領域を開拓・確立する。そのために、ウイルスの宿主間伝播、抗原変異、病原性発現、流行、進化と糖鎖、

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、感染過程における糖鎖、感染宿主細胞の応答と糖鎖、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、新たなリバースジェネティクス手法による人工変異ウイルス粒子の創製、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、糖鎖合成遺伝子群解析などを駆使した。

結論: 1)アジア、ヨーロッパに拡散しつつある高病原性トリインフルエンザウイルスのヒ トへの伝播機構、ウイルス受容機構に関わる糖鎖ウイルス学研究: ヒトの気道上皮細胞(初 代培養細胞)にはこれまで知られていないトリインフルエンザウイルスと結合するレセプターシアロ 糖鎖が存在することを見出した。これにより、高病原性トリインフルエンザウイルスをニワトリから高濃 度且つ直接暴露された場合、ヒトへの伝播が起こりうることを明らかにした。さらに、2003 年に南中 国で高病原性トリインフルエンザウイルス(H5N1 亜型)に感染した少年から分離されたウイ ルスは、トリウイルスとは異なり、ヒトへ感染可能な変異を遂げていたこと、すなわち、 Neu5Ac2-6Gal と Neu5Ac2-3Gal の糖鎖のいずれにも結合性を持つことを明らかにした。さ らに、ベトナムにおいて予防薬的に抗インフルエンザ薬であるリン酸オセルタミビルを投 与された少女から分離されたウイルス株の中に、Neu5Ac2-6Gal 認識性を獲得し、リン酸オ セルタミビルに抵抗性をもつウイルスが出現したことを初めて見出した。これらの発見は、 高病原性トリインフルエンザウイルスはひとーヒト間伝播可能な変異を遂げつつあり、い つかヒトの間で高病原性を維持したまま世界的流行(パンデミック)を始める可能性を示 した。2) トリインフルエンザウイルスがヒトーヒト間伝播を可能とする変異を高感度で 監視する新しい簡便法の開発:上記の事実を背景に、トリインフルエンザウイルスがヒト 型へ変異する兆しを高感度に監視する新しいシステム構築に関する実験を開始し、ほぼ完 成の域に達した。すなわち、ヒトインフルエンザウイルスに対する主要レセプター分子お よびトリインフルエンザウイルスに対するレセプター分子と予想される糖鎖構造を模倣し た人工糖鎖ポリマーおよび組換え体糖転移酵素を用いて創製した人工糖タンパク質を作成 した。これらの物質を用いて、トリとヒト由来のインフルエンザウイルスの結合特異性を 定量化する測定方法を開発した。本測定システムは、ヒトへ直接感染したトリインフルエ ンザウイルスのヒトからヒトへの感染を予測するための測定法、測定キットの開発につな がるものと期待される。次年度以降、実用化を目指す。3)インフルエンザウイルス受容 体破壊酵素(ノイラミニダーゼ)の全く新しい機能(トリ、ヒトを区別する宿主域決定因 子、ウイルス増殖性など)の発見:シアリダーゼ活性のlow-pH 安定性を保持している香港 かぜウイルス A/Hong Kong/1/68 (H3N2)株をマウスに 12 回継代すると、NA の 468 番目の アミノ酸残基のみが Pro から His に変異することが報告されている。そこで、A/Hong Kong/1/68 株 NA の 468 番目を His に置換した NA 発現プラスミドを構築し、293T 細胞に発 現させた NA を用いてシアリダーゼ活性の low-pH 安定性に及ぼすアミノ酸置換の影響を親 株 NA と比較した。その結果、A/Hong Kong/1/68 (H3N2)株 NA の 468 番目のアミノ酸残基 を Pro から His に変異するとシアリダーゼ活性の low-pH 安定性が消失することが判明した。

- 4) インフルエンザウイルスの感染分子機構:4-1) 近年、インフルエンザウイルスの感染 には糖脂質ばかりでなく、ある N-結合型糖タンパク質が宿主への感染に必要であることを 示唆する報告がされた。そこで本年度、インフルエンザウイルスが結合する宿主細胞膜由 来の糖タンパク質受容体候補の検索を、PVDF 膜ブロットを用いた Immunostaining 法(PVDF membrane blot/ Immunostaining )で行ない、ウイルスシアリダーゼ感受性で、ウイルスへ マグルチンを介してウイルスと結合性する、すなわち、ウイルス結合性宿主細胞膜由来糖 タンパク質候補を少なくとも3つ見いだした。これらは、推定分子量約200-250KDa、170KDa、 85KDa のタンパク質であり、85KDa タンパク質は N-型糖タンパク質で、N-型糖鎖がウイルス 結合に関与することが示された。4-2) インフルエンザウイルスの宿主細胞への侵入過程に、 p38MAPK カスケードが関与することを見いだした。インフルエンザウイルスの侵入時に p38MAPK 阻害剤を添加することで、ウイルスの亜型、型に依存せず、 ウイルス感染は約 70% 阻害された。p38MAPK活性化阻害がウイルスの細胞侵入を部分的に抑制することから、この 酵素群カスケードがウイルス侵入の制御因子の1つであることが確認された。4-3) 甘草に 含まれる生薬成分グリチルリチン酸(GL)は、C 型肝炎ウイルスの治療薬として広く日本で用 いられている。GL の作用機序は未だ不明であるが、免疫賦活活性、抗腫瘍活性に加え、HIV や SARS ウイルスなどにも抗ウイルス効果をもつ。GL とその誘導体に抗インフルエザンザウ イルス効果があるか否かを調べた結果、GL や誘導体の一部はウイルス感染をウイルス複製 過程で阻害する可能性を見いだした。
- 5) デングウイルス受容体糖鎖を担持する合成デンドリマーの動物レベルでの感染阻害の 発見:パラグロボシドのオリゴ糖オリゴ糖クラスターを発現する新規化合物(デンドリマ 一)を開発、その阻害効果を調べた結果、特定の型のデンドリマーにデングウイルス感染 阻害作用が認められた(埼玉大・工・照沼大陽教授、長崎大・森田公一教授との共同研究、 特許出願済み)。さらに、マウス動物感染モデルを用いて、細胞レベルで効果が観察された デンドリマーのデングウイルス感染に対する阻害効果を調べた結果、ウイルス感染後に起 きる血液中の抗ウイルス抗体価の上昇が有意に抑制されることが観察され、初めて本デン ドリマーが動物レベルでも効果があることが示唆された。6)ウイルス、宿主細胞、ウイルス 感染阻害候補物質などが発現する糖鎖の多次元 HPLC 法や NMR 法による迅速決定: 6-1) バ キュロウイルス発現系を用いた糖転移酵素およびヘマグルチニンの発現:多種多様な糖鎖 ライブラリーを構築するためには、糖転移酵素を用いた糖の付加が必須となる。様々な糖 転移酵素(FucT-VII、GlcNAc6ST-1、GalT-IV など)およびヘマグルチニンをバキュロウイ ルス発現系の構築を行うことに成功した。一連の糖転移酵素を用いればインフルエンザウ イルスの標的糖鎖のスクリーニングを行うことが可能となる。6-2) <u>ウイルス宿主の糖鎖プロ</u> ファイリング: インフルエンザウイルスは腸管を宿主として増殖する。 その増殖メカニズムを 理解するためウズラとニワトリの腸管由来の糖鎖プロファイリングを行った。その結果、 ウズラの腸管の N型シアロ糖鎖には $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸が 63 %存在しており、 $\alpha$ 2-3 結合 のシアル酸が 37 %存在していた。一方、ニワトリの腸管には 90 % がα2-6 結合したシアル

酸が存在していた。この結果はインフルエンザウイルスの変異および宿主間の伝播のメカ ニズムを解明するための基盤となった。6-3) Opisthorchis viverrini 由来の糖鎖プロファイリ ング: Opisthorchis viverrini は東ヨーロッパやアジアに広く分布する寄生虫であり、肝癌な どの様々な肝臓の病気を引き起こすことが知られている。寄生虫に発現している糖鎖は宿 主への感染や抗原性と深く関与している。Opisthorchis viverrini の感染メカニズムの解明の 第一歩としてこの寄生虫に発現している N 型糖鎖の構造解析を行った。その結果、コンプレ ックス型糖鎖が 28 %、ハイマンノース型糖鎖が 69 %存在していることが明らかとなった。コ ンプレックス型糖鎖はガラクトース残基が結合しておらず、また多分岐型は存在しなかっ た。ハイマンノース型糖鎖の中にはグルコースが 1 残基結合した糖鎖が 5%含まれていた。 7) 高いワクチン効果を持つ糖鎖欠失エイズウイルスの弱毒化のメカニズムの解析と有効 で安全なワクチン開発の基盤の構築 : 7-1) 糖鎖欠失サル免疫不全ウイルス (SIV) (Δ5G) の <u>初期感染解析による弱毒化のメカニズム解析</u>:エイズウイルス感染の初期感染過程はその 後の病態を決定する重要な要因であり、糖鎖欠失 SIV(Δ5G)の弱毒化も初期感染に病原性 ウイルス感染との違いがあることが推測された。そこで、糖鎖欠失変異株 Δ 5G と病原性野 生株 SIV239 それぞれの感染後1〜2週間で採取した主要な感染標的組織の免疫組織学的解 析により感染細胞の局在と同定ならびにその経時変化の解析を行った。その結果、 $\Delta 5G$ と SIV239 の標的細胞は同じ (T 細胞) であるが、 $\Delta 5G$  のリンパ系組織での感染細胞は一過性 にのみ検出されることが示された。さらに Δ5G は病原性 SIV 感染で報告されているような 急激なメモリーCCR5+ CD4 T細胞の消失が少なかった。これらの結果から、Δ 5G 感染で は標的組織での細胞傷害が少ないことが推測され、このことは初期感染によって引き起こ されるウイルス特異的免疫誘導にも有利であると考えられた。7-2) 糖鎖欠失ウイルスのウ イルス学的性状と弱毒化との関連:昨年度までの in vitro 解析から∆ 5G は細胞指向性、中 和抗体感受性が SIV239 とは異なることを明らかにし、Δ 5G の 5 か所の糖鎖欠失変異のど れがこれらのウイルス学的性状変化に関与するのかを同定した。この結果に基づき、ウイ ルス学的性状の異なる新たな2種の5糖鎖欠失SIVと性状はΔ5Gと同じであるが3糖鎖欠 失変異しか持たない SIV を作製し、サルへの感染実験を開始した。現在、感染後 20 週を経 過した時点であり、感染後40〜50週までの経過観察と病原性ウイルスのチャレンジ感染実 験を計画している。8)重篤な感染症の原因ウイルス(HIV-1、HTLV-I、HCV、HBV)につい て、新たに開発した定量法を用いたウイルスの細胞侵入機構の解析と、糖鎖に関連した抗 ウイルス剤の開発:G タンパク質共役受容体(G protein-coupled receptors, GPCRs)に属 するケモカイン・レセプター (chemokine receptors, CKRs) の多くは、ヒト免疫不全ウイ ルス (human immunodeficiency viruses, HIVs)、あるいはサル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency viruses, SIVs) のコレセプターとして機能する。CKR の多くは、細胞外 に配位するアミノ末端領域 (amino-terminal region, NTR) に N 型糖鎖結合シグナルを有 するが、その役割は不明である。 11種類のCC型CKR(CCR1、CCR2b、CCR3、CCR4、CCR5、 CCR6、CCR7、CCR8、CCR9B、CCR10、CCR11)、6 種類の CXC 型 CKR (CXCR1、CXCR2、CXCR3、

CXCR4、CXCR5、CXCR6)、CX3C 型 CKR である CX3CR1、XC 型 CKR である XCR1、非典型型 CKR である D6、および CKR 関連 GPCR であるフォルミルペプチド・レセプターFML1 の遺伝子を、 発現ベクターpMX-puro あるいは pCX-bsr にクローニングした。これらの発現ベクターを、 ヒトglioma 由来 CD4 陽性細胞 NP-2/CD4 にレトロウイルスベクターを用いて導入して発現 させ、HIV あるいは SIV を暴露して、CKR のコレセプター活性を調べた。CCR2b、CCR4、CCR7、 CXCR1、CXCR2、CXCR3 を除く全ての CKR に、HIV/SIV のコレセプター活性を検出した。コレ セプター活性と CKR の NTR の N 型糖鎖結合シグナルの有無とは相関しなかった。また、D6 と FML1 においては、NTR の N 型糖鎖結合シグナルを遺伝子工学的に欠失させても、コレセ プター活性は維持された。従って、NTRにおけるN型糖鎖結合シグナルは、CKRのHIV/SIV のコレセプター活性に必須ではないと考えられた。しかし、それらがコレセプターと HIV/SIV との結合に関与することで、コレセプター活性の効率に影響する可能性が考えられ る。また、N型糖鎖結合シグナルは、多くのCKRのNTRにみとめられることから、CKRの機 能にかかわる可能性がある。さらに、コレセプターGPR1 の N 末 27 アミノ酸残基の著名な HIV-1 感染抑制効果を発見した。今後、HIV/SIV のコレセプター機能解析を通して、CKR 分 子における糖鎖の役割を明らかにしていく予定である。9)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:これまで、6位に硫酸基を持つ N-アセチルグ ルコサミンやガラクトサミン誘導体に、シアリダーゼ阻害活性やヘマグルチニン結合活性 があることを見出してきた。その一方で、これら硫酸化糖誘導体は細胞試験においては、 十分なウイルス増殖や感染阻害効果を示さないことが判明した。以上の結果をもとに、硫 酸基のカウンターイオンとして働くグアニジル基を持つ L-アルギニンを、アグリコン部分 に導入した糖アルギニン誘導体 (6-sulfo-GalNAc-Arg, 6-suofo-GlcNAc-Arg) を新たに設計 した。活性を調べたところ、硫酸基を持たない糖アルギニン誘導体が、濃度依存的にイン フルエンザウイルスの細胞感染を抑えることがわかった(IC₅ = 30~50 μM)。活性を示した 化合物はカルボキシル基や硫酸基のようなアニオン性基を持っておらず、シアル酸やシア ル酸-2-エン構造とは大きく異なる。これらはヘマグルチニン結合活性やシアリダーゼ阻害 活性を示さなかったことから、通常とは別の機構で細胞感染を阻害していることを意味し、 新しい感染阻害機構を提案できる可能性を含んでいる。又、生体内にある安価な糖とアミ ノ酸から、新しい分子骨格と機構に基づく抗インフルエンザ剤が開発できることを示した。 次のステップとして、さらに低濃度で阻害効果を示す化合物の分子設計を行った。我々は、 同時に行ってきた糖脂質に関する基礎研究の過程で、6位に特定の官能基(リン酸、コリ ン、アミン)を持つ糖脂質構造が、特徴的な自己組織構造の構築、温度に対する応答性、 抗原提示、病原性など重要な機能を果たす上で、重要な活性構造単位であることを明らか にしてきた。この研究結果を基に、L-アルギニンを D-グルコースの6位に結合させ、アグ リコンには、ジヒドロコレステロールを結合した糖脂質 (Arg-糖脂質) を設計した (図1)。 細胞を用いた活性試験で 6-Arg-糖脂質は極めて少ない量(20-40ナノモル)でも、イ ンフルエンザウイルスの細胞感染を阻害できる優れた作用を持つことが判った( $IC_{50}$  < 50 nM)。市販されている糖脂質はこのような阻害活性を示さないことを確認した。Arg-糖脂質や関連するアルギニル化糖は、インフルエンザ感染を予防する有望な薬剤と言える。感染メカニズムを明らかにする上でも重要な生化学試薬である。

Mol. Wt.: 706.01

Dihydrocholesteryl 6-L-arginyl-6-amino-6-deoxyα-D-glucopyranoside

図 1 Arg-糖脂質の構造

本研究で発見されたアルギニン糖脂質-Aは、ウイルスの感染を強力に抑える効果を持ち、 生体内成分から構築される新規糖脂質として、抗インフルエンザ剤として有望である。ア ルギニンル化糖はその糖脂質構造とすることで、ナノモルレベルでインフルエンザウイル スの細胞感染を防ぐ効果を示す。その具体的な作用機構を明らかにするため、新たに1) アルギニル化糖誘導体ライブラリーの構築と、2)フローサイトメトリーによる細胞試験 の実施が必要である。実用化にむけて安全性試験と適用範囲の確認を並行して行う。又、 本プロジェクトの班員との共同研究において、エイズウイルス、コロナウイルス、テング ウイルスなど、他のウイルスに対する効果を調べ、適用の拡大を図る。

10) <u>ヒトパラインフルエンザウイルスの受容体結合領域の分子構造の解明</u>: ヒトパラインフルエンザウイルス HN タンパク質遺伝子発現細胞を用いた赤血球吸着法により、シアル酸結合様式の認識特異性を規定するアミノ酸部位を解析した結果、2箇所のアミノ酸残基を置換することでシアロ糖鎖受容体認識特異性が大きく変化することが判明した。

#### 3. 研究実施体制

「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、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

「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・院・薬学研究科、助教授)

②研究項目: 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

「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

「西田・ナノクラスター」グループ

①研究分担グループ長:西田 芳弘(名古屋大学、助教授)

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」

ウイルスなどの感染症を予防、治療、診断するための糖鎖素材を分子設計して、具体的に機能評価することによって、糖鎖を分子ベースとする 新規医薬品、診断薬、感染予防素材を開発することを目的としている。

「星野/森・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、教授)

森 一泰 (国立感染症研究所、主任研究官)

②研究項目:糖鎖機能による HIV 感染の制御(星野 洪郎) 糖鎖機能解析による HIV 感染の制御(森 一泰)

「糖鎖機能によるデングウイルス感染の制御研究」グループ

- 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、教授)
- ②研究項目:
  - (ア) 分子設計技術により化学合成されたデングウイルスリセプター結合阻止物質 (左一八博士担当)のデングウイルス感染阻害効果の判定
  - (イ) デングウイルス感染モデルの改良:マウス血清中に存在するデングウイルス 感染阻害物質の探索

# 4. 主な研究成果の発表(論文発表および特許出願)

- (1) 論文(原著論文)発表
- Q. Mai Le, Maki kiso, Kazuhiko Someya, Yuko T. Sakai, T. Hien Nguyen, Khan H. L. Nguyen, N. Dinh Pham, Ha H. Ngyen, Shinya Yamada, Yukiko Muramoto, Taisuke Horimoto, Ayato Takada, Hideo Goto, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Yoshihiro Kawaoka: Isolation of drug-resistant H5N1 virus

Nature, 437, 1108 (2005)

Takumi Furuta, Minatsu Sakai, Hiroyasu Hayashi, Tomohiro Asakawa, Fumi Kataoka, Satoshi Fujii, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Kiyoshi Tanaka, Nathan Fishkin and Koji Nakanishi: Design and Synthesis of Artificial Phospholipid for Selective Cleavage of Integral Membrane Protein.

Chem. Comm. 36, 4575-4577 (2005)

- Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Chao-Tan Guo, Kazuya I. P. Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, Hideo Goto, Yoshihiro Kawaoka, Yasuo Suzuki: Sialidase activity of influenza A virus in a endocytic pathway enhances viral replication J. Virol. 79, 11705-11715 (2005)
- Kyoko Shinya, Masato Hatta, Shinya Yamada, Ayato Takada, Shinji Watanabe, Peter Halfmann, Taisuke Horimoto, Gabriele Neumann, Jin Hyun Kim, Wilina Lim, Yi Guan, Malik Peiris, Makoto Kiso, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Yoshihiro Kawaoka: Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003.

J. Virol. 2005 79, 9926-32 (2005)

Cazuya I.P.J. Hidari, Nobuhiro Horie, Takeomi Murata, Daisei Miyamoto, Takashi Suzuki, Taiichi Usui, and Yasuo Suzuki: Purification and characterization of a soluble recombinant human ST6Gal I functionally expressed in *Escherichia coli*.

Glycoconjugate J. 22 1-11 (2005)

O Toshihiro Kogure, Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Daisei Miyamoto, Kazuya I.P.J. Hidari, Guo Chao-Tan, Toshihiro Ito, Yoshihiro Kawaoka and Yasuo Suzuki: Human trachea primary epithelial cells express both sialyl2-3Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl-2-6-Gal receptor for human influenza viruses.

Glycoconjugate J., 23, 99-104 (2006)

 H. Tagawa, Y. Kizuka, T. Ikeda, S. Itoh, N. Kawasaki, H. Kurihara, M. L.
 Onozato, A. Tojo, T. Sakai, T. Kawasaki, and S. Oka Non-sulfated form of the HNK-1 carbohydrate is expressed in mouse kidney

J. Biol. Chem. 280 (25), 23876-23883 (2005).

M. Hirano, B. Y. Ma, N. Kawasaki, K. Okimura, M. Baba, T. Nakagawa, K. Miwa, N. Kawasaki, S. Oka, and T. Kawasaki Mannan-Binding Protein Blocks the Activation of Metalloproteases Meprin alpha and beta.

J. Immunology 175 (5), 3177-3185 (2005).

M.Terada, K.H. Khoo, R. Inoue, C.I. Chen, K. Yamada, H. Sakaguchi, N.
 Kadowaki, B. Y. Ma, S. Oka, T. Kawasaki, and N. Kawasaki Characterization of

oligosaccharide ligands expressed on SW1116 cells recognized by

Mannan-binding protein a highly fucosylated polylactosamine type N-glycan. *J. Biol. Chem.* 280 (12), 10897-10913 (2005)

S. Kakuda, Y. Sato, Y.asuhiro Tonoyama, Shogo Oka, and Toshisuke Kawasaki.
 Different acceptor specificities of two glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate.

Glycobiology 15(2): 203-210 (2005).

O H.Yagi, N.Takahashi, Y.Yamaguchi, N.Kimura, K.Uchimura, R.Kannagi and K.Kato: Development of structural analysis of sulfated N-glycans by multi-dimensional HPLC mapping methods.

Glycobiology 15, 1051-1060 (2005)

- S.Sekiya, Y.Yamaguchi, K.Kato and K.Tanaka: Mechanistic elucidation of the formation of reduced 2-aminopyridine derivatized oligosaccharides and their application in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
   Rapid Communications in Mass Spectrometry 19, 3607-3611 (2005)
- O B.S.Wojczyk, N.Takahashi, M.T.Levy, D.W.Andrews, W.R.Abrams, W.H.Wunner and S.L.Spitalnik: N-glycosylation at one rabies virus glycoprotein sequon influences N-glycan processing at a distant sequon on the same molecule

  Glycobiology 15, 655-666 (2005)
- M. Suzuki, Y. Nishida, Y. Ohguro, K. Kobayashi: Functional 1,3-Benzodixoles Making a Fluorescent Response to Local Transformation in Chemo-reactive Pendant Group.

Heterocycles, 65 (5), 1051-1061 (2005)

 M. Suzuki, Y. Ohguro, Y. Nishida, M. Miyamoto, K. Kobayashi: Design of Photo-reactive Fluorescent Glycosyl Donor for Fabrication of Carbohydrate-based Functional Materials.

Lett. Org. Chem., 2, 323-329 (2005).

O Y. Shingu, A. Miyachi, Yoshiko Miura, K. Kobayashi, <u>Y. Nishida:</u> One-pot alpha-Glycosylation Pathway via in Situ Generation of Glycosyl Imidate in *N,N*-Dimethylformamide.

Carbohydrate Res., 340, 2236-2244 (2005)

- H. Kato, N. Kaneta, S. Nii, K. Kobayashi, N. Fukui, H. Shinohara and Y. Nishida: Preparation and Supramolecular Properties of Unadulterated Glycosyl Liposomes from a Bis(alpha-D-mannopyranosyl)[60] Fullerene Conjugates.
   Chem. Biodiversity 2, 1232-1241 (2005)
- $\bigcirc$  M. Suzuki, Y. Ohguro, K. Kobayashi and Y. Nishida: 1,3-Benzodioxole-based β and γ-Peptide Linkages Exhibiting Unique Fluorescence, Conformation and Self-association Properties.

Heterocycles, 65, 2395-2409 (2005)

- O Roy BB, Jinno-Oue A, Shinagawa M, Shimizu A, Tamura K, Shimizu N, Tanaka A, and Hoshino H.: Isolation of the feline alpha1,3-galactosyltransferase gene, expression in transfected human cells and its phylogenetic analysis.

  J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol. 306B, 59-69 (2005)
- Saha, M. N., Tanaka, A., Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Tamura, K., Shinagawa,
   M., Chiba, J., and Hoshino H: Formation of vesicular stomatitis virus
   pseudotypes bearing surface proteins of hepatitis B virus.

J. Virol., 79, 12566-12574 (2005)

- Jinno-Oue A, Shimizu N, Soda Y, Tanaka A, Ohtsuki T, Kurosaki D, Suzuki Y, and Hoshino H.: The synthetic peptide derived from the NH2-terminal extracellular region of an orphan G protein-coupled receptor, GPR1, preferentially inhibits infection of X4 human immunodeficiency virus type 1.
  J. Biol. Chem., 280, 30924-30934 (2005)
- Tamura K, Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Takagi H, Kato N, Morikawa A, and Hoshino H. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication.

Microbes Infect., 7, 29-40 (2005)

Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Nakayama EE, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y.: Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against simian immunodeficiency virus SIVmac239 in a macaque AIDS model.

J. Virol., 79, 10386-10396 (2005)

 Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita and Yoshihiro Makino.: Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to Vero cells.

Microbiol. Immunol., 49, 285-294 (2005)

Manmohan Parida, Kouhei Horioke, Hiroyuki Ishida, Paban Kumar Dash, Parag Saxena, Asha Mukul Jana, Mohammed Alimul Islam, Shingo Inoue, Norimitsu Hosaka, and Kouichi Morita: Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay.

J. Clin. Microbiol.,: 2895-2903 (2005)

Celia C. Carlos, Kazunori Oishi,\* Maria T. D. D. Cinco, Cynthia A. Mapua, Shingo Inoue, Deu John M. Cruz, Mary Ann M. Pancho, Carol Z. Tanig, Ronald R. Matias, Kouichi Morita: Filipinas F. Natividad, Akira Igarashi, And Tsuyoshi Nagatake. Comparison of Clinical Features and Hematologic Abnormalities Between Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Among Children in the Philippines.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 73, 435–440 (2005)

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita: Evaluation of Inapparent Nosocomial Server Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 12, 848-854 (2005)

O Leonora T.D. Salda, Maria D.C.Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Nobuyuki Kobayashi, Kouichi Morita: Molecular Epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: Genotype shift and local evolution.

Am.J.Trop.Med.Hyg.. 73, 796-802 (2005).

Nawa M., Takasaki T., Ito M., Inoue S., Morita K., and Kurane I.: Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Sero diagnosis of Dengue Virus Infection.

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology., 12, 1235-1237 (2005)

O Paresh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khana, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita: Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17.

Vaccine, 24, 402-411 (2006)

## (2) 特許出願

H17 年度出願件数:7件(CREST 研究期間累積件数:14件)