

「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

(中部大学生命健康科学部 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、「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、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、2002年11月に発足した。平成18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 (Nature, 2006)、2) インフルエンザウイルスの感染、増殖機構、細胞内輸送機構およびトリにおけるインフルエンザウイルス受容体シアロ糖鎖分布 (Glycobiology, 2007, in press) の解明、3) 抗インフルエンザ活性を持つ糖鎖化合物の探索 (Antiviral Res., 2006; Carbohydrate Res., 2006; Bioorg. Med. Chem., 2006; Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, etc)、4) パラインフルエンザウイルスにおける糖鎖機能の解明と創薬 (Carbohydrate Res., 2006)、5) デングウイルス感染における糖鎖の役割と創薬研究 (J. Biochem., 2006)、6) 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 (J. Virol., 2006)、7) 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 (Glycobiology, 2006)、8) 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、9) 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、10) デンドリマーによるウイルス阻害剤の創製などを中心とした研究が進んだ。昨年度からの特徴として、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。最終年度に向けて、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、昨年度と同様、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、リバーシ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) 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:

a) 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 (Glycoconjugate J., 2006)。 b) 高病原性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簡便・高感度に監視する新しいシステム構築に成功した。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 (Neu5Ac2-6Gal) 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 (Neu5Ac2-3Gal) 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。本年度これらのポリマーを充分量合成し、H5N1発生源である中国、タイ、インドネシアなどとの協力研究体制を構築した(国際会議発表)。 c) 高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルス感染者から分離されたウイルスの受容体結合性を規定するアミノ酸領域をリバーシジェネティクスにより作製された遺伝子組換えウイルスを用いて解析した。その結果、高病原性H5N1型トリインフルエンザウイルスの受容体結合性は、HAの182番目もしくは192番目のアミノ酸残基の変異に伴い、Neu5Ac2-3GalだけでなくNeu5Ac2-6Galも認識できるように変化することが判明した (Nature, 2006)。 d) 高病原性トリインフルエンザウイルスはトリの気道、腸管で増殖する。今回、高病原性トリインフルエンザウイルスの宿主標的器官であるニワトリ、およびウズラの腸管におけるトリおよびヒト型インフルエンザウイルスシアロ糖鎖受容体の存在を生化学的、免疫学的に調べた。その結果、ニワトリ、ウズラの腸管(コロン)での、ヒトおよび高病原性トリインフルエンザウイルス両方のレセプターシアロ糖鎖 (Neu5Ac2-6Gal, Neu5Ac2-3Gal) の存在を明らかにした。この結果から、高病原性トリインフルエンザウイルスはニワトリやウズラの体内でヒト型ウイルスに変異する可能性を明らかにした。本結果は、現在トリ間で流行している高病原性トリインフル

エンザウイルスH5N1が、ニワトリやウズラ宿主においてヒト-ヒト間伝播を可能とする変異を遂げる可能性を初めて明らかにしたもので重要な発見である (Glycobiology, 2007, in press)。

## 2) インフルエンザウイルスの感染分子機構:

a) 昨年度に続き、インフルエンザウイルス感染の初期に起こるウイルス粒子の細胞内進入機構を解明するために感染宿主細胞内の様々な情報伝達分子の動態を調べた。その結果、p38MAPK阻害の前処理により、ウイルスの感染効率は顕著に抑制されたが、MEK阻害剤では効果が認められなかった。さらに、感染阻害効果はウイルスの型、亜型に依存せず、ウイルス侵入初期にp38MAPK阻害剤による抑制効果が発揮されたことから、p38MAPKがウイルス侵入過程と関連することが判明した。 b) H3型ヒトインフルエンザウイルスのシアル酸分子種認識に関与するHAのアミノ酸領域をリバーシジェネティクスにより作製した遺伝子組換えウイルスにより解析した結果、2箇所のアミノ酸部位が、シアル酸分子種やシアル酸結合様式の認識に重要であることを見出した。 c) Glc-Cer合成阻害剤で宿主細胞 (MDCK) 内スフィンゴ糖脂質合成を抑制させるとインフルエンザウイルスの感染効率が抑制されることを見いだした。これにより、インフルエンザウイルスの宿主内細胞におけるスフィンゴ糖脂質の役割の重要性が示された (Biol. Pharm. Bull., 2006)。

## 3) インフルエンザウイルス宿主の糖鎖プロファイリング:

a) ウイルスヘマグルチニンと糖鎖との親和性解析のため、多次元HPLC法を用いた糖鎖プロファイリングにより糖鎖ライブラリを拡充した。特に、硫酸基転移酵素、シアル酸転移酵素やグルクロン酸転移酵素を用いることにより、シアロ硫酸化糖鎖やグルクロン酸含有糖鎖などの希少な糖鎖を標品として得ることに成功した。これを活用し、ニワトリおよびウズラ腸管におけるN-グリコシドシアロ糖鎖の解析を行い、Neu5Ac2-3Gal、Neu5Ac2-6Galのいずれか1つまたは両方を持つ糖鎖群を同定した (Glycobiology, 2007, in press)。一方、安定同位体標識を施した糖鎖とヘマグルチニンの相互作用解析をNMR法により行い、ヘマグルチニンに結合した糖鎖の立体構造に関する情報を得ることに成功した。<sup>13</sup>Cにて安定同位体標識を施したシアロ糖鎖 (NeuAc α 2-6[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Gal β 1-4GlcNAc) とリコンビナントヘマグルチニンとの相互作用を種々のNMRスペクトル (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-NOESYスペクトル) を用いて解析した。また、ウイルス感染阻害剤をデザインするため、ウイルス感染を阻害することが知られているツバメの巣に着目して結合実験を行った。その結果、ツバメの巣に由来するN型シアロ糖鎖は、カモインフルエンザウイルス [A/duck/313/4/78 (H5N3)] と結合することが判明した。このN型シアロ糖鎖の構造とNMR法から得られた知見をもとに、今後感染阻害剤のデザインと開発を行う予定である。

## 4) 抗インフルエンザ薬創製のための研究:

a) 燕の巣の抽出液中にインフルエンザウイルス感染を阻止するN-グリコシド型糖鎖を見だし、その糖鎖構造を明らかにした (Antiviral Res., 2006)。 b) カルボシラン dendrimer (Figure 1) を支持体として用いた糖鎖クラスター化合物の応用に向けた以下の3つの課題について合成研究を展

開した。まず、糖鎖クラスター化合物群のタンパク質への接着能を、物理化学的手法(蛍光分析)を用いて評価することを目的とし、ラクトリアオース(GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc)クラスター化合物群の合成を行った。ラクトリアオース誘導体をラクトースおよびグルコサミン塩酸塩を出発物とし合成を行った後、カルボシランデンドリマーへの導入反応および脱保護を行い、第0世代3分岐(Fan(0)3)および4分岐(Ball(0)4)、第1世代6分岐(Dumbbell(1)6)および12分岐(Ball(1)12)のデンドリマー世代および末端糖鎖数の異なる4つの糖鎖クラスター化合物の合成に成功した。これらクラスター化合物群のコムギ胚芽レクチンWGAとの結合分析を蛍光測定により行い、Dumbbell(1)6型は遊離の糖鎖と比べ親和定数が2500倍と増加しており、糖鎖のカルボシランデンドリマー支持体によるクラスター化という手法の有効性を改めて確認した。

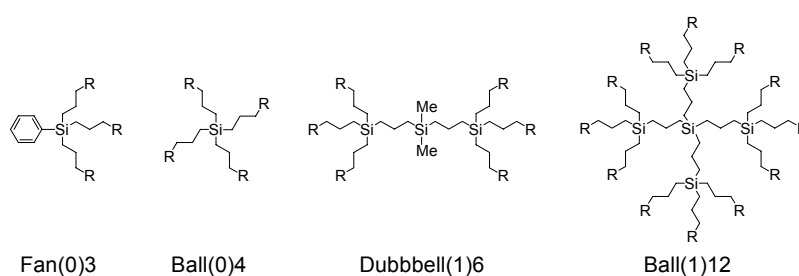
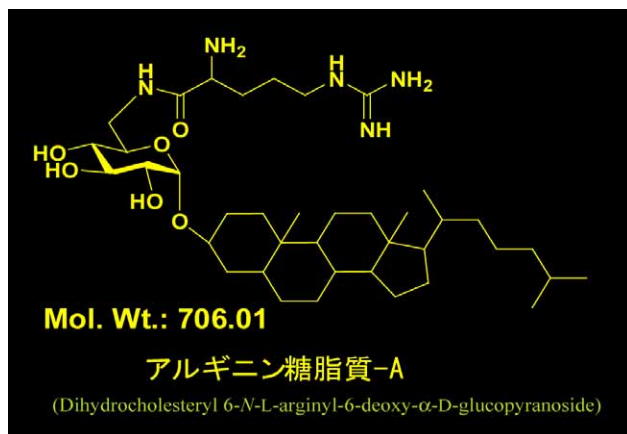


Figure 1. 合成に用いたカルボシランデンドリマー骨格

- c) シアロ糖鎖結合チオシアロシドカルボキシデンドリマーはインフルエンザウイルスのシアリダーゼ活性を抑制することを見いだした (Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007)。  
 d) キトサンをバックボーンとし、インフルエンザウイルスの受容体シアロ糖鎖を側鎖に結合させたポリマーの合成に成功した。本分子はインフルエンザウイルスの赤血球凝集を強く阻止した (Carbohydrate Res., 2006)。  
 d) アルギニン糖脂質-A の各種類縁化合物の分子設計と合成と抗インフルエンザ活性試験: 昨年度の本研究で開発されたアルギニン糖脂質-A (図) は、インフルエンザウイルスの細胞感染を抑える優れた機能を持つ。平成 18 年度は、その作用機構は明らかにするために、以下の実験を実施した。



- (1) アルギニン糖脂質-A の各種類縁化合物の分子設計と合成と抗インフルエンザ活性試験: L-アルギニンをD-アルギニンに置換した誘導体、遊離のアミノ基をN-アセチル基に置換した化合物、コレステロールを糖に置換した化合物、をそれぞれ合成して抗ウイルス活性試験を実施した。又、アルギニンの効果を確認するため、L-ヒスチジンとL-リジンに置き換えた一連のアミン酸結合

型糖脂質を新たに合成した。アルギニン糖脂質-Aを確立した方法で新たに合成を行なった。合成品を宿主細胞、或いはウイルスと一緒に培養を行なってから感染の阻害能力を評価したところ、

本化合物は細胞側ではなく、ウイルス側に働いて細胞感染を抑えていることが判った。また、シアリダーゼの阻害活性を持たない事、さらに、ヘマグルチニンとの結合活性を示さないことを確認した。これらのことから、これらはこれまで確認されていない新しい機構で感染を阻害していることを強く示唆している。

亜型の異なる一連のヒト A型インフルエンザウイルス (WSN/33(H1N1)、JAPAN/305/57(H2N2)、Texas/68(H2N2)、Memphis/1/71(H3N2)) を用いた感染阻害試験を行なった。Texas/68(H2N2) 以外のインフルエンザウイルスにはほぼ同等の強い感染阻害活性が認められた。Texas/68(H2N2) はもともと強い感染力を示すことが知られたウイルスであり、その阻害は他に比べて弱い結果となったが、本アルギニル化糖脂質はサブマイクロモルレベルでこのウイルスに対しても感染阻害効果を示すことが判明した。

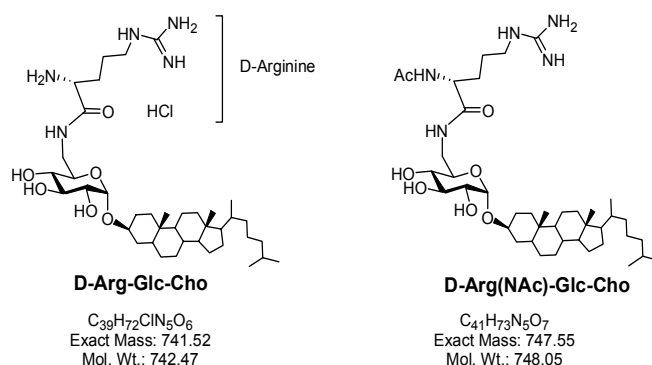


図2 D-アルギニン糖脂質-A とその N-アセチル誘導体

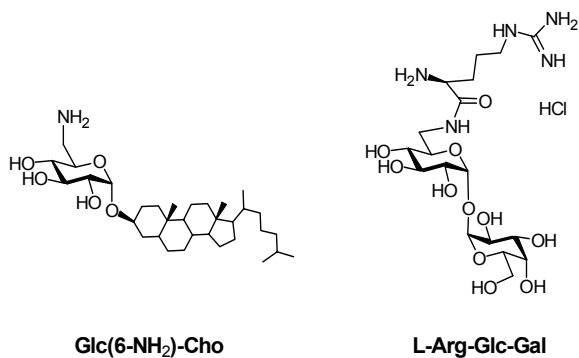


図3 各種アミノ酸糖脂質誘導体

その一方で、これらの糖脂質誘導体は強い界面活性作用を持ち、マイクロモルレベルにおける高濃度で細胞の溶解活性が確認された。これらは、細胞毒性に繋がる可能性もあることから、アグリコンの脂質部位を親水性の糖で置換した化合物を新たに合成した(図3 右)。この化合物はガラクト型トレハロースを骨格に持つ新規な糖-アミノ酸誘導体である。抗ウイルス活性を調べたところ、アルギニン糖脂質-Aに比べると活性は低下したが、強い活性を維持していた。高濃度においても細胞毒性を示さないことから、有望な抗インフルエンザ剤になると期待される。以上、アルギニル化

構造と活性の相関を探る目的で、D-アルギニンを持つ立体異性体(図2)を新たに合成して、抗ウイルス活性を調べた。感染阻害活性はL-体に比べて2~5倍向上することが判明した。また、N-アセチル基を持つ誘導体では活性の低下が確認されたが、強い活性は維持していた。アルギニンを取り除いたアミノ基誘導体(図3 左)では、全く活性は確認されなかった。

糖脂質-Aの作用は、ホスト細胞ではなくインフルエンザウイルス側に働くこと、コレステロールは活性に必須ではないこと、ヒトA-型ウイルスに対して特に高い阻害作用を示すことを明らかにした。今後は、アルギニン糖脂質-Aとともに、実用化試験を行ない具体的な用途を実証していく予定である。

#### 5) パラインフルエンザウイルスにおける糖鎖機能の解明と創薬:

a) ヒトパラインフルエンザウイルスの糖鎖末端シアル酸結合様式に対する結合性は、1型と3型ウイルスでは異なる。そこで、1型および3型ウイルスHN糖タンパク質スパイク間で、受容体結合領域のアミノ酸配列を比較し、部位特異的突然変異体を用いたHN糖タンパク質遺伝子発現細胞系を構築し、受容体結合特異性を規定するアミノ酸領域を解析した。その結果、2箇所のアミノ酸部位が、1型と3型ウイルスの受容体結合性の相違に関与していることを見出した。 b) 2-deoxy-2,3-dihydro-*N*-acetylneuraminic acid およびその誘導体(4位置換基誘導体)は、ヒトパラインフルエンザウイルス(1型)の感染を阻止することを見いだした(Bioorg. Med. Chem., 2006)。また、4-O-alkylated 2-deoxy-2,3-didehydro-*N*-acetylneuraminic acid とその誘導体はヒトパラインフルエンザウイルス3型感染を阻止することも見いだした (Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007)。

#### 6) デングウイルス感染における糖鎖の役割:

a) デングウイルス結合性糖鎖残基(Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc-)を多価に結合させた異なる骨格構造を有する 3 種類の新規化合物(デンドリマー)Fan(0)3, Ball(0)4, Dumbbell(1)6を合成し、デングウイルス感染阻害効果を調べた(埼玉大学工学部・照沼大陽教授との共同研究)。その結果、糖鎖残基の数が最も多い Dumbbell(1)6 が最も強い阻害効果を示すことが判明した。1-2) デングウイルスの domain III (EGP-DIII) タンパク質を遺伝子組換えタンパク質として大腸菌を用いて作製することに成功した。組換え EGP-DIII タンパク質は、デングウイルスと同様に LacNAcCer に強い結合性を示した (J. Biochem., 2006)。本研究で確立した合成経路ではより効率的にラクト-*N*-ネオテトラオース誘導体を合成できることが示され、Dumbbell(1) 6 型クラスター化合物の実用化試験に耐えうる合成経路を確立することができた。 b) デングウイルスのウイルス受容体(糖鎖)に対するウイルス粒子の吸着阻害剤として設計合成された Dendrimer (Dumbbell(6)-paragloboside)のデングウイルス感染阻害効果を固体(マウス)レベルでも検証した。Dendrimer (Dumbbell(6)-paragloboside)を 1  $\mu$  g/gram-body-weight の量で腹腔内に投与し、そのごデングウイルスを腹腔内に接種した場合には、デング抗体の産生抑制(最大 50%)が認められた。しかし、自然宿主でないマウスでは十分なコントロール群においても十分なウイルス血症が得られず、直接的にウイルス複製の抑制の有無を検証することはできなかった。今後、最終的な結論を得るため、サルにおける同様の検証を実施する必要がある。次年度は、デングウイルス感染の唯一の動物モデルであるサルを用いた実験を予定している。

7) 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:

a) HIV-1 の細胞への感染には、細胞側レセプターとして CD4 とさらに CXCR4 や CCR5 などのコレセプターを必要とする。これらレセプター/コレセプター以外にウイルスの細胞への結合に大きく影響する因子として、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが知られている。酵素処理により細胞表面のヘパラン硫酸を除去すると HIV-1 の感染性が低下することや、ヘパラン硫酸あるいはヘパリンが HIV-1 の感染を阻害することが報告されている。ヘパラン硫酸あるいはヘパリンの構造的特徴は、陰性荷電をおびていることである。従って、その結合様式は相手側の陽性荷電を介した電気的結合が中心となる。タンパク質の場合、塩基性アミノ酸(Lys, Arg, His)が重要で、ヘパリンと相互作用するヘパリン結合ドメイン (Heparin Binding Domain: HBD)が知られている。HIV-1 における HBD は、とくに T 細胞株指向性株のエンベロープタンパク質 gp120 の V3 領域内に X-B-B-B-X-B-X-X-B-X 配列としてコードされている。従って、V3 領域内の HBD を介して HIV-1 は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合するものと考えられている。

本研究では、ヘパリンによる HIV-1 感染抑制機序を検討することで、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンを介した HIV-1 の細胞吸着の分子機序の詳細を明らかにした。そこで異なる濃度のヘパリンを HIV-1 と混合し、標的細胞 (NP-2/CD4/CXCR4 細胞)に接種し、4 日後の培養上清中の HIV-1 抗原 (gag タンパク質: p24)量を ELISA 法で定量した。ヘパリンは、濃度依存性に HIV-1 (IIIB 株)の NP-2/CD4/CXCR4 細胞への感染を抑制した。

組み換えエンベロープタンパク質 (recombinant gp120: rgp120) 結合試験では、ELISA プレートにあらかじめ HIV-1 のコレセプター GPR1 の N 末端側細胞外領域由来ペプチド (GPR1ntP(1-27) アミノ酸配列: MEDLEETLFEFENYSYDLDYYSLESC)、あるいは可溶性 CD4 (sCD4)をコートしておき、T 細胞株指向性由来 rgp120 を室温で反応させた。rgp120 は、前者 (GPR1ntP(1-27))の場合、V3 領域を介して、そして後者 (sCD4)の場合は、CD4 結合領域を介してプレートに吸着する。この系を用いて、ヘパリンの有無による rgp120 の結合に及ぼす影響を ELISA 法にて解析した。ヘパリンは rgp120 と GPR1ntP(1-27)との結合を阻害したが、sCD4 との結合を阻害しなかった。このことは、ヘパリンは、rgp120 の CD4 結合領域ではなく、V3 領域に結合することを示していた。細胞への HIV-1 結合試験は、細胞とウイルスをインキュベートし、未吸着ウイルスを洗浄除去後、細胞溶解液中に含まれる p24 量を ELISA 法で定量した。細胞内に侵入したウイルス量を決定する場合は、細胞とウイルスをインキュベートし洗浄した後、トリプシン処理後に、ELISA を行った。まず、T 細胞株への HIV-1 (IIIB 株)の 37°C での結合に及ぼすヘパリンの影響を調べた。あらかじめ感染を完全に抑制する濃度の CD4 抗体で細胞を処理しても、抗体未処理コントロールのおよそ 6 割のウイルスは細胞に結合した。しかし、細胞内のウイルスは検出されなかった。このことより、HIV-1 の細胞表面への結合には CD4 だけでなく CD4 以外の分子を介した結合も関与していることが推測された。次に、抗 V3 抗体の影響を調べたところ、細胞表面への HIV-1 結合を完全に抑制した。この結果は、V3 領域は CD4 を含めたすべての細胞表面分子への HIV-1 結合に関与していることを示唆していた。ヘパリンは抗 V3 抗体と同様に、細胞への HIV-1 結合を強く抑制した。以上の結

果より、ヘパリンは HIV-1 の V3 領域と結合することで、CD4 を含めたすべての細胞表面分子への HIV-1 の結合を阻害していることが推測された。HIV-1 の細胞との結合に関与する CD4 以外の細胞表面分子としては、コレセプターやヘパラン硫酸プロテオグリカンなどが候補として挙げられるが、それら分子がどのような順序で HIV-1 と相互作用し、最終的にウイルス膜と細胞膜の融合が成立していくのかは、今後の検討課題である。

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) は、成人 T 細胞白血病、HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis の原因ウイルスである。我々は HTLV-I の無細胞性ウイルス感染系として GFP (green fluorescent protein) 遺伝子組み換えウシ水疱性口内炎ウイルス (VSV) と HTLV-I との間で HTLV-I の膜蛋白を持つ高力価のシュードタイプウイルス VSVΔG\*(HTLV-I) を作製する系を確立した。b) HTLV-I 低感受性ヒト細胞株に HTLV-I 高感受性 U251MG 細胞株由来の cDNA ライブラリーを導入しスクリーニングを行った。このスクリーニングによりヘパラン硫酸プロテオグリカン (シンデカン1並びにシンデカン2) のコアプロテインであることを明らかにできた。この結果を基に種々の細胞のプロテオグリカン並びにプロテオグリカンの持つ硫酸化多糖の発現とウイルス感染について調べてきた。その結果、硫酸化多糖が HTLV-I 感染において重要な役割を持つことを明らかにすることができた。以上の結果をもとに HTLV-I 感染におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの作用機序の解明とヘパラン硫酸プロテオグリカンに関連した抗 HTLV-I 剤の開発を目的とする。c) VSVΔG\*(HTLV-I) pseudotype virus は、GFP 遺伝子組み換え VSV である VSVΔG\*-G を HTLV-I (コスモポリタン株 2M、メラネシア株 Mel5) 産生 8C 細胞に感染させ、感染後 15-20hr の細胞培養上清を回収し調整した。また同様にしてウシ白血病ウイルス Bovine leukemia virus (BLV) の pseudotype virus, VSVΔG\*(BLV) pseudotype virus を比較用に作製した。以上の pseudotype は標的細胞に接種したのち、蛍光顕微鏡下で GFP 発現細胞数を計測することで標的細胞への感染性を検討した。d) 標的細胞表面のヘパラン硫酸の発現量の違いと HTLV-I 感染時における硫酸化多糖の量が HTLV-I 感染に及ぼす影響を検討した。HTLV-I 感染感受性細胞をヘパラン硫酸分解酵素であるヘパリチナーゼ-I で前処理した後、HTLV-I pseudotype、並びにヘパリチナーゼ-I で前処理した HTLV-I pseudotype を接種し影響を検討した。デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸は HTLV-I pseudotype の感染を促進した。特にヘパラン硫酸に感染促進作用が認められた。この効果は 2M 株では約 30 倍、Mel5 株では数倍であり、株間での違いが観察された。またヘパリンは、HTLV-I pseudotype の感染に影響し、2M 株で感染促進作用が観察された。一方、MEL5 株では感染促進効果が観察されなかった。ヘパリン、ヘパラン硫酸は、BLV あるいは VSVG 蛋白の pseudotype 感染にはほとんど影響しなかった。HTLV-I pseudotype の感染性は、ヘパリチナーゼ I で前処理すると減少した。

細胞膜表面にヘパラン硫酸がほとんど検出されない K562 細胞クローンと細胞膜表面にヘパラン硫酸が多く検出されるシンデカン-1 導入 K562 細胞クローンでは感染時におけるヘパラン硫酸、ヘパリンの効果が著しく異なっており、細胞膜表面にヘパラン硫酸を発現していない K562 細胞クローンの方で相対的に強く観察された。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの発現は色々の細胞においてその発現量、構成比は異なっており、このことが標的細胞の HTLV-I 感染感受性に影響を与



えていると考えられる。細胞表面のヘパラン硫酸、遊離の状態の硫酸化多糖、ウイルス粒子のヘパラン硫酸などが HTLV-I 感染に影響することが明らかとなった。その効果は HTLV-I の株間で異なり、特にヘパリンでは感染促進と感染阻害の両方が観察された。HTLV-I 感染における硫酸化多糖の効果をさらに多くの細胞株、ウイルス株を用いて検討し、細胞株間、ウイルス株間の差異を明らかにすることで HTLV-I の感染機構の一面を解明できると考える。

#### 8) 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:8-1) 糖鎖欠失サル免疫不全ウイルス(SIV) (Δ5G) の初期感染解析による弱毒化のメカニズム解析:

a) 昨年に引き続き、5 カ所の糖鎖欠失ウイルス(Δ5G)のサルにおける初期感染期の解析により低病原性化のメカニズムを解析した。Δ5G は病原性 SIV239 と同じ CD4+T 細胞に感染・増殖することを昨年度報告したが、本年度に行った詳細な病理解析により、感染細胞の分布、感染組織に違いがあることが明らかになった。すなわち、腸管組織において、Δ5G は腸管粘膜固有層の T 細胞に感染していたのに対し、SIV239 は腸管リンパ集合組織(パイエル板様組織)の T 細胞に多くの感染細胞が存在した。また全身性リンパ組織(表層リンパ節、脾臓、血中リンパ球など)での感染は Δ5G は SIV239 より 1 log 低かった。さらに感染の標的となる CCR5+CD4+T 細胞の末梢血中の動態を調べた結果、SIV239 感染では感染後急激に減少するのに対し、Δ5G 感染ではかえって上昇している傾向が見られた。これらの結果から、Δ5G で見られた腸管粘膜固有層への感染は一時的なダメージは起こすが、免疫の破綻を導くような重大な損傷を与えないのに対して、SIV239 における腸管リンパ集合組織への感染はメモリー T 細胞に傷害を与え、免疫破綻を導くのではないかと推測された。 b) 昨年度作製した Δ5G とは異なるウイルス学的性質(細胞指向性と中和抗体感受性)を持つ新たな 3 種類の糖鎖欠失ウイルスをアカゲザルに接種した。これら新規の糖鎖変異ウイルスも Δ5G と同様に、急性感染では SIV239 と同等のウイルス増殖を示したが、速やかに感染は制御された。さらに Δ5G を含めた糖鎖欠失ウイルス感染ザルに、SIV239 とアミノ酸配列で 15-20% の相違(HIV-1 各クレード間における多様性と同程度の相違)がある SIVsmE543 のチャレンジ感染を行い、ワクチン効果について検討した。その結果、これまでに報告しているように親株である SIV239 を感染制御したのは勿論のこと、SIVsmE543 をも感染制御した。エイズワクチンにおいて、異種株ウイルスの感染が制御された例はこれまでに報告されていない。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「鈴木康夫/鈴木 隆・ウイルス感染グライコミクス」グループ

##### ①研究者名

鈴木 康夫(中部大学 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)「加藤・構造生物学」グループ

①研究者名

加藤 晃一(名古屋市立大学 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

(3)「西田/小林・ナノクラスター」グループ

①研究者名

西田 芳弘(千葉大学 教授)

②研究項目

- ・硫酸化糖、アルギニル化糖、コリン含有糖など特定の生理活性官能基をもつナノ糖鎖クラスター材料の分子設計、インフルエンザウイルスや微生物毒素の感染阻害剤、糖鎖ナノ材料の創製

(4)「星野/森・HIV 感染における糖鎖機能解析」グループ

①研究者名

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

(5)「森田・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研究者名

森田 公一(長崎大学熱帯医学研究所 教授)

②研究項目

- ・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害物質(左一八博士担当)のデングウイルス感染阻害効果の判定

(6)「照沼・糖鎖合成」グループ

①研究者名

照沼 大陽(埼玉大学 教授)

②研究項目

- ・デング熱ウイルス阻害剤の合成

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- Chao-Tan Guo, Tadanobu Takahashi Wakoto Bukawa, Noriko Takahashi, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Kazuya I-P Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki: Edible bird's nest extract inhibits influenza virus infection. *Antiviral Res.* 70, 140-146 (2006)
- Kiyoshi Ikeda, Kazuki Sato, Satoru Kitani, Takashi Suzuki, Naoyoshi Maki, Yasuo Suzuki, Masayuki Sato: 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid analogues structurally modified at the C-4 position: Synthesis and biological evaluation as inhibitors of human parainfluenza virus type1. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 7893-7897 (2006)
- Kazuya I.P.J. Hidari, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki: Suppression of the biosynthesis of cellular sphingolipids results in the inhibition of the maturation of influenza virus particles in MDCK cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1575-1579 (2006)
- Yutaka Makimura, Shinya Watanabe, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Hideharu Ishida, Makoto Kiso, Takane Katayama, Hidehiko Kumagai, Kenji Yamamoto: Chemoenzymatic synthesis and application of a sialoglycopolymer with a chitosan backbone as a potent inhibitor of human influenza virus hemagglutination. *Carbohydr. Res.* 341, 1803-1808 (2006)
- Mikhail N. Matrosovich, Takashi Suzuki, Yoshio Hirabayashi, Wolfgang Garten, Robert G Webster, Hans-Dieter Klenk: Gangliosides are not essential for influenza virus infection. *Glycoconj. J.* 23, 107-113 (2006)
- Toshihiro Kogure, Takashi Suzuki, Tadanobu Takahashi, Daisei Miyamoto, Kazuya I.P.J. Hidari, Guo Chao-Tan, Toshihiro Ito, Yoshihiro Kawaoka, Yasuo Suzuki: Human trachea primary epithelial cells express both sialyl-2,3 Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl-2,6 Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconj. J.* 23, 101-106 (2006)
- Chie Aoki, Kazuya I.P.J. Hidari, Saki Itonori, Akihiro Yamada, Naonori Takahashi, Takeshi Kasama, Futoshi Hasebe, Mohammend Alimul Islam, Ken Hatano, Koji Matsuoka, Takao Taki, Cha-Tan Guo, Tadanobu Takahashi, Yuichi Sakano, Takashi Suzuki, Daisei Miyamoto, Mutsumi Sugita, Daiyo Terunuma, Koichi Morita, Yasuo Suzuki: Identification and characterization of carbohydrate molecules in mammalian cells recognized by dengue virus type 2. *J. Biochem.* 139, 607-614 (2006)
- M.Holland, H.Yagi, N.Takahashi, K.Kato, C.O.S.Savage, D.M.Goodall, and R.Jefferis: Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA associated systemic vasculitis *Biochim. Biophys. Acta. -General Subjects* 1760, 669-677 (2006)
- K.Talabnin, H.Yagi, N.Takahashi, T.Suzuki, K.Kato, H.Uemura, P.Saichua, S.Kaewkes, S.Wongkham, Y.Suzuki and B.Sripa:Glycobiological study of adult *Opisthorchis viverrini*:

- Characterization of N-linked oligosaccharides. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 230–233 (2006)
- Shinya Yamada, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki, Mai Q. Le, Chairul A. Nidom, Yuko Tagawa-Sakai, Yukiko Muramoto, Mutsumi Ito, Maki Kiso, Taisuke Horimoto, Kyoko Shinya, Toshihiko Sawada, Makoto Kiso, Taiichi Usui, Takeomi Murata, Yipu Lin, Alan Hay, Lesley F. Haire, David J. Stevens, Rupert J. Russell, Steven J. Gamblin, John J. Skehel, Yoshihiro Kawaoka: Hemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444, 378–382 (2006)
- S.J.Yoon, K.I.Nakayama, N.Takahashi, H.Yagi, N.Utkina, H.Y.Wang, K.Kato, M.Sadilek, S.I.Hakomori: Interaction of N-linked glycans, having multivalent GlcNAc termini, with GM3 ganglioside. *Glycoconjugate J.* 23, 639–649 (2006)
- 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 Zool B Mol Dev Evol.* 2006, 306, 59–69 (2006)
- Y Shimizu, M Okoba, N Yamazaki, Y Goto, T Miura, M Hayami, H Hoshino and T Haga: Construction and in vitro characterization of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with the RANTES gene. *Microbes Infection*, 8, 105–113 (2006)
- 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)
- Islam M.A., Ahmed M.U., Begum N., Chowdhury N.A., Khan A.F., Parquet M.C, Bipolo S., Inoue S., Hasebe F., Suzuki Y., Morita K. : Molecular Characterization and Clinical Evaluation of Dengue Outbreak in 2002 in Bangladesh. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, Vol.59, 85–91(2006)
- H. Uzawa, T. Nagatsuka, H. Hiramatsu, Y. Nishida, “A bovine glucuronidase for assembly of beta-D-glucuronyl-(1-3)-6-O-sulfo-beta-D-gluco- and galactopyranosyl linkages” *Chem Commun.*, 1381–1383 (2006).
- S. Yamaguchi, Y. Nishida, M. Kambara, C. -L. Kim, N. Ishiguro, T. Nagatsuka, H. Uzawa, M. Horiuchi, “Inhibition of PrPSc formation by synthetic O-sulfated glycopyranosides and their polymers” *Biophys. Biochim. Acta. Res. Commun.*, 349, 485–491 (2006).
- K Abe , A Nozaki, K Tamura, M Ikeda, K Naka, H Dansako, H Hoshino, K Tanaka, and N Kato. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-hepatitis C virus peptide enhance antiviral activity in cultured human hepatocytes. *Microbiol Immunol.*, 51: 117–125 (2007)
- Jun-ichi Sakamoto, Tetsuo Koyama, Kazuya I.P.J. Hidari, Sangchai, Yingsakmongkon, Daisei Miyamoto, Wipawee Usawattanakul, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Yasuaki Esumi, Ken Hatano, Daiyo Terunuma, and Koji Matsuoka: Thiosialoside clusters using carbosilane dendrimers core

scaffolds as a new class of influenza neuraminidase inhibitors<sup>†</sup>. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 717–721 (2007)

- Tindal, D.J., Dyason, J.C., Thomson R.J., Suzuki, T., Ueyama, H., Kuwahara, Y., Maki, N., Suzuki, Y., Itzstein M.V.: Synthesis and evaluation of 4-O-alkylated 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid derivatives as inhibitors of human parainfluenza virus type-3 sialidase activity. *Bioorg. Med. Chem Lett.*, 17, 1655–1658 (2007)
- Chao-Tan Guo, Noriko Takahashi, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Tadanobu Takahashi, Shuang-Qin Yi, Yong Chen, Toshihiro Ito, Koichi Otsuki, Hiroshi Kida, Yoshihiro Kawaoka, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Daisei Miyamoto, Takashi Suzuki, and Yasuo Suzuki: The quail and chicken intestine have sialyl-Gal sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors. *Glycobiology* (2007) in press

## (2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 0 件 (CREST 研究期間累積件数: 17 件)