SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

糖鎖を活用したインフルエンザウイルスブロッカーの機能設計

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2013-01-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 尾形, 慎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/7036

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：１３８０１
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2011
課題番号：22780101
研究課題名（和文）糖鎖を活用したインフルエンザウイルスブロッカーの機能設計

研究課題名（英文）Functional design of influenza virus blocker utilizing glycans

研究代表者
尾形　慎（OGATA　MAKOTO）
静岡大学・創造科学技術大学院・特任助教
研究者番号：10532666

研究成果の概要（和文）：
インフルエンザウイルスの感染および接着に関与する特定のシアロ糖鎖構造を合成可能な糖転移酵素発現技術を、カイコ幼虫を利用したバクミドシステムにより達成した。これにより、トリ型およびヒト型インフルエンザウイルスヘマグルチニンが感染の際に認識する構造複雑な糖鎖構造の実践的かつ定量的な合成が可能となった。さらに、これら糖鎖を種々の骨格基盤（天然ポリペプチド・多糖ポリマー・金属キレート分子など‥）に導入することで糖鎖クラスター効果に基づくインフルエンザウイルスブロッカーを構築した。これら各種インフルエンザウイルスブロッカーを用いたインフルエンザウイルス感染阻害試験および赤血球凝集阻害試験の結果より、トリ型およびヒト型インフルエンザウイルスの糖鎖認識特異性は末端シアル酸残基の結合様式において異なるだけでなく、内部糖鎖構造もその活性に大きく関与していることを示した。さらには、インフルエンザウイルスを標的とした糖鎖クラスター材料の創製および設計における骨格基盤やクラスター数・スペーサー構造などの重要性も実証した。

研究成果の概要（英文）：
Artificial glycoclusters with various backbones（γ-polyglutamic acid, glycopolymer, and EGTA etc…）and multivalent sialyloligosaccharide units have been chemoenzymatically synthesized as potential polymeric inhibitors of infection by influenza virus. Furthermore, in order to synthesize an artificial sialoglycoclusters, we developed a large-scale production of rat α2,3- or α2,6-sialyltransferases（α2,3- or α2,6-SiaTs）. The α2,3- or α2,6-SiaTs were expressed in fifth instar silkworm larval hemolymph using recombinant both cysteine protease- and chitinase-deficient *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus（BmNPV-*CP*$^-$-*Chi*$^-$）bacmid. The expressed α2,3-SiaT and α2,6-SiaT were used for sialylation of asialoglycoclusters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学
科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学
キーワード：分子認識

１．研究開始当初の背景

ムチンは生体内に多量に見出される糖タンパク質であり、近年様々な生化学的現象に関与していることが明らかに成りつつあるが、その分子量の大きさや糖鎖付加に伴う複雑さから生体高分子材料として研究対象にしにくい状況にあった。また、これまでムチンのような生体高分子を模倣した人工糖鎖高分子合成は、主に単純な単糖や二糖を有機合成的手法により、高分子（ポリアクリルアミド等）に組み込むことで機能化の研究がなされてきた。しかし、より高次の生体膜表面バイオミメティック糖鎖を作製するためには、天然糖鎖に類似した貴重な糖鎖を組み込んだ人工複合糖質を構築するための結合技術が必須となる。申請者は、国内外で独自に構築してきたバイオプロセスを主流とした人工糖鎖高分子構築技術を基盤としており、他の追随を許さない先駆的成果を収め、その成果は先導的役割を果たしてきている。

ここでは、現在大きな社会問題となっているインフルエンザウイルスが認識する特定の糖鎖構造に着目し、天然のムチンを模倣した人工糖鎖高分子（**インフルエンザウイルスブロッカー**）を創り出すための革新的技術開発とその方法論を展開する（図 1）。さらに申請者は、実践的な感染阻止剤合成を目指し、インフルエンザウイルスが認識する糖鎖構造を単純な直鎖状の炭素鎖でミミックする**グライコミメティクス**への応用を推進する。本研究課題は、トリおよびヒトインフルエンザウイルスそれぞれの感染初期における糖鎖認識特異性をターゲットとするもので、学術的にも注目を集めている研究課題である（図 2）。また、実用面においても極めて重要性かつ緊急性の高い**感染予防**や**ウイルス診断システム**に資するテーマであると位置づけることが出来る。

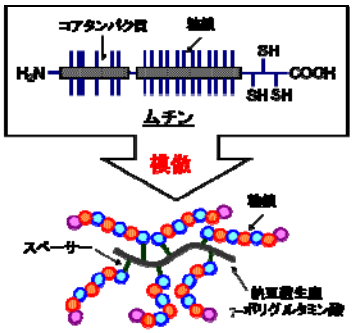


図1 人工糖鎖高分子（インフルエンザウイルスブロッカー）

２．研究の目的

申請者はこれまでに、インフルエンザウイルスヘマグルチニンと宿主受容体糖鎖間では一分子一分子間の相互作用は微弱であるがクラスタリングすることで強い相互作用になり優れた認識能を発現することを明らかにしてきた。この概念をもとに強力かつ実践的合成を視野に入れた、モジュール化結合法や効率的二糖配糖化法への改良、カイコ幼虫を用いたヒト型インフルエンザウイルス受容体合成酵素の大量発現系構築を行ってきた。そこで、申請者はこれら独自の合成技術を組み合わせることで、グライコモジュール化法をさらに発展・拡張した、トリ型およびヒト型それぞれに対応したインフルエンザウイルスブロッカーとしてのグライコ・ナノマテリアルを選抜そして創製する（図 3）。

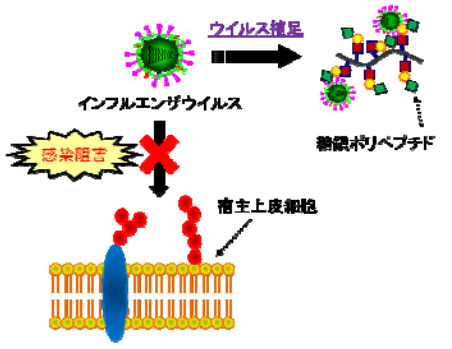


図2 糖鎖ポリペプチドのインフルエンザウイルス感染阻害機構

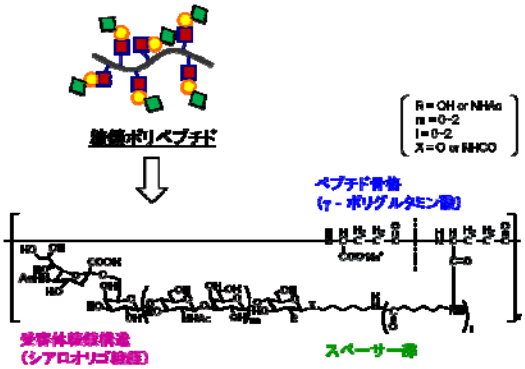


図3 糖鎖を活用したインフルエンザウイルス感染阻害剤のモジュール合成

３．研究の方法

(1) トリ型インフルエンザウイルスブロッカー合成の鍵酵素であるα2,3-シアリルトランスフェラーゼの大量発現系構築を試みた。その方法は、ラット肝臓 cDNA ライブラリーを鋳型とした PCR により、膜貫通領域を除去したラット由来 α2,3-シアリルトランスフェラーゼ遺伝子を増幅し、カイコ由来 bombixin 分泌シグナル配列、FLAG タグ配列を含む融合遺伝子を構築した。続いて、本融合遺伝子を挿入した組み換え BmNPV バクミドを作製し、カイコ幼虫に注射後約 1 週間飼育し体液を採取した。得られた体液を活性測定に供した結果、酵素活性を確認した。

(2) トリ型およびヒト型インフルエンザウイルスヘマグルチニンの糖結合特異性に基づいた糖鎖リガンド[3～7 糖構造；

Neu5Acα2,3/6(Galβ1,4GlcNAc/Glc)$_n$ (n = 1～3)]の大量合成を、本プロジェクトにおいて発現系を確立した α2,3-シアリルトランスフェラーゼおよび申請者らがこれまでに発現系を確立したα2,6-シアリルトランスフェラーゼ等を用いることで実現した。これにより、インフルエンザウイルスブロッカー合成およびインフルエンザウイルスに対する相互作用解析を実施可能な研究体制を整えた。

(3) 本プロジェクトにおいて実践的合成法を確立したトリ型およびヒト型インフルエンザウイルスヘマグルチニンに結合親和性を有する合成糖鎖リガンドを、物性や分子サイズ・クラスター数などが異なる各種骨格基盤[γ-ポリグルタミン酸・1,6-ヘキサンジオール・グリコールエーテルジアミン四酢酸(金属架橋剤)・多糖ポリマーなど]に組み込むことで、それぞれ機能の異なる各種多価性インフルエンザウイルスブロッカーを合成した。

(4)合成した各種インフルエンザウイルスブロッカーは、トリ型またはヒト型インフルエンザウイルスに対する各種相互作用解析（赤血球凝集阻害試験・ELISA 法および MDCK 細胞を用いた感染阻害活性試験法）によって評価した。

４．研究成果

(1) α2,3-シアリルトランスフェラーゼの発現は、まず初めに、作成バクミド (bx-FLAG tagged α2,3SiaT/bacmid) が濃度 250 ng/μL となるように PBS で希釈し、そこへ 10%量の DMRIE-C を添加し、カイコ注射用バクミド溶液を調整した。次に、5 齢フヨウツクバネ（*Bombyx mori*）の一群を 6 匹として、1 匹あたり 30 μL を注射した。注射後、24 時間ごとに体液を採取した。その結果、4 日目から 6.5 日目にかけて α2,3SiaT 活性を確認した。酵素活性は感染後 6.5 日目で最大に達し、そのカイコ幼虫体液内における酵素活性濃度は 410 mU/mL に達した（図 4)。また、コントロールとして用いた bacmid (-) の系では、本酵素活性は確認されなかった。

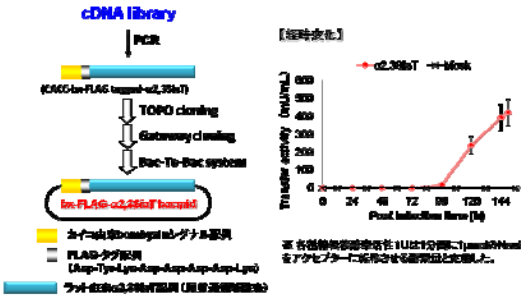


図4 バクミドシステムを用いたα2,3-シアリルトランスフェラーゼの発現

(2) 本組換え酵素（α2,3-シアリルトランスフェラーゼ）を利用することで、非常に高収率（85%以上）にトリ型インフルエンザウイルスのヘマグルチニンが認識する糖鎖ユニット（Neu5Acα2,3LacNAc- or Lac- R）を合成する事に成功した。さらに、以前発現系を構築したカイコ幼虫発現α2,6-シアリルトランスフェラーゼも利用する事により、種々の骨格構造［金属キレート分子（EGTA）・多糖ポリマー（分岐グルカン）・ポリペプチド］にトリ型インフルエンザウイルス認識糖鎖（シアロ 3 糖）やヒト型インフルエンザウイルス認識糖鎖（シアロ 5 および 7 糖）を多価に配位したインフルエンザウイルスブロッカーを創製した。

(3) 作製した各種インフルエンザウイルスブロッカーのうちγ-ポリグルタミン酸を骨格に有する感染阻害剤（人工糖鎖ポリペプチド）に対して赤血球凝集阻害試験および感染阻害試験を行った結果、シアル酸結合特異性の異なるトリ型およびヒト型インフルエンザウイルスに対し、シアル酸をもたない化合物は阻害効果を示さなかったが、α2,3 結合のシアル酸を有する化合物はトリ型に、α2,6 結合のシアル酸を有する化合物はヒト型にそれぞれ阻害活性が確認された。また、トリ型およびヒト型インフルエンザウイルスの糖鎖認識特異性は末端シアル酸の結合様式だけではなく、そのコアとなる内部糖鎖構造も活性に大きく関与していた。特に、ヒト型インフルエンザウイルスにおいては内部糖鎖構造の延長は著しい感染阻害活性の増大をもたらし、MDCK 細胞を用いた感染阻害試験においては pM レベルの活性を示した(図 5)。さらに、このようなヒト型インフルエンザウイルス感染阻害活性の飛躍的な増大に関与する内部糖鎖構造部分は構造単純なアルキルスペーサーで変更可能であることも明らかにした。このようなインフルエンザウイルスブロッカーに関する最終的な成果は、インフルエンザウイルス感染阻害剤の量産化および機能設計に大きく貢献すると考えられる。

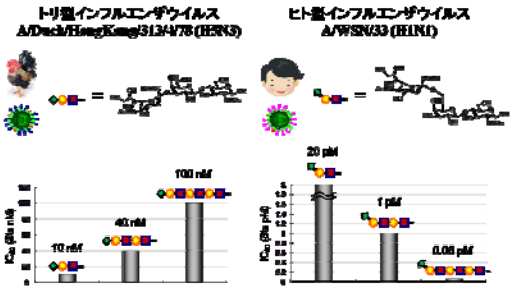


図5 糖鎖ポリペプチドのトリ型およびヒト型インフルエンザウイルスに対する感染阻害効果

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計６件）

1) Ogata, M., Yano, M., Umemura, S., Murata, T., Park, E. Y., Kobayashi, Y., Asai, T., Oku, N., Nakamura, N., Matsuo, I., Usui, T. Design and synthesis of high-avidity tetravalent glycoclusters as probes for *Sambucus sieboldiana* agglutinin and characterization of their binding properties. **Bioconjugate Chem.**, 2012, 23, 97-105. （査読有）
2) Kato, T., Manohar, S. L., Kanamasa, S., Ogata, M., Park, E. Y. Improvement of the transcriptional strength of baculovirus very late polyhedrin promoter by repeating its untranslated leader sequences and coexpression with the primary transactivator. **J. Biosci. Bioeng.**, 2012, 113, 694-696. （査読有）
3) Endo, T., Matsuda, S., Obara, T., Chuma, Y., Ogata, M., Yanagida, Y., Hatsuzawa, T., Usui, T. Label-free detection of oligosaccharide-lectin interaction using plasmonic optical device for glycomics application. **Sensor. Mater.**, 2011, 23, 135-146. （査読有）
4) Ogata, M., Kameshima, Y., Hattori, T., Michishita, K., Suzuki, T., Kawagishi, H., Totani, K., Hiratake, J., Usui, T. Lactosylamidine-based affinity purification for cellulolytic enzymes EG I and CBH I form *Hypocrea jecorina* and their properties. **Carbohydr. Res.**, 2010, 345, 2623-2629. （査読有）
5) Ogata, M., Obara, T., Chuma, Y., Murata, T., Park, E. Y., Usui, T. Molecular design of fluorescent labeled glycosides as acceptor substrates for sialyltransferases. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 2010, 74, 2287-2292. （査読有）
6) Masaka, R., Ogata, M., Misawa, Y., Yano, M., Hashimoto, C., Murata, T., Kawagishi, H., Usui, T. Molecular design of *N*-linked tetravalent glycosides bearing *N*-acetylglucosamine, *N,N'*-diacetylchitobiose and *N*-acetyllactosamine: Analysis of cross-linking activities with WGA and ECA lectins. **Bioorg. Med. Chem.**, 2010, 18, 621-629. （査読有）

〔学会発表〕（計８件）

1) 森大地，尾形慎，朴龍洙，碓氷泰市．フコシル三糖及び五糖含有新規4価配位体の合成．日本農芸化学会（2012/3/24，京都女子大学（京都府））．
2) 梅村征一郎，尾形慎，村田健臣，朴龍洙，中村直樹，松尾一郎，碓氷泰市．シアロ型多価糖鎖配位体とニホンニワトコレクチンとの凝集メカニズムの解析．日本農芸化学会（2012/3/24，京都女子大学（京都府））．
3) 杉山尚弘，梅村征一郎，尾形慎，渡邊浩史，柳瀬美千代，鷹羽武史，碓氷泰市．シアリルオリゴ糖鎖含有デキストリンナノ粒子の合成およびインフルエンザウイルスとの結合能評価．日本農芸化学会（2012/3/24，京都女子大学（京都府））．
4) 田見祐一，中馬康志，尾形慎，村田健臣，碓氷泰市．レクチン結合親和力に基づくアシアロ型多価配糖体の分子設計．日本農芸化学会（2012/3/24，京都女子大学（京都府））．
5) 森大地，尾形慎，碓氷泰市，朴龍洙．Bm NPVバクミドシステムを用いたカイコでの哺乳類由来糖転移酵素の発現．日本糖質学会（2011/7/13，ハイブ長岡（新潟県））．
6) 田見祐一，杉山尚弘，中馬康志，尾形慎，碓氷泰市．二分岐二本鎖配糖体の設計に基づくECAレクチンとの結合親和性評価．日本糖質学会（2011/7/12，ハイブ長岡（新潟県））．
7) 尾形慎，矢野恵美，村田健臣，朴龍洙，中村直樹，松尾一郎，碓氷泰市．レクチンとの架橋複合体形成能を有する四価シアロ型糖鎖配糖体の機能設計．日本糖質学会（2011/7/11，ハイブ長岡（新潟県））．
8) Ogata, M., Kameshima, Y., Hattori, T., Totani, K., Nakamura, T., Koshino, H., Hiratake, J., Usui, T. Lactosylamidine-based affinity purification for cellulolytic enzymes EG I and CBH I and analysis of their condensation and transglycosylation reactions. Plant polysaccharide and applied glycoscience workshop (PPAGW), 2010/7/29-31, The Sasakawa Hall（東京都）．

〔図書〕（計４件）

1) Ogata, M., Misawa, Y., Usui, T. Molecular design of multivalent glycosides bearing GlcNAc, $(GlcNAc)_2$ and LacNAc: Analysis of cross-linking activities with WGA and ECA lectins. **Biosensors - Emerging Materials and**

Applications, ISBN 978-953-307-328-6, 2011, 17-34.
2) 尾形慎：糖鎖を活用したインフルエンザウイルス感染阻害剤の酵素化学合成，***バイオサイエンスとインダストリー***，2010, **68**, 409-411.
3) 尾形慎：糖鎖を活用したインフルエンザウイルス感染阻害剤の機能設計，***化学工業***，2010, **61**, 920-926.
4) Ogata, M., Murata, T., Park, E. Y. Usui, T. Chemoenzymatic synthesis of glycan-arranged polymeric inhibitors against influenza virus infection. ***J. Appl. Glycosci.***, 2010, **57**, 137-144.

〔産業財産権〕
○出願状況（計 1 件）

名称：ウイルス阻害剤
発明者：碓氷泰市，尾形慎，朴龍洙，宮崎忠昭
権利者：国立大学法人静岡大学
種類：特許
番号：PCT/JP2011/054384
出願年月日：2011 年 2 月 25 日
国内外の別：国外

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
尾形　慎（OGATA MAKOTO）
静岡大学・創造科学技術大学院・特任助教
研究者番号：10532666

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：