

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究(B)  
 研究期間： 2007～2009  
 課題番号： 19310141  
 研究課題名（和文） 人工ムチンの機能設計に基づく変異克服型抗インフルエンザウイルス剤の開発  
 研究課題名（英文） Functional design of artificial mucin based Influenza virus Inhibitor in overcoming the mutation  
 研究代表者  
 碓氷 泰市 (USUI TAIICHI)  
 静岡大学・農学部・教授  
 研究者番号： 50111802

## 研究成果の概要（和文）：

インフルエンザウイルスの感染、接着に関わる特定の受容体シアロオリゴ糖鎖を高い効率且つ単純な手法で高密度に天然素材ポリペプチドである納豆菌由来 $\gamma$ -ポリグルタミン酸ベースに配して抗原性の変異を克服しかつトリ型およびヒト型インフルエンザウイルスに対応した強力な抗インフルエンザウイルス剤を構築した。また、感染阻害試験の結果から両型の受容体糖鎖特異性は末端シアル酸の結合様式において異なるだけでなく、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ることを実証した。

## 研究成果の概要（英文）：

We designed a series of spacer-*O/N*-linked glycopolymers carrying long/short  $\alpha$ 2,3/6 sialylated glycan to act strong inhibitors of the influenza virus. As an alternative design, sialoglycopolypeptides carrying long-spacer linked glycans were engineered by replacement of the *N*-acetylactosamine (LN: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) unit by an alkyl chain. Structure-activity relationship of the resulting sialoglycopolypeptides with different glycans in the array has been investigated by in vitro and in vivo infection experiments. The avian viruses specifically bound to glycopolypeptides carrying a short sialoglycan with higher affinity than to a long glycan. In contrast, human viruses preferentially bound not only to long  $\alpha$ 2,6 sialylated glycan with LN repeats in the receptors, but also to more spacer-linked glycan in which the inner sugar has been replaced by a nonsugar structural unit such as a pentylamido group. Our strategy provides a facile way to design strong polymeric inhibitors of infection by avian and human influenza viruses.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
平成 20 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
平成 21 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：糖鎖工学，人工ムチン，  
インフルエンザウイルス，複合糖質，  
分子認識，糖鎖ミメティックス

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは、人獣共通感染症であり極めて感染力・伝播力が強く抗原変異を繰り返しそれまでの抗原性とは異なる新種が出現するため有効な治療法や感染防御法が見出されていないウイルスの一つである。この制圧は人類共通の課題であり学術的、社会的に極めて意義深く緊急性が求められる。現在、我が国では抗インフルエンザ薬としてウイルスシアリダーゼの特異的阻害剤であるタミフルが欧米から導入されているが、本剤はウイルスの宿主細胞から遊離を阻止できるが、感染の予防、感染の初期反応はブロックできないとされる。また、インフルエンザウイルスは極めて感染力が強く抗原変異を繰り返し、そのため種々の亜型が存在し、それまでの抗原性とは異なる新種が出現するため、ワクチンなどによる効果的な防御対策が立てにくい問題がある。最近では、トリインフルエンザウイルスを起源とした新たな高病原性インフルエンザウイルスの発生が危惧されており、ウイルスの変異に関係なく広く受容体の結合を阻害するインフルエンザ予防剤・治療薬の開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

我々は、既にインフルエンザウイルス受容体糖鎖の研究から、ヒトや他の動物（トリ、ブタ、ウマ）インフルエンザウイルスは抗原性の変異に関らず共通した受容体糖鎖（シアリルラクト系 I および II 型）と結合し、これでウイルスを処理するとウイルスの宿主細胞への感染・侵入が強力に

ブロックされることを見出した。即ち、上記インフルエンザウイルス受容体糖鎖構造を含有する高分子体（ポリペプチド、ポリアクリルアミドなどを骨格とする酵素・化学合成ポリマー）を活用すれば、ウイルス変異を克服し全てのインフルエンザウイルス感染を阻止できる画期的な抗インフルエンザ薬を開発できる可能性を示して来た。そこで、インフルエンザウイルスの感染、接着に関わる特定の受容体シアロオリゴ糖鎖を高い反応効率で且つ単純な手法で高密度に天然素材ポリペプチドである納豆菌由来  $\gamma$ -ポリグルタミン酸をベースとして配列させて糖鎖含有ポリペプチドを作製し、抗インフルエンザ活性を飛躍的に高めて抗原性の変異を克服した抗インフルエンザ薬を機能設計すると共に、量産のための方法論・技術論を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルスに対する強力な高分子阻害剤を開発する目的で、納豆菌由来  $\gamma$ -ポリグルタミン酸をポリペプチドベースとして人工糖鎖含有ポリペプチドの分子設計を行った。本糖鎖ポリマーの設計にあたり①インフルエンザウイルス受容体糖鎖部、②リンカー部、③ポリペプチド部の部分構造に三分割した。まず①と②をワンポットで実際に酵素的に配糖化したラクースおよび N-アセチルラクトサミン二糖アルキル配糖体を合成した。次に、①+②を繋ぎ合せた配糖体に③を繋ぎ、高分子ベース  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の側鎖カルボキシル基を介して実際に単純な工程で効果的に繋ぎ合わせる結合法を確立した(図 1)。

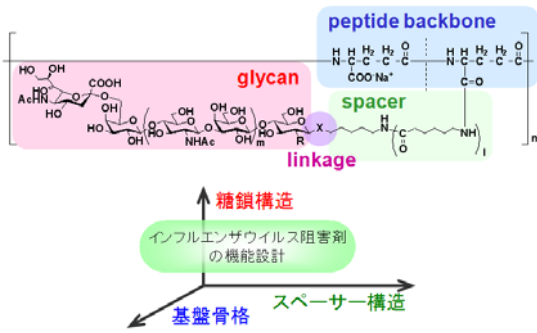


図1. 糖鎖ポリペプチドの分子設計

(2) トリ型およびヒト型インフルエンザウイルスの受容体糖鎖構造に基づいたアシアロ型、シアロ型糖鎖含有ポリペプチド (Neu5Acα2-3(6)Galβ1-4G、Neu5Acα2-3(6)Galβ1-4GlcNAc) のライブラリーを作製し、インフルエンザウイルス感染阻害試験を実施すべく体制を整えた。

#### 4. 研究成果

(1) 作製した糖鎖含有糖鎖ポリペプチドに関する赤血球凝集阻害活性試験の結果、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糖鎖ポリマーは全く阻害活性を示さなかったのに対し、トリ型は 2-3 結合、ヒト型は 2-6 結合のシアル酸をそれに活性を示し、結合特異性と一致した結果を得た(図2)。

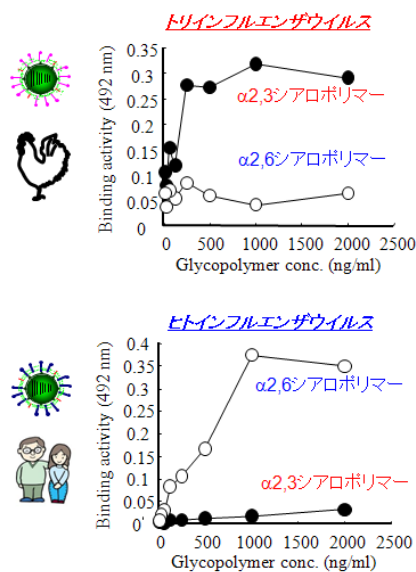


図2. トリおよびヒトインフルエンザウイルスの簡便判別法

(2) 本成果に基づいて、シアリル三糖構造を有する糖鎖含有ポリペプチドを対象化合物として、①ウイルス受容体糖鎖部、②リンカー部、③ポリペプチド部それぞれ三部分の結合様式や構造を変化させることで、強力なインフルエンザウイルス感染阻害剤を創出すべく機能設計を行った。設計に基づいて、内部糖鎖構造が N-アセチルラクタミン繰り返し鎖構造を含む O-結合型および N-結合型シアロ糖鎖ポリペプチドの系統的合成を行うとともに、内部糖鎖構造をアルキル鎖スペーサーに見立てた各種シアロ糖鎖ポリペプチドも作製した。一連の作製した糖鎖含有ポリペプチドの構造と活性との相関を検証した。

(3) 作製した O および N 結合型人工糖鎖ポリペプチドライブラリーを用いた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試験の結果から両型の受容体糖鎖特異性は末端シアル酸の結合様式において異なるだけでなく、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。この内部糖鎖構造に対する活性の違いはヒトとトリで大きく異なっており、特にヒト型ウイルスにおいては内部糖鎖の延長は著しい活性の増大をもたらすとは対象的にトリ型では内部糖鎖の延長は活性の減少をもたらした。

(4) 上記成果に基づいて、本活性に関与する内部糖鎖をアルキル直鎖に置き換え、末端をシアリル三糖に限定した各種糖鎖ポリペプチドを新たに合成した。その結果、内部糖鎖の場合と同様に、アルキル鎖の延長は阻害活性の増大と対応し、アルキルスペーサーは糖鎖ミメティックとして充分に利用できることを見出した(図3)。この機能設計に基づく最終的成果は、インフルエンザウイルス吸着剤の実践的量产化に見通しを与えた。

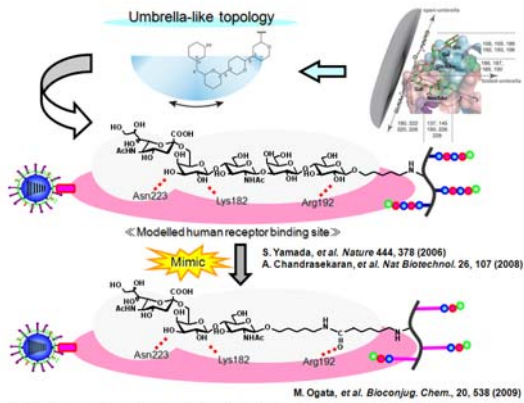


図3. 糖鎖ミメクスを利用したポリマー型インフルエンザウイルス阻害剤

(5) インフルエンザウイルス感染の宿主受容体糖鎖構造に基づいて安価な素材である納豆菌由来ポリグルタミン酸をベースに高密度にオリゴ糖鎖を配した糖鎖含有ポリペプチドを機能設計し、ヒトとトリの両方の型に応じた従来では達成し得ない汎用性に富む糖鎖受容体の製造法を確立した。これら受容体がインフルエンザ感染試験で極めて高い阻害活性を有し、変異に惑わされない強力な吸着活性を有することを実証した。

#### 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 11 件)

- 1) Ogata, M., Hattori, T., Takeuchi, R., and Usui, T. Novel and facile synthesis of furanodictines A and B based on transformation of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose into 3,6-anhydro hexofuranoses. **Carbohydr. Res.**, 査読有、345: 230-234 (2010).
- 2) Masaka, R., Ogata, M., Misawa, Y., Yano M., Hashimoto, C., Murata, T., Kawagishi, H., and Usui, T. Molecular design of N-linked tetravalent glycosides bearing N-acetylglucosamine, N,N'-dicetylchitobiose and N-acetylglucosamine: Analysis of cross-linking activities with specific lectins. **Bioorg. Med. Chem.**, 査読有、18: 621-629

(2010).

- 3) Nagae, M., Nishi, N., Murata, T., Usui, T., and Nakamura, T. Structural analysis of the recognition mechanism of poly-N-acetylglucosamine by the human galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain. **Glycobiology**, 査読有、19: 112-117 (2009).
- 4) Ogata, M., Hidari, K., Murata, T., Shimada, S., Kozaki, W., Park, E.Y., Suzuki, T., and Usui, T. Chemoenzymatic synthesis of sialoglycopolypeptides as glycomimetics to block infection by avian and human influenza virus. **Bioconjugate Chem.**, 査読有、20: 538-549 (2009).
- 5) Ogata, M., Hidari, K., Kozaki, K., Murata, T., Hiratake, J., Park, E.Y., Suzuki, T., and Usui, T. Molecular design of spacer N-linked sialoglycopolypeptide as polymeric inhibitors against influenza virus infection. **Biomacromolecules**, 査読有、10: 1894-1903 (2009).
- 6) Ogata, M., Nakajima, M., Kato, T., Obara, T., Yagi, H., Kato, K., Usui, T., and Park, E.Y. Synthesis of sialoglycopolypeptide for potentially blocking influenza virus using a rat  $\alpha 2,6$ -sialyltransferase expressed in BmNPV bacmid-injected silkworm larvae. **BMC Biotechnol.**, 査読有、9: 1-13 (2009).
- 7) Misawa, Y., Akimoto, T., Amarume, S., Murata, T., and Usui, T. Enzymatic synthesis of spacer-linked divalent carrying N-acetylglucosamine and N-acetylglucosamine: Analysis of cross-linking activities with WGA. **J. Biochem.**, 査読有、143: 21-30 (2008).
- 8) Misawa, Y., Masaka, R., Maeda, K., Yano, M., Murata, T., Kawagishi, H., and Usui, T. Efficient synthesis of spacer-N-linked

- double-headed glycosides  
*N*-acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose their cross-linking activities with wheat germ agglutinin. **Carbohydr. Res.**, 査読有、347: 434-442 (2008).
- 9) Hidari, K., Murata, T., Yoshida, K., Takahashi, Y., Minamijima, Y., Miwa, Y., Adachi, S., Ogata, M., Usui, T., Suzuki, Y., and Suzuki, T. Chemoenzymatic synthesis, characterization and application of glycopolymers carrying lactosamine repeats as entry inhibitors against influenza virus infection. **Glycobiology**, 査読有、18: 779-788 (2008).
- 10) Ogata, M., Murata, T., Murakami, K., Suzuki, T., Hidari, K., Suzuki, Y., and Uusi, T. Chemoenzymatic synthesis of artificial glycopolypeptides containing multivalent sialyloligosaccharides with a  $\gamma$ -polyglutamic acid backbone and their effect for inhibition of infection by influenza viruses. **Bioorg. Med. Chem.**, 査読有、15: 1383-1393 (2007).
- 11) Ogata, M., Zeng, X., Uusi, T., and Uzawa, H. Substrate specificity of *N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* to artificialglycosyl acceptors having various substituents at the reducing ends. **Carbohydr. Res.**, 査読有、342: 23-30 (2007).
- [学会発表] (計 12 件)
- 1) 矢野恵美, 橋本知佳, 尾形慎, 朴龍洙, 村田健臣, 碓氷泰市. シアロ型多価配糖体の設計とレクチンとの相互作用解析. 第29回日本糖質学会(2009年9月10日, 高山).
- 2) 小原平圭, 尾形慎, 中馬康志, 朴龍洙, 村田健臣, 碓氷泰市.  $\alpha$ 2,6 シアル酸転移酵素の活性測定に対する受容体としての蛍光標識受容体基質の合成. 第29回日本糖質学会 (2009年9月10日, 高山).
- 3) 中馬康志, 小原平圭, 尾形慎, 村田健臣, 碓氷泰市. N-結合型糖鎖をミミックした二本鎖及び二分岐二本鎖配糖体の酵素・化学合成. 第29回日本糖質学会 (2009年9月10日, 高山).
- 4) 尾形慎, 村田健臣, 朴龍洙, 碓氷泰市. 酵素-化学合成法を用いた人工糖鎖ポリペプチドの分子設計~酵素利用の観点から~. 糖質関連酵素シンポジウム (2009年9月18日, 弘前).
- 5) 小崎渉, 尾形慎, 酒井有子, 朴龍洙, 村田健臣, 左一八, 鈴木隆, 碓氷泰市. トリおよびヒトインフルエンザウイルスに対する糖鎖高分子阻害剤の分子設計 (1). 日本農芸化学会 (2008年3月28日, 名古屋).
- 6) 尾形慎, 酒井有子, 小崎渉, 朴龍洙, 村田健臣, 島田静美, 左一八, 鈴木隆, 碓氷泰市. トリおよびヒトインフルエンザウイルスに対する糖鎖高分子阻害剤の分子設計 (2). 日本農芸化学会 (2008年3月28日, 名古屋).
- 7) 尾形慎, 左一八, 島田静美, 小崎渉, 朴龍洙, 村田健臣, 碓氷泰市, 鈴木隆. 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. 第28回日本糖質学会 (2008年8月18日, つくば).
- 8) 小崎渉, 尾形慎, 朴龍洙, 村田健臣, 左一八, 鈴木隆, 碓氷泰市. ヒトおよびトリインフルエンザウイルス阻害剤としての人工糖鎖ポリペプチドの効率的合成. 第28回日本糖質学会(2008年8月19日, つくば).
- 9) 尾形慎, 朴龍洙, 村田健臣, 島田静美, 左一八, 鈴木隆, 碓氷泰市. 抗インフルエンザ剤としての LacNAc 繰り返し含有シアロ糖鎖ポリペプチドの分子設計. 日本農芸化学会(2007年3月26日, 東京).
- 10) 酒井有子, 尾形慎, 村田健臣, 左一八, 鈴木隆, 碓氷泰市. 人工糖鎖ポリペプチドのスペーサー部構造の違いがインフルエンザウイルス感染阻害活性へ及ぼす影響. 日本農芸化学会 (2007年3月26日, 東京).
- 11) 小崎渉, 尾形慎, 朴龍洙, 村田健臣, 左一八, 鈴木隆, 碓氷泰市. 抗インフルエンザウイルス剤の実践的合成法の開発. 第27回日本糖質学会(2007年8月2日, 福岡).
- 12) 尾形慎, 高橋香元, 朴龍洙, 村田健臣, 吉田和弘, 島田静美, 左一八, 鈴木隆, 碓氷泰市. インフルエンザウイルス感染阻害剤としてのシアロ人工糖鎖ポリペプチドの分子設計. 第27回日本糖質学会 (2007年8月2日, 福岡).

[図書] (計 1 件)

- 1) Murata, T., and Usui, T. Convenient synthesis of glycan-related oligosaccharides and their transformation into neoglycoconjugates using enzymatic methods. In: **Experimental Glycoscience, Glycobiology.** Taniguchi, N., Suzuki, A. *et al.* (eds.) pp. 498, Springer, 5-8 (2008).

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

- 1) 名称：新規な N 結合型人工シアロ糖鎖含有ポリマーおよびその製造方法  
発明者：碓氷泰市，村田健臣，鈴木隆，左一八，大場勇介，浜本智樹，野口利忠

権利者：国立大学法人静岡大学，静岡県公立大学法人，ヤマサ醤油(株)

種類：特許

番号：PCT/JP/61429

出願年月日：2008/6/24

国内外の別：国外

- 2) 名称：抗ウイルス剤

発明者：鈴木隆，左一八，村田健臣，碓氷泰市，竹田聡，山田浩平，野口利忠，鈴木康夫

権利者：国立大学法人静岡大学，静岡県公立大学法人，ヤマサ醤油(株)

種類：特許

番号：特願 2007-161257

出願年月日：2007/6/19

国内外の別：国内

- 3) 名称：改変ポリヘドリンプロモーター、  
パクミド変異体及び目的タンパク質の製造方法

発明者：朴龍洙，碓氷泰市，村田健臣，金政真

権利者：国立大学法人静岡大学

種類：特許

番号：特願 2007-154456

出願年月日：2007/6/11

国内外の別：国内

- 4) 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：特願 2010- 248463

出願年月日：2010/3/4

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

碓氷 泰市 (USUI TAIICHI)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：50111802

### (2) 連携研究者

村田 健臣 (MURATA TAKEOMI)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：30273171

朴 龍洙 (PARK ENOCH)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授

研究者番号：90238246

鈴木 隆 (SUZUKI TAKASHI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：20240947

左 一八 (HIDARI KAZUYA)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：20260226