

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790044

研究課題名(和文) グライコムクス技術によるロタウイルスレセプターの特異性と抗ウイルス薬創薬の検証

研究課題名(英文) Glycomics for identification of rotavirus receptor and development of antiviral agent

研究代表者

山田 佳太 (YAMADA, Keita)

近畿大学・薬学部・研究員

研究者番号：80584185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円、(間接経費) 390,000円

研究成果の概要(和文)：ロタウイルス感染症は、世界中で乳幼児を中心に年間1億人が発症する疾患であり、発展途上国を中心に年間60万人以上の死者を出している。ロタウイルスは、ウイルス表面に糖鎖認識分子を発現しており、感染時に宿主細胞上の糖鎖に結合することが示唆されている。しかし、これまでウイルス粒子が結合する糖鎖の解析例は報告されておらず、ウイルスエントリーに関わる重要な糖鎖構造は未だ明らかにされていない。我々は、これまで開発した糖鎖分析技術及び糖鎖アレイ法¹を用いて生ロタウイルスが認識する糖鎖構造を明らかにした。また、ウイルス標的糖鎖構造が宿主細胞上の糖脂質に大量に発現していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Rotavirus is the major etiology of severe gastroenteritis in infants especially in developing countries. It is indicated that human rotavirus (hRV) recognizes glycans expressed on host cells as the initial step of virus-cell entry. In this study, glycan structures recognized by hRV were studied by the glycan array method, which we previously established. We found that hRV (MO strain) strongly recognizes NeuGc residues and sulfated glycans. These results indicated that NeuGc and sulfated glycans show a n important role in human rotavirus infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：ロタウイルス 硫酸化糖鎖 N-グリコシルノイラミン酸 糖脂質 糖鎖アレイ 分析化学

1. 研究開始当初の背景

乳幼児や幼児が罹る代表的な疾患として、ロタウイルス感染症が挙げられ、発症者数は年間1億人以上にもなる。ロタウイルス感染症は発熱と共に重篤な下痢を引き起こし、発展途上国を中心に60万人の死者を出している。我が国でも年間78,000人の入院患者を出しており、その医療費負担は100億円と見積もられている。

ロタウイルスは、宿主細胞上の糖鎖に結合することで感染を成立させることが示唆されているが、認識糖鎖の構造及びレセプター分子の特定はなされておらず、詳細な感染メカニズムは未だ明らかにされていない。そのため、この感染症に対する根本的な治療法はなく、対処療法のみで対応せざるを得ない状況である。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、申請者が開発した糖鎖解析技術を用いて、ロタウイルスの感染機構の一旦を解明し、治療法開発に関する有益な情報を取得することである。研究期間前半では、ヒトロタウイルスが認識する糖鎖構造を特定する。研究期間後半ではウイルス認識糖鎖のキャリア分子を同定し、ウイルスレセプターとなりうる分子を特定する。さらに感染実験により、糖鎖がウイルスの感染性に与える影響を評価することで、糖鎖構造を指標とした抗ウイルス薬の創薬の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、まずロタウイルスに高い感受性を示すMA104細胞表面に発現する糖鎖を網羅的に解析し、ウイルス高感受性細胞の特徴的な糖鎖プロファイルを明らかにした。糖鎖解析手法はこれまでに申請者が確立した手法に従って実施した(Yamada K et al. J Proteome Res. 2009 8(2):521-37, J Pharm Biomed Anal. 2011 55(4):702-27)。

(2) (1)の結果を基に、高感受性細胞の糖鎖プロファイルを反映させた糖鎖アレイを作製し、作製したアレイを用いてヒトロタウイルス(MO株)認識糖鎖をスクリーニングした。糖鎖アレイ解析法は申請者が確立した手法に従って実施した(Yamada K et al. Anal Chem. 2013 85(6):3325-33)。またウイルス認識糖鎖の発現量を定量的に評価することで、キャリア分子になりうる分子を特定した。

(3) 特定したウイルス認識糖鎖によるウイルス感染阻害実験を実施した。感染阻害効果は、MA104細胞に対するロタウイルスの感染率を求めことで評価した。

4. 研究成果

(1) ヒトロタウイルス高感受性細胞(MA104細胞)に発現する糖タンパク質糖鎖、糖脂質糖鎖を網羅的に解析した。糖タンパク質糖鎖のアスパラギン残基結合(N-結合)型糖鎖は、高

分岐型糖鎖やポリラクトサミン型糖鎖等の高分子糖鎖が大量に観察された。さらに、ガラクトースの6位が硫酸化された糖鎖やマンノースの6位がリン酸化された糖鎖も観察され、複雑な糖鎖プロファイルを示した。一方、セリンスレオニン残基結合(O-結合)型糖鎖は、コア構造にCore 1およびCore 2構造を持つ糖鎖が主に観察された。さらに、N-結合型糖鎖と同様にポリラクトサミン構造を有するものが観察された。さらに、O-結合型、N-結合型糖鎖共に非還元末端に、N-グリコシルノイラミン酸(NeuGc)を有するものが大量に観察された。また、高感受性細胞が発現するグリコサミノグリカン類についても、解析を進めた。2 糖分析により部分構造を解析した結果、ウイルス高感受性細胞が発現するグリコサミノグリカン類の主要な成分は、コンドロイチン4硫酸であることが明らかになった。

糖脂質糖鎖解析した結果、分子量2000以上の高度に伸長されたガングリオシド型糖鎖が観察された。また、非還元末端がN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)で停止した糖鎖が大量に観察された。また、糖タンパク質糖鎖と同様に、硫酸化糖鎖及びNeuGcを有する糖鎖が観察された。

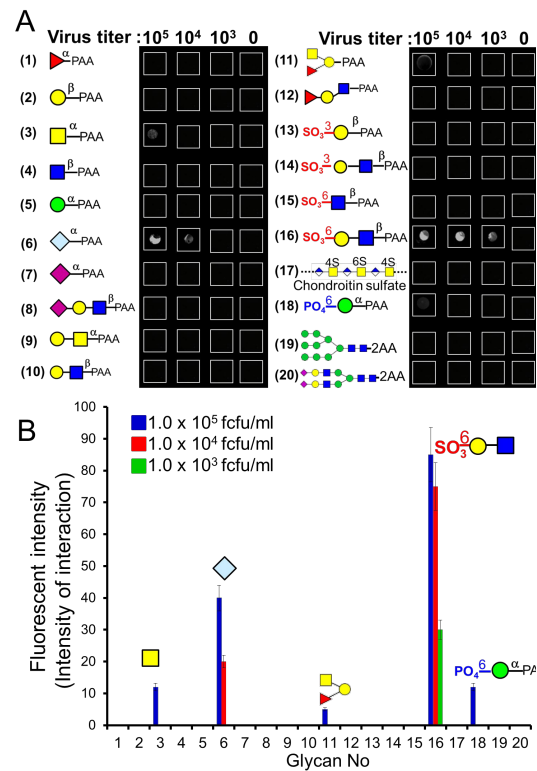


Figure 1. Interaction between glycans and human Rotavirus (MO strain)

(A) Image (B) Fluorescent intensity of spots

(2) (1)の解析結果を基に高感受性細胞の糖鎖プロファイルを反映させた、糖鎖アレイを

作製し、ヒトロタウイルス(MO株)の生ウイルスの認識糖鎖をスクリーニングした。MO株ウイルスは、複数の糖鎖と相互作用を示したが、NeuGcとガラクトースの6位が硫酸化された糖鎖に強い親和性を示すことが明らかになった。ガラクトース6硫酸化糖鎖は、ロタウイルス感染部位となる小腸上にも発現しうるため、ヒトロタウイルスの標的糖鎖となる可能性が非常に高い。一方ヒトは体内でNeuGcを合成することができないためヒト組織中ではNeuGcは発現しないと言われている。しかし、最近、ヒトは食事等によって外部からNeuGcを取り込み、糖鎖の生合成に利用することが明らかになっている(J Exp Med. 2010 207(8):1637-46)。従って、NeuGcがヒトロタウイルスの標的になる可能性も非常に高いと考えられる。

さらに、糖タンパク質と糖脂質上に発現するNeuGc及び硫酸化糖鎖の発現量を比較すると、糖脂質上のNeuGc及び硫酸化糖鎖の量が、糖タンパク質上に存在するものに比べて約3倍も高い値を示した。また、Guoらは、細胞表面の糖脂質糖鎖を切除するとウイルスに対する細胞の感受性が低下することを報告している。(J Biochem. 126(4):683-8 (1999))この結果から、ヒトロタウイルスと相互作用する糖鎖の主要なキャリア分子は糖脂質(スフィンゴ糖脂質)であることが示唆された。

(3)糖鎖を指標とした抗ウイルス薬創薬の可能性を検証するため、NeuGcによるヒトロタウイルス感染阻害効果を評価した。感染阻害効果、MA104細胞に対するロタウイルスの感染率を求め評価した。解析の結果、NeuGcは弱いながらもロタウイルスの感染阻害作用を示した。現在、ウイルスとより強い相互作用を示した硫酸化糖鎖を用いた感染阻害実験を実施中である。

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)

Inagaki M, Muranishi H, Yamada K, Kakehi K, Uchida K, Suzuki T, Yabe T, Nakagomi T, Nakagomi O, Kanamaru Y.

Bovine κ -casein inhibits human rotavirus (HRV) infection via direct binding of glycans to HRV.

Journal of dairy science, 2014, 97(5):2653-61 査読有 DOI: 10.3168/jds.2013-7792

Kinoshita M, Mitsui Y, Kakoi N, Yamada K, Hayakawa T, Kakehi K.

Common glycoproteins expressing poly-lactosamine-type glycans on matched patient primary and metastatic melanoma cells show different glycan profiles.

Journal of Proteome Research, 2014,

13(2):1021-33. 査読有 DOI: 10.1021/pr401015b

Yamada K, Hirabayashi J, Kakehi K.

Analysis of O-glycans as 9-fluorenylmethyl derivatives and its application to the studies on glycan array.

Analytical chemistry, 2013, 85(6):3325-33. 査読有 DOI: 10.1021/ac303771q

Iwatsuka K, Watanabe S, Kinoshita M, Kamisue K, Yamada K, Hayakawa T, Suzuki T, Kakehi K.

Free glycans derived from glycoproteins present in human sera.

Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2013, 928, 16-21. 査読有 DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.03.010

Mitsui Y, Yamada K, Hara S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

Comparative studies on glycoproteins expressing poly-lactosamine-type N-glycans in cancer cells.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 70:718-26. 査読有 DOI: 10.1016/j.jpba.2012.06.035

Sumiyoshi W, Nakakita S, Miyanishi N, Yamada K, Hasehira K, Nakakita Y, Hirabayashi J.

Hypersialylated type-I lactosamine-containing N-glycans found in Artiodactyla sera are potential xenoantigens.

Glycobiology, 2012, 22(8):1031-41. 査読有 DOI: 10.1093/glycob/cws069

〔学会発表〕(計 11 件)

山田佳太, 木下充弘, 徐吉夫, 井上利樹, 青島元法, 長谷川清孝, 清一雄, 北荘一郎, 掛樋一晃, 「癒着防止剤中カルボキシメチルセルロースの構造評価技術」日本薬学会第134年会, 熊本, 2014年3月29日

山田佳太, 栢原春奈, 稲垣瑞穂, 木下充弘, 金丸義敬, 鈴木徹, 矢部富雄, 中込とよ子, 中込治, 掛樋一晃, 「ロタウイルスエントリー機構の解明に向けたグライコミクス」, 日本薬学会第134年会, 熊本, 2014年3月28日

大野翔平, 稲垣瑞穂, 山田佳太, 鈴木徹, 松田幹, 高橋毅, 杉山誠, 中込とよ子, 中込治, 矢部富雄, 金丸義敬, 「牛乳由来タンパク質ラクトフォリンの感染阻害作用に関する研究」, 日本農芸化学会中部支部第168回例会, 愛知, 2013年10月12日

山田佳太, 栢原春奈, 稲垣瑞穂, 金丸義敬, 矢部富雄, 鈴木徹, 中込治, 中込とよ子, 木下充弘, 掛樋一晃, 「ヒトロタウイルス感染機構の解明に向けたグライコミクス

解析」, 第 32 回日本糖質学会年会, 大阪, 2013 年 8 月 5 日

山田佳太, 栢原春奈, 稲垣瑞穂, 金丸義敬, 鈴木徹, 中込 治, 中込とよ子, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃, 「ヒトロタウイルスが認識する糖鎖の解析とその臨床化学的応用の可能性」, 日本薬学会第 133 年会, 神奈川, 2013 年 3 月 29 日

山田佳太, 平林 淳, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃, 「多様なムチン型糖鎖アレイの作製を可能にする糖鎖ライブラリー構築技術」, 日本薬学会第 133 年会, 神奈川, 2013 年 3 月 29 日

稲垣瑞穂, 村西晴香, 山田佳太, 内田健志, 鈴木徹, 矢部富雄, 中込とよ子, 中込治, 金丸義敬, 「ヒトロタウイルスは, 牛乳カッパカゼインの糖鎖構造を認識する」, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 14 日

大野翔平, 稲垣瑞穂, 山田佳太, 矢部富雄, 鈴木徹, 高橋毅, 杉山誠, 中込とよ子, 中込治, 金丸義敬, 「牛乳ラクトフォリンの示すヒトロタウイルス感染阻害作用(続報)」第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月 14 日

山田 佳太, 平林 淳, 掛樋一晃
「Fmoc 標識化法を用いた O-結合型糖鎖解析-汎用性の高い O-結合型糖鎖ライブラリーの構築-」, 第 31 回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2012 年 9 月 19 日

神末和哉, 大河原周平, 山田 佳太, 岩塚欣也, 木下 充弘, 早川 堯夫, 掛樋 一晃, 「ヒト胃腺癌細胞 MKN45 細胞は糖タンパク質由来遊離糖鎖を細胞外へ分泌する」, 第 31 回日本糖質学会年会, 鹿児島, 2012 年 9 月 18 日

Mizuho Inagaki, Shohei Ohno, Keita Yamada, Takeshi Takahashi, Yoshitaka Nakamura, Tsukasa Matsuda, Tomio Yabe, Tohru Suzuki, Makoto Sugiyama, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, and Yoshihiro Kanamaru: The inhibitory mechanism of bovine lactophorin against human rotavirus gastroenteritis., World Congress of Microbes-2012, Guangzhou, China, July 30, 2012.

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 佳太 (YAMADA Keita)

近畿大学・薬学部・研究員

研究者番号: 80584185

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし