

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 8 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570146

研究課題名（和文） 糖鎖機能制御プローブによるウイルス受容体機能の解明と感染制御

研究課題名（英文） Investigation and application of virus receptors for infection control by chemical probes regulating glycan function

研究代表者

左 一八 (HIDARI KAZUYA)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：20260226

研究成果の概要（和文）：ウイルス受容体糖鎖機能および病態形成機構解明のために、受容体特異的認識抗体を作製するとともに、生体内分布を明らかにするための基盤を構築した。人工糖鎖分子および糖誘導体を用いたウイルス-受容体糖鎖間相互作用解析法により、受容体糖鎖との相互作用を解析する高感度化システムを確立した。受容体機能を競合的に阻害するプローブとの相互作用の分子機構を明らかにし、さらに病態形成に関わる宿主因子として新たにスフィンゴ糖脂質を見出した。

研究成果の概要（英文）： In order to elucidate molecular function of virus receptors and mechanisms on progression of virus-infectious diseases, we generated a new monoclonal antibody specific for virus glycan receptor, which would contribute to elucidation of tissue distribution of the virus receptor. Artificial glycans and carbohydrate derivatives that competitively inhibited virus-glycan receptor interaction are used to establish a sensitive analysis method for virus adsorption properties. In addition, we newly found glycosphingolipids involved in progression of virus-infectious diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学、ウイルス、感染症、受容体、分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザウイルス（IFV）、デングウイルス（DEV）感染症は、自然宿主である野生動物から終末宿主のヒトへとウイルスが異種間感染することで引き起こされる。

(2) これらのウイルス受容体が糖鎖分子で

あること、糖鎖分子がウイルス侵入に関わる可能性などが報告されてきた。

(3) ウイルス-受容体糖鎖分子間相互作用やウイルス受容体糖鎖分子の機能は解明されておらず、ウイルス初期感染・異種間感染機構および病態形成機構は不明であった。

(4) 感染初期段階の宿主側因子に作用する抗ウイルス剤の報告はなく、ウイルスの異なる宿主指向性を評価する方法論も確立していなかった。

2. 研究の目的

感染初期におけるウイルスと宿主受容体分子との相互作用の解明は、ウイルス感染による病態形成を理解するうえで必須である。

(1) 複数の糖鎖機能制御化合物（プローブ）を用い、ウイルス吸着・侵入過程における受容体糖鎖分子の機能および宿主細胞とウイルスとの相互作用によって誘起される受容体糖鎖を介した細胞応答の実体を包括的に明らかにする。すなわちウイルス初期感染における受容体糖鎖機能および病態形成機構を解明することを目的とする。

(2) 糖鎖機能制御プローブの低分子化・標的分子特異性向上による分子最適化により、新規作用機序を持つウイルス侵入阻害剤を創出、ならびに高感度ウイルス宿主指向性検出システムを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は世界的規模で流行する IFV と DEV について、以下の研究を実施する。

(1) 受容体糖鎖分子を特異的に検出する単クローン抗体を用いて、異なる宿主での受容体分子の組織、細胞における局在性、感染標的組織・細胞での受容体糖鎖合成様式を解明する。

(2) ウイルスタンパク質と受容体糖鎖分子との相互作用を測定し、糖鎖構造-ウイルス親和性の相関を解析する。

(3) 糖鎖機能制御プローブと標的タンパク質との相互作用を、構造生物学的手法ならびに Bioinformatics を用いて分子レベルで解明する。

(4) ウイルス感染初期に受容体糖鎖分子を介した宿主細胞内情報シグナルを網羅的に解析することにより、病態形成に関与する初期シグナル分子を同定、糖鎖分子を介した情報伝達系を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 宿主特異的受容体糖鎖分子の組織分布、局在性の解析：

トリ IFV 受容体糖鎖構造 (Neu5Ac α 2-3Gal) を認識する単クローン抗体を樹立した。この抗体を用いた糖鎖発現解析より、これまでトリ受容体の組織分布の解析に用いられてきた糖鎖特異性の低い MAM レクチンとは異なる

発現結果が得られた。本抗体は、トリ受容体糖鎖に対して極めて特異性が高いことから、トリ受容体糖鎖分子の組織分布、局在性の解析により IFV の異種間感染基盤となる受容体糖鎖分子の局在性を解明することが可能となった。DEV 受容体候補糖鎖分子に特異的に反応する単クローン抗体を用い細胞表面糖鎖発現解析により、ウイルス感受性と当該糖鎖分子発現との相関性を明らかにした。

(2) 異なる種由来のウイルスと宿主受容体糖鎖分子との相互作用の解析：

IFV 種特異的に結合する糖鎖ポリマーを用いたウイルス-受容体糖鎖間相互作用解析法により、異なる種・異なる地域・異なる年代から分離されたウイルス株のヒト受容体およびトリ受容体糖鎖との相互作用を網羅的に解析した。その結果、近年分離されたヒト H3 亜型臨床株のヒト受容体糖鎖に対する結合特性変化および受容体糖鎖との相互作用の変化にかかわるヘマグルチニン分子上のアミノ酸変異を同定した。

(3) ウイルス-受容体糖鎖模倣機能制御プローブとの相互作用の解析：

表面プラズモン共鳴法により、デングウイルス E タンパク質-グリコサミノグリカン相互作用を解析するための高感度化システムを確立した。本法を用いて、デングウイルス感染阻害作用を示す 2 種類のグリコサミノグリカン、ヘパリンとコンドロイチン硫酸 E (CSE) との結合親和性に違いがあることが明らかとなった。ヘパリンと CSE との糖鎖構造比較により、デングウイルス感染阻害効果に必要な最小糖構造として硫酸化グルクロン酸を推定した。その構造情報に基づき、グルクロン酸の種々の硫酸化誘導体を化学合成し、その抗デングウイルス効果を検討した。その結果、E タンパク質高親和性プローブとしてメチル- α -3-O-硫酸化グルクロン酸を創出した。

(4) 糖鎖生合成阻害剤によるウイルス受容体機能発現の制御：

感染感受性細胞において、複合糖鎖分子を生合成する糖転移酵素阻害剤の抗デングウイルス活性をスクリーニングした結果、受容体糖鎖分子を含む複合糖鎖発現抑制に伴い、ウイルス感染・増殖能が著しく低下することを見出した。本阻害剤は糖鎖機能制御プローブのみならず、抗デングウイルス剤リードとなることが期待される。

(5) 糖鎖機能制御プローブと標的タンパク質複合体の生化学的および構造生物学的解析：

ウイルスタンパク質-宿主糖鎖分子間相

相互作用について、プローブ分子の化学的修飾を網羅的に行い、ウイルスタンパク質との複合体の立体構造を、コンピュータモデリング法により解析した。その結果、DENVが持つ結合タンパク質であるEタンパク質上のLys295が3-位硫酸化グルクロン酸誘導体との結合に関与している可能性が示唆された。

(6) ウイルス-糖鎖分子間相互作用が誘起する細胞内シグナルの生化学的解析および機能の解明:

ウイルス感染初期における宿主糖鎖分子との相互作用に関して、デングウイルスタンパク質とスフィンゴ糖脂質を介した相互作用によるウイルス増殖への影響、および細胞内シグナルの重要な場となるスフィンゴ糖脂質が形成する細胞膜ドメイン形成について生化学的性状を解析した。その結果、ラフトと呼ばれる細胞内におけるスフィンゴ糖脂質が形成するマイクロドメインにデングウイルスEタンパク質が分布すること、その分布を阻害するとウイルス増殖が著しく阻害されることを見出した。

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 12 件)

① K. I. P. J. Hidari, T. Suzuki: Antiviral agents targeting glycans on dengue virus E-glycoprotein. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 9, 983-985 (2011) 査読有

② K. I. P. J. Hidari, T. Suzuki: Dengue virus receptor. *Trop. Med. Health* 39, 37-43 (2011) 査読有

③ J. Chen, S. Yamada, Y. Hama, A. K. Shetty, T. Kobayashi, H. Oda, K. Seiki, E. Kim, T. Kimura, N. Takahashi, Kazuya I. P. J. Hidari, T. Suzuki, Y. Suzuki, K. Sugahara: Unique heparan sulfate from shrimp heads exhibits a strong inhibitory effect on infections by dengue virus and Japanese encephalitis virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 136-142 (2011) 査読有

④ S. Wichit, A. Jittmittraphap, K. I. P. J. Hidari, B. Thaisomboonsuk, S. Petmitr, S. Ubol, C. Aoki, S. Itonori, K. Morita, T. Suzuki, Y. Suzuki, W. Jampangern: Dengue virus type 2 recognizes carbohydrate moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian and mosquito cells. *Microbiol. Immunol.* 55, 135-140 (2011) 査読有

⑤ Masanori Muranaka, Takashi Yamanaka,

Yoshinari katayama, Kazuya I. P. J. Hidari, Hiroaki Kanazawa, Takashi Suzuki, Kazuomi Oku, Toshifumi Oyamadai: Distribution of influenza virus sialoreceptors on upper and lower respiratory tract in horses and dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 125-127 (2011) 査読有

⑥ D. Kato, I. Watanabe, M. Arihara, N. Sugiura, K. Kimata, Y. Suzuki, K. Morita, K. I. P. J. Hidari, T. Suzuki: Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. *Antiviral Res.* 88, 236-243 (2010) 査読有

⑦ T. Yamanaka, K. Tsujimura, T. Kondo, T. Matsumura, H. Ishida, M. Kiso, K. I. P. J. Hidari, T. Suzuki: Infectivity and pathogenicity of canine H3N8 influenza A virus in horses. *Influenza Other Respi. Viruses* 4, 345-351 (2010) 査読有

⑧ K. I. P. J. Hidari, T. Suzuki: Glycan receptor for influenza virus. *Open Antimicrob. Agents J.* 2, 26-33 (2010) 査読有

⑨ M. Ogata, K. I. P. J. Hidari, W. Kozaki, T. Murata, J. Hiratake, E. Y. Park, T. Suzuki, T. Usui: Molecular design of spacer-N-linked sialoglycopolyptide as polymeric inhibitors against influenza virus infection. *Biomacromolecules* 10, 1894-1903 (2009) 査読有

⑩ K. I. P. J. Hidari, K. Oyama, G. Ito, M. Nakayama, M. Inai, S. Goto, Y. Kanai, K. Watanabe, K. Yoshida, T. Furuta, T. Kan, T. Suzuki: Identification and characterization of flavonoids as sialyltransferase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 609-613 (2009) 査読有

⑪ K. I. P. J. Hidari, M. Ogata, T. Murata, S. Shimada, W. Kozaki, E. Y. Park, T. Suzuki, T. Usui: Chemoenzymatic synthesis of sialoglycopolyptides as glycomimetics to block infection by avian and human influenza viruses. *Bioconjugate Chem.* 20, 538-549 (2009) 査読有

⑫ J. Sakamoto, T. Koyama, D. Miyamoto, S. Yingsakmongkon, K. I. P. J. Hidari, W. Jampangern, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Esumi, T. Nakamura, K. Hatano, D. Terunuma, K. Matsuoka: Systematic syntheses of

influenza neuraminidase inhibitors: A series of carbosilane dendrimers uniformly functionalized with thioglycoside-type sialic acid moieties. Bioorg. Med. Chem. 17, 5451-5464 (2009) 査読有

〔学会発表〕(計 31 件)

1. K.I.P.J. Hidari : Sulfated Glucuronide Derivative As A Potential Anti-dengue Virus Agent.

8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (Tokyo), Program and Abstracts, p. 73, 30 November, 2011

2. K.I.P.J. Hidari : A monoclonal antibody recognizes sialo-glycans with Sia α 2-3 Glycans.

The 4th International Conference on Health and Longevity Sciences (Shizuoka), Program and Abstracts, p. 56, 21 October, 2011

3. 左 一八 : デングウイルス E タンパク質を標的とする抗ウイルス剤の創製
US フォーラム 2011 (静岡)、要旨集 p. 92、2011 年 9 月 27 日

4. 山口真帆 : 新規 Sia α 2-3 結合型糖鎖検出プローブの確立
第 84 回日本生化学会大会 (京都)、プログラム p. 96、2011 年 9 月 23 日

5. K. Ekawa : Biochemical properties of N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein.

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011, Sapporo), Final Program p. 162, 15 September, 2011

6. 江川且起 : Sia α 2-3 含有糖鎖の免疫学的検出
第 30 回日本糖質学会年会 (長岡)、要旨集 p. 124、2011 年 7 月 13 日

7. 左 一八 : デングウイルス E タンパク質機能を標的とする低分子糖誘導体
第 30 回日本糖質学会年会 (長岡)、要旨集 p. 46、2011 年 7 月 11 日

8. 江川且起 : Sia α 2-3 含有糖鎖の免疫学的検出
第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会 (名古屋)、要旨集 p. 84、2011 年 7 月 9 日

9. 左 一八 : Sia α 2-3 含有糖鎖の免疫学的

検出

第 25 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム (富山)、プログラム p. 5、2011 年 6 月 3 日

10. 山口真帆 : Sia α 2-3 含有糖鎖の免疫学的検出

第 75 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (静岡)、抄録集 p. 59、2011 年 5 月 28 日

11. 江川且起 : デングウイルス NS1 タンパク質糖鎖の生化学的性状

第 75 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (静岡)、抄録集 p. 58、2011 年 5 月 28 日

12. 吉野宏毅 : イヌから分離された A 型インフルエンザウイルスのシアロ糖鎖認識

第 75 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (静岡)、抄録集 p. 56、2011 年 5 月 28 日

13. 左 一八 : 病原性の異なる日本脳炎ウイルス株の硫酸化糖鎖認識

第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (金沢)、要旨集 p. 18、2011 年 5 月 20 日

14. 左 一八 : デングウイルス E タンパク質機能を阻害する低分子誘導体

第 46 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (金沢)、要旨集 p. 14、2011 年 5 月 20 日

15. 左 一八 : デングウイルス結合性硫酸化糖鎖分子の同定と感染制御への応用

第 53 回日本脂質生化学会 (東京)、要旨集 p. 174、2011 年 5 月 13 日

16. 神邊友宏 : デングウイルス結合性硫酸化糖鎖分子の構造と性状解析

日本薬学会第 131 年会 (静岡)、要旨集 3、p. 96、2011 年 3 月 31 日

17. 吉野宏毅 : イヌインフルエンザウイルスのシアロ糖鎖認識機構

日本薬学会第 131 年会 (静岡)、要旨集 3、p. 95、2011 年 3 月 31 日

18. 須藤 豊 : 病原性の異なる日本脳炎ウイルス株の硫酸化糖鎖認識

日本薬学会第 131 年会 (静岡)、要旨集 3、p. 216、2011 年 3 月 30 日

19. 渡邊 圭一 : 大腸菌を宿主とする組換え体シアル酸転移酵素発現系の構築

日本薬学会第 131 年会 (静岡)、要旨集 3、p. 109、2011 年 3 月 30 日

20. 左 一八：インフルエンザウイルスが認識する宿主受容体糖鎖
日本薬学会第 131 年会（静岡）、要旨集 3、
p. 174、2011 年 3 月 29 日
21. K. Watanabe: Purification of soluble recombinant human ST6Gal I expressed in *E. coli*.
Sialoglyco2010 (Potsdam, Germany),
Abstract p. A26, August 22, 2010
22. K.I.P.J. Hidari: Anti-flavi virus activity of sulfated carbohydrates.
25th International Carbohydrate Symposium (Tokyo), Abstract p. 541, August 5, 2010
23. 左 一八：日本脳炎ウイルス感染における硫酸化糖鎖分子の構造と機能
第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（東京）プログラム・抄録集、p. 19、2010 年 5 月 28 日
24. K.I.P.J. Hidari: Anti-Dengue Virus Activity of Sulfated Polysaccharides
Duke-NUS Emerging Infectious Diseases Inauguration Symposium & 4th Asian Dengue Research Network Meeting (Singapore), Abstract p. 46, Dec. 9, 2009
25. 左 一八：硫酸化糖鎖を介したデングウイルス - 宿主細胞間相互作用
第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）、要旨集、p. 464、2009 年 10 月 26 日
26. 南島陽平：インフルエンザウイルスヘマグルチニン受容体糖鎖間相互作用の分子機構
糖鎖科学名古屋拠点 第 7 回若手の力（名古屋）、要旨集、p. 15、2009 年 9 月 30 日
27. 左 一八：フラビウイルス感染に関わる硫酸化糖鎖分子の構造と機能
第 29 回日本糖質学会年会（高山）、要旨集、p. 61、2009 年 9 月 11 日
28. 渡邊一平：グリコサミノグリカンによるフラビウイルス感染阻害
第 29 回日本糖質学会年会（高山）、要旨集、p. 126、2009 年 9 月 10 日
29. 南島陽平：伸長度の異なるシアロ糖鎖に対するインフルエンザウイルス結合性
第 23 回インフルエンザ研究者交流の会（東京）、プログラム集、p. 1、2009 年 7 月 3 日
30. 左 一八：日本脳炎ウイルス感染における硫酸化糖鎖分子の構造と機能
第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（千歳）プログラム・抄録集、p. 58、2009 年 6 月 20 日
31. 左 一八：シアル酸転移酵素阻害剤の探索および作用機構
第 73 回日本生化学会中部支部例会（名古屋）、抄録集、p. 12、2009 年 5 月 23 日

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：抗デングウイルス剤

発明者：鈴木 隆、左 一八、池田 潔

権利者：静岡県公立大学法人、学校法人常翔学園

種類：特許権

番号：特願 2010-248271

出願年月日：2010 年 11 月 5 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

左 一八 (HIDARI KAZUYA)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：20260226

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

池田 潔 (IKEDA KIYOSHI)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：40168125

山中 隆史 (YAMANAKA TAKASHI)

日本中央競馬会競走馬総合研究所・研究員

研究者番号：40446513

菅 敏幸 (KAN TOSHIYUKI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10221904

村田 健臣 (MURATA TAKEOMI)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：30273171

森田 公一 (MORITA KOUICHI)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：40182240