

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550193

研究課題名(和文)インフルエンザ感染を阻害するシアリルラクトース 3 way junction 核酸の創製

研究課題名(英文) Sialyllactose - modified 3-way junction DNA as a inhibitor of influenza hemagglutinin

研究代表者

江原 靖人 (EBARA, YASUHITO)

神戸大学・人間発達環境学研究所・准教授

研究者番号：40251657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インフルエンザウイルス上のヘマグルチニン(HA)のシアリルラクトース結合部位に多点で効率よく結合するような糖鎖修飾3量体核酸の設計、および合成を行った。赤血球凝集阻害実験より、この糖鎖修飾3量体核酸は種々の亜型のインフルエンザウイルスのHAに対して $10^8$  M<sup>-1</sup>オーダーの結合定数を有していることが確認された。またこの核酸を担体に固定化することにより、インフルエンザウイルス量を検出することができた。インフルエンザウイルスが変異してもHAのシアリルラクトース認識能は維持されることから、この糖鎖修飾核酸は、あらゆる型のインフルエンザウイルスを検出する材料として応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Sialyllactose(SL) is present on cellular surface and plays a important roles in the infection on influenza virus. The SL is recognized by hemagglutinin(HA) protein on the virus. A compound that inhibits the interaction between SL on the cell and hemagglutinin has been thought to prevent infection of influenza virus, because the amino acids sequence of sialic acid binding site in HAs are highly conserved among influenza virus strains. In this study, SL-modified dUTP was synthesized as a substrate of DNA polymerase, and these SLs were incorporated on 3-way junction DNAs. These DNAs have high affinity (15 nM) to the hemagglutinin on influenza virus A/PR/8/34(H1N1). These DNAs are expected to be used as influenza virus sensing or inhibitors of influenza infection.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：インフルエンザ ヘマグルチニン シアリルラクトース 3-way junction DNA DNA polymerase

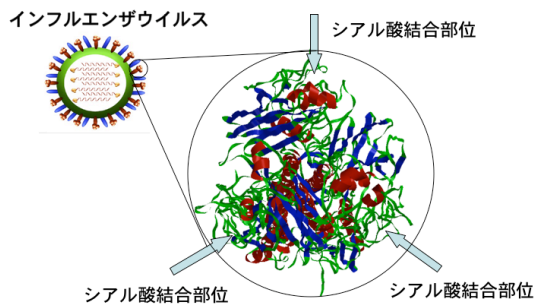
1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスによるヒト、トリへの感染は、ウイルスの変異が速いため社会的な影響が大きく、現在最も感染の拡大が危惧されている感染症の一つである。近年では2009年に新型ウイルスが流行し、2013年4月に中国において確認されたH7N9型新型ウイルスも世界的拡大が懸念されている。また国内でも2014年4月に鳥インフルエンザが発生した。インフルエンザ治療薬の主流はタミフルをはじめ、インフルエンザ表面のシアリダーゼという酵素の機能を阻害する化合物であるが、シアリダーゼの変異速度は非常に速く、最近タミフル耐性のウイルスの増加が既に確認されている。この問題に対処するため、変異したウイルスに対しても効果のある化合物の開発は重要である。一方、インフルエンザ表面には、シアリダーゼの他にヘマグルチニンという糖鎖レセプターが存在し、このタンパク質も感染に重要な役割を果たしている。このヘマグルチニンはウイルスの変異によっても比較的保存される確率が高いことが知られており、このヘマグルチニンをターゲットとする化合物は新型、季節性だけでなく、今後出現するであろうあらゆるインフルエンザに対しても感染阻害効果がある可能性がある。しかし一般にヘマグルチニンとシアル酸との結合定数は $10^3 \text{ M}^{-1}$ 程度とそれほど高くないため、ヘマグルチニンと高い親和性で結合させるためには、高分子化合物などにシアル酸残基を複数個修飾し、「クラスター効果」を利用することが有効であると考えられてきた。例えば、シアル酸をポリアクリルアミド、ポリスチレン、デンドリマーなどに修飾した化合物が、合成されてきたが、nM オーダーという低濃度でも結合できる化合物はまだ合成されていない。また糖鎖の数や配向を制御することが困難であり、骨格が合成高分子であるため生体毒性を有することが指摘されている。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではインフルエンザウイルスのヘマグルチニンHAをターゲットとし、DNA上にシアリルラクトース残基を複数個修飾した化合物により、nM オーダーの低濃度でイ

ンフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)の構造



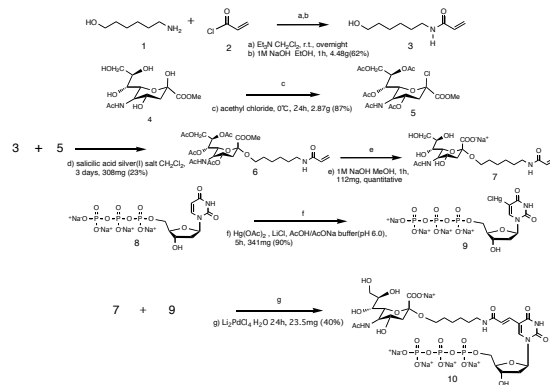
HAにシアル酸結合部位が3カ所あることに着目

ンフルエンザウイルスと結合する化合物の合成を目的とした。シアリルラクトースをHA

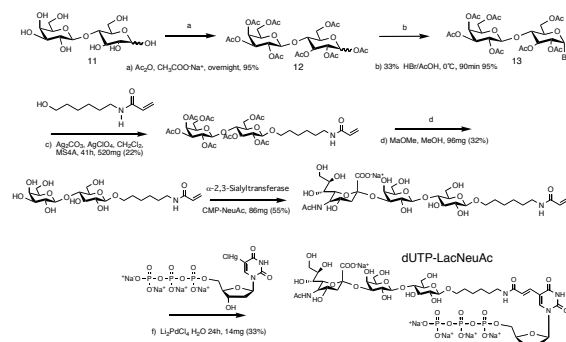
の3つの糖鎖結合部位にうまく適合させることができれば、理論上、 $10^3 \times 10^3 \times 10^3 = 10^9 \text{ M}^{-1}$ の結合定数が得られるため、実現可能な目標と考えた。

3. 研究の方法

*Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters (2007)*において既に報告した手法を用い、式1, 2に示すような、シアリルラクトース修飾ヌクレオチド3リン酸(dUTP-Sialic acid, dUTP-Sialyllactose)を合成した。このdUTP-Sialic acid, Sialyllactose と、dATP, dCTP, dGTP, Primer, Template, DNA polymeraseを反応させることにより、シアリルラクトースが複数個修飾されたDNAを合成した。



式1 dUTP-Sialic acidの合成スキーム



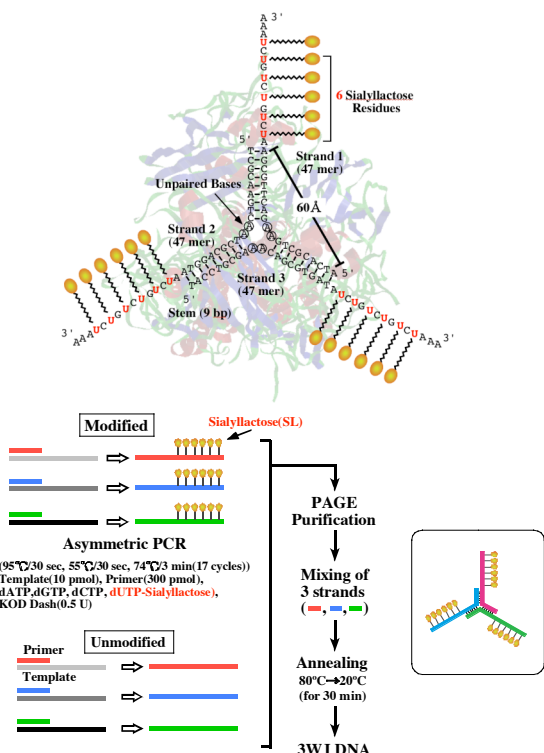
式2 dUTP-Sialyllactoseの合成スキーム

次に、このシアリルラクトース修飾DNAがインフルエンザウイルス表面のヘマグルチニン(HA)と相互作用するかどうかを確認するために、インフルエンザA/PR/8/34(H1N1)とトリ赤血球との凝集における、赤血球凝集阻害濃度( $K_i^{HA}$ )を評価した。

4. 研究成果

シアリルラクトース残基を40bp DNA上に1個(T1)および、5個(T5)、10個(T10)、15個(T15)連続的に配置したシアリルラクトース修飾DNAをDNAポリメラーゼを用いて合成し、その赤血球凝集阻害濃度( $K_i^{HA}$ )を評価したところ、それぞれ120 nM, 100 nM, 50 nM, 40

nM であった (表 1)。すなわち、シアリルラク トース残基を複数個配置することによる、 クラスター効果が確認された。しかし、これ らの DNA は剛直な二重鎖 DNA 上に直線的に シアリルラク トースが修飾されており、HA の 3 つのシアリルラク トース結合部位に同時 に結合しているとは考えにくい。そこで、シ アリルラク トース残基が HA の 3 つのシアリ ルラク トース結合部位に同時に結合するこ とを可能にするために、下図のスキームでシア リルラク トース修飾 3-way junction DNA の合 成を行った。



DNA の 3 つのアームに sialyllactose を 6 個ず つ修飾した 3-way junction DNA においては  $K_i^{HA}$  は 15nM まで減少し、インフルエンザ ウイルスと高い親和性を有していることが 確認された。DNA 上の Sialyllactose 残基が インフルエンザウイルス上の HA と多点で 効率よく相互作用したためと考えられる。 この化合物はインフルエンザウイルスに 対し、①抗体と同等の結合能力を有する。② 感染の際に必須であるヘマグルチニン(HA) を標的としているため、ヒト型、トリ型を問 わず、またウイルスがどのように変異しても 結合力を失わない。③製造において、鶏卵、 動物、細胞などの生物等を用いないので、迅 速かつ工業的スケールで大量合成できる。④ 化学的に安定である (抗体のように変性しな い)。⑤生体中の成分を骨格としているので、 生体毒性が少ない、などの特徴を有するため、 種々の電子デバイスや、既存のイムノクロマ ト法診断キット上に固定化することにより、 抗体を用いた従来法よりも高感度かつ迅速 にインフルエンザ感染を診断するシステム、 および治療薬としての応用が可能である。

表 1 種々シアリルラク トース修飾 DNA の赤血球凝集阻害定数 ( $K_i^{HA}$ )

	$K_i^{HA}$
T1	120 nM
T5	100 nM
T10	50 nM
T15	40 nM
3WJ	15 nM

## 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 1 件)

- ① M, Matsui, Y. Ebara, "Enhanced binding of trigonal DNA-carbohydrate conjugates to lectin", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 6139-6143, 2012  
査読有、  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.08.028

〔学会発表〕 (計 15 件)

- ① 江原靖人、開發邦宏、加藤修雄、「あらゆるインフルエンザウイルスと結合するシアリルラク トース修飾 3-way junction型 DNA」、第63回高分子学会年 次大会, 1G19, 名古屋国際会議場, 2014 年5月28日

【プレスリリース】

[http://main.spsj.or.jp/koho/63n/63n\\_2.pdf](http://main.spsj.or.jp/koho/63n/63n_2.pdf)

- ② 江原靖人、「あらゆるインフルエンザ ウイルスと結合するシアリルラク トース修飾 3-way junction DNA」、第36 回日本分子生物学会年会、P2-0959, 神 戸ポートアイランド、2013年12月4 日

- ③ 江原靖人、赤松 大地、原 直己、河野 杏奈、「インフルエンザウイルスと高 い親和性を有する、Sialyllactose 修飾 3-way junction DNA」、第51回日本生物 物理学会年会、3P308, 京都 (京都国際 会議場)、2013年10月30日

- ④ 江原靖人、「あらゆるインフルエンザ ウイルスと結合する糖鎖修飾核酸」、 イノベーション・ジャパン 2013, 科学 技術振興機構; 新エネルギー・産業技術 総合開発機構, 東京 (東京ビッグサイ ト)、2013年8月29-30日

【発表資料】

[http://www.jst.go.jp/tt/fair/ij2013/exhibitor\\_list\\_ca05.html](http://www.jst.go.jp/tt/fair/ij2013/exhibitor_list_ca05.html)

- ⑤ 江原 靖人、赤松 大地、原 直己、「インフルエンザウイルスと結合するシアリルラクトース修飾 3-way junction 型 DNA の合成」、第 59 回高分子研究発表会、兵庫県民会館、2013 年 7 月 12 日
- ⑥ 赤松大地、原 直己、江原靖人、「インフルエンザウイルスと結合するシアリルラクトース修飾 3-way junction 型 DNA の合成」、第 20 回クロマトグラフィシンポジウム、クロマトグラフィ学会、神戸（神戸大学）、2013 年 6 月 6-7 日
- ⑦ Y. Ebara, K. Kaihatsu, and N. Kato, "Sialyllactose - modified 3-way junction DNA as a inhibitor of influenza hemagglutinin", 第 62 回高分子学会年次大会 IN15 (京都)、2013 年 5 月 29 日
- ⑧ 江原靖人, 開発邦宏, 加藤修雄、「インフルエンザウイルスと結合するシアリルラクトース修飾 3-way junction 型 DNA の構築」、日本化学会第 93 春季年会 3D5-35 (立命館大学、滋賀)、2013 年 3 月 24 日
- ⑨ 江原 靖人、「インフルエンザウイルスと結合する糖鎖修飾核酸」、第 2 回 JST 推薦シーズ 新技術説明会、科学技術振興機構、東京、2013 年 2 月 25 日  
【発表資料】  
[http://jstshingi.jp/abst/p/12/1258/astep2\\_14.pdf](http://jstshingi.jp/abst/p/12/1258/astep2_14.pdf)
- ⑩ Y. Ebara, K. Kaihatsu and N. Kato, "Sialyllactose-modified DNA as a inhibitor of influenza hemagglutinin" "The 9th SPSJ International Polymer Conference, 14F04, 2012 年 12 月 14 日、神戸
- ⑪ 江原 靖人、「インフルエンザウイルス吸着素材の研究」、イノベーション関西、科学技術振興機構、大阪（グランキューブ大阪）、2012 年 12 月 6 日
- ⑫ 江原 靖人、「糖鎖修飾核酸を用いたインフルエンザウイルスの吸着および検出」、次世代医療システム産業化フォーラム、大阪商工会議所、大阪、2012 年 10 月 23 日
- ⑬ 江原靖人, 開発邦宏, 加藤修雄、「インフルエンザウイルスのヘマグルチニンとシアリルラクトース修飾 DNA 構造体との相互作用—糖鎖修飾位置、核酸構造の影響」、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、3A-09、2012 年 9 月

8 日、北海道大学

- ⑭ 江原靖人、開発邦宏、加藤修雄、「DNA polymerase を用いたシアリルラクトース修飾 DNA の合成、及びそれを用いたインフルエンザウイルス感染の阻害効果」、第 34 回日本分子生物学会年会、1T14pII-9(1P-0622)、横浜、2011 年 12 月 13 日、
- ⑮ 江原靖人、開発邦宏、加藤修雄、「インフルエンザ感染阻害能を有するシアリルラクトース修飾 DNA の合成」、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、3C-11、9 月 14 日、つくば国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ① 名称：「糖鎖修飾三量体構造オリゴクレオチド及びその使用」  
発明者：江原靖人  
権利者：国立大学法人 神戸大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2013/81399  
出願年月日：2013/11/21  
国内外の別：国外
- ② 名称：「糖鎖修飾三量体構造オリゴクレオチド及びその使用」  
発明者：江原靖人  
権利者：国立大学法人 神戸大学  
種類：特許  
番号：特願 2012-256216  
出願年月日：2012/11/22  
国内外の別：国内
- ③ 名称：「糖鎖修飾核酸及びその使用」  
発明者：江原靖人  
権利者：国立大学法人 神戸大学  
種類：特許  
番号：特開 2012-056904  
出願年月日：2010/09/10  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

神戸大学人間発達環境学研究科・江原 靖人

<http://www.h.kobe-u.ac.jp/ja/staffs/>

EBARA%20Yasuhito

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江原 靖人 (EBARA YASUHITO)

神戸大学・人間発達環境学研究科・准教授

研究者番号：4 0 2 5 1 6 5 7

(2) 研究分担者

開発 邦宏 (KAIHATSU KUNIHIRO)  
大阪大学・産業科学研究所・准教授  
研究者番号：70419464

(3) 連携研究者