

平成 30 年 6 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410180

研究課題名(和文) あらゆるインフルエンザウイルスを捕捉・検出する糖鎖修飾三量体核酸の開発

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科・准教授

研究者番号：40251657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス(IV)は現在、パンデミックが最も危惧されているウイルスである。このウイルスの表面はヘマグルチニン(HA)という3量体タンパク質によって覆われている。HAのシアル酸結合部位と高い親和性で結合する化合物は、あらゆる型のIVに対して予防、診断、治療が可能であると考えられる。本研究ではIV上のHAの3つの糖鎖結合部位に同時に結合するような3-way junction糖鎖修飾DNAを合成した。このDNAは、シアリルラクトース基単独に比べ、80,000倍親和性が向上した。この化合物は、高感度・迅速にインフルエンザ感染を診断するシステムや治療薬としての応用が可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：Influenza is one of the most infectious diseases in the world. On the virus, there are hemagglutinin(HA) protein that recognizes sialic acid (SA) on a cell surface and plays an important role in the first step of infection. So the compounds that bind strongly to HA would be useful for various influenza virus detection as the corresponding antibodies because the amino acid sequence of HA's SA binding sites are highly conserved if virus mutations occur. In this study, Sialyllactose (SL) -modified 3-way junction DNAs were synthesized using SL-modified dUTP and DNA polymerase. One of the 3WJ DNA showed 80,000-fold higher binding affinity for influenza virus A/Puerto Rico/08/34 (H1N1) compared to the 2,3-SL. This result indicated that the glycocluster effect and optimal spatial arrangement of the 3WJ DNA improved the weak interactions between a sialic acid and its binding site on HA. This 3WJ DNA compound has possible application as an inhibitor of influenza infection and for virus sensing.

研究分野：生物有機化学

キーワード：インフルエンザウイルス 3-way junction DNA シアリルラクトース ヘマグルチニン 検出 DNAポリメラーゼ

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。インフルエンザを治療するという観点では、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が用いられるが、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。

インフルエンザウイルスの感染拡大を防ぐという観点からは、早期発見が必要である。検出感度においては、リアルタイムPCRやウイルス培養が優れているが、検出に時間がかかり高価な装置を必要とするという欠点がある。一方、迅速診断キットは特別な装置を必要とせず迅速に診断できる利点があり、医療機関での診断手法の主流となっている。その迅速診断キットにおいては、インフルエンザウイルスの核タンパク質と結合する抗体が用いられている。この抗体を金属微粒子とニトロセルロース膜に固定化することにより、目視によるインフルエンザウイルスの検出が可能である。しかし、検出限界は $10^4$ から $10^5$  pfu/mL (pfuはウイルスの個数に相当)であり、発症後一定時間以上経過しウイルス量が増えないと検出が困難である。抗体は特異性が高いが、その調製にはマウスを用いる必要があり、時間がかかる。よって新型ウイルスが出現した場合、そのシーズン中に対応する抗体および検出キットを作成することは困難である。また、抗体はタンパク質であるが故に、熱や湿気に弱く長期保存が難しいという問題もある。

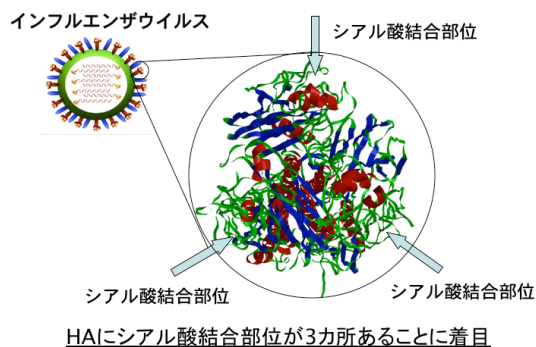
一方、インフルエンザ表面には、シアリダーゼの他に、感染の最初の段階において重要な役割を果たすヘマグルチニン(HA)という、細胞表面のシアル酸を認識する3量体の糖鎖レセプターが500-1000個存在する。このヘマグルチニンはウイルスの変異によっても比較的保存される確率が高いことが知られており、このヘマグルチニンをターゲットとする化合物は新型、季節性だけでなく、今後出現するであろうあらゆるインフルエンザに対しても感染阻害効果がある可能性がある。しかし一般にヘマグルチニンとシアル酸との結合定数は $10^{-6}$ 程度とそれほど高くないため、ヘマグルチニンと高い親和性で結合させるためには、高分子化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、

dendrogram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。

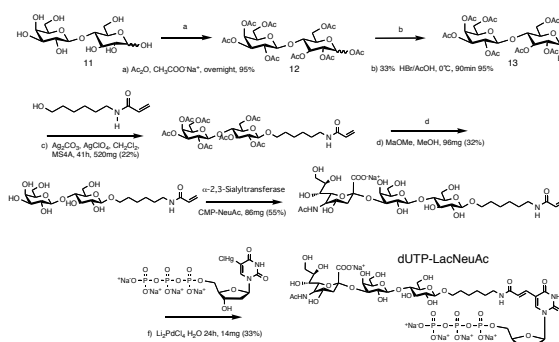
2. 研究の目的

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と結合するシアリルラクトース修飾3-wayjunction DNAの合成を行ない、ウイルス検出に応用できるかどうかを検討した。

インフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)の構造



3. 研究の方法

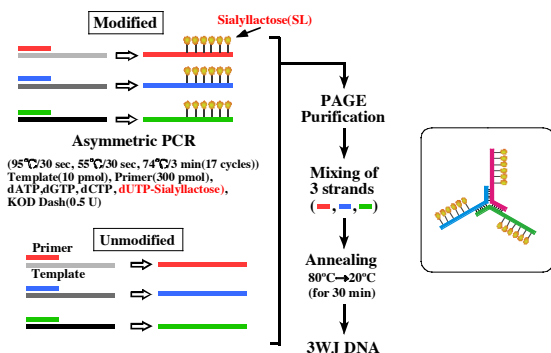


式1 dUTP-Sialyllactoseの合成スキーム

*Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* (2007)において既に報告した手法を用い、式1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。さらに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-wayjunction DNAの合成を行った。

次に、このシアリルラクトース修飾3-wayjunction DNAがインフルエンザウイル

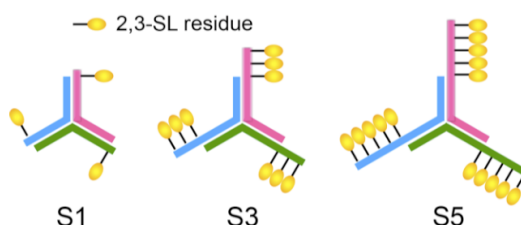
ス表面のヘマグルチニン(HA)と相互作用するかどうかを確認するために、インフルエンザ A/PR/8/34(H1N1)とトリ赤血球との凝集における、赤血球凝集阻害濃度( $K_i^{HA}$ )を評価した。



#### 4. 研究成果

DNA の 3 つのアームに修飾するシアリルラクトース基の個数を 1, 3, 5 と変化させた以下のような構造体 S1, S3, S5 を合成し、赤血球凝集阻害実験により、インフルエンザウイルスとの親和性を評価した。構造体 S1, S3, S5 は 41°C~44°C の融解温度を有し、安定な 3 量体構造を形成することが Tm 測定、電気泳動により確認された。2,3-シアリルラクトース Na<sup>+</sup> と比べ、S1 は  $1.0 \times 10^4$  倍、S3 は  $8.0 \times 10^4$  倍親和性が向上した。当初の予定通り、S1, S3 の 3 方向のアームに存在するシアリルラクトース基が、インフルエンザヘマグルチニンの 3 つのシアル酸結合部位と 3 点で相互作用できるようになったためと考えられた。また、シアリルラクトース基が 3 方向に 1 個ずつ配置された S1 よりも、3 個ずつ配置された S3 の方が高い親和性を示したのは、アーム上に多くのシアリルラクトース基が存在した方が、ヘマグルチニン上の 1 個のシアル酸結合サイトに対する結合速度定数が増加するためと考えられた。すなわち S3 が高い親和性を有するのは、(1) DNA 上のシアリルラクトース基を、ヘマグルチニンの 3 つのシアル酸結合部位に適合するように配置することにより、結合前後のエントロピー減少を最小に抑える効果と、(2) 一つのアームに 3 個シアリルラクトース基を配置することにより、シアル酸結合部位一ヶ所に対する結合速度定数を向上させる効果、の相乗効果によるものと考えられる。しかし、アームに 5 個のシアリルラクトース基が修飾された構造体 S5 では、親和性が減少した。シアリルラクトース基が多ければ、上記 (2) の効果は向上すると期待されるが、S5 のように多くしすぎると、糖鎖密度の増加が糖鎖の配向などに影響を与え、親和性が減少する可能性があることを示している。

本研究でシアリルラクトース基を修飾する数や位置を厳密に制御することにより、初めてこのような知見を得ることができた。



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と期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Miyuki Yamabe, Kunihiko Kaihatsu and Yasuhito Ebara, "Sialyltransferase-Modified Three-Way Junction DNA as Binding Inhibitor of Influenza Virus Hemagglutinin", *Bioconjugate Chem.*, 29, pp.1490-1494, 2018. 【査読有り】 DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00045

[学会発表] (計 13 件)

1. 江原靖人、開発邦宏、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. 山部美幸、浅井佑介、赤松大地、河野杏奈、原直己、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 three-way junction DNA」、第60回高分子研究発表会, C2-16, 神戸, 2014年7月25日
3. 山部美幸、赤松大地、江原靖人、「シアリルラクトース修飾 3-way junction型 DNA を用いたインフルエンザウイルスの検出」、日本化学会第95春季年会, 2J6-05, 千葉(日本大学), 2015年3月27日
4. 山部美幸、赤松大地、開発邦宏、江原靖人、「あらゆるインフルエンザウイルスを捕捉する シアル酸修飾 3-way

- junction 構造 DNA」, 第 64 回高分子学会年次大会, 3Pb110, 札幌 (札幌コンベンションセンター)、2015 年 5 月 29 日
5. 山部美幸、乃村勇輝、松田美加、赤松大地、浅井佑介、江原靖人、「あらゆるインフルエンザウイルスを捕捉するシアル酸修飾 3-way junction 型 DNA」, 第 61 回高分子研究発表会、Pa-60, 神戸 (兵庫県民会館)、2015 年 7 月 17 日
  6. 江原靖人、「糖鎖修飾 3 量体核酸を用いたインフルエンザウイルスの検出」, イノベーション・ジャパン 2015, 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)、2015 年 8 月 27 - 28 日
  7. Y. Ebara, M. Yamabe, D. Akamatsu, K. Kaihatsu, and N. Kato, "Sialyllactose-modified 3-way junction DNA as a inhibitor of influenza hemagglutinin", *Pacificchem 2015*, ハワイ (ホノルル), 2015 年 12 月 19 日
  8. D. Akamatsu, M. Yamabe, Y. Ebara, "Detection of influenza viruses by using oligonucleotide-based sialic acid - modified nanoparticle", *Pacificchem 2015*, ハワイ (ホノルル), 2015 年 12 月 17 日
  9. 赤松大地、山部美幸、江原靖人、「シアル酸修飾オリゴヌクレオチド担持ナノ粒子を用いたインフルエンザウイルスの検出」、日本化学会第 96 春季年会 1B3-43 (同志社大学、京都)、2016 年 3 月 24 日
  10. 山部美幸、開発邦宏、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ル酸修飾 3-way junction DNA の合成」、日本化学会第 96 春季年会 1C3-49 (同志社大学、京都)、2016 年 3 月 24 日
  11. 山部美幸、開発邦宏、江原靖人、「インフルエンザウイルスと結合するシアルラクトース修飾 DNA」, 第 64 回高分子学会年次大会, 3H05, (神戸、神戸国際会議場)、2015 年 5 月 27 日
  12. Y. Ebara, M. Matsuda, M. Yamabe, "Expanding glycoconjugate library on nucleic acids and its enhanced affinity to lectins", 第 64 回高分子学会年次大会, 2J10, (神戸、神戸国際会議場)、2015 年 5 月 26 日
  13. Y. Ebara, M. Yamabe, K. Kaihatsu, "Sialyllactose-modified 3-way junction DNA that have Influenza virus binding ability", 日台医用分光学国際シンポジウム, 2J10, (淡路夢舞台国際会議場、兵庫)、2016 年 12 月 5 - 6 日
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]  
○取得状況 (計 1 件)
1. 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: 特許第 5788653 号  
登録: 2015/08/7  
国内外の別: 国内
- [その他]  
新聞記事  
日本経済新聞 (2014 年 7 月 8 日付)  
「新型インフル判定」
- [著書]  
現代化学 2015 年 2 月号  
「インフルエンザウイルスを捕捉する糖鎖修飾三量体 DNA-予防・診断・治療を指して」、p. 42-47
- 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: 40251657
  - (2) 研究分担者  
中村 晴信 (NAKAMURA HARUNOBU)  
神戸大学・人間発達環境学研究科・教授  
研究者番号: 10322140
  - (3) 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