

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 2 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 左 一八 
所属機関名： 静岡県立大学
所属部署名： 薬学部 職名： 准教授
所 在 地： 静岡市谷田 52-1
電 話： 054-264-5720 内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

受容体糖鎖構造に基づくウイルス機能阻害剤探索

3. 研究組織：

| | |
|-----------------|--------------|
| 日本側研究者氏名： 左 一八 | 職名： 准教授 |
| 所属機関名： 静岡県立大学 | 部署名： 薬学部 |
| 中国側研究者氏名： 郭 潮潭 | 職名： 所長 |
| 所属機関名： 浙江省医学科学院 | 部署名： 生物工程研究所 |

4. 当該研究における発表論文等

本研究は、Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 424, 573-578 (2012)に
紙上発表した。

受容体糖鎖構造に基づくウイルス機能阻害剤探索

| | |
|---------|-----------------|
| 研究者氏名 | 准教授 左 一八 |
| 日本所属機関 | 静岡県立大学薬学部生化学分野 |
| 中国研究者氏名 | 所長 郭 潮潭 |
| 中国所属機関 | 浙江省医学科学院生物工程研究所 |

要旨

Sia α 2-3 糖鎖に対する新規単クローン抗体 (HYB4) を樹立し、その性状解析を行った。HYB4 の詳細な糖鎖認識性を明らかにし、HYB4 を用いた生化学的な Sia α 2-3 糖鎖検出法を確立した。HYB4 はインフルエンザウイルス (IFV) の細胞表面への結合を有意に阻害したことから機能的 IFV 受容体 (Sia α 2-3) 糖鎖を検出できることが示唆された。ヒト IFV について、その受容体合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとして大腸菌を宿主として、より効率的かつ簡便に発現・精製できる系を確立した。

デングウイルス (DENV) についてウイルスの結合性、感染阻害効果を示す HNK-1 糖鎖分子の合成酵素遺伝子を細胞に導入した HNK-1 糖鎖高発現細胞において DENV の有意な感染性の上昇が観察された。HNK-1 が DENV の機能的受容体であることが示唆された。ウイルス機能制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 感染阻害活性を有する化合物として 3-O-硫酸化グルクロン酸を創出した。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコに強力な抗 DENV 活性を見出した。

Key Words インフルエンザウイルス、デングウイルス、糖鎖受容体、抗ウイルス剤

緒言：

感染初期におけるウイルスと宿主受容体糖鎖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。インフルエンザウイルス (IFV) やデングウイルス (DENV) 感染症は、自然宿主動物から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。これまで宿主糖鎖分子のウイルス感染における機能、ウイルス異種間感染機構、さらには病態形成の分子機構は十分に解明されていない。ウイルス感染時、宿主側因子に作用する抗ウイルス剤は臨床応用されていない。

IFV の宿主認識において、シアル酸含有糖鎖 (シアロ糖鎖) は宿主特異的受容体として機能していると考えられている。IFV の表面には、ヘマグルチニン (Hemagglutinin, HA) と、ノイラミニダーゼ (Neuraminidase, NA) の 2 種類の糖タンパク質がスパイク状に突出しており、A 型 IFV は HA と NA の抗原性に基づいて多くの亜型 (HA は 1~16 種類 6)、NA は 1~9 種類 7) に分類される。HA は宿主細胞膜上に存在し受容体として機能する特定のシアロ糖鎖の認識、結合および膜融合による細胞内侵入に関わる [1]。IFV 受容体認識において、シアル酸の結合様式が深く関与している。ヒト IFV は α 2-6 結合型のシアロ糖鎖 (Sia α 2-6 糖鎖) に対して高い親和性を持つ一方、トリ IFV は α 2-3 結合型のシアロ糖鎖 (Sia α 2-3 糖鎖) に対して高い親和性を持つことが明らかとなっている [2-4]。さらに IFV 受容体認識はシアル酸が結合する内部糖鎖構造によっても影響を受けることが近年報告されている [4, 5]。このような結合親和性の違いがトリーヒト間などの異種間感染において重要になると考えられている [6]。IFV 受容体の分子実体、受容体の生体内分布など、感染過程に関与する因子の網羅的探索研究は、新たな作用機序を有する抗インフルエンザ薬の開発など予防対策の物質的基盤を確立するうえで重要な知見となることが期待されている。

Flavivirus 属のデングウイルス (DENV) は広範囲におけるエピデミックの引き金となる病原体であり、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) により人から人へ媒介される。熱帯・亜熱帯地域を中心に公衆衛生上の重要な問題となっている [7]。毎年 1 億人がデング熱を発症し、そのうち 50 万人がデング出血熱を発病している。DENV の感染者数は拡大の一途を示している。発展途上国における、人口の都市部への集中増加、温暖化による媒介動物の生息地域の拡大、航空機に代表される交通の発達など種々の要因により、世界的な流行が危惧されている [8]。DENV には 1~4 型の 4 つの血清型があり、いずれの血清型の感染によっても同様の感染症状を示すため、病態から感染した血清型を推定することはできない。初感染時、患者体内には同型に対する中和抗体は産生されるが、他型に対する交叉防御免疫が成立しない。そのため、他の血清型による再感染時の免疫応答がデング出血熱の発生リスクを上昇させていると考えられている [9]。その疫学的な複雑さから、病態の解明、ワクチンの開発が非常に困難である。現在、特異的な治療法もなく、対症療法が中心である。

これまでに chondroitin sulfate E (CSE) や heparin などの硫酸化グリコサミノグリカン分子がデングウイルスの宿主への結合・侵入に関わると予想されている。これらの物質は強力な感染阻害活性を示すことから、DENV 感染阻害、結合性を示す硫酸化糖鎖分子には、受容体活性を保持した共通の糖鎖構造が存在していることが推測されている。グリコサミノグリカンは直鎖状高分子多糖であり、繰り返し 2 糖単位に結合した硫酸基の数とその結合位置の違いにより、構造に多様性を有する硫酸化糖鎖分子である。

本研究では宿主受容体糖鎖分子の構造とそれを生合成する糖転移酵素 (GT) に着目して、感染初期における宿主側因子の性状を明らかにすることで、異種間感染および病態形成機構の解明を目指すとともにウイルス機能阻害剤となる物質の探索・同定を目的とした。

対象と方法：

1) IFV 受容体に対する単クローン抗体の作製・性状解析および IFV 受容体探索への応用：

Sia α 2-3 糖鎖構造を有する糖脂質 (Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer) を免疫原、*Salmonera Minnesota* R595 株の菌体膜をアジュバントとして C3H マウスに免疫した。定法により得られたハイブリドーマの培養上清をスクリーニングして、抗体陽性クローン HYB4 を取得した。HYB4 の詳細な反応特異性を確認した。さらに HYB4 を用いた Sia α 2-3 糖鎖検出法として、ELISA、Western blotting、Flow cytometry、細胞染色法を検討した。従来 Sia α 2-3 糖鎖検出プローブとして利用されていたレクチンとの糖鎖反応性の比較を行うことで、HYB4 の Sia α 2-3 糖鎖検出プローブとしての有用性の評価を行った。

2) ヒト IFV 受容体生合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子の取得、および組換え体酵素の発現：

ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリーから PCR 法により、ST6Gal I の cDNA (NCBI, GenBank Accession Number, BC031476) を取得した後、制限酵素 *EcoRI* で処理し、細胞質領域および膜貫通領域を除去することで可溶性体 ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子を得た。この遺伝子を低温で高いタンパク質発現効率を有するコールドショックベクター、pCold TF にクローン化、大腸菌へ導入し、ヒト ST6Gal I 発現大腸菌を作製した。作製したクローン化 hST6Gal I 大腸菌を用いて、温度、添加剤、培養時間などの誘導条件を検討することにより酵素タンパク質発現を行った。さらにキレートカラムを用いた酵素タンパク質の精製を行った。

3) DENV 受容体合成酵素遺伝子高発現細胞の樹立と性状解析：

HNK-1 合成酵素遺伝子 GlcAT-P を COS-7 細胞にトランスフェクションすることにより HNK-1 高発現細胞を取得した。対照として遺伝子を含まない pIRES ベクターをトランスフェクションした。これらの細胞表面における発現は Flow cytometry および Western blotting 法により確認した。これらの細胞に対する DENV の感染性を定法に従って Focus forming assay により評価した。

4) 低分子糖誘導体設計・合成および薬用・食用共通素材であるキノコの抗デングウイルス感染阻害効果の評価：

glycosaminoglycan を構成する硫酸基を持つ低分子糖鎖誘導体の構造活性相関解析からデザイン、化学合成合成された低分子硫酸化糖誘導体の DENV 感染阻害効果を Focus forming assay により評価した。また、16 種類のキノコの抽出物について ENV 感染阻害効果を Focus forming assay により評価した。

結果：

1) IFV 受容体に対する単クローン抗体の作製・性状解析および IFV 受容体探索への応用：

新規 Sia α 2-3 糖鎖検出プローブとして単クローン抗体 (HYB4) を確立した。本抗体は抗糖鎖抗体ではまれな IgG3 クラスの抗体であった。HYB4 は、IFV 受容体構造である Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-R を特異的に認識した。本抗体は、細胞表面にあるシアロ糖鎖を認識できること、さらに IFV の結合を有意に阻害できることが明らかとなった (図 1、2)。

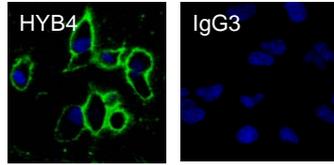


図1. HYB4によるA549細胞の免疫染色

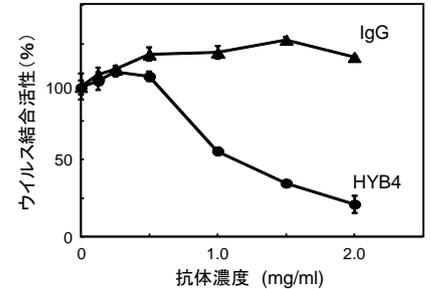


図2. HYB4によるIFVのA549細胞表面への結合阻害

2) ヒト IFV 受容体生合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子の取得、および組換え体酵素の発現：

ヒト IFV 受容体合成酵素 ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとって大腸菌で発現を行った。目的タンパク質の誘導時間の検討の結果、15 $^{\circ}$ C、24 時間のタンパク質誘導時間で目的タンパク質の発現量が増加することが明らかとなった (図 3)。同様の誘導条件で、従来用いていた pMAL-p2x vector を用いるタンパク質発現系との比較を行ったところ、今回用いた方法は従来の方法よりはるかに目的タンパク質の発現量が多いことが確認された。

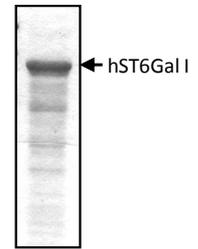


図3. 組換え体hST6Gal I CBB染色

3) DENV 受容体合成酵素遺伝子高発現細胞の樹立と性状解析：

Western blotting により、GlcAT-P 遺伝子導入 COS-7 細胞で HNK-1 糖鎖が合成されたことが確認された。また、Flow cytometry の結果から、合成された HNK-1 糖鎖は細胞表面に発現されていることが確認された。このとき、heparan sulfate や chondroitin sulfate など、他の糖鎖分子の発現量への影響は認められなかった。DENV 感染性を調べた結果、GlcAT-P 遺伝子導入 COS-7 細胞で有意に菅先生の上昇が観察されたことから、HNK-1 糖鎖が細胞表面上で受容体として機能していることが示唆された。

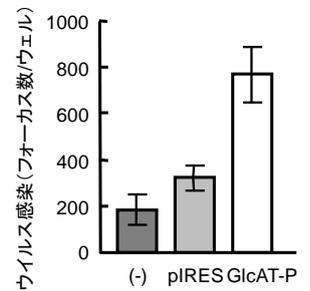


図4. HNK-1高発現細胞におけるDENV感染性の変化

4) 低分子糖誘導体設計・合成および薬用・食用共通素材であるキノコの抗 Dengue ウイルス感染阻害効果の評価：

糖鎖機能発現制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 特異的に相互作用を示す共通構造から、硫酸化グルクロン酸が推定された。種々の硫酸化グルクロン酸誘導体を化学合成し、阻害活性調べた。その結果、3-O-硫酸化体に阻害活性が認められた。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコ抽出液から抗 DENV 活性を探索した。その結果、オオヒラタケの熱水抽出物中に強力な Dengue ウイルス感染阻害活性を見出した。日本脳炎ウイルス感染を阻害しなかったことから特異的な阻害効果であることが示唆された (図 5)。

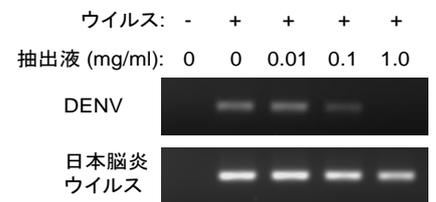


図5. オオヒラタケ抽出液によるDENV感染阻害

考察：

本研究では、Sia α 2-3 糖鎖に対する新規単クローン抗体 (HYB4) を樹立し、HYB4 を用いた生化学的な Sia α

2-3 糖鎖検出法を確立した。HYB4 はトリ型インフルエンザウイルス (IFV) の細胞表面への結合を有意に阻害した。トリ→ヒトへの異種間感染機構を理解するうえで、トリ型 IFV 受容体分子のヒトでの局在性を明らかにする必要がある。本抗体は IFV の異種間感染機構の解明に大きく寄与することが期待される。ヒト IFV について、その受容体合成酵素ヒト ST6Gal I (hST6Gal I) 遺伝子をクローン化、およびその組換え体酵素をとって大腸菌を宿主として、より効率的かつ簡便に発現・精製できる系を確立した。本酵素を用いることによりヒト IFV 受容体糖鎖を有する様々な誘導体の効率的かつ大量合成が期待される。

デングウイルス (DENV) についてウイルスの結合性、感染阻害効果を示す HNK-1 糖鎖分子の合成酵素遺伝子を細胞に導入した HNK-1 糖鎖高発現細胞において DENV の有意な感染性の上昇が観察された。本糖鎖分子は調べたすべてのウイルス感受性細胞に発現している一方、感染非感受性の細胞株には発現していないことなどの知見から、機能的な DENV 受容体である可能性が示された。今後、ヒトの組織における本糖鎖分子の発現を調べることにより、デングウイルスの病態形成の機序の解明が進むものと考えられる。ウイルス機能制御のための有用物質を探索する目的で、低分子糖鎖誘導体の構造活性相関の解析から、DENV 感染阻害活性を有する化合物として 3-O-硫酸化グルクロン酸を創出した。さらに生薬および食用資源として利用されているキノコに強力な抗 DENV 活性を見出した。DENV の吸着に関わる糖鎖構造を明らかにすることは、DENV の宿主認識メカニズムを解明に重要であり、今回創出した化合物は抗 DENV 薬開発に繋がるリード化合物となることが期待できる。また、生薬・食用資源であるキノコから熱安定性の抗デングウイルス活性が見出されたことから、本資源は熱帯地域において有用な生薬製剤として利用できる可能性がある。

参考文献：

1. Wiley, N. C., Skehel, J. J. 1987. The structure and function of the HA membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56, 365-394.
2. Rogers, G. N., Paulson, J. C. 1983. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127, 361-373.
3. Rogers, G. N., Pritchett, T. J., Lane, J. L., Paulson, J. C. 1983. Differential sensitivity of human, avian, and equine influenza A viruses to a glycoprotein inhibitor of infection: selection of receptor specific variants. *Virology* 131, 394-408.
4. Suzuki, Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28, 399-408.
5. Hidari, K. I., Murata, T., Yoshida, K., Takahashi, Y., Minamijima, Y. H., Miwa, Y., Adachi, S., Ogata, M., Usui, T., Suzuki, Y., Suzuki, T. 2008. Chemoenzymatic synthesis, characterization, and application of glycopolymers carrying lactosamine repeats as entry inhibitors against influenza virus infection. *Glycobiology* 18, 779-788.
6. Beare, A. S., Webster, R. G. 1991. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 119, 37-42.
7. Weaver, S. C. and Barrett, A. D. 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol.* 2, 789-801
8. WHO website <http://www.who.int/en/>
9. IDSC (Infectious Disease Surveillance center) 国立感染症研究所 感染情報センター website <http://idsc.nih.go.jp>

注：本研究は、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 424, 573-578 (2012) に掲載。

作成日：2013年3月2日