

糖鎖固定化磁性金ナノ粒子 (SMGNP)

図4に α グルコースを固定化した糖鎖固定化磁性金ナノ粒子 (Glc α 1-4Glc-MGNP) の調製スキームなどを示した。まずマグネタイト (Fe_3O_4) を形成させた後、in situ で NaAuCl_4 と還元剤として NaBH_4 、および糖鎖リガンド複合体 (Glc α 1-4Glc-mono) を加えることによって、磁性粒子に部分的に金粒子を析出させ、そこに糖鎖を固定化した磁性金ナノ粒子 (総称: SMGNP) を調製した。糖鎖の固定化は、SMGNP を MALDI-TOF/MS 分析に供することによって調べた。即ち、以前から糖鎖固定化金ナノ粒子の MALDI-TOF/MS 分析では、還元条件下でエネルギーを与えることによって、金トリガンド複合体の硫黄 (S) 原子との間の結合が切れ、固定化に用いた糖鎖リガンド複合体の分子質量が観測される現象がみられていた。今回調製した SMGNP においても、Glc α 1-4Glc-mono に相当する分子質量が観測 (図4, 下段左) されたことから、糖鎖は SGNP と同様に固定化されていることが示された。そのサイズは透過型電子顕微鏡を測定する (図4, 下段右) ことによって調べ、直径2~5 nm であることが示唆された。次に、調製した Glc α 1-4Glc-MGNP の選択的レクチン捕捉活性を図5のように調べた。図5左のプロトコールに基づき、 α グルコース結合性のレクチンである Con A と糖鎖結合性を持たない BSA を混合したところ凝集塊が生成した。その凝集塊を磁力により分離して、上清をとった。凝集塊を磁気分離を行いつつ洗浄した後、高濃度のグルコースを加えて、凝集塊を溶解させた。Con A と BSA の混合物、上清、ならびに再溶解 (再分散) した溶液の SDS-PAGE 分析を図5右に示す。再溶解液には

Con A のバンドだけがみられた。このことは、Con A が SMGNP の α グルコースと結合し、Con A が4量体であることから架橋が起こって凝集塊ができ、それが高濃度のグルコースを添加することによって、競合阻害が起こって凝集塊が溶解し、溶液に Con A が再分散したことを示している。なお、上清には BSA と Con A 両方のバンドがみられるが、タンパクの量が多すぎて、SMGNP の量が不足したためと考えられる。

自動濃縮装置の試作

まずヘパリンを固定化した磁性金ナノ粒子 (Hep-MGNP) を同様に調製した。この粒子のサイズは約5 nm 程度で、上記のようにレクチンと凝集塊を作らない場合は十分な磁性はなく、ウイルスに吸着したナノ粒子を直接磁石で集めることは不可能であった。そこで、大粒径磁気ビーズを混合し、まずウイルスに吸着したナノ粒子をウイルスごと大粒径磁気ビーズで捕集し、ついで大粒径磁気ビーズを磁石で捕集するという方法を開発した (平成22年3月に特許出願)。この方法によって、混合・反応などの操作に1時間以上の時間がかかっていたところを大幅に短縮でき、15分程度で濃縮可能なプロトコールを完成させた。このプロトコールを自動化するべく、ウイルス濃縮装置 (試作機) の開発を行った。検体及び試薬をセットし、スタートボタンを押すと全自動で RT-PCR 試薬の封入までを行い、8サンプル同時に処理できる装置を試作することができた。この際、PCR 反応はトラスト社の UR104MK4 をもちいて高速 RT-PCR を行い、ウイルス濃縮から RT-PCR の結果が出るまで、30分を目標とした。(図6)

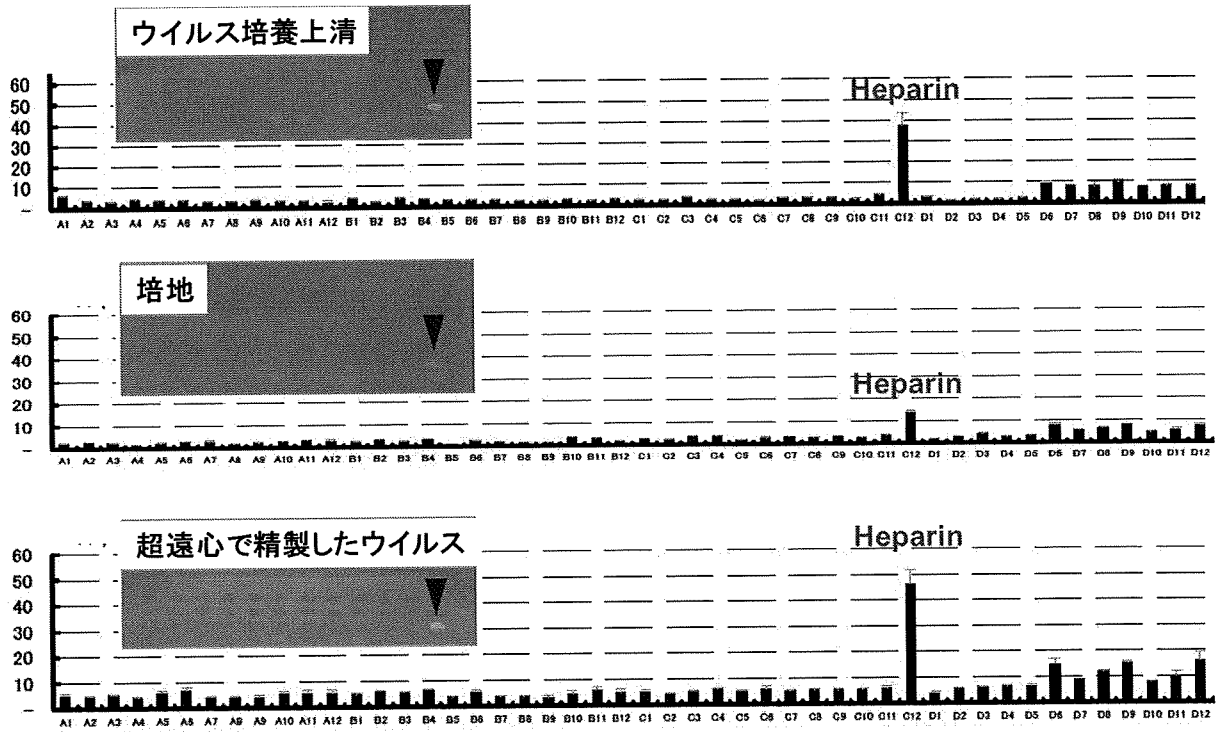


図2 図1のアレイ型シュガーチップとSPRイメージング法によるコイヘルペスウイルス (KHV) の糖鎖結合性の解析

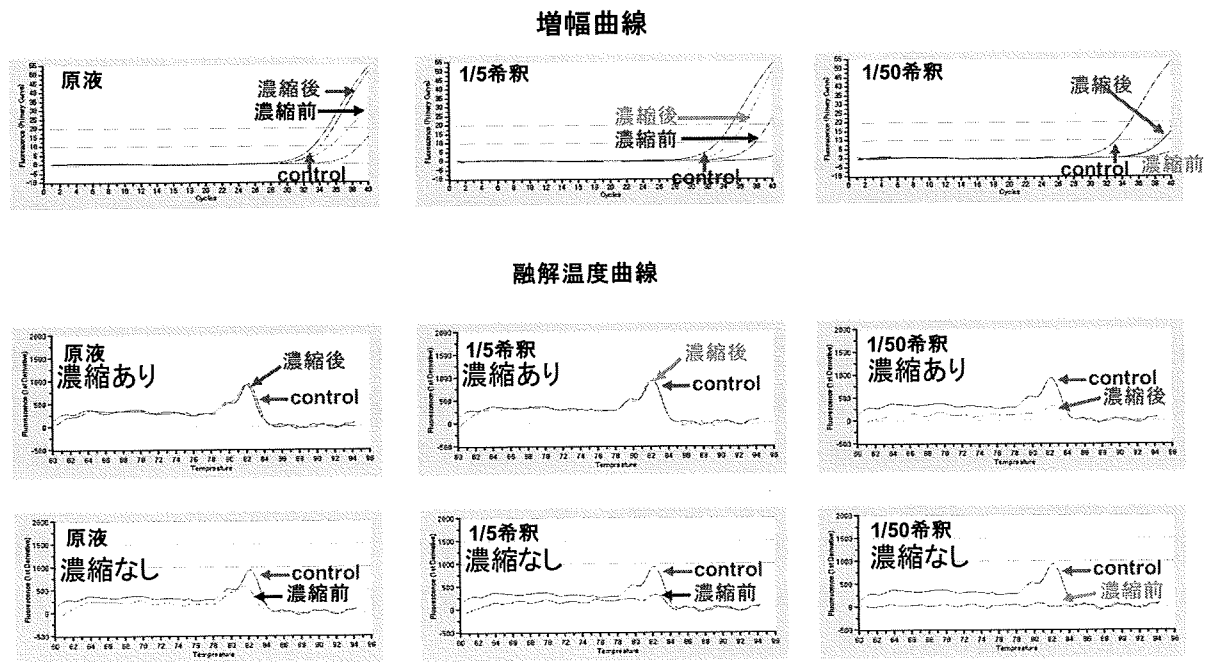
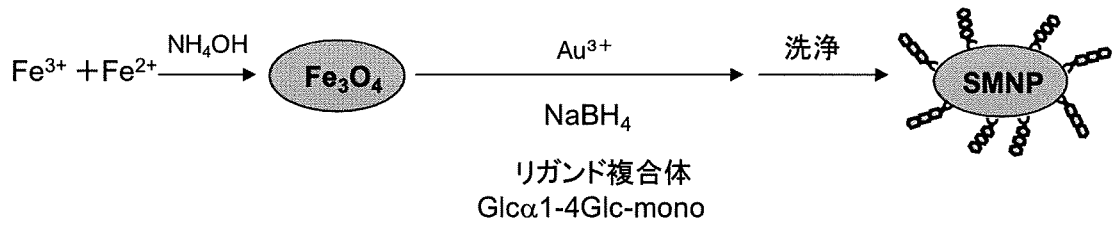
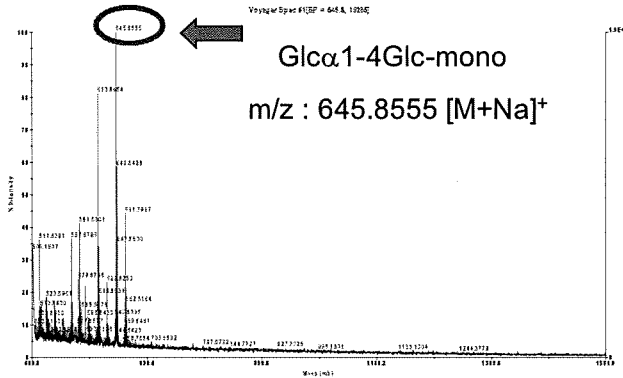


図3 ヘパリンを固定化した金ナノ粒子とリアルタイムPCRを用いたKHVの濃縮。上段：増幅曲線、下段：融解温度曲線。



MALDI-TOF/MSによるリガンドの確認



TEM画像

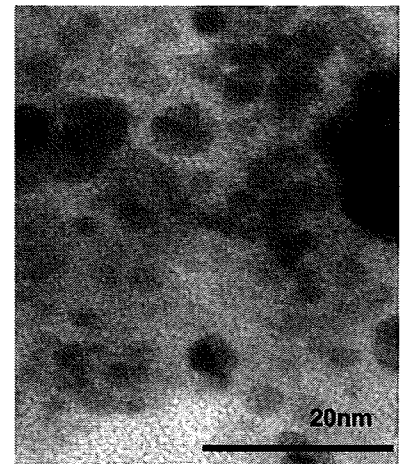


図4 α グルコースを固定化した糖鎖固定化磁性金ナノ粒子の調製スキーム (上段)、MALDI-TOF/MS 分析による糖鎖の確認(下段左)、ならびに調製し棚の粒子の透過型電子顕微鏡イメージ (下段右)。

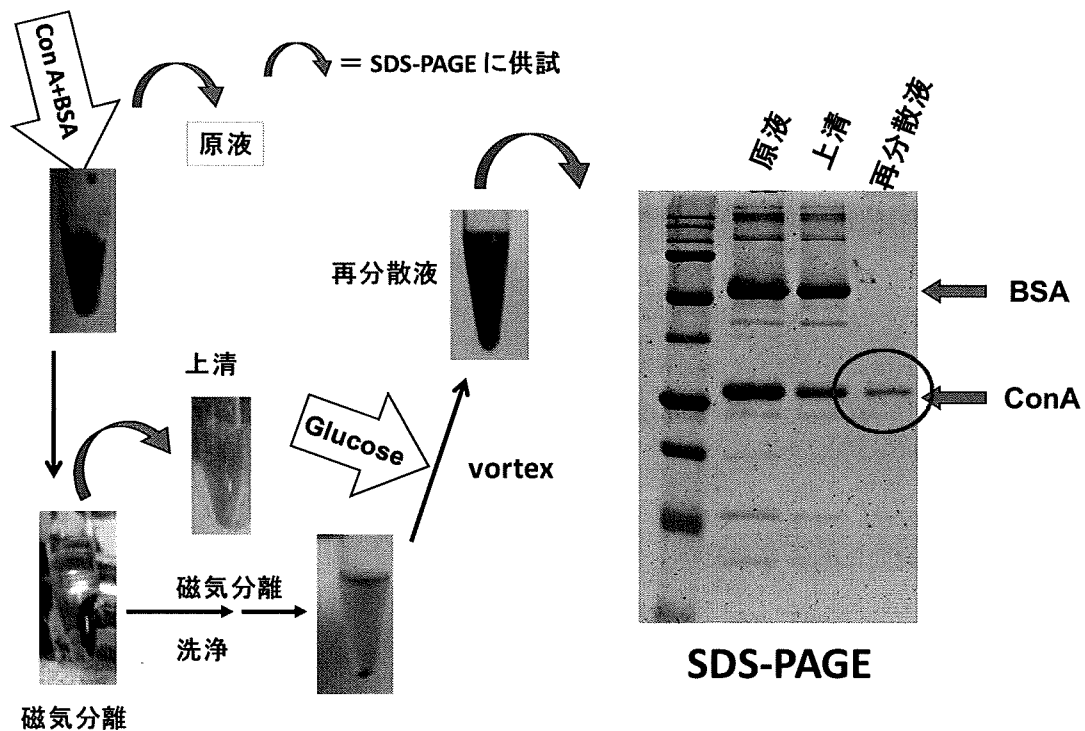


図5 α グルコースを固定化した糖鎖固定化磁性金ナノ粒子を用いたレクチンの選択的回収・精製スキーム (左) と SDS-PAGE による分析 (右)。

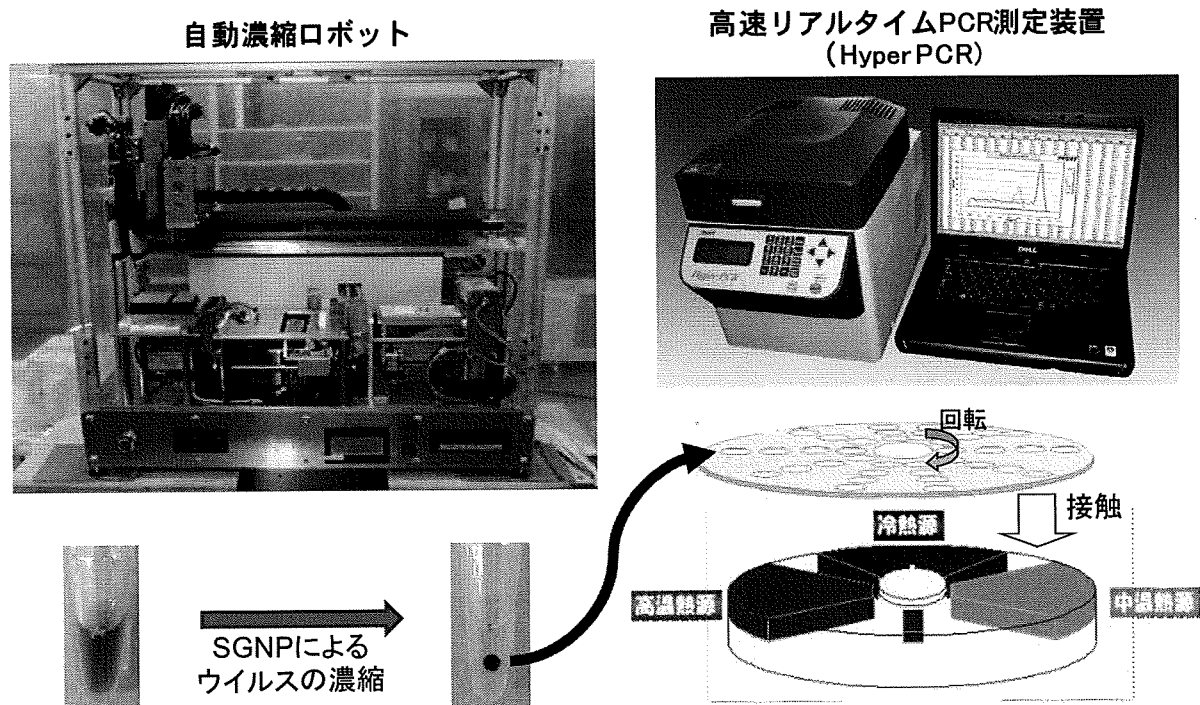


図6 自動ウイルス濃縮機(左)と超高速リアルタイムPCR分析機器(右)を用いた迅速超高度ウイルス遺伝子測定システム。

E. 結論

ウイルスの糖鎖結合活性を測定し、ナノ粒子に固定化する糖鎖を簡便に決定できるシステム、さらに自動化も可能とする糖鎖固定化磁性金ナノ粒子の開発は目標通り達成した。自動濃縮装置も試作機が完成し、その改良機もコーネット株式会社の協力の下、鋭意行っている。来年度行う計画である、HTLV-1、HIV、HCVなど病原性の高いウイルスを濃縮し、高感度で分析するシステムに十分適応できる系が完成し、今後の展開が期待できる。

F. 研究発表(本研究に関するもの)

1. 論文発表

- ◆ K. Tawaratsumida, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, Y. Fujimoto, K. Fukase, Y. Suda, M. Hashimoto, Characterization of N-terminal Structure of TLR2-activating Lipoprotein in *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, 284(14), 9147-52 (2009)
- ◆ S. Muraoka, Y. Ito, M. Kamimura, M. Baba, N. Arima, Y. Suda, S. Hashiguchi, M. Torikai, T. Nakashima, K. Sugimura, Effective induction of cell death on adult T-cell leukaemia cells by HLA-DR β -specific small antibody fragment isolated from human antibody phage library, *J. Biochem.*, 145(6), 799-810 (2009)
- ◆ M. Sato, Y. Ito, N. Arima, M. Baba, M. Sobel, M. Wakao, Y. Suda, High sensitivity analysis of naturally occurring sugar chains, using a novel fluorescent linker molecule. *J. Biochem.*, 146, 33-41 (2009)
- ◆ Y. Fujimoto, M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y.

- Suda, K. Fukase, Lipopeptides from Staphylococcus aureus as Tlr2 Ligands: Prediction with mRNA Expression, Chemical Synthesis, and Immunostimulatory Activities, ChemBioChem, 10 (14), 2311-15 (2009)
- ◆ Y. Fujimoto, M. Hashimoto, M. Furuyashiki, M. Katsumoto, T. Seya, Y. Suda, K. Fukase, Lipopeptides from Staphylococcus aureus as Tlr2 Ligands: Prediction with mRNA Expression, Chemical Synthesis, and Immunostimulatory Activities, ChemBioChem., 10, 2273-03 (2009)
 - ◆ N. Sasaki, T. Hirano, T. Ichimiya, M. Wakao, K. Hirano, A. Kinoshita-Toyoda, H. Toyoda, Y. Suda, S. Nishihara, The 39-Phosphoadenosine 59-Phosphosulfate Transporters, PAPST1 and 2, Contribute to the Maintenance and Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, ProsOne, 4 (12), ppe8262 (2009)
 - ◆ A. Saito, M. Wakao, H. Deguchi, A. Mawatari, M. Sobel, Y. Suda, Towards the assembly of heparin and heparin sulfate oligosaccharide libraries: efficient synthesis of uronic acid and disaccharide building blocks, TETRAHEDRON, 66, 3951-62 (2010)
2. 学会発表
- ◆ 隅田泰生, 「糖鎖固定化金ナノ粒子: ウイルスの超高感度検出のための新規ツール」、国際バイオフォーラム、2009年7月1日~3日、発表日 2009/7/1(口頭) 東京都
 - ◆ 張旭, 青山和枝, 加瀬哲男, 隅田泰生, 「糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたインフルエンザウイルスの高感度検出」、第23回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2009年7月3日~5日(口頭)、東京都
 - ◆ 若尾雅広, 小幡瑠美, 酒見千穂, 杜若祐平, 近藤宇男, 満下宣子, 隅田泰生, 「コンドロイチン硫酸部分二糖構造ライブラリーの構築とシュガーチップへの応用」、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~11日、発表日 2009/9/9(口頭)、岐阜県高山市
 - ◆ 山口憂三, 佐藤昌紀, 岩切健二, 若尾雅広, 隅田泰生, 「蛍光性リンカーを用いた微量糖鎖のチップ化と局在プラズモン共鳴法による相互作用解析」、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~11日、発表日 2009/9/10(口頭)、岐阜県高山市
 - ◆ 田中小代里, 若尾雅広, 隅田泰生, 「Fe₃O₄をコア成分とした糖鎖固定化磁性金ナノ粒子の開発」、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~11日、発表日 2009/9/11(ポスター)、岐阜県高山市
 - ◆ 張旭, 青山和枝, 若尾雅広, 隅田泰生, 「当鎖固定化金銀の粒子を用いたインフルエンザウイルスの高感度検出」、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~11日、発表日 2009/9/11(ポスター)、岐阜県高山市
 - ◆ 隅田泰生, 小野敬子, 山口裕三, 「分離・精製技術分子相互作用」、Bio Japan2009 (world Business Forum)、2009年10月7日~9日、発表日 2009/10/7(ポスター)、横浜市
 - ◆ 隅田泰生, 「新しいバイオデバイス: シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子」、

- 技術開発フォーラム－新規分子検出システムによる次世代バイオ分析、全日本科学機器展 in 大阪 2009、学会連動セミナーの一企画、2009年10月21日（口頭）、大阪市
- ◆ 張旭、青山和枝、田中小代里、森川佐依子、廣井聡、加瀬哲男、若尾雅広、隅田泰生、「糖鎖への結合性を利用したインフルエンザウイルスの類型化ならびに高感度検出法」、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日～27日（口頭）、東京都
 - ◆ 恒見圭太、隅田泰生、橋本雅仁、「Mesorhizobium loti 由来NO生産リポ多糖の活性検討及び構造解析」、第82回日本生化学会大会(4P-730)、2009年10月21日～24日、発表日2009/10/24(ポスター)、兵庫県神戸市
 - ◆ 隅田泰生、張旭、青山和枝、鶴田一祥子、加瀬哲男、小財健一郎、若尾雅広、「糖鎖固定化金ナノ粒子を用いたウイルスの濃縮と高感度検出」、第82回日本生化学会大会(4P-867)、2009年10月21日～24日、発表日2009/10/24(ポスター)、兵庫県神戸市
 - ◆ 田中小代里、張旭、青山和枝、加瀬哲男、若尾雅広、隅田泰生、「糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルス濃縮」、第82回日本生化学会大会(4P-871)、2009年10月21日～24日、発表日2009/10/24(ポスター)、兵庫県神戸市
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- ◆ 隅田泰生、若尾雅広、「糖鎖固定化磁性金属ナノ粒子の製造方法」、特願2009-175001、出願日：2009年7月28日
 - ◆ 隅田泰生、若尾雅広、児玉崇、「ウイルス濃縮方法および磁性体組成物」、特願2010-45753、出願日：2010年3月2日
 - ◆ 若尾雅広、隅田泰生「糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子、およびその製造方法」、特願2010-53040、出願日：2010年3月10日
 - ◆ 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、「リンカー化合物およびリガンド並びにオリゴ糖鎖の固定化方法および蛋白質分析用の支持体」、登録番号4364853、登録日：2009年8月25日
 - ◆ 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケルソベール、「多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法」、登録番号4430344、登録日：2009年12月25日
 - ◆ 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケルソベール、「多岐用途型リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法」、中国ZL03821302.8、登録日：2009年8月6日

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

平成 21 年度 分担研究報告書

ヘルペスウイルス感染症への応用

分担研究者 奥野壽臣 兵庫医科大学・准教授

研究要旨：ヒトヘルペスウイルス 6（HHV-6）、HHV-7 がヘパリン結合金ナノ粒子（Heparin Gold Nano Particle、HGNP）によって濃縮できるか否かを調べた。ウイルス粒子と HGNP を混合し、HGNP へのウイルス粒子の結合量を定量 PCR 法で測定した。その結果、両ウイルスとも濃縮できる可能性が得られた。唾液での応用を想定し、健常成人の唾液内の両ウイルスの存在を PCR で検出したところ、HHV-6 は 11 名中 名が nested PCR でのみ陽性であったが、HHV-7 では 11 名中 名が陽性となり、その内 名は single PCR でも検出できた。

A. 研究目的

糖鎖結合金ナノ粒子を用いてヒトヘルペスウイルスを濃縮すること。

B. 研究方法

ヒトヘルペスウイルス 6（HHV-6）、HHV-7 を含む液をフィルター濾過したものにヘパリン結合金ナノ粒子（Heparin Gold Nano Particle、HGNP）を加え、一晚 4 度で反応させた。100,000g、30 分遠心し HGNP を沈殿させ、その沈渣にバッファーを加え元の量に戻した。それと元のウイルス液とに含まれるウイルス量を Real-time PCR で定量し、両者を比較した。

健常成人 11 人より唾液を採取し、煮沸後 nested PCR によって両ウイルスの検出を試みた。同意を得た者のみから唾液を採取した。

C. 研究結果

HHV-6 の Real-time PCR による Ct 値は、

元のウイルス液で、HGNP 処理した場合にはであった。HHV-7 は通常の PCR で調べたが、どちらの液も 25 サイクルあたりでの増幅の効率は同程度であった。健常成人の唾液では、HHV-6 は 11 名中 名が nested PCR でのみ陽性であったが、HHV-7 では 11 名中 名が陽性となり、その内 名は single PCR でも検出できた。

D. 考察

HGNP 処理ウイルス液は量としては元のウイルス液と同量なので、もしその中のウイルス量が元と同程度であれば、それはウイルスが HGNP とともに沈殿したことを示している。PCR の結果から、両ウイルス液中のウイルス量にはそれほど差がなかった。このことから、ウイルスが Heparin に結合して沈殿したことになる。つまり、この方法によってウイルス濃縮が可能である。唾液の結果は、かなりの率でウイルスが分泌されていることを示している。そしてその量は HHV-7 の方が多かった。これらは従来の報告と合致している。

E. 結論

HGNP で HHV-6、7 を濃縮することができる。この方法で唾液中のウイルスの検出感度を高めることができる可能性が示唆され、他のヘルペスウイルスへの応用が期待された。

F. 研究発表

1.論文発表

- ◆ Otani, N., Baba, K., Okuno, T.
Interferon- γ release assay: A simple method for detection of varicella-zoster virus-specific cellmediated immunity. J. Immunol. Methods 351: 71-74, 2009.

2.学会発表

- ◆ Okuno, T., Ursea, R., Hooper, L. C., Smith, J., Hooks, J. J., Hayashi, K. :
Involvement of HHV-6 in corneal inflammation. The 34th International Herpesvirus Workshop, 2009, Ithaca.

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

平成 21 年度 分担研究報告書

シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成

分担研究者 石田秀治 岐阜大学応用生物科学部・教授

研究要旨:我々は生理活性複合糖質の化学生物学的研究を展開しており、その基盤として糖鎖、特に化学的・生物学的に興味深いシアル酸含有糖鎖の合成を進めている。平成 21 年度は最も高度にシアロ化されたガングリオシド GQ1b の実践的合成法を確立した。さらにシアル酸をモチーフとした阻害剤の設計と合成に成功した。これらの糖鎖は、ウイルスが特異的に結合する糖鎖の探索のためのシュガーチップ (SC)、ならびにウイルスの濃縮等に使用する糖鎖固定化金ナノ粒子 (SGNP) の調製に用いられる。

A. 研究目的

我々は生理活性複合糖質の化学生物学的研究を展開しており、その基盤として糖鎖、特に化学的・生物学的に興味深いシアル酸含有糖鎖の合成を進めている。本稿では、ウイルスが特異的に結合する糖鎖の探索のために必要となる構造明確な糖鎖を合成することを目的とする。

なり、大量合成への応用が可能となった。また、p-メトキシベンジル基を有するグルコシルセラミドを用いることで、脱保護における収率低下などの問題点を克服できた。更にシュガーチップへの応用を含めた非天然型の分子プローブの創製も好収率で系統的に達成した。

棘皮動物由来ガングリオシド HLG-2 の全合成

ナマコの抽出液から同定された神経活性化作用のある HLG-2 の全合成に成功した。活性の高い N-2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル (Troc) 保護シアル酸供与体と 1, 5-ラクタム化シアル酸受容体を縮合することで、特徴的な 3 糖構造、 α -N-グリコリルシアリル (2-4) - α -N-アセチル (2-6) - グルコシドの構築を立体選択的に達成した。得られた 3 糖を糖供与体に導き、セラミド分子の一級水酸基と直接縮合させ、HLG-2 保護を合成した。

B-E. 研究方法 ～ 結論

ガングリオシド GQ1b 及び誘導体の効率的合成

ガングリオシド GQ1b の非還元側 7 糖とグルコシルセラミドとの間の「カセットアプローチ」を用いて、ガングリオシド GQ1b の収率的な全合成を達成した。シアリル α (2-8) シアリル α (2-3) ガラクトース構造を鍵中間として用いることで糖鎖構築が極めて簡便に

引き続き脱保護を行い、目的とするガングリオシドHLG-2の全合成に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ◆ Abdu-Allah, Hajjaj Hassan Mohamed, Watanabe, K., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H., Kiso, M.: Potent small molecule mouse CD22-inhibitors: Exploring the interaction of the residue at C-2 of sialic acid scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 5573–5575, 2009.
- ◆ Sadagopan, M., Vats, S., Moriya, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H., Kiso, M.: Human sialidase inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation of 4-acetamido-5-acylamido-2-fluoro benzoic acids. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 4595-4603, 2009.
- ◆ Abdu-Allah, Hajjaj Hassan Mohamed, Watanabe, K., Hayashizaki, K., Iwayama, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H., Kiso, M.: Synthesis of biotinylated sialoside to probe CD22–ligand interactions. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 4488-4491, 2009.
- ◆ Tanaka, H., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M., Ishihara, H., Koketsu, M.: Synthetic study on $\alpha(2-8)$ -linked oligosialic acid employing 1,5-lactamization as a key step. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 4478-4481, 2009.
- ◆ Iwayama, Y., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A first total synthesis of ganglioside HLG-2. *Chem. Euro. J.*, **15**, 4637-4648,

2009.

- ◆ Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Ganglioside GQ1b: Efficient total synthesis and the expansion to synthetic derivatives to elucidate its biological roles. *J. Org. Chem.*, **74**, 3009-3023, 2009.
 - ◆ Sato, T., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Di-tert-butylsilylene- directed α -selective synthesis of p-nitrophenyl T-antigen analogues. *Glycoconjugate J.*, **26**, 83-98, 2009.
- ### 2. 学会発表
- ◆ 鈴木達哉, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 水酸基をアルキルセレノ基で置換したセレノ糖鎖の合成研究、2010 年度大会 日本農芸化学会、東京、平成 22 年 3 月 28 日-30 日。
 - ◆ 藤川紘樹, 布施智明, 今村彰宏, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 環状 GlcCer acceptor を用いたガングリオシド GalNAc-GD1a の全合成、2010 年度大会 日本農芸化学会、東京、平成 22 年 3 月 28 日-30 日。
 - ◆ 玉井秀樹, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真, Tamai, H., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: 部分修飾シアル酸二量体を有するガングリオシド LLG-3 の全合成、2010 年度大会 日本農芸化学会、東京、平成 22 年 3 月 28 日-30 日。
 - ◆ 河村奈緒子, 安藤弘宗, 田中賢治, 鈴木健一, 楠見明弘, 石田秀治, 木曾真: ラフト分子の一分子追跡の為の蛍光 GM3 プローブの合成と機能評価 2010 年度大会 日本農芸化学会、東京、平成 22 年

3月28日-30日。

- ◆ 毛受雅典, 安藤弘宗, 石田秀治, 額瀨守, 木曾真: パラ位置換ベンジルセレノグリコシド供与体を用いたグリコシル化反応の検討、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
- ◆ 齊藤里紗, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 癌特異抗原としてのガングリオシド GM2 同族体の合成研究、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
- ◆ 岩山祐己, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: トラフナマコ由来生理活性ガングリオシド HPG-7 の全合成研究、2010年度大会 日本農芸化学会、東京、平成22年3月28日-30日。
- ◆ 藤川紘樹, 今村彰宏, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 分子内グリコシル化を用いた効率的ガングリオシド合成法の開発、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市(飛騨・世界生活文化センター) (Oral)
- ◆ 田中秀則, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真, 額瀨守: 1,5-ラクタム化を鍵反応とした α -(2-8) オリゴシアル酸の合成研究、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市(飛騨・世界生活文化センター) (poster)
- ◆ 玉井秀樹, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 棘皮動物アオヒトデ由来ガングリオシド LLG-3 の合成、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市(飛騨・世界生活文化センター) (Oral)
- ◆ 岩山祐己, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: トラフナマコ由来新規生理活性ガングリオシド HPG-7 の全合成 (1) 還元末端側 2 糖の効率的合成、第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市(飛騨・世界生活文化センター) (poster)
- ◆ 中島慎也, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: ラクト及びガングリオ系二系列を同一分子中に有するハイブリッド型ガングリオシドの全合成第29回日本糖質学会年会、2009年9月9日~9月11日、岐阜県高山市(飛騨・世界生活文化センター) (poster)
- ◆ Nakashima, S., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A First Synthesis of Lacto-ganglio Series Ganglioside, 15th European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19-24, 2009. (Oral)
- ◆ Tamai, H., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Synthetic Study of Ganglioside LLG-3 from Echinoderms. 15th European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19-24, 2009.(poster)
- ◆ Yoshida, F., Saito, R., Komura, N., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: An efficient synthesis of GM1 epitope-containing Octasaccharide from *C.jejuni*, 15th European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19-24, 2009. (poster)

HTLV-1 の糖鎖結合性の解析

分担研究者 有馬直道 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・教授

研究趣旨: 難治性である成人T細胞白血病の原因ウイルスであるHTLV-1の糖鎖結合性を、multi-SPR法を用いて解析した。ウイルス材料として、HTLV-1感染細胞培養上清を超遠心により部分精製したものをを用いた。その結果、SV-I, II, CMV, VZVなど他の多くのウイルスがコンドロイチンEに対して結合性を示す中で、本ウイルスはコンドロイチンBに対して特異的に結合性を示した。今後、この性質を利用してHTLV-1キャリアや本疾患患者の体液からの微量定量測定系の確立と、その測定法を用いて病態との関連性などを検討する予定である。

A. 研究目的

鹿児島県を中心として西南九州に多発している成人T細胞白血病(Adult T cell leukemia: ATL)は従来の抗がん剤を用いる多剤併用療法では極めて難治性である。また、最近登場した幹細胞移植療法も、本疾患の発症年齢が骨髄移植法適応年齢からすると高齢であることや、また実際に治療が行えた例でも合併症や再燃の問題等があり、未だ多くの患者に対する効果的な治療法とは云えない状況にある。従って、今後ATLの治療成績を向上させるためには、新たな発想に基づく治療法の確立が急務となっている。

本疾患はレトロウイルスの一種であるHTLV-1が感染したTリンパ球が腫瘍化した造血器腫瘍であり、ウイルス保持者(キャリア)から生涯発症率として約50名中1名で発症する。HTLV-1ウイルスの感染経路で最も重要なものは、乳児期にキャリア母親から母乳を介して感染する母乳感染経路である。通常ウイルスはTリンパ球内に存在し、細胞同士の接触

で感染が成立し、遊離のウイルスでは感染がほとんど成立しないと云われていた。しかしながら、最近の研究により、遊離ウイルスでもDendritic cellに取り込まれる事により最終的にTリンパ球に感染することが実験的には明らかになってきた。本疾患が発見されて30年ほど経つが、ウイルス自体およびウイルス感染様式など解決すべき課題は数多く残されており、これらの解決が新たな治療法開発の契機となる可能性も否定できない。

一方、糖鎖は生体内で多彩な機能を示し、生命現象に不可欠な役割を有する。細胞表層の糖鎖はウイルスにはレセプターとして使用され、その感染を仲介する。HTLV-1も細胞表層の糖鎖と密接な相互作用のもとに細胞への感染が成立するものと考えられる。そこで、本研究では、隅田らが開発した糖鎖を固定化したバイオデバイス「シュガーチップ」および「糖鎖固定化金ナノ粒子(以下、SGNPと略)」を用いて、HTLV-1に特異的に結合する糖鎖を明らかにし、対応するウイルス蛋白の同定、ウイルス濃縮、

キャリアや ATL 患者サンプルからのウイルスの検出、病態との関連などについて明らかにすることを目的とする。

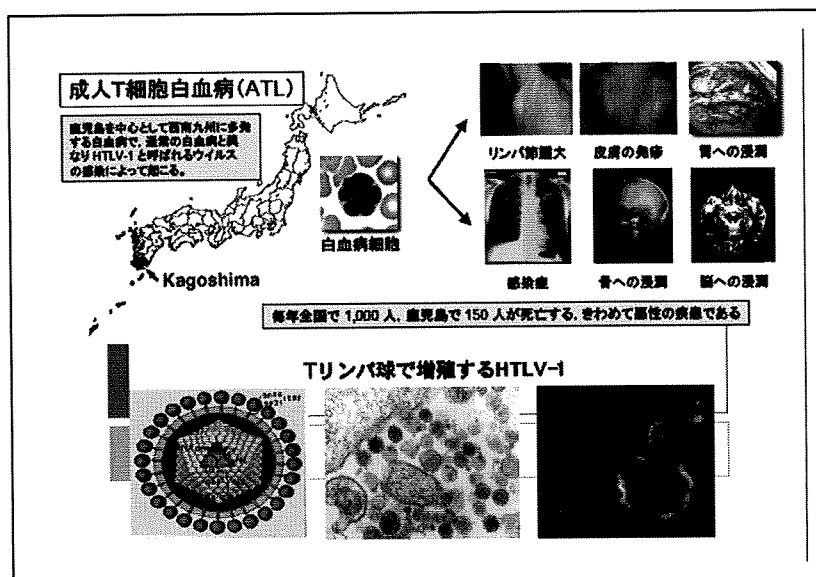


図1 成人T細胞白血病(ATL)の疫学と臨床およびHTLV-1

B. 方法と材料

細胞株として、ATL患者の末梢血単核球から樹立したS1T, K3T, およびMT-2、さらにATLと関連のない急性リンパ系白血病細胞株MOLT-4を用いた。K3T, MT-2はHTLV-1産生株であり、S1Tは非産生株である。もちろんMOLT-4もHTLV-1を産生していない。図2にはHTLV-1由来のTax蛋白産生の有無を、フローサイトメトリー法、ノザンプロット法、およびウエスタン法で、蛋白やmRNAの有無を調べたものである。MT-2およびK3TではTax蛋白の産生が明らかである。通常、Tax蛋白の産生はHTLV-1ウイルスの産生と考えて間違いのないと思われる。次

に、各細胞培養上清を径0.45・mのフィルターでろ過し、100000 xg, 90分間の超遠心をおこない、沈殿物をPBS 1mlに再分散させた。さらに同じ条件で超遠心し、沈殿物をPBS/T (tween 20)に再分散させて、測定検体とした。最初の上清より10倍濃縮となっている。糖鎖結合性はmultiSPR (MultiSPR-052-chooo-03)装置を用いた。測定の原理の詳細は省くが、multiplate型の糖鎖結合plateを用い、各ウエルには図3に示すように、多数の糖鎖が結合しており、SPR法で各ウエルにおける結合の強さを測定した。

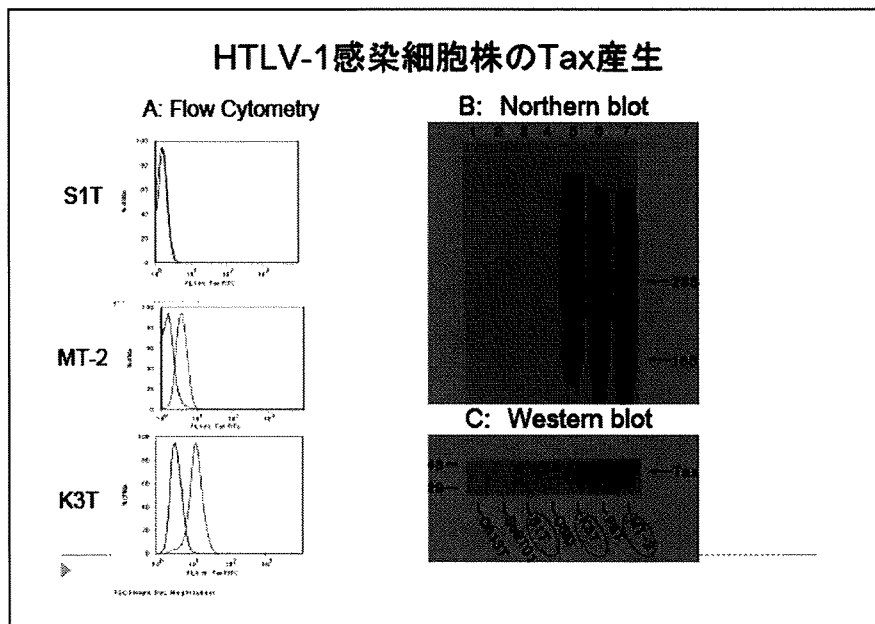


図2 HTLV-1感染細胞 S1T, MT-2, K3T の Tax 蛋白産生について

【目的】 HTLV-1の糖鎖結合能を分析する

【材料】 各細胞培養液、PBS/T(0.05%)

【装置・チップ】 MultiSPR (MultiSPR-052-ohc-03)

【方法】

- ① 各細胞培養上清 8 ml をフィルターろ過 (0.45 μm)
- ② 超遠心 (100000 × g, 90 分, 4°C)
- ③ PBS (1 ml) に再分散させ
- ④ 超遠心 (100000 × g, 90 分, 4°C)
- ⑤ PBS/T (600 μl) に再分散させ
- ⑥ そのまま測定

【測定サンプル】

medium K3T, S1T, MT-2, MoTT4.

| | | | |
|----|--------------------------------------|----|---------------------------------------|
| 1 | GlcA1-4Glc | 25 | GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc |
| 2 | GlcA1-4Glcα1-4Glc | 26 | GlcNAcα1-6Glc |
| 3 | GlcA1-6Glcα1-8Glc | 27 | GalNAcβ1-3Gal |
| 4 | GlcA1-6Glc | 28 | NeuAcα2-3Galβ1-4Glc |
| 5 | GlcA1-6Glcα1-8Glc | 29 | NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAc |
| 6 | Glcβ1-3Galβ1-2Glc | 30 | NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-8Glc |
| 7 | Glcβ1-4Glc | 31 | NeuAcα2-2Galβ1-4GlcNAcβ1-8Glc |
| 8 | Glcβ1-6Glc | 32 | NeuAcα2-8Galβ1-4Glc |
| 9 | Galα1-6Glc | 33 | NeuAcα2-1-6Galβ1-3GlcNAcβ1-8Glc |
| 10 | Galα1-4Galβ1-4Glc | 34 | NeuAcα2-1-6Galβ1-4GlcNAcβ1-6Glc |
| 11 | Galβ1-3GalNAcα1-6Glc | 35 | NeuAcα2-6GalNAcα1-6Glc |
| 12 | Galβ1-4GlcNAcβ1-6Glc | 36 | Heparin |
| 13 | Galβ1-4Glc | 37 | Chondroitin sulfate |
| 14 | Galβ1-4(Fucα1-2)GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc | 38 | Chondroitin sulfate A |
| 15 | Mannα1-2Man | 39 | Chondroitin sulfate B |
| 16 | Mannα1-2Mannα1-6Man | 40 | Chondroitin sulfate C |
| 17 | Mannα1-6Man | 41 | Chondroitin sulfate D |
| 18 | Fucα1-2Galβ1-4Glc | 42 | Chondroitin sulfate E |
| 19 | Fucα1-6Glc | 43 | GlcHS6Sα1-4Glcαβ1-8Glc |
| 20 | Fucβ1-4Glc | 44 | GalNAc6Sα1-4GalNAcα1-6Glc |
| 21 | Xyloβ1-6Glc | 45 | GalNAcα1-4GalNAcβ1-6Glc |
| 22 | GlcNAcα1-6Glc | 46 | GalNAcα1-4GalNAcα1-6Glc |
| 23 | GlcNAcβ1-4GlcNAc | 47 | GalNAcβ1-3GalNAc4Sββ1-6Glc |
| 24 | GlcNAcβ1-6Glc | | |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium |
| B | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium |
| C | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium |
| D | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium |
| E | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium |
| F | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium |
| G | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium |
| H | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium | medium |

図3 プレートの各ウェルに結合した糖鎖一覧、および検体サンプルの処理

C. 結果

SPR法による測定結果を可視化したものが図4左である。右はそのデータを定量化したものである。コントロール（培養液そのもの）でもヘパリンに対して強い結合が認められる。細胞株の上清由来の検体では、ヘパリン以外に、ヘパラン硫酸類にも結合性が認められる。注目すべきは、K3TおよびMT-2では、コンドロイチンBに結合性をしめしていること、さらにSITやMOLT-4では示していないということである。

もちろんコントロールでも結合性を示していない。今回の測定では、Tax産生株由来の検体にのみ結合性が認められている。

次いで、検体の希釈による濃度勾配での結合強度曲線を求めた結果が図5である。ヘパリンとコンドロイチンBを提示する。ヘパリンは結合強度が高いがコントロールでもかなり高い。これに比べて、コンドロイチンBはK3TおよびMT-2、すなわちTax産生株上清でのみ結合活性が認められた。

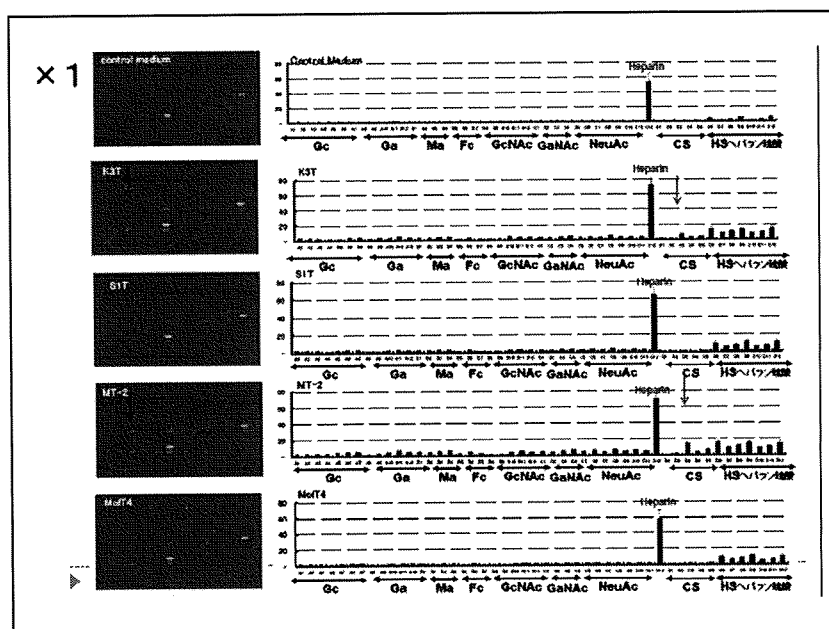


図4 MultiSPR法による測定結果、赤矢印はコンドロイチンBとの結合を示す

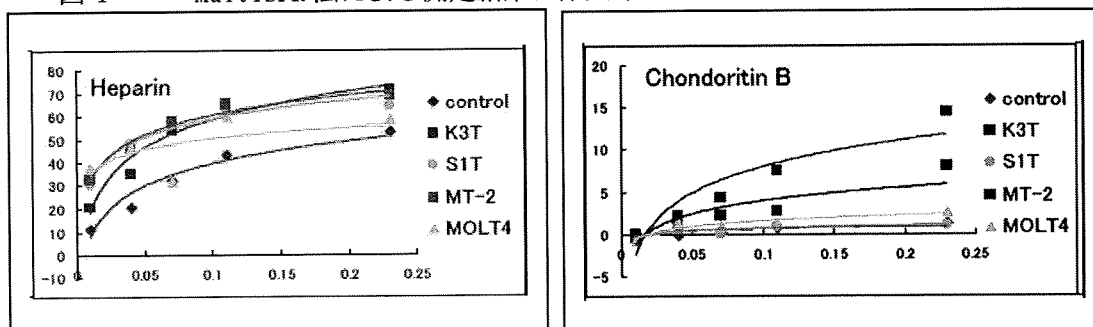


図5 ヘパリンとコンドロイチンBの結合強度曲線

D・E. 考察・結論

今回の研究では Tax 産生細胞培養上清からのサンプルにはコンドロイチン B に対する結合活性が確認された。結合物質は未だ同定されていないが、ウイルス粒子もしくはウイルス関連蛋白である可能性は高い。一方、ヘパリンに対する結合性は、Tax 産生の有無とは無関係であり、また培養液自体にも認められたことより、FBSに含まれる物質が関与しているものと考えられる。今回、Tax 産生細胞培養上清からのサンプルにコンドロイチン B に対する結合物質が確認されたことは、他の幾つかのウイルスである HSB-I, II, CMV, VZV, BVDV などが、コンドロイチン E に対して結合性を示す中で、きわめて注目すべき結果である。この性質を利用して、ウイルス粒子の濃縮が可能であれば、細胞培養液と同時に、キャリアや患者の体液からのウイルス粒子の微量定量が可能となるかもしれない。これまで、血清を含む体液からのウイルス粒子の検出は報告されていない。これはおそらく血清中のウイルス粒子がきわめて少量であるためと推測される。微量測定系が確立できれば、キャリアや患者病態のより詳細な解析が可能となり、本疾患の診療に大いに役立つものと思われる。また、基礎研究的側面からはコンドロイチン B に結合するウイルス蛋白もしくは糖蛋白についても明らかにしたい。ウイルス感染のいまだ不明な分子機構を解明するツールとなる可能性もある。いずれにしても本研究のさらなる展開に努めたい。

F. 研究業績

1. 論文発表

- ◆ S. Suzuki, S. Nagel, B. Schneider, S. Chen, M. Kaufmann, K. Uozumi, N. Arima, H. G. Drexler, A. R. MacLeo. A second NOTCH1 chromosome rearrangement: t(9;14)(q34.3;q11.2) in T-cell neoplasia. *Leukemia* 23, 1003-1006, 2009
- ◆ S. Owatari, M. Otsuka, T. Takeshita, K. Mizukami, S. Suzuki, K. Uozumi, Y. Tashiro, N. Arima, S. Hanada. Uncommon cases of immature-type CD56+ natural killer (NK)-cell neoplasms, characterized by expression of myeloid antigen of blastic NK-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* 89, 188-194, 2009
- ◆ T. Kozako, M. Yoshimitsu, H. Fujiwara, I. Masamoto, S. Horai, Y. White, M. Akimoto, S. Suzuki, K. Uozumi, C. Tei, Arima N. PD-1/PDL-1 expression in HTLV-1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia* 23, 375-382, 2009
- ◆ T. Kozako, K. Fukuda, S. Hirata, Y. White, M. Harao, Y. Nishimura, Y. Kino, S. Soeda, H. Shimeno, F. Lemonnier S. Sonoda, N. Arima. Efficient induction of human T-cell leukemia virus -1-specific CTL by chimeric particle without adjuvant as a prophylactic for adult T-cell leukemia. *Mol. Immunol.*, 47, 606-613, 2009

2. 学会発表

- ◆ 吉満誠、小迫知弘、鈴木紳介、松下格司、久保田龍二、出雲周二、魚住公治、有馬直道、HTLV-1 感染者における免疫抑制受容体の発現. 第 2 回 HTLV-1 研究会, 2009 年 8 月 30 日、東京
- ◆ 小迫知弘、田路真吾、鈴木進、占野廣司、魚住 34 公治、有馬直道、HTLV-1 関連疾患における HTLV-1 特異的 CTL の多様性、第 68 回日本癌学会総会、2009 年 9 月 30 日、横浜
- ◆ T. Kozako, T. Shoji, A. Aikawa, S. Hayashida, Y. Kuramoto, R. Mononagare, S. Honda, H. Shimeno, S. Soeda, M. Yoshimitsu, Y. White, N. Arima. SIRT1, a longevity gene encoded protein, regulates apoptosis of adult T-cell leukemia cells and its inhibition by sirtinol induces apoptosis. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting, 2009, December 7, New Orleans, LA, USA
- ◆ T. Kozako, M. Akimoto, Y. White, S. Toji, K. Matsushita, S. Izumo, S. Suzuki, K. Uozumi, H. Shimeno, S. Soeda S, N. Arima. Target Epitopes of Human T Lymphotropic Virus 1 Recognized by Class I MHC-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes in HAM/TSP Patients and Infected Patients with Autoimmune Disorders. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting, 2009, December 6, New Orleans, LA, USA
- ◆ Y. White, M. Yoshimits, T. Kozako, M.

Akimoto, S. Toji, K. Matsushita, R. Kubota, S. Izumo, K. Uozumi, S. Shimeno S, S. Soeda, N. Arima. Increased Frequency of HTLV-1 Tax Specific CD8+ Regulatory T-Cells in HTLV-1 Infected Individuals. The American Society of Hematology 51th Annual Meeting (New Orleans, LA)

ウシウイルス性下痢症ウイルス（BVDV）の糖鎖結合能に関する研究

分担研究者 馬場昌範 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 張 旭 鹿児島大学大学院理工学研究科 大学院生

研究要旨:フラビウイルス科に属するウイルスの、糖鎖に対する結合能を明らかにする目的で、今年度は培養細胞で大量に増やすことが可能で、ヒトに感染しないウシウイルス性下痢症ウイルス（BVDV）を用いて、その糖鎖結合能について検討を行った。その結果、BVDV は負の電荷を有する、全てのヘパラン硫酸系糖鎖に対して結合性を示すとともに、コンドロイチン硫酸系糖鎖に対しては、一部のものだけに結合した。一方、BVDV は電荷を持っていない GcNAc 系の糖鎖に対する結合能が見られたことから、BVDV が GcNAc 系の糖鎖を特異的に認識していることが示唆された。

A. 研究目的

フラビウイルス科 (*Flaviviridae*) に属するウイルスは、エンベロープを有する 1 本鎖の + 鎖 RNA ウイルスであり、粒子は 40~60 nm の直径を持つ。フラビウイルス科にはフラビウイルス属、ペスチウイルス属、ヘパシウイルス属の 3 属が存在する。フラビウイルス属の主なものとしては、黄熱病ウイルス (YFV)、デング熱ウイルス (DENV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、西ナイルウイルス (WNV) があり、どれも蚊やダニによって媒介される。ペスチウイルス属の主なものとしては、ウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) やブタコレラウイルス (SFV) があり、これはヒトには感染しないが、家畜には重篤な疾患を引き起こす。ヘパシウイルス属には C 型肝炎ウイルス (HCV) があり、これは主に感染血の輸血によって感染し、感染すると高頻度に慢性肝炎へと移行し、肝ガンの原因となる。

これらの中で、特にフラビウイルス属のウイルスは、ヒトに対して重篤な疾患を引き起こすことがあり、発症予防や治療の点からも、高感

度で特異的なウイルス検出法が必要である。また、ペスチウイルス属のウイルスについても、畜産・獣医学領域において、高感度なウイルス検出法のニーズは大きい。そこで、本研究ではフラビウイルスに特異的に結合する糖鎖が存在するかどうかについて検討し、もし特異的な糖鎖が同定出来れば、それを用いて高感度なフラビウイルスの検出方法を確立することを目的としている。今年度はその第 1 段階として、培養細胞にて容易に増殖し、大量のウイルスが得られるとともに、ヒトには感染しないことから、実験室内で安全に取り扱える BVDV を用いて、その糖鎖結合能に関する検討を行った。

B. 研究方法

ウイルスと細胞:細胞障害性 BVDV である Nose 株を全ての実験に用いた。細胞は正常仔牛腎細胞由来の細胞株である Madin-Darby bovine kidney (MDBK) 細胞を用いた。MDBK 細胞は 10% ウマ血清 (HS) 添加 Dulbacco's Modified Eagle Medium DMEM 培地中で、37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。ウイルスストッ

クは 1.0×10^6 個の MDBK 細胞に multiplicity of infection (MOI) = 5 にて BVDV を感染させ、3 日間培養後に上清を回収し、1300 rpm にて 5 分間遠心処理して上清を回収し、使用するまで -80°C に保存した。

ウイルスの濃縮と精製：BVDV の糖鎖への結合能を糖鎖チップを用いて測定するために、ウイルスの濃縮と精製を行った。具体的には、得られたウイルスストック液 25 ml を $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターを用いて濾過した。濾過したウイルス液は、次に超遠心 ($100,000 \times g$, 90 分, 4°C) を行い、得られた沈澱物を 1 ml のリン酸緩衝液 (PBS) に再浮遊させた。これを再び超遠心 ($100,000 \times g$, 90 分, 4°C) し、得られた沈澱

を $500 \mu\text{l}$ の PBS に再浮遊させ、これを「50 感染価サンプル」と規定した。さらに、このサンプルを PBS にて 2 および 4 倍に希釈し、それぞれを「25 感染価サンプル」および「12.5 感染価サンプル」とした。

糖鎖結合能の測定：得られたサンプルは、図 1 に示すような糖鎖をマウントした糖鎖チップ MultiSPR-052-cho-01 (株式会社 スティックスバイオテック) と表面プラズモン共鳴測定装置 (1 channel 96 ligands SPR, Toyobo) を用いて、その糖鎖結合能を解析した。

(倫理面への配慮について)

本研究では、ヒトのサンプルは用いていない。

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| A | Gc 4Gc | Gc 4Gc 4Gc | Gc 6Gc 4Gc | Gc 6Gc | Gc 6Gc 6Gc | Gc 3Gc 3 Gc | Gc 4Gc | Gc 6Gc | Ga 6Gc | Ga 4Ga 4 Gc | Ga GaN Ac α 6Gc | Ga GcN Ac β 6Gc |
| B | Ga 4Gc | Ga 4[Fc 3]GcNAc 3Ga 6Gc | Ma 2Ma | Ma 3Ma 6Ma | Ma 6Ma | Fc 2Ga 4 Gc | Fc 6Gc | Fc 6Gc | Xy β 6Gc | GcNAc 6 Gc | GcNAc GcNAc | GcNAc 6 Gc |
| C | GcNAc 3 Ga 4GcN Ac 3Ga 4 Gc | GaNAc 6 Gc | GaNAc 3 Ga | NeuAc 23 Ga 4Gc | NeuAc 23 Ga 4GcN Ac | NeuAc 23 Ga GcN Ac β 6Gc | NeuAc 23 Ga 4GcN Ac β 6Gc | NeuAc 26 Ga 4Gc | NeuAc 26 Ga GcN Ac β 6Gc | NeuAc 26 Ga 4GcN Ac β 6Gc | NeuAc 26 GaNAc α 6Gc | Heparin |
| D | Chondoriti n | Chondoriti n A | Chondoriti n B | Chondoriti n C | Chondoriti n D | Chondoriti n E | GcNS6S 4GcA 6Gc c | GcNS6S 4IdA2S 6 Gc | GcNS6S 4IdA2S 6 Gc | GcNS 4G cA 6Gc | GcNS 4Id A2S 6Gc | GcA 3Ga NAc4S6S 6Gc |
| E | Gc 4Gc | Gc 6Gc | Ga 6Gc | Ga 4Ga 4 Gc | Ga GaN Ac α 6Gc | Ga GcN Ac β 6Gc | Gc 4Gc | Gc 4Gc 4Gc | Gc 6Gc 4Gc | Gc 6Gc | Gc 6Gc 6Gc | Gc 3Gc 3 Gc |
| F | Fc 6Gc | Fc 6Gc | Xy β 6Gc | GcNAc 6 Gc | GcNAc GcNAc | GcNAc 6 Gc | Ga 4Gc | Ga 4[Fc 3]GcNAc 3Ga 6Gc | Ma 2Ma | Ma 3Ma 6Ma | Ma 6Ma | Fc 2Ga 4 Gc |
| G | NeuAc 23 Ga 4GcN Ac β 6Gc | NeuAc 26 Ga 4Gc | NeuAc 26 Ga GcN Ac β 6Gc | NeuAc 26 Ga 4GcN Ac β 6Gc | NeuAc 26 GaNAc α 6Gc | Heparin | GcNAc 3 Ga 4GcN Ac 3Ga 4 Gc | GaNAc 6 Gc | GaNAc 3 Ga | NeuAc 23 Ga 4Gc | NeuAc 23 Ga 4GcN Ac | NeuAc 23 Ga GcN Ac β 6Gc |
| H | GcNS6S 4GcA 6Gc c | GcNS6S 4IdA2S 6 Gc | GcNS6S 4IdA2S 6 Gc | GcNS 4G cA 6Gc | GcNS 4Id A2S 6Gc | GcA 3Ga NAc4S6S 6Gc | Chondoriti n | Chondoriti n A | Chondoriti n B | Chondoriti n C | Chondoriti n D | Chondoriti n E |

図 1. 糖鎖チップのレイアウト

C. 研究結果

それぞれのサンプルを解析した結果、図 2 に示すような糖鎖結合のパターンがみられた。比

較対象として、フィルター処理しただけの感染細胞からの培養上清と、ウシ胎仔血清 (FBS)