

Scheme 3 コンドロイチン硫酸部分二糖構造 (GlcA2S3Sβ1-4GalNAc4S) の合成とリガンド複合体化

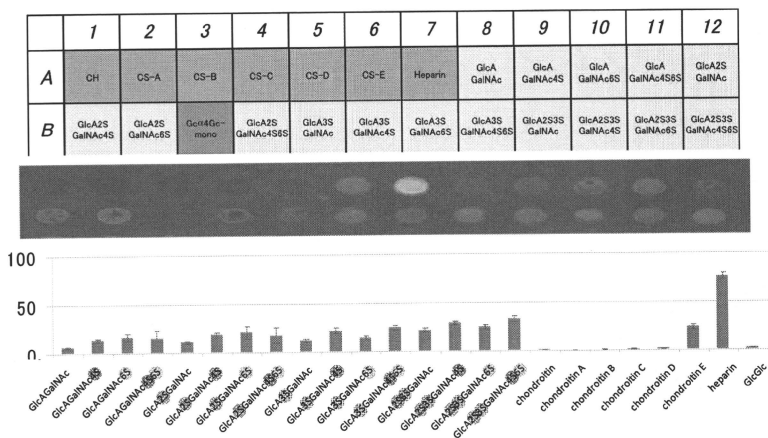


図1 GAG シュガーチップの糖鎖配列と SPR イメージング法による HIV の糖鎖結合性の解析



図2 自動濃縮装置 MOC-1 の外観

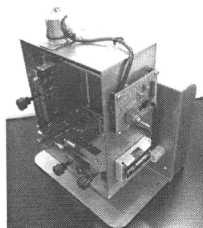


図3 1検体濃縮機

		ppt		sup		no SMGNP	
		Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
Hep-GNP	1/100000	34.3	83.55	35.51	80.24	26.08	85.58
	1/1000000	35.67	80.18	35.65	80.3	33	85.52
DS25-MGNP	1/100000	35.22	83.61	35.83	80.25	35.47	80.41
	1/1000000	35.25	83.65	36.7	80.37	37.37	80.64
p.c. (1/100)						34.99	83.7
n.c.						38.64	79.78

Tm 解析 (Hep-GNP)

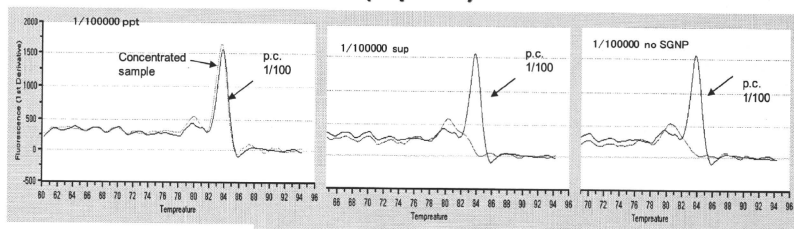


図4 (上段) コクサッキーウイルス (CA16) の Hep-GNP を用いたマニュアルでの濃縮と、DS25-MGNP を用いた自動濃縮機 (MOC-1) を用いたときの結果の比較。ウイルス培養上清を 1/10000 および 1/1000000 に希釈して実験に使用。(下段) Hep-GNP を用いて濃縮した画分 (ppt)、濃縮画分の上清 (sup)、濃縮前のウイルス希釈液 (no SGNP) の解離曲線 (Tm) 解析。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ◆ J.P. Yang, R. Yoshida, Y. Kariya, X. Zhang, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Suda, A. Takada, Y. Ito and K. Sugimura, Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: mimotope and neutralizing activity, *The Journal of Biochemistry*, 148(4), pp.507-515, 2010.
- ◆ E. Wijelath, M. Namekata, J. Murray, M. Furuyashiki, S. Zhang, D. Coan, M. Wakao, R. B. Harris, Y. Suda, L. Wang, M. Sobel, Multiple mechanisms for exogenous heparin modulation of vascular endothelial growth factor activity, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol.111(2), pp.461-468, 2010.
- ◆ H. Kariya, Y. Yoshihara, Y. Nakao, N. Sakurai, M. Ueno, M. Hashimoto, Y. Suda, Carboxymethyl-chitin promotes chondrogenesis by inducing the production of growth factors from immune cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol.94A(4), pp.1034-1041, 2010.
- ◆ A. Saito, M. Wakao, H. Deguchi, A. Mawatari, M. Sobel, Y. Suda, Toward the assembly of heparin and heparin sulfate oligosaccharide libraries: efficient synthesis of uronic acid and disaccharide building blocks, *Tetrahedron*, 66, pp.3951-3962, 2010.

2. 学会発表

- ◆ 田中小代里, 張旭, 永友真未, 若尾雅広, 隅田泰生, 酸化鉄を磁性成分に持つ糖鎖固定化磁性ナノ粒子の調製, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月
- ◆ 宮原つかさ, 若尾雅広, 隅田泰生, ムチン型糖鎖コア構造に関する合成研究, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月
- ◆ 春山まみ, 齊藤彰寛, 横山理沙, 若尾雅広, 隅田泰生, イズロン酸を含むヘパラン硫酸部分二糖構造の合成とシュガーチップへの応用, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月
- ◆ 杜若祐平, 若尾雅広, 隅田泰生, デルマトン硫酸部分二糖構造に関する合成研究, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月
- ◆ 新地浩之, 中川奨, 若尾雅広, 望月衛子, 上松太郎, 桑畑進, 隅田泰生, ZnS-AgInS₂/ZnS コア/シェル構造を有する糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の合成と応用, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月
- ◆ 松山奈央, 齊藤彰寛, 若尾雅広, 隅田泰生, グルクロン酸を含むヘパラン硫酸部分二糖構造の合成研究, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月
- ◆ 仮屋博敬, 岩切健二, 新地浩之, 永友真未, 若尾雅弘, 隅田泰生, 一本鎖抗体固定化量子ドットを用いた ATL 細胞の On-site 検査システムの開発, JST 地域間連携事業 ATL (成人 T 細胞白血病・リンパ腫) シンポジウム2011 in 福岡, 2011年2月27日, アクロス福岡, 福岡, ポスター
- ◆ 岩切健二, 仮屋博敬, 山口憂三, 佐藤綾香, 戎義子, 岡田摩耶, 若尾雅広, 隅田泰生, ファイバー型シュガーチップを用いた ATL 細胞表層糖鎖に特異的に結合する一本鎖抗体 (scFv) の探索, JST 地域間連携事業 ATL (成人 T 細胞白血病・リンパ腫) シンポジウム 2011 in 福岡, 2011年2月27日, アクロス福岡, 福岡, ポスター
- ◆ 西原祥子, 佐々木紀彦, 平野和己, 隅田泰生, 豊田英尚, 一宮智美, ES 細胞の未分化性・多能性維持, 分化シグナルの拠点となる硫酸化糖鎖, BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生物化学会大会 合同大会), 2010年12月7~10日, 神戸ポートアイランド, 兵庫, ワークショップ
- ◆ Masahito Hashimoto, Mami Ozono, Yasuo Suda, Structurer and immunobiological activities of lipopolysaccharide from *Acetobacter pasteurianus*, BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生物化学会大会 合同大会), 2010年12月7~10日, 兵庫, ポスター
- ◆ 永友真未, 田中小代里, 若尾雅広, 隅田泰生, 蛋白質-糖鎖固定化磁性金ナノ粒子を用いた細胞や微生物の分離・濃縮, BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生物化学会大会 合同大会), 2010年12月7~10日, 神戸ポートアイランド, 兵庫, ポスター
- ◆ 田中小代里, 張旭, 馬場昌範, 若尾雅広, 隅田泰生, 糖鎖固定化磁性金ナノ粒子を用いたウシウイルス性下痢症ウイルスの高感度検出, BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生物化学会大会 合同大会), 2010年12月7~10日, 神戸ポートアイランド, 兵庫, ポスター
- ◆ 張旭, 小林健一郎, 的央央人, 兵藤則行, 若尾雅広, 隅田泰生, 糖鎖固定化金ナノ粒子を用いた鯉ヘルペスウイルスの高感度検出, BMB2010(第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生物化学会大会 合同大会), 2010年12月7~10日, 神戸ポートアイランド, 兵庫, ポスター
- ◆ H. Kariya, Y. Yoshihara, N. Sakura, M. Ueno, M. Hashimoto, Y. Suda, Enhancement of

- bactericidal activity of phagocyte by carboxymethyl-chitin, BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生物化学会大会 合同大会), 2010年12月7~10日, 神戸ポートアイランド, 兵庫, ポスター
- ◆ Y. Suda, High Sensitive Detection of Viruses Based on Their Binding Activities to Sugar-Chains, Japan-Taiwan 3 University Joint Seminar on Nanostructure and Advanced Materials, Nov. 25-26, 2010, Kagoshima, oral
 - ◆ M. Hashimoto, M. Ozono, Y. Suda, Structural study of lipopolysaccharide from acetic acid bacteria, Japan-Taiwan 3 University Joint Seminar on Nanostructure and Advanced Materials, Nov. 25-26, 2010, Kagoshima, poster
 - ◆ Keiko Ono, Hiroyuki Kariya, Kazuki Tawaratsumida, Yasuo Suda, Expression of *Staphylococcus aureus* lipoproteins in various conditions, Japan-Taiwan 3 University Joint Seminar on Nanostructure and Advanced Materials, Nov. 25-26, 2010, Kagoshima, poster
 - ◆ X. Zhang, M. Baba, N. Arima, M. Okamoto, M. Wakao, Y. Suda, Comprehensive Analyses of Sugar-Chain Binding Activity of Viruses Using Array-type Sugar Chip, Japan-Taiwan 3 University Joint Seminar on Nanostructure and Advanced Materials, Nov. 25-26, 2010, Kagoshima, poster
 - ◆ H. Shinchi, M. Wakao, Y. Suda, Preparation and Application of Sugar-Chain Immobilized Fluorescent Nanoparticles Containing CdTe/CdS Core/Shell Structure, Japan-Taiwan 3 University Joint Seminar on Nanostructure and Advanced Materials, Nov. 25-26, 2010, Kagoshima, poster
 - ◆ 小野敬子, 俵積田一樹, 隅田泰生, 橋本雅仁, 黄色ブドウ球菌由来免疫活性化物質に関する研究, 第16回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2010年11月12~13日, かしはら万葉ホール, 奈良, 口頭
 - ◆ 田崎聖聖, 上村広志, 若尾雅広, 隅田泰生, ルイス型糖鎖の合成とシュガーチップ化, 2010年日本化学会西日本大会, 2010年11月6~7日, 熊本大学(黒髪キャンパス), 熊本, 口頭
 - ◆ 隅田泰生, 張旭, 青山和枝, 若尾雅広, 森川佐依子, 廣井聡, 加瀬哲男, 斎藤秀, 糖鎖結合性に基づくインフルエンザウイルス株の類型化と予測, 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月7~9日, 徳島市あわぎんホール, 徳島, ポスター
 - ◆ 隅田泰生, 糖鎖化学に基づいた新型インフルエンザ検査法の開発, 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2010年10月30日, 摂南大学薬学部, 大阪, 特別講演
 - ◆ 隅田泰生, 張旭, 永友真未, 青山和枝, 横山理沙, 田中小代里, 劉文騎, 若尾雅広, 糖鎖固定化ナノ粒子を利用したウイルスの高感度検出, 第4回バイオ関連シンポジウム, 2010年9月25~26日, 大阪大学豊中キャンパス, 大阪, ポスター
 - ◆ 若尾雅広, 小幡瑠美, 酒見千穂, 杜若祐平, 近藤宇男, 隅田泰生, コンドロイチン硫酸部分構造の合成とタンパク質相互作用解析, 第59回高分子討論会, 2010年9月15~17日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター, 北海道, 口頭
 - ◆ 隅田泰生, 糖を使ったナノテクでウイルスを測る, JSTサイエンスカフェみやざき, 2010年9月8日, 宮日会館, 宮崎, 独立行政法人 科学技術振興機構 JSTイノベーションサテライト宮崎 主催, 招待講演
 - ◆ M. Wakao, R. Obata, C. Sakami, Y. Kakitsubata, T. Kondo, N. Mitsushita, Y. Suda,

- Synthesis and Application of Chondroitin Sulfate Partial Disaccharide Library, The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Aug. 1-6, 2010, Tokyo(Chiba), Japan, poster
 - ◆ S. Nishihara, N. Sasaki, T. Hirano, T. Ichimiya, K. Hirano, H. Toyoda, Y. Suda, Functional analysis of sulfated glycans in the differentiation of embryonic stem cells, The 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Aug. 1-6, 2010, Tokyo(Chiba), Japan, oral
 - ◆ 隅田泰生, High sensitive detection of viruses based on their binding activities to sugar-chains, 第49回日本生体医工学会大会, 2010年6月25~27日, 大阪国際交流センター, 大阪, オーガナイズドセッション
 - ◆ 馬場宏一, 奥野寿臣, 古谷基, 隅田泰生, 超高速 PCR 装置『UR-104MK IV』の評価, 第51回日本臨床ウイルス学会, 2010年6月19~20日, サポート高松シンポルタワー, 香川, 口頭
 - ◆ 春山まみ, 大石紘, 齊藤彰寛, 若尾雅広, 隅田泰生, イズロン酸含有ヘパラン硫酸部分二糖構造に関する合成研究, 日本化学会第90回春季年会, 2010年3月26~29日, 近畿大学本部キャンパス, 大阪, 口頭
 - ◆ 出口弘史, 齊藤彰寛, 馬渡彩, 若尾雅広, 隅田泰生, グルクロン酸-グルコサミン配列を持つヘパラン硫酸部分構造に関する合成研究, 日本化学会第90回春季年会, 2010年3月26~29日, 近畿大学本部キャンパス, 大阪, 口頭
 - ◆ 馬渡彩, 齊藤彰寛, 出口弘史, 若尾雅広, 隅田泰生, イズロン酸-グルコサミン配列を有するヘパラン硫酸部分二糖構造の合成研究, 日本化学会第90回春季年会, 2010年3月26~29日, 近畿大学本部キャンパス, 大阪, 口頭
 - ◆ 酒見千穂, 杜若祐平, 若尾雅広, 隅田泰生, コンドロイチン硫酸四糖部分構造の合成研究, 日本化学会第90回春季年会, 2010年3月26~29日, 近畿大学本部キャンパス, 大阪, 口頭
 - ◆ 若尾雅広, 新地浩之, 隅田泰生, CdTe/CdS コア/シェル構造を有する糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子の合成と応用, 日本化学会第90回春季年会, 2010年3月26~29日, 近畿大学本部キャンパス, 大阪, 口頭
 - ◆ 竹内誠, 若尾雅広, 佐坂真一, 荻原亮介, 隅田泰生, 干渉分光バイオセンサーを用いた糖鎖-タンパク質相互作用解析, 日本化学会第90回春季年会, 2010年3月26~29日, 近畿大学本部キャンパス, 大阪, 口頭
 - ◆ M. Hashimoto, Y. Suda, Changes in Expression of Lipoproteins in *Staphylococcus aureus*, 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月27~29日, パシフィコ横浜, 神奈川, ポスター
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- ◆ 隅田泰生, 荒野明男, 楠本正一, ソベールマイケル, 若尾雅広, 「リンカー化合物及びリガンド複合体, 並びにそれらの製造方法」、登録番号4628960 (2010/11/19)
 - ◆ 若尾雅広, 隅田泰生, 「糖鎖固定化蛍光性ナノ粒子、及びその製造方法」、特2010-53040 (2010/3/10)、出願人: 国立大学法人鹿児島大学、株式会社スディックス バイオテック
 - ◆ 若尾雅広, 隅田泰生, 児玉崇, 「ウイルスの濃縮方法および磁性体組成物」、特願2010-045753 (2010/3/2)、出願人: 国立大学法人鹿児島大学、株式会社スディックス バイオテック、株式会社ニート
 - ◆ 隅田泰生, 「糖鎖リガンド複合体、およびそのリガンド複合体を用いたタンパク質

の分析方法」、中国 ZL 2005800005186.9 (2010/6/9)

- ◆ 隅田泰生、西村知見、岸本裕子、中川裕美、
「新規糖固定化金属ナノ粒子およびこれを用いて糖-タンパク質相互作用を測定する方法、並びに糖-タンパク質相互作用体からタンパク質を回収する方法」、EPC 1909104 (2010/7/21)
- ◆ 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケルソベール、若尾雅広、「リンカー化合物およびリガンド複合体、並びにそれらの製造方法」、EPC 1731517 (2010/11/17)
- ◆ 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケルソベール、「リンカー化合物およびリガンド複合体、並びにそれらの製造方法」、アメリカ 7,838,549 (2010/11/23)
- ◆ 隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケルソベール、「リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法」、カナダ 2,500,190 (2011/1/4)

シアル酸含有オリゴ糖鎖の合成に関する研究

研究分担者 石田秀治 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究要旨:ユニークな構造を有する糖鎖として、牛脳から単離され、糖鎖に対する自己免疫疾患の患者の血清と反応することが知られているハイブリッド型ガングリオシドに着目し、その全合成を達成した。得られた合成標品を患者血清との反応に供し、陽性の結果を得た。

A. 研究目的

近年、生物情報分子として、糖鎖の機能に注目が集まっている。糖鎖は主に動物細胞の表層に存在し、細菌やウィルスに対する受容体としての機能や細胞のマーカーとしての機能を有している。分担者らは糖鎖の構造と機能を分子レベルで解明するために、糖鎖の化学合成を精力的に進めている。本研究では、牛の脳から発見され、糖鎖に対する自己抗体が発症原因となっている自己免疫疾患の患者血清と反応することが知られているユニークなガングリオシドに着目し、その全合成を達成するとともに患者血清との反応性を調べることにした。

B. 研究方法

ガングリオシドは、シアル酸を有するスフィンゴ糖脂質の総称で、基本骨格の違いにより、ガングリオ系、ラクト-ネオラクト系、グロボーソグロガ系などに分類されており、それらの化学合成において個別の方法論が確立されている。本研究で対象としたガングリオシドは、ガングリオ系とラクト系の構造的特徴を併せ持つ非常にユニークな構造を持つガングリオシドであり、新たな方法論を開発しながら全合成を進める必要があった。

標的分子は、7糖が脂質と結合した糖脂質であり、この両者は合成の最終段階で縮合することとした。また7糖は、非還元末端側3糖と、

還元側末端側4糖に分割し、その分岐構造を有する4糖は安価に入手できるラクトースから誘導することとした。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果、考察

非還元側3糖は、GM2 エピトープと呼ばれる構造であり、既知の方法に従って合成した。分岐構造を有する還元末端側4糖は、市販のラクトースから誘導されるガラクトース部分の3位、4位が遊離の構造を中間体に用い、2つの水酸基の選択性の差を利用して効率的に構築する経路での合成を試みた。しかし、残念ながら2つの水酸基の間に十分な選択性が得られなかったため、スズアセタールを用いる活性化を経ることによって、3位と4位に選択性を持たせることにした。

即ち、3、4位遊離のラクトースの3位のみ保護基を導入した後、4位にガラクトサミンを導入し、続いて3位の脱保護、そして3へのグルコサミンの導入を行い、目的とする分岐4糖に導いた。続いて非還元側3糖とこの4糖を高収率（86%）で縮合して7糖とした後、保護基の変換により7糖性糖鎖供与体とした。

続いて脂質を導入し、最後に全ての保護基を除去することで目的とするユニークな構造のハイブリッド型ガングリオシドの全合成に成功した。合成ガングリオシドは、TLC での移

動度、患者血清との反応性において、天然抽出
ガングリオシドと同一の性質を示した。

D. 結論

GM2 エピトプユニットと、ラクトテトラオ
ースユニットを合成単位に用いる合成経路に
より、目的とするラクト-ガングリオ系ガング
リオシドの全合成に成功した。生物試験に必要
な十分量が得られたため、患者血清との反応性
を調べた。本自己免疫疾患は ALS と誤診され
ている場合も多く、今後 ALS 患者の血清を用
いて試験することにより、より明確な診断が可
能となるであろう。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ◆ Tamai, H., Ando, H., Tanaka, H.,
Hosoda-Yabe, R., Yabe, T., Ishida, H. and
Kiso, M.: The total synthesis of the
neurogenic ganglioside LLG-3 isolated from
the starfish *Linckia laevigata*. *Angew. Chem.
Int. Ed. Engl.*, 50, 2330-2333, 2011.
- ◆ Abdu-Allah, H.H.M., Watanabe, K.,
Completo, G.C., Sadagopan, M., Hayashizaki,
K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H.,
Kozutsumi, Y., Paulson, J.C., Tsubata, T.,
Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.:
CD22-Antagonists with nanomolar potency:
The synergistic effect of hydrophobic groups
at C-2 and C-9 of sialic acid scaffold. *Bioorg.
Med. Chem.*, 19, 1966-1971, 2011.
- ◆ Nakashima, S., Ando, H., Imamura, A., Yuki,
N., Ishida, H. and Kiso, M.: A first total
synthesis of a hybrid-type ganglioside
associated with amyotrophic lateral sclerosis
like disorder. *Chem. Eur. J.*, 17, 588-597,
2011.
- ◆ Sadagopan, M., Sriwilajaroen, N., Vats, S.,
Ando, H., Miyagi, T, T., Suzuki, Ishida, H.

and Kiso, M.: Investigation of 2-fluoro
benzoic acid derivatives as influenza A viral
sialidase selective inhibitors. *Anti-Infective
Agents in Medicinal Chemistry*, 9, 198-204,
2010.

- ◆ Sadagopan, Magesh, Moriya, S., Suzuki, T.,
Miyagi, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Use of
structure-based virtual screening in the
investigation of novel human sialidase
inhibitors. *Med. Chem. Res.*, 19, 1273-1286,
2010.
- 2. 学会発表
- ◆ 小西美紅, 藤川紘樹, 中島慎也, 河村奈緒
子, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 新規環
状グルコシルセラミド受容体を用いたガ
ングリオシド GalNAc-GM1b の全合成研
究、2A37p05, 2011 年度大会 日本農芸化
学会、京都、平成 23 年 3 月 25 日-28 日
(Oral).
- ◆ 山本直輝, 田中秀則, 安藤弘宗, 石田秀治,
木曾真: 分子イメージングへ向けたシア
リルルイス X プロープの合成研究、
3A37a15, 2011 年度大会 日本農芸化学会、
京都、平成 23 年 3 月 25 日-28 日(Oral).
- ◆ 川瀬貴裕, 山本直輝, 中島慎也, 安藤弘宗,
石田秀治, 木曾真: メリビオサミンのシ
アリル化アナログの合成、3A37a03, 2011
年度大会 日本農芸化学会、京都、平成
23 年 3 月 25 日-28 日(Oral).
- ◆ 水野孝星, 玉井秀樹, 安藤弘宗, 石田秀治,
木曾真: 棘皮動物由来ガングリオシド
CJP-2 の合成研究、2A37p04, 2011 年度大
会 日本農芸化学会、京都、平成 23 年 3
月 25 日-28 日(Oral).
- ◆ 石田秀治: 糖鎖を用いた感染と免疫の制
御. 岐阜健康長寿・創薬推進機構 第 2
回異分野交流研究会「岐阜発、人類の健
康保持と創薬への挑戦」(平成 22 年 12 月
10 日、岐阜薬科大学大学院講義

- 室)(Lecture)
- ◆ 石田秀治: 糖鎖の機能を利用する: 薬物送達への応用. アグロサイエンスカフェへあんな研究, こんな技術へ. (平成 22 年 12 月 7 日, 愛知県産業労働センター ウィンクあいち)(Lecture)
 - ◆ Tamai, H., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A first total synthesis of neurogenic ganglioside LLG-3 from starfish *linckia laevigata*. Association of Pacific Rim Universities (APRU) Research Symposium on the Interface between Molecular Biology and Nano-biology, 京都大学 芝蘭会館(京都)、平成 22 年 11 月 24-26 日 (ポスター).
 - ◆ Iwayama, Y., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Synthetic study on novel bioactive ganglioside HPG-7. 2nd iCeMS Retreat, 淡路夢舞台(兵庫), 平成 22 年 10 月 1-2 日 (ポスター).
 - ◆ 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 の合成研究、P-18, 第 8 回糖鎖科学名古屋拠点「若手の力」フォーラム, 名古屋大学 (愛知県名古屋)、平成 22 年 9 月 6 日 (ポスター).
 - ◆ 中島慎也, 藤川紘樹, 河村奈緒子, 齋藤里紗, 小西美紅, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: ガングリオシド合成に有用なグルコシルセラミド受容体の開発研究、第 8 回糖鎖科学名古屋拠点「若手の力」フォーラム, 名古屋大学 (愛知県名古屋)、平成 22 年 9 月 6 日 (ポスター).
 - ◆ 玉井秀樹, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真: 特異な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、第 8 回糖鎖科学名古屋拠点「若手の力」フォーラム, 名古屋大学 (愛知県名古屋), 平成 22 年 9 月 6 日 (ポスター).
 - ◆ Ishida, H.: Design, synthesis and biological evaluation of novel sialosides as potent and selective inhibitors for siglecs. Freie Universität Berlin, August 27, 2010 (Lecture).
 - ◆ Kiso, M., Ishida, H. and Ando, H.: Novel gangliosides synthesis toward applications in medicinal chemistry and cell biology. 13th International Conference on Biology and Chemistry of Sialic Acids – SialoGlyco 2010, Potsdam, Germany, August 21-26, 2010 (Keynote Speaker, 基調講演)
 - ◆ Abdu-Allah, H. H. M., Ishida, H., Watanabe, K., Tsubata, T., Completo, G., Paulson, J. C., Ando, H. and Kiso, M.: Design, synthesis and biological evaluation of novel sialosides as potent and selective inhibitors for siglecs. 13th International Conference on Biology and Chemistry of Sialic Acids – SialoGlyco 2010, Potsdam, Germany, August 21-26, 2010 (Poster).
 - ◆ Fujikawa, K., Konishi, M., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A first total synthesis of ganglioside GalNAc-GD1a by employing intramolecular glycosylation as a key step. A-O-022, 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Makuhari Messe International Convention Complex, Tokyo (Chiba), Japan, August 1-6, 2010 (Oral).
 - ◆ Nakashima, S., Fujikawa, K., Komura, N., Saito, R., Konishi, M., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: Examination of the Glc-Cer-based approaches toward Systematic Ganglioside Synthesis. A-P-111, 25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010), Makuhari Messe International Convention Complex, Tokyo (Chiba), Japan, August 1-6, 2010 (Poster).
 - ◆ Iwayama, Y., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.:

Synthetic Study on Novel Bioactive
Ganglioside HPG-7 from *H. perricax*.
A-P-109, 25th International Carbohydrate
Symposium (ICS2010), Makuhari Messe
International Convention Complex, Tokyo
(Chiba), Japan, August 1-6, 2010 (Poster).

- ◆ Tamai, H., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M.: A
First Total Synthesis of Ganglioside LLG-3
from Echinoderms. A-P-116, 25th
International Carbohydrate Symposium
(ICS2010), Makuhari Messe International
Convention Complex, Tokyo (Chiba), Japan,
August 1-6, 2010 (Poster).
- ◆ 玉井秀樹, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真:
部分修飾シアル酸二量体を有するヒトゲ
由来ガングリオシド LLG-3 の全合成. 第
45 回天然物化学談話会, 三谷温泉ホテル
明山荘 (愛知県蒲郡市), 平成 22 年 7
月 6 日~8 日 (ポスター)
- ◆ 岩山祐己, 安藤弘宗, 石田秀治, 木曾真:
棘皮動物由来生体活性ガングリオシド
HLG-2 の全合成. 第 45 回天然物化学談話
会, 三谷温泉ホテル明山荘 (愛知県蒲郡
市), 平成 22 年 7 月 6 日~8 日 (ポスタ
ー)

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

HTLV-1 の糖鎖結合性の解析に関する研究

研究分担者 有馬直道 大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：難治性である成人 T 細胞白血病の原因ウイルス 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用いた。その結果、HTLV-1 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 の濃縮およびそれを利用した *in vitro* 感染系の確立、臨床的には 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。

A. 研究目的

鹿児島を中心に多発している成人 T 細胞白血病(Adult T cell leukemia : ATL)は従来の抗がん剤による多剤併用療法には難治性であり、また最近新たに登場した造血幹細胞移植療法も本疾患が高齢者(60歳以上)に多いことから、大部分の患者には福音となっていない。今日、高齢化とともに、ATL 死亡者数が依然として高い数字を維持している現状において、新たな作用機序による治療法の確立が急務である。

HTLV-1 は ATL の原因ウイルスであり、乳児期にキャリアである母親の母乳中の感染リンパ球を接種することで感染する経路が主であると考えられる。感染は細胞同士の接触で成り立ち、遊離したウイルスと細胞間では効率的に行われないと云われている。しかしながら、HTLV-1 感染における分子レベルでのメカニズムについては未だ詳細は解明されていない。本研究ではウイルスの特性を糖鎖結合性から解明し、体液中のウイルス定量、ウイルスの試験管内濃縮、それを用いたウイルス感染の分子機序の解明、および病態との関連などを明らかにして、最終的には感染予防もしくは新たな治療法開発に結び付く研究をおこなうことを目的としている。

B. 研究方法

ATL 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。

各細胞培養上清を径 0.45 μm のフィルター

年次	全国	鹿児島県
平成 12 年	984	166 (16.9)
平成 13 年	1075	153 (14.2)
平成 14 年	1017	146 (14.4)
平成 15 年	1017	147 (14.5)
平成 16 年	998	132 (13.2)
平成 17 年	1086	149 (13.7)
平成 18 年	1046	134 (12.8)
平成 19 年	1075	146 (13.6)
平成 20 年	1048	143 (13.6)
平成 21 年	1032	146 (14.1)
平均	1038	146 (14.1)

(厚生労働省人口動態から)

表 1 全国および鹿児島県における ATL 死亡者数

でろ過し、10000 g x 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-cho-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 を使い、各ウェルには、多種類の糖鎖が結合しており、SPR 法で各ウェルにおける結合の強さを測定した。これらをもとに、chondroitin sulfate B との結合が本ウイルスの特性であることを明らかにし、そこでさらに chondroitin sulfate B を金粒子(gold partile)に結合固定させたものを用いて HTLV-1 の濃縮実験を行った。

Chondroitin sulfate B 糖鎖固定化金ナノ粒子によるウイルスの濃縮実験は、上記の要領で調整したウイルス液に、chondroitin sulfate B 糖鎖固定化金ナノ粒子を混和後、3 0 分静置、その後 10,000g 10 分遠心、上清と沈殿に分ける処理前のサンプルと合わせて、3 種類のサンプルを 100℃、10 分処理し、Real Time-PCR(RT-PCR) に用いる。沈殿分画はさらに 10,000g 2 分遠心し上清を用いる。図 1 に方法を示す。

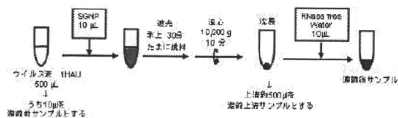
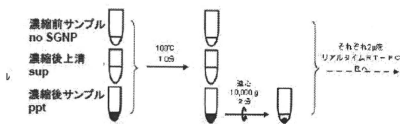


図 1 培養上清、粒子沈殿分画、非結合上清分画の調整



RT-PCR 用プライマーの標的は HTLV-1 の pX 遺伝子であり、forward primer pX2-S: (5'-CGGATACCCAGTCTACGTGT-3'), reverse primer pX2-AS. (5'-CAGTAGGGCGTGACGATGTA-3') を用いた。

(倫理面への配慮)

今年度は特に患者検体を用いていないが、次年度は患者検体を用いる予定である。このため、申請者は鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会に必要な研究計画申請書を提出し、審査を仰ぐ計画である。

C. 研究結果

SPR 法による各種糖鎖結合性検査では、ヘパリンおよび chondroitin sulfate B に対して、有意の、かつ強い結合性を示した。その他の、糖鎖の、Gca6Gc, Chondroitin sulfate A, Chondroitin sulfate C, Chondroitin sulfate D, Chondroitin sulfate E には特異的結合性は認められなかった。図 2 A-D に示す。

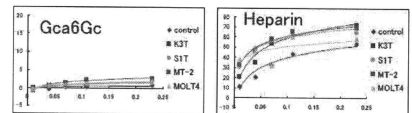


図 2-A ; Gca6Gc と Heparin に対する結合性

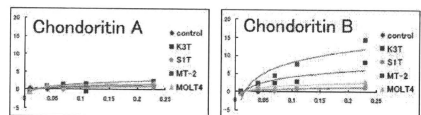


図 2-B Chondroitin Sulfate A と B に対する結合性

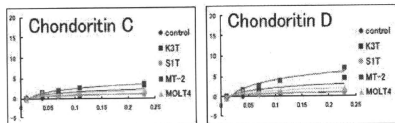


図 2-C Chondroitin sulfate C と D に対する結合性

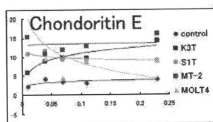


図 2-D Chondroitin sulfate E に対する結合性

HTLV-1 が chondroitin sulfate B に特異的に結合することから、chondroitine sulfate B 固定化金ナノ粒子によるウイルス粒子の濃縮を図 1 に示すような方法で検討したところ、図 4 に示すように、RT-PCR 法による解析からは約 5 サイクル分の濃縮が観察された。

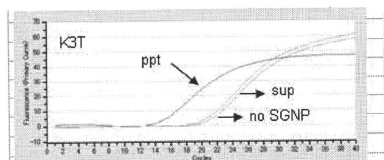


図 3 金粒子によるウイルスの濃縮

D. 考察

今回の SPR 法による糖鎖結合性の実験では、Heparin とともに、chondroitin sulfate B に特異的に結合性を示した。Heparin に対してはかなりの多くのウイルスが結合性を示すことが知られており、HTLV-1 もまたそれらの多くのウイルスのひとつということであろう。

一方、Chondroitin Sulfate B に対する結合性については、かなり特異的な現象である。すなわち、HSV-1, II, CMV, VZV, BVDV などの多く

のウイルスが、chondroitin sulfate の中では、E に結合性を示し、B に対しては全く結合性を示していない。したがって、Chondroitin sulfate B に対する強い結合性は HTLV-1 の極めて特徴的な性質といえることができる。この特性を用いれば、今後、体液中の微量ウイルスの濃縮、およびそれを前提とした測定系の開発などが可能となろう。これらは本ウイルス感染症の病態との関連性に関する研究の優れた方法となる可能性がある。

それらを可能ならしめるために、本研究では chondroitin sulfate B を金ナノ粒子に結合させたもので、HTLV-1 の濃縮ができるか否かを検討した。結果は、RT-PCR で測定する限り 5 サイクル分の濃縮がみられた。このことから、金ナノ粒子を用いることで、ウイルスを表面に集合させることで、本ウイルスの感染実験系を確立することが可能となるのではないかと考えられる。従来、HTLV-1 感染は細胞—細胞の接触により行われるといわれていた。最近、遊離ウイルスによる感染が可能との報告があるが、それは dendritic cell へ遊離ウイルスが取り込まれ、dendritic cell から T リンパ球へはやはり細胞—細胞感染となっている。一方、昨年の nature medicine への報告では、ウイルス産生細胞は産生したウイルスを細胞膜にパイオフィルムに包まれた形で保持しているとしている。この細胞膜結合型ウイルスの集団が、細胞—細胞感染を可能にしていることも考えられる。そこで、今回、本研究で明らかにされた、Chondroitin sulfate B 結合金ナノ粒子にウイルスを結合させたものは、正常 T リンパ球に対して感染性を示しうるのではないとも考えられる。もしこれが可能となれば、ウイルス感染の分子機構のさらなる解明がなされ、感染予防法の開発も可能となる。したがって、この課題は HTLV-1 の研究課題として極めて重要なものと位置づけられる。今後、早急にこの可能性を検討したいと考えている。

E. 結論

1. Chondroitin sulfate を固定化したアレイタイプのシュガーチップを用いて、HTLV-1 の結合挙動を観察した。
2. HTLV-1 は chondroitin sulfate B と特異的に結合した。
3. HTLV-1 はその他へパリンとも結合した。
4. Chondroitin sulfate B を固定化した金ナノ粒子で HTLV-1 を濃縮できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ◆ Kozako T, Akimoto M, Toji S, White Y, Suzuki S, Arima T, Suruga Y, Matsushita K, Shimeno H, Soeda S, Kubot R, Izumo S, Uozumi K, Arima N. Target epitopes of HTLV-1 recognized by class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes in patients with myelopathy and spastic paraparesis and infected patients with autoimmune disorders. *Journal of Medical Virology*, 83:501-509, 2011
 - ◆ Kozako T, Hirata S, Shimizu Y, Satoh Y, Yoshimitsu M, White Y, Lemonnier F, Soeda S, Arima N. Oligomannose-coated liposomes efficiently induce huma virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS Journal*, 278:1358-1366, 2011
- ### 2. 学会発表
- ◆ 黒木友昭、青木則子、駿河幸男、松下格司、魚住公治、有馬直道。多関節痛で発症し、PR3-ANCA 陽性であった後腹膜繊維症の1例。第54回 日本リウマチ学会総会 2010年4月23日、神戸
 - ◆ Kobune H, Suzuki S, Uozumi K, White Y, Yoshimitsu M, Kozako K, Arima N. Induction of cell death in adult T-cell leukemia cell lines by survivin-responsive conditionally replicating adenoviruses. The 15th Congress of Europe Hematology Association, June 11, 2010, Barcelona, Spain
 - ◆ 濱崎隆之, 外山政明, 有馬直道, 橋本祐一, 馬場昌範. 抗 ATL 作用を有する新規化合物の活性と作用機序解析. 第2回 HTLV-1 研究会・合同班会議, 2009年8月29日, 東京.
 - ◆ 伊東祐二, 杉村和久, 鳥飼正治, 中島敏博, 隅田泰生, 有馬直道, 馬場昌範. 抗体ファージライブラリから得られた HLA-DR 特異的な低分子抗体による HTLV-1 感染細胞への効果的な細胞死誘導. 第2回 HTLV-1 研究会・合同班会議, 2009年8月30日, 東京.
 - ◆ Kawada H, Inoue H, Nakamura D, Hayashida M, Yoshimitsu M, Hamada H, Uozumi K, Arima N. Reduced intensity allogeneic transplant for MDS overt leukemia or dependent blood transplantation. 第7回日本血液学会学術集会 2010, 9月24日、横浜
 - ◆ Inoue H, Uozumi K, Kawada H, Yahashida M, Nakamura D, Hamada H, Suzuki S, Matsushita K, Arima N. The effective treatment of 2CdA and Imatinib for mastocytosis carrying a SNP of PDGF-R α . 第7回日本血液学会学術集会 2010, 9月25日、横浜
 - ◆ Nakamura D, Suzuki S, Hayashida M, Kawada H, Inoue H, Hamada H, Matsushita K, Tanabe H, Nakabeppu Y, Uozumi K, Arima N. Experience of Radioimmunotherapy with 90Y-Ibritumomab tiuxetan in our institution. 第7回日本血液学会学術集会 2010, 9月25日、横浜
 - ◆ Hayashida M, Kawada H, Nakamura D, Inoue

H, Arima T, Higashi Y, Kanekkura T, Uozumi M, Arima N. Subcutaneous opanniculitis T-cell lymphoma (SPTCL) – When should we judge it and begin chemotherapy? 第72回日本血液学会学術集会 2010, 9月26日、横浜

- ◆ 海江田智恵、林田真衣子、藤野聡司、中村大輔、井上大栄、川田英明、濱田平一郎、鈴木伸介、魚住公治、有馬直道。ボルテゾミブが著効し救命し得た二次性形質細胞性白血病の1例。第291回日本内科学会九州地方会 2010年11月14日、鹿児島
- ◆ 藤野聡司、中村大輔、川田英明、井上大栄、濱田平一郎、魚住公治、有馬直道 化学療法後に血小板減少も改善した ITP 合併びまん性大細胞型リンパ腫の1例 第291回日本内科学会九州地方会 2010年11月14日、鹿児島

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

発明の名称：サービピンプロモーターを含む増殖制御型ウイルスベクターによる造血器腫瘍の遺伝子治療

日本脳炎ウイルス（JEV）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、昨年度は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調べたが、今年度は日本脳炎ウイルス（JEV）を用いて同様の検討を行った。その結果、JEV は BVDV と同様に、負の電荷を有する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。しかし、BVDV とは異なり、電荷を持っていない GcNAc 系の糖鎖に対する結合能はみられなかった。

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 ウィルスであり、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、何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、高頻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。昨年度は実験室内で安全に取り扱える BVDV を用いて、その糖鎖結合能について調べたが、今年度はヒトに病原性を示す JEV を用いて、同様の検討を行った。

B. 研究方法

ウイルスと細胞：実験には JEV の Nakayama 株を用いた。ウイルスは長崎大学熱帯医学研究所の森田公一教授より分与された。ウイルスの増殖にはハムスター腎細胞である BHK-21 を使用した。BHK-21 細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FCS) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地中で、37℃、5% CO₂ 存在下にて培養した。ウイルスストックは細胞に JEV を感染させ、3 日間培養後に上清を回収し、3,000 rpm にて 5 分間遠心処理して上清を回収し、そ

れに 1% のホルマリンを加えて、ウイルスを不活化したものをを用いた。ウイルス液は使用するまで-80℃に保存した。

ウイルスの濃縮と精製:JEV 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 100 ml を 0.45 μm 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 × g, 90 分, 4℃) を行い、得られた沈殿物を 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 × g, 90 分, 4℃) し、得られた沈殿物を 500 μl の 0.05% の Tween 20 を含む PBS (T-PBS) に再浮遊させ、これを「× 1 サンプル」と規定した。さらに、このサンプルを T-PBS にて 2 および 4 倍に希釈し、それぞれを「× 1/2 サンプル」および「× 1/4 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 スディック スパイオテック) 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。また、動物実験も行っていない。

	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 α6Gc	Ga GcN Ac β6Gc
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 β6Gc	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 β6Gc	NeuAc 23 Ga 4GcN Ac β6Gc	NeuAc 26 Ga 4Gc	NeuAc 26 Ga GcN Ac β6Gc	NeuAc 26 Ga 4GcN Ac β6Gc	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 6G 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 Ac α6Gc	Ga GaN Ac β6Gc	Ga GcN Ac β6Gc	Gc 4Gc	Gc 4Gc 4Gc	Gc 6Gc 4Gc	Gc 6Gc	Gc 6Gc 6Gc	Gc 3Gc 3 Gc
F	Fc 6Gc	Fc 6Gc	Xy β6Gc	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 β6Gc	NeuAc 26 Ga 4Gc	NeuAc 26 Ga GcN Ac β6Gc	NeuAc 26 Ga 4GcN Ac β6Gc	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 β6Gc
H	GcNS6S 4GcA 6G 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、非感染 BHK-21 培養上清 (原液) をフィルター濾過だけをしたもの (原液と PBS にて 1/2 に希釈したもの) をコントロールとして、同様に解析した。

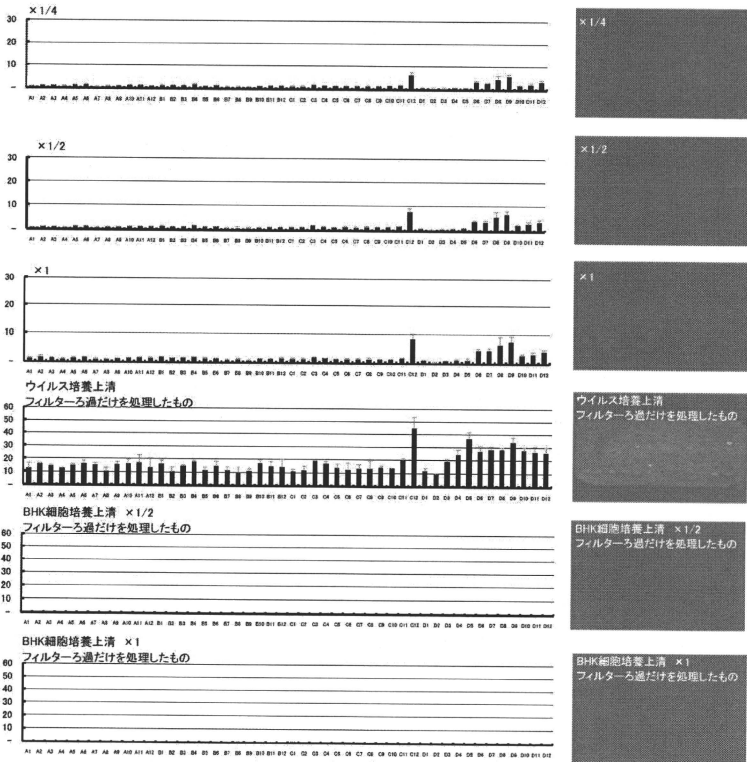


図2. 各サンプルの糖鎖結合能

D. 考察

今回 JEV を用いて得られた結果を、昨年度得られた BVDV での結果と比較すると、JEV は BVDV と同様に、全ての HS 系糖鎖に対して結合性を示した (図3)。これは、ヘパラン硫酸 (HS) 系糖鎖がマイナス電荷を有する硫酸基を多く持っており、プラスに帯荷しているウイルスのエンベロープタンパク質との、静電的相互作用の結果による結合であると考えられる。また、コンドロイチン (CS) 系糖鎖について、CS A, CS B, CS C, CS D, CS E には

すべて硫酸化基を持っているにも関わらず、JEV は CS E にだけ結合した (図3)。ここで、糖鎖の構造を比べみると、CS E の硫酸基は他の CS 系の糖鎖と違って、2 つの硫酸基が最も近く、隣同士のような位置関係にあり、糖鎖結合能が硫酸基の位置関係によって左右されていることが示唆された。

一方、HS 系や CS 系の糖鎖と異なり、負の電荷を持っていない GcNAc 系の糖鎖に対し BVDV が結合したのに対し、JEV は GcNAc 系の糖鎖に対しては結合が観られなかった。

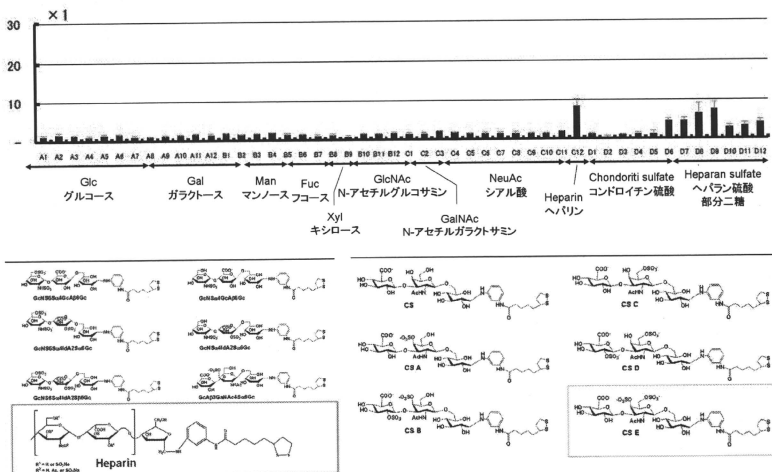


図3. JEVの糖鎖への結合

E. 結論

本研究において、JEVの糖鎖結合能は同じフラビウイルス科に属するBVDVの糖鎖結合能とは異なり、むしろヘルペスウイルスのそれと類似していることが明らかとなった。

F. 研究発表 (本研究に関係するもの)

1. 論文発表

- Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Miyachi H, Hashimoto Y, Aoyama H. Structural development studies of anti-hepatitis C virus agents with a phenanthridinone skeleton. *Bioorg. Med. Chem.* **18**: 2402-2411 (2010).
- Salim MTA, Okamoto M, Hosoda S, Aoyama H, Hashimoto Y, Baba M. Anti-bovine viral diarrhoea virus activity of novel diphenylmethane derivatives. *Antiviral Chem. Chemother.* **20**: 193-200 (2010).
- Misawa T, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Aoyama H, Hashimoto Y, Sugita K. Synthesis and anti-hepatitis C virus activity of morpholino triazine derivatives. *Heterocycles* **81**: 1419-1426 (2010).
- Aoyama H, Baba M, Hashimoto Y. Nitrogen-containing fused-heteroaromatic compounds as anti-bovine viral diarrhoea virus (BVDV) agents. *Curr. Bioact. Compd.* **6**: 118-128 (2010).
- Salim MTA, Goto Y, Hamasaki T, Okamoto M, Aoyama H, Hashimoto Y, Musiu S, Paeshuyse J, Neyts J, Froeyen M, Herdewijn P, Baba M. Highly potent and selective inhibition of bovine viral diarrhoea virus replication by γ -carboline derivatives. *Antiviral Res.* **88**: 263-268 (2010).
- Aoyama H, Sugita K, Nakamura M, Aoyama A, Salim MTA, Okamoto M, Baba M, Hashimoto Y. Fused heterocyclic amino compounds as anti-hepatitis C virus agents. *Bioorg. Med. Chem.* in press.

2. 学会発表

1. Baba M, Salim M, Okamoto M, Aoyama H, Hasjimoto Y, Takebe Y, Paeshuyse J, Neyts J. γ -Carboline derivatives as porent and selective inhibitors of bovine viral diarrhea virus (BVDV) replication. *23th International Conference on Antiviral Research*, April 26, 2010, San Francisco, USA.
2. 青山洋史, 中村政彦, 青山 惇, Mohammed TA Salim, 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範, 橋本祐一. 複素環構造を有する新規抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 剤の創製. 第 20 回抗ウイルス療法研究会, 2010 年 5 月 20 日, 熊本.
3. Mohammed TA Salim, Takayuki Hamasaki, Mika Okamoto, Hiroshi Aoyama, Yuichi Hashimoto, Jan Paeshuyse, Johan Neyts, Masanori Baba. Highly potent and selective inhibition of bovine viral diarrhea virus replication by γ -carboline derivatives. 第 20 回抗ウイルス療法研究会, 2010 年 5 月 21 日, 熊本.
4. 張 旭, 馬場昌範, 有馬直道, 岡本実佳, 若尾雅広, 隅田泰生. アレイ型シュガーチップを用いたウイルスの糖鎖結合性の探索. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 9 日, 徳島.

G. 知的財産権の出願・登録状況

本研究に関するものでは、特になし。