

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14982

研究課題名（和文）ウイルスに付加する糖鎖の異種宿主間病原体伝播における新規生物学的機能の解明

研究課題名（英文）Novel biological functions of glycans attached to the viruses in interspecies transmission

研究代表者

日尾野 隆大（Hiono, Takahiro）

北海道大学・One Healthリサーチセンター・講師

研究者番号：00775819

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルスに付加する糖鎖の生物学的な機能を探索するために、ウイルス感染動物から採取した臓器乳剤を用い、ウイルス糖タンパク質上の糖鎖構造を解析できるか試みた。2段階の免疫沈降を実施することによって、ウイルス糖タンパク質を選択的かつ高精度に抽出することに成功したが、得られたシグナルは極めて微弱であり糖鎖に関する情報を得ることはできなかった。ウイルス糖タンパク質上の糖鎖構造を制御する機構として、タンパク質の産生量と折りたたみ効率に関与することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実際の感染個体で増殖したウイルスについて、培養細胞等で再増殖することなく、直接付加している糖鎖の構造を解析する手法を確立するには至らなかったものの、宿主由来のタンパク質をできる限り排除する必要があるなど課題が特定された。ウイルス糖タンパク質上の糖鎖構造を制御する機構については、本技術を応用展開していくことで、バイオ医薬品の翻訳後修飾の制御技術へと発展していく可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：In order to explore the biological functions of glycans added to viruses, we attempted to analyze the glycan structures on viral glycoproteins using organ homogenates collected from virus-infected animals. However, the signal obtained was very weak and no information on glycans could be obtained. Also, the study revealed that the amount of protein production and folding efficiency were found to be involved in the regulation of glycan structures on viral glycoproteins.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス SARS-CoV-2 糖タンパク質 レクチンアレイ 糖鎖構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスの表面タンパク質にはしばしば糖鎖が付加している。これら糖鎖はウイルス粒子の外殻として宿主の免疫システムと相互作用し、ウイルスの免疫原性、抗原性や病原性に寄与している。ウイルスタンパク質は宿主細胞のマシナリで合成されるため、従ってウイルスに付加する糖鎖も宿主によって合成される。すなわちこれら糖鎖は宿主にとっての自己抗原である。ウイルスに付加する糖鎖は、ウイルスタンパク質のエピトープ部分を立体障害によってマスクし、抗体を始めとする宿主の免疫システムによる認識から逃れることに寄与していると考えられている。一方で糖鎖の合成機構には動物種差が存在するため、ウイルスが異種の宿主間で伝播する場合、ウイルスに付加する糖鎖は必ずしも自己抗原とならない。

我々はこれまでの研究で、A 型インフルエンザウイルスがイヌ腎臓由来細胞(MDCK 細胞)で増殖した際、ヘマグルチニン糖タンパク質(HA)上の糖鎖に Gal 抗原が付加していることを見出した(Hiono et al., *Virology*, 2019)。Gal 抗原は GGTA1 酵素によって合成される Gal 1-3Gal で構成される糖鎖抗原である。GGTA1 遺伝子は哺乳動物に特異的な遺伝子であり、従って鳥では Gal 抗原が作られない。更に特筆すべきこととして、ヒトや旧世界ザルを含む狭鼻猿類では GGTA1 遺伝子を欠損しており、Gal 抗原を作れない。またこれら動物では血中に自然抗体として抗 Gal 抗体を有しており、その量は全 IgG の 1%にも及ぶ(Galili et al., *PNAS*, 1987)。A 型インフルエンザウイルスは鳥からブタを介してヒトに伝播すると考えられている。野外でも鳥からブタ、ブタからヒトへの散発的なウイルス伝播例が報告されている。上述のように鳥、ブタ、ヒトでは Gal 抗原の合成能が異なるため、それぞれの動物で増殖したウイルスに付加する糖鎖の構造は異なり、特にブタからヒトへの伝播にあたってはウイルスに付加する糖鎖に対する自然抗体の存在下で異種宿主間伝播が起こることが想定される。

2. 研究の目的

本研究ではウイルスに付加する糖鎖と宿主の持つ抗糖鎖自然抗体がウイルス-宿主相互作用の中で果たす役割を明らかにすることを最終的な目的とした。具体的には、A 型インフルエンザウイルス (IAV) に付加する Gal 抗原の生物学的機能の解明を試みた。一方でそのためには、実際の感染個体で増殖したウイルスについて、培養細胞等で再増殖することなく、直接付加している糖鎖の構造を解析する手法を確立する必要がある。申請者の確立したレクチンマイクロアレイによる手法は、糖鎖構造解析に最も汎用される質量分析による方法と比較してはるかに高い感度を有しているが、研究開始段階では本手法が *in vivo* 由来の検体においても有効であるかは分からなかった。そこで本研究ではまず、ウイルス感染動物から採取した臓器乳剤を用い、ウイルス糖タンパク質上の糖鎖構造を解析できるか試みた。

一方、ウイルス糖タンパク質に付加する糖鎖の検出感度を検討していく過程で、ウイルス糖タンパク質上の糖鎖構造を制御する技術確立につながる現象が認められた。具体的には、蛍光タンパク質タグの付加やプロモーターの改変によって、組換えタンパク質上の糖鎖構造に変化が生じた。これは当初計画では予想していなかったことであり、当初の目標と合わせて両方向からの解析を進めることによって、ウイルス粒子に付加する糖鎖の生物学的意義についてより包括的に理解が進むと考え、そのメカニズムの解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

IAV をマウスに、または SARS-CoV-2 をハムスターに接種して、その肺を採集し、10% 乳剤を調製した。この乳剤から認識エピトープの異なる 2 種類の抗体を用いて、2 段階の免疫沈降を実施することによって、IAV の HA タンパク質または SARS-CoV-2 の S タンパク質を精製した。精製タンパク質をウェスタンブロットングまたはレクチンアレイに供して糖鎖構造の解析を試みた。インフルエンザウイルスの HA タンパク質を分泌型三量体として発現ベクターにクローニングし、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞にトランスフェクションした。得られた組換えタンパク質に付加する糖鎖をレクチンアレイで解析した。上記発現ベクターを元に、蛍光タンパク質の融合、コドンユースの改変、プロモーターの変更など種々の改変を施し、産出される組換えタンパク質に付加する糖鎖の構造を比較した。また、タンパク質の発現動態を、ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーで解析した。タンパク質を産生している細胞における小胞体ストレスの指標として、XBP1 遺伝子を定量した。

4. 研究成果

A 型インフルエンザウイルス、A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) 株を接種したマウスから肺を採材し、10%臓器乳剤を調製した。この臓器乳剤から、認識エピトープの異なる 2 種類の抗体を用いて、2 段階の免疫沈降を実施することによって、ヘマグルチニンタンパク質を選択的かつ高精度に抽出することに成功した。一方で、得られたシグナルは極めて微弱であり、抽出したヘマグルチニンタンパク質上の糖鎖に関する情報を得ることはできなかった。糖鎖検出とタンパク質検出の感度の差に起因するものと考えている。一方で SARSCoV-2 に感染したハムスターの肺乳剤

から 2 段階の免疫沈降ステップを踏んで S タンパク質の精製を試みたが、宿主由来のタンパク質を排除することが困難であり、かつ S タンパク質が得られていないということがわかった。両ウイルスともに、これまでの経験上臓器乳剤中に含まれるウイルスの量については十分であると考えられることから、臓器乳剤中に含まれる多量の宿主由来のタンパク質が免疫沈降の抗原抗体反応を阻害していると予想している。当初目的を達成するためには、この宿主由来のタンパク質をできる限り排除するような前工程を挟む必要があり、その方法論を検討していくことが肝要であると考えられる。

レクチンアレイを用いてウイルス糖タンパク質に付加する糖鎖の検出感度を検討していく過程で、HA タンパク質を sfGFP との融合タンパク質として発現させると、レクチンアレイのシグナルプロファイルが変化することに気がついた。具体的には、AOL、AAL といったフコース認識レクチンや MAL-I、SNA、SSA、TJA-I といったシアル酸認識レクチンのシグナルが、sfGFP を融合していないタンパク質と比較して低かった (図 1)。一方で、遺伝子発現に用いるプロモーターを CMV プロモーターから CAG プロモーターへ変えたところ、UDA で僅かなシグナルの変化を認めた。sfGFP の融合による糖鎖構造の変化メカニズムを探索する目的で小胞体ストレスに着目し、組換え HA または HA-sfGFP を発現する細胞の XBP1 遺伝子 mRNA のスプライシングを検討したが、その増減の違いを見出すことはできなかった。

図 1

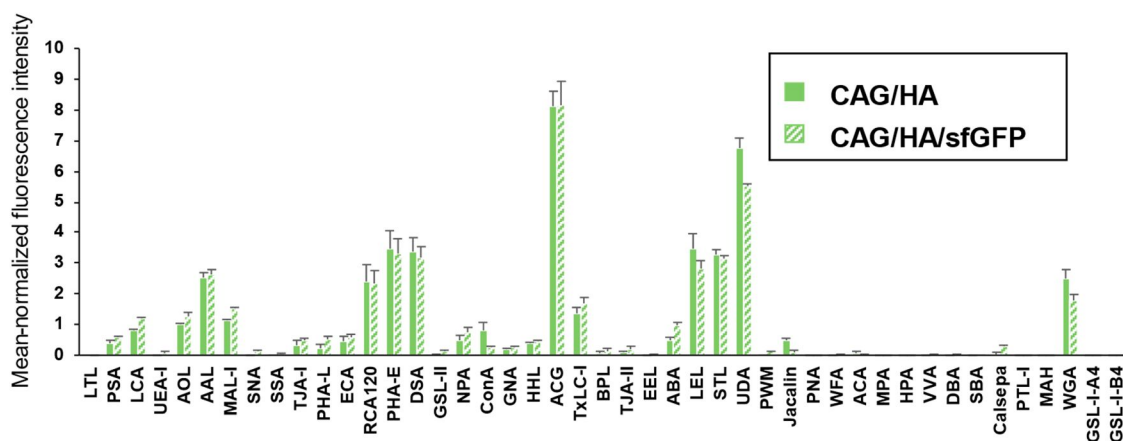
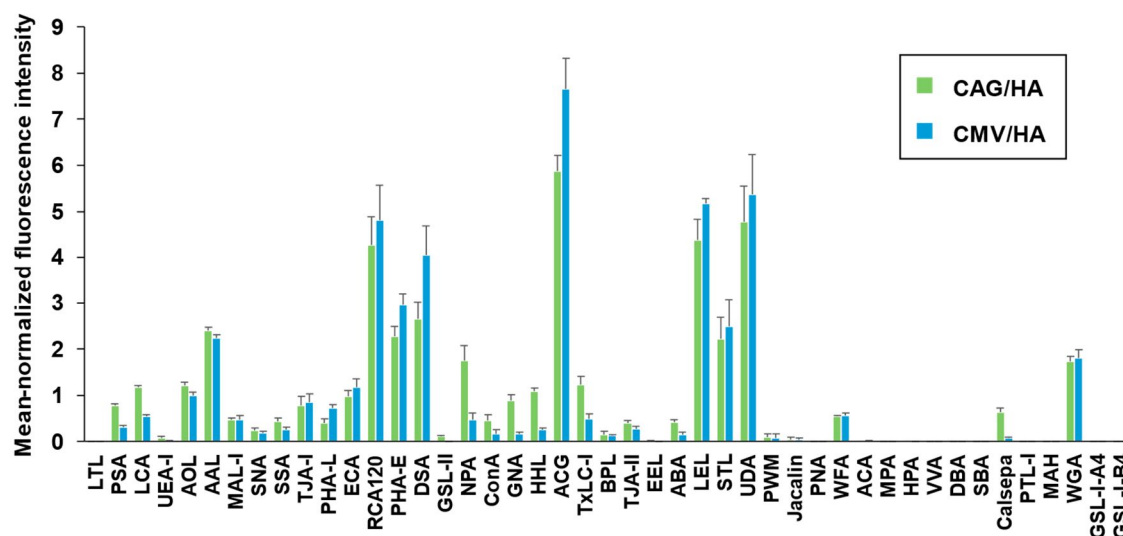
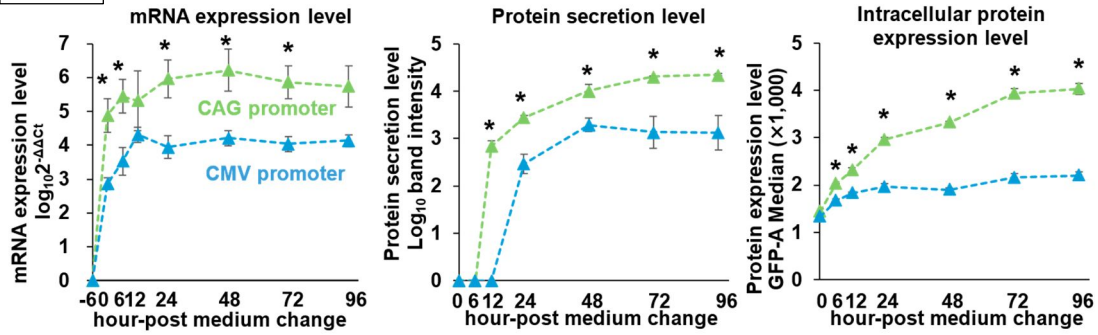


図 2





次に、細胞におけるタンパク質産生量に着目し、異なる2つのプロモーター、具体的には上述のCMVおよびCAGプロモーターの制御の下、組換えHAを発現し、付加している糖鎖の構造をレクチンアレイで調べた。その結果、CAGプロモーターの制御下で発現したHAタンパク質はCMVプロモーターの制御下で発現したそれと比較して、特にマンノース型糖鎖認識レクチンのシグナルに差が認められ、マンノース型糖鎖の含有量に差があることが示唆された(図2)。さらにHAタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を作出し、その細胞内での動態を詳細に解析した結果、CAGプロモーターの制御下でHAタンパク質を発現した場合は、CMVプロモーターの制御下と比較して、細胞外に分泌されるタンパク質の量が多いだけでなく、細胞内においても顕著にタンパク質が蓄積していることがわかった(図3)。以上のことから、細胞内でのタンパク質の合成量が過剰になると、利用できる糖鎖合成機構の許容量を凌駕することで未成熟な糖鎖を有するタンパク質が発現することがあると推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsukamoto Yuta, Hiono Takahiro, Yamada Shintaro, Matsuno Keita, Igarashi Manabu, Kato Hiroki et al.	4. 巻 379
2. 論文標題 Inhibition of cellular RNA methyltransferase abrogates influenza virus capping and replication	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 586 ~ 591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.add0875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hiono Takahiro, Kobayashi Daiki, Kobayashi Atsushi, Suzuki Tamami, Satake Yuki, Harada Rio, Matsuno Keita, Sashika Mariko, Ban Hinako, Kobayashi Maya, Takaya Fumihito, Fujita Hiroko, Isoda Norikazu, Kimura Takashi, Sakoda Yoshihiro	4. 巻 578
2. 論文標題 Virological, pathological, and glycovirological investigations of an Ezo red fox and a tanuki naturally infected with H5N1 high pathogenicity avian influenza viruses in Hokkaido, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 35 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2022.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiono Takahiro, Kobayashi Daiki	4. 巻 2556
2. 論文標題 Receptor-Binding Assay for Avian Influenza Viruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 141 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2635-1_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiono Takahiro, Kuno Atsushi	4. 巻 2556
2. 論文標題 Glycan Profiling of Viral Glycoproteins with the Lectin Microarray	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2635-1_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaniki Haruhiko, Murakami Shin, Nishikaze Takashi, Hiono Takahiro, Igarashi Manabu, Furuse Yuki, Matsugo Hiromichi, Ishida Hiroho, Katayama Misa, Sekine Wataru, Muraki Yasushi, Takahashi Masateru, Takenaka-Uema Akiko, Horimoto Taisuke	4. 巻 96
2. 論文標題 Influenza A Virus Agnostic Receptor Tropism Revealed Using a Novel Biological System with Terminal Sialic Acid Knockout Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0041622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.00416-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Daiki, Hiono Takahiro, Ichii Osamu, Nishihara Shoko, Takase-Yoden Sayaka, Yamamoto Kazuo, Kawashima Hiroto, Isoda Norikazu, Sakoda Yoshihiro	4. 巻 315
2. 論文標題 Turkeys possess diverse Sia 2-3Gal glycans that facilitate their dual susceptibility to avian influenza viruses isolated from ducks and chickens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198771 ~ 198771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2022.198771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 日尾野隆大, 小林 大樹, 小林 篤史, 鈴木 玲海, 佐竹 優樹, 松野 啓太, 佐鹿 万里子, 伴 日向子, 原田 里桜, 小林 茉弥, 青島 圭佑, 高谷 文仁, 富士田 裕子, 磯田 典和, 木村 享史, 迫田 義博
2. 発表標題 2021-2022年冬季における北海道の野鳥と哺乳動物からの高病原性鳥インフルエンザウイルスの検出
3. 学会等名 日本ウイルス学会北海道支部第55回夏季シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日尾野隆大, 小林 大樹, 小林 篤史, 鈴木 玲海, 佐竹 優樹, 松野 啓太, 佐鹿 万里子, 伴 日向子, 原田 里桜, 小林 茉弥, 青島 圭佑, 高谷 文仁, 富士田 裕子, 磯田 典和, 木村 享史, 迫田 義博
2. 発表標題 キタキツネおよびタヌキからのH5N1亜型高病原性鳥インフル エンザウイルスの分離
3. 学会等名 第35回インフルエンザ研究者交流の会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Hiono, Daiki Kobayashi, Rio Harada, Atsushi Kobayashi, Tamami Suzuki, Yuki Satake, Keita Matsuno, Mariko Sashika, Hinako Ban, Maya Kobayashi, Keisuke Aoshima, Fumihito Takaya, Hiroko Fujita, Norikazu Isoda, Takashi Kimura, Yoshihiro Sakoda
2. 発表標題 Ezo red foxes and tanukis were naturally susceptible for the infection of highly pathogenic avian influenza viruses
3. 学会等名 Sialoglyco 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日尾野隆大, 小林 大樹, 小林 篤史, 鈴木 玲海, 佐竹 優樹, 松野 啓太, 佐鹿 万里子, 伴 日向子, 原田 里桜, 小林 茉弥, 青島 圭佑, 高谷 文仁, 富士田 裕子, 磯田 典和, 木村 享史, 迫田 義博
2. 発表標題 キタキツネ及びタヌキからの高病原性鳥インフルエンザウイルスの分離
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Hiono, Daiki Kobayashi, Yuto Kikutani, Masatoshi Okamatsu, Manabu Igarashi, Norikazu Isoda, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida
2. 発表標題 Glycoscientific approaches toward understanding the host preference of avian influenza viruses
3. 学会等名 The 6th One Health Lecture Series on Solutions to Global One Health Challenges Towards Human Animals and Environmental Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	University of Bonn			
オランダ	Utrecht University			