

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06597

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス 宿主糖質相互作用の包括的解析とその感染病態における意義

研究課題名(英文) Comprehensive analyses of the interaction between host glycan and influenza viruses and its significance in virus infection

研究代表者

日尾野 隆大 (Hiono, Takahiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：00775819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスは糖と密接に関連した病原体である。本研究では、インフルエンザウイルスと糖質の直接的な相互作用に加えて、感染に対する宿主免疫応答としての糖質の発現変動を解析することで、その宿主域と病原性を規定する因子の同定を試みた。インフルエンザウイルスのHAの当結合特異性およびNAの基質特異性を解析する手法を確立した。またインフルエンザウイルス感染細胞では様々な糖鎖変化が認められることをレクチンマイクロアレイで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus is a glycan-associated pathogen. In the present study, we analyzed direct interactions of glycan and influenza viruses via HA and NA, as well as host glycome changes after virus infections. The methods for the evaluation of glycan binding the HA and substrate specificity of the NA were established in the present study. Also, the present study demonstrated various changes in host glycome after the influenza virus infection using lectin microarray technique.

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 鳥インフルエンザ レクチンマイクロアレイ 糖鎖生物学

1. 研究開始当初の背景

細胞の膜には糖タンパク質や糖脂質、プロテオグリカンなどが存在し、これらの炭水化物部分、すなわち糖鎖が表面を覆っている。この厚い糖質の層は「グリコカリックス」と呼ばれ、外的刺激から細胞を保護するとともに細胞間の相互作用の機能を担っている。グリコカリックスを形成する糖質において、シアル酸は構造の末端に位置することから、種々の病原微生物が宿主細胞に接着する際のレセプターとしてシアル酸を含む糖質(シアロ糖)を利用している(Varki et al., Lab Invest, 2007)。インフルエンザウイルスも表面タンパク質であるヘマグルチニン(HA)が、シアロ糖をレセプターとして認識するとともに、別の表面タンパク質ノイラミニダーゼ(NA)がシアロ糖の加水分解活性を有し、宿主細胞から出芽する際に糖鎖末端のシアル酸を切断することで、ウイルス粒子の放出を助けている。

インフルエンザはヒトを含む哺乳動物と鳥に分布する人獣共通感染症である。インフルエンザウイルスがヒトの間で世界的大流行(パンデミック)を起こすかどうかは、その受容体特異性に大きく依存しており、2,6 シアロ糖を受容体とするウイルスのみがこれまでヒトでパンデミックを起こしている(Matrosovich et al., J Virol, 2000)。一方、インフルエンザウイルスの自然宿主である野生のカモから分離されるウイルスは2,3 シアロ糖を認識して感染する。動物インフルエンザウイルスでも中国の家禽で蔓延するH7N9 および H9N2 亜型の鳥インフルエンザウイルスや、ブタインフルエンザウイルスは2,6 シアロ糖を認識する。これらのウイルスは偶発的にヒトに感染した例が報告されているが、効率的にヒト間を感染伝播することはない(Neumann et al, Virology, 2015)。一方で、これら2,6 シアロ糖を認識するウイルスのうち、ヒト間の効率的な伝播に与る分子メカニズムに関しては不明である。

また、宿主組織に分布する糖質もダイナミックに変化することが分かっている。例えば、炎症時にはTNFの刺激によってその局所におけるシアル酸の量の変動するが(Delmotte et al., J Biol Chem, 2002)、HA および NA というシアル酸関連分子を有するインフルエンザウイルスの感染に伴い、実際にシアロ糖の発現がどのように変動するのか、またそれが感染において正・負どちらに働くかということについてはよくわかっていない。

インフルエンザウイルスと糖質の相互作用は、単にレセプター・リガンド関係ではなく、その病態発現に重要な役割を果たしている可能性がある。すなわち、HA と NA を介したインフルエンザウイルスと糖質の直接的相互作用に加えて、感染に対する宿主免疫応答

としての糖質の発現変動を解析することで、インフルエンザウイルスの宿主域と病原性を規定する因子に関する全く新たな要因を同定できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスと宿主糖質の関係を ウイルスと糖の直接的な相互作用の解析、および ウイルス感染に伴う宿主応答としての糖質の発現変動の解析を通して、糖質がインフルエンザの病態やウイルスの宿主域とどのように関わっているかを明らかにする。

当初計画ではヒトで流行するウイルスとその他のウイルスを用いてこれらを解析し、その差異を明らかにする予定であった。しかし平成29年4月に研究代表者の異動によって所属機関が変更となったため、使用するウイルス株や実験方法を変更する必要があった。特に については、主としてインフルエンザウイルスの実験室株が感染培養細胞の糖鎖に与える影響を評価した。

3. 研究の方法

ウイルスと糖の直接的な相互作用の解析
HA の糖結合特異性を解析するために分泌型の三量体組換え体を作製した。具体的には HA 遺伝子からシグナルペプチドと膜貫通領域、細胞内ドメインをコードする領域を削り、N 末端側に CD5 のシグナルペプチド配列、C 末端側に三量体形成ロイシンジッパーモチーフおよびタグ配列がコードされるよう配列を付加して、プラスミドベクターに挿入した。これを HEK293S GnT (-/-)細胞に導入して組換え HA を回収、精製した。これを材料に Biacore X100 装置を用いて表面プラズモン共鳴法で糖結合特異性を解析するための条件を検討した。

NA の糖基質特異性を解析するために、市販の糖鎖合成基質と Thermo Fisher Scientific 社の Amplex Red 試薬を用いた方法を確立した。具体的にはガラクトースオキシダーゼとペルオキシダーゼの存在下で NA がシアル酸を遊離すると、露出した非還元末端のガラクトースを基質としてガラクトースオキシダーゼが過酸化水素を産生、これにより Amplex Red がレゾルフィンへと変換され呈色する。これにより生じる蛍光をリアルタイム PCR 装置により温度制御下でモニタリングした。

ウイルス感染に伴う宿主応答としての糖質の発現変動の解析

インフルエンザウイルスに感染したマウスにおける糖鎖の変化を解析するために、Balb/c マウスに A/Aichi/2/1968 (H3N2) 株を鼻腔内接種し、感染3および7日後に肺を採

取した。採取した肺から RNA を抽出し、定量的 PCR によって ST3Gal-1、-2、-3、-4、-5、-6、および ST6Gal-1 の mRNA を定量した。

A 型インフルエンザウイルスに感染した細胞における糖鎖の変化を網羅的に検索するために犬腎臓由来細胞 (MDCK 細胞) に A/Aichi/2/1968 (H3N2) 株を接種し、感染細胞ライセートを調製した。これをレクチンマイクロアレイ解析に供し、各レクチンとの反応性を感染細胞と Mock 接種細胞で比較した。

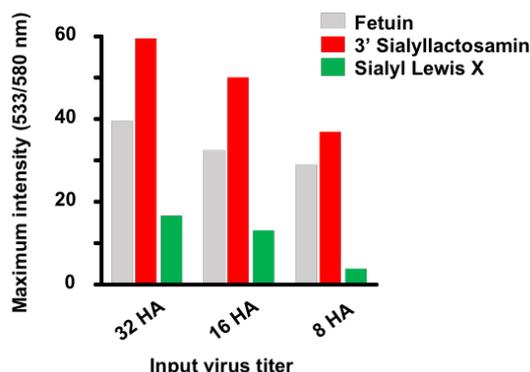
4. 研究成果

ウイルスと糖の直接的な相互作用の解析

HA の糖結合特異性を解析するために、H1 から 16 までのすべての亜型について、三量体分泌タンパク質として HA を発現するためのプラスミドベクターに導入した。これらのうち、哺乳動物細胞での発現が良かった A/duck/Mongolia/54/2001 (H5M2) 株の HA について、Biacore X100 (GE 社) を用いた表面プラズモン共鳴法で糖結合特異性を解析するための条件を検討した。その結果、単量体糖鎖をセンサーに固相化し、アナライトとして三量体の HA を用いても解析可能な安定的なシグナルが得ることはできなかった。ポリアクリルアミドで多量体化した糖鎖をセンサーに固相化し、さらにアナライトの三量体の HA は付加したタグに対する抗体、さらに抗 IgG 抗体を用いてクラスターを形成させることにより高いシグナルを得ることに成功した。一方で、この系では糖と HA の結合が多対多の関係になるため既存の反応モデルにうまく回帰することができず、適切な反応速度パラメーターを得ることができなかった。より単純な反応系での評価が可能な高感度の分析機を用いるか、複雑な系をうまく回帰できる新規モデルを構築することが必要と考えられる。

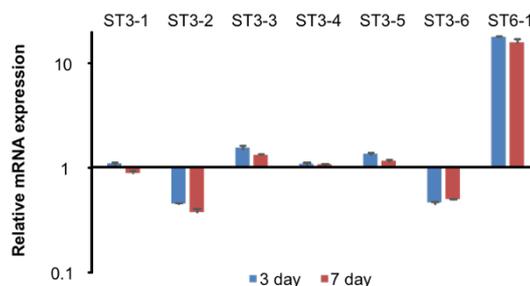
NA の基質特異性を解析するために Onsirisakul ら (World J Virol, 2014) の報告に従い、市販の合成糖鎖基質と Amplex Red 試薬 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた実験系の確立を試みた。Helder ら (J Virol, 2015) の報告では、インフルエンザウイルスの NA はレイス型フコースを有するシアロ糖を基質とすにくいとされている。そこで A/duck/Mongolia/54/2001 (H5M2) 株を用いて、3' シアリルラクトサミンとシアリルルイス X に対する NA 活性を比較した。NA 活性による糖分解産物の精製を Amplex Red の蛍光を指標として経時的にモニタリングしたところ、シアリルルイス X を基質とした場合の蛍光強度は 3' シアリルラクトサミンを基質とした場合と比較して低いことが確認できた。反応時間の進行に伴ってバックグラウンドシグナル上昇してしまうという問題が認め

られたが、特別な修飾を施していない市販の糖鎖プローブを基質とし、比較的少量のウイルスを用いて NA の基質特異性を評価する系が樹立できたと考えている。



ウイルス感染に伴う宿主応答としての糖質の発現変動の解析

A/Aichi/2/1968 (H3N2) 株を接種したマウスから肺を採取し、RNA を抽出、シアル酸転移酵素遺伝子の発現を定量的 PCR で調べた。その結果、ST6Gal1 において発現の亢進が認められた。再現性の確認やウイルス株間の比較を予定していたが、期間中に研究代表者の異動があり、異動後の機関で動物感染実験の系を再構築することができなかった。そのため、現段階でこれ以上の検討ができていない。



そこで、A 型インフルエンザウイルスを接種した培養細胞における糖鎖の変化を網羅的に検索することとした。ウイルス感染細胞のライセートをレクチンマイクロアレイ解析に供したところ、多数のレクチンで反応性の変化が認められた。当初から予想されていたとおり、感染細胞では非感染細胞と比較してシアル酸認識レクチンの反応性が低く、反対にアシアロ糖認識レクチンの反応性が高かった。これは増殖に伴ってウイルス NA がシアル酸を糖鎖から遊離したためであると考えられる。今後、その他の変化について更に解析を進めるとともに、ウイルス株間の比較が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Suzuki M, Okamatsu M, Hiono T, Matsuno K, Sakoda Y. 2017. Potency of an inactivated influenza vaccine prepared from A/duck/Hokkaido/162/2013 (H2N1) against a challenge with A/swine/Missouri/2124514/2006 (H2N3) in mice. J. Vet. Med. Sci. 79:1815-1821.

Nakatsukasa A, Kuruma K, Okamatsu M, Hiono T, Suzuki M, Matsuno K, Kida H, Oyamada T, Sakoda Y. 2017. Potency of whole virus particle and split virion vaccines using dissolving microneedle against challenges of H1N1 and H5N1 influenza viruses in mice. Vaccine 35:2855-2861.

Ohkawara A, Okamatsu M, Ozawa M, Chu D-HH, Nguyen LT, Hiono T, Matsuno K, Kida H, Sakoda Y. 2017. Antigenic diversity of H5 highly pathogenic avian influenza viruses of clade 2.3.4.4 isolated in Asia. Microbiol. Immunol. 61:149-158.

Okamatsu M, Ozawa M, Soda K, Takakuwa H, Haga A, Hiono T, Matsuo A, Uchida Y, Iwata R, Matsuno K, Kuwahara M, Yabuta T, Usui T, Ito H, Onuma M, Sakoda Y, Saito T, Otsuki K, Ito T, Kida H. 2017. Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A(H5N6), Japan, November 2016. Emerging Infect. Dis. 23:691-695.

〔学会発表〕(計 1 件)

日尾野隆大, 鳥インフルエンザウイルスの糖鎖結合特異性, 第 31 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 静岡県静岡市, 2017 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日尾野 隆大 (HIONO, Takahiro)
産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・
研究員
研究者番号: 00775819