

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08398

研究課題名(和文)糖鎖解析技術を用いたロタウイルス宿主特異性と種間伝播の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Analysis of the Molecular basis of rotavirus host specificity and interspecies transmission

研究代表者

山田 佳太 (Yamada, Keita)

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：80584185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ロタウイルス感染機構や種間伝播の分子機構を明らかにするため、いくつかのロタウイルスが結合する糖鎖構造を調べた。その結果、一つのウイルスが複数の糖鎖と結合していることが明らかになった。またロタウイルス感染実験で使用される複数のモデル細胞中の糖鎖構造解析を行い、ウイルス結合糖鎖の発現状況が、各細胞で大きく異なることを明らかにした。これらの解析結果から、ロタウイルスが異なる宿主種の細胞に感染する際に、異なる糖鎖を使用するという汎用的な能力を持っているという考えに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ロタウイルス感染メカニズムを解明すると共に、ロタウイルス種間伝播の分子機構の理解に繋がるものである。種間伝播の機構が明らかになれば、ロタウイルス感染症の同行を予測し、感染症の予防策の開発が可能になると期待される。また、本研究では課題を進める上でいくつかの生体分子の分析法を開発している。これらの技術は、ロタウイルス感染症だけでなく、多くの疾患の原因解明やマーカー開発に適用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：We screened the binding glycans of several rotaviruses. We found that one virus bound to multiple types of glycans. We also analyzed the glycans in several model cells used in rotavirus infection experiments and found that the expression amount of rotavirus-binding glycans differed in each cell. The observations we made in this study lead to a hypothesis that rotaviruses possess the versatile capacity to employ different glycan when they infect cells of different host species.

研究分野：分析化学

キーワード：ロタウイルス 硫酸化糖鎖 フコシル化糖鎖 グライコミクス 種間伝播

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルス感染症は、乳幼児に重篤な下痢や発熱をひき起こし、発展途上国を中心に年間 45 万人の死者をだしている。我が国でも、本感染症による入院患者数は年間 78,000 人と報告されており、その医療費負担は 500 億円以上と見積もられる。ロタウイルスは非常に多様で、変異しやすい性質を有している。多様なロタウイルスの主な識別は、ウイルス上の糖鎖認識分子の遺伝子型(P 遺伝子型)と、ウイルス上の糖タンパク質の遺伝型(G 遺伝型)の 2 つの遺伝子型を指標として行われる。また、ロタウイルスは、ヒト以外にもあらゆる哺乳類や鳥類に感染し、変異を繰り返しながら、異種宿主間を伝播する。したがって元々はヒトへ感染しないウイルスであっても、変異蓄積によって、ヒトに対する感染性を獲得する危険性を有している。(Arch Virol. 2009;154(5):733-46)。しかしながら、ロタウイルスの宿主特異性を決定する要因については、明らかにされてない部分が多く、他の動物からヒトへの種間伝播の監視は極めて難しい状況である。

2. 研究の目的

ロタウイルスは、P 遺伝子由来の糖鎖認識分子を介して、宿主細胞上の糖鎖に結合し、細胞へ侵入することが示唆されていたが、ウイルスが結合する糖鎖構造の詳細な解析は行われていなかった。申請者は、ウイルス結合糖鎖のスクリーニングを可能にする糖鎖アレイ技術を開発しこの技術を用いていくつかのロタウイルスが結合する糖鎖構造を明らかにした。その結果、ウイルスの種類によって認識糖鎖構造が異なることを明らかにした。

この検討結果から、前述したロタウイルスの宿主特異性及び異種間伝播にウイルス認識糖鎖が関与するという仮説を立てた。実際にインフルエンザウイルスではウイルス結合糖鎖の違いが宿主特異性に関与している報告があるため、ロタウイルスにも同様のことが言える可能性がある。本研究ではこの仮説を検証するため、ロタウイルス結合糖鎖の詳細な解析及び、ロタウイルスの宿主細胞上のウイルス結合分子の発現状況の解析を試みた。

3. 研究の方法

(1)ロタウイルス結合糖鎖の解析

連携研究者から分与された生ロタウイルスをトリプシンで消化し、活性化した後糖鎖アレイに添加し、抗ロタウイルス抗体及び Cy3 標識化 2 次抗体を用いて、アレイ上のウイルスを検出した。糖鎖アレイは、申請者が過去に用いた手法(Anal Chem. 85(6):3325-33, 2013)を基に自作した。具体的にはエポキシコーティングスライドガラスに、糖鎖ポリマー等の糖鎖誘導体を固定化し、ウシ血清アルブミンを用いてブロッキングした。

(2)宿主細胞上の糖鎖解析

細胞及び組織試料から総タンパク質画分、及び糖脂質画分を分画後、各画分から糖鎖を遊離させた。遊離された糖鎖を 2-アミノ安息香酸で標識化後、HPLC による分離分析を実施した。糖鎖の分離は、セロトニンアフィニティークロマトグラフィー法と TSKgel Amide-80 column を用いた親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)による 2 次元クロマトグラフィー法により分離した。分離した糖鎖を MALDI-QIT-TOF MS を用いた質量分析装置で解析し構造を推定した。

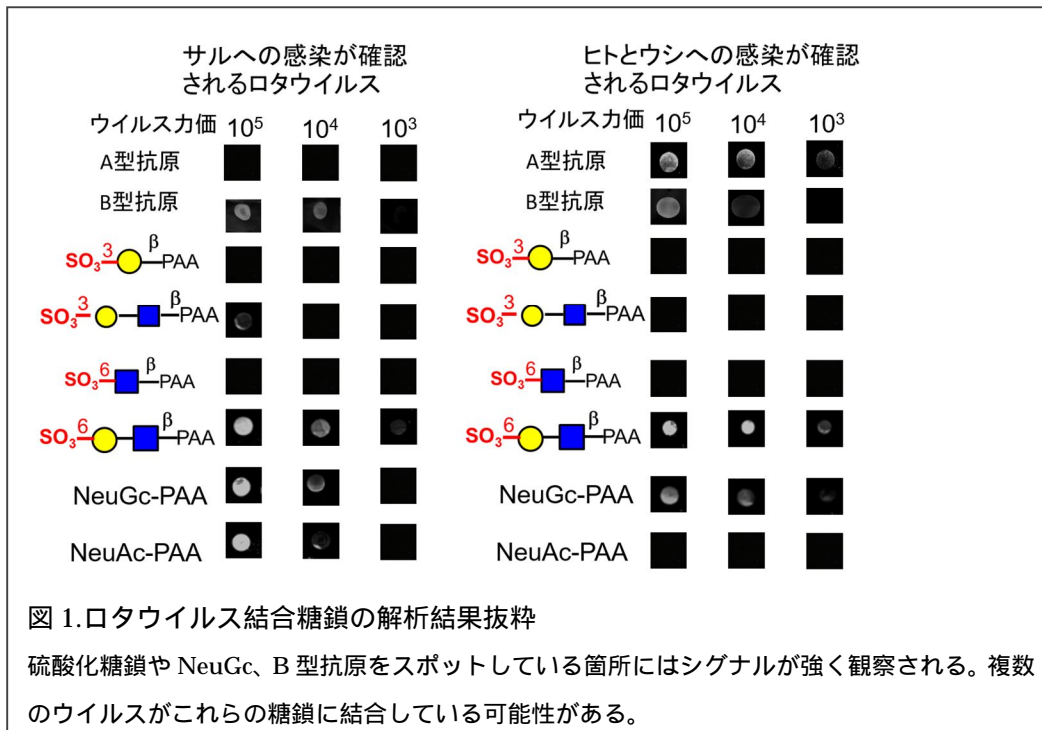
(3)糖鎖キャリアタンパク質の解析

生体試料から回収した総タンパク質画分を各種プロテアーゼで断片化後、分子量分画法により、糖ペプチドを濃縮した。糖ペプチドを濃縮後、アフィニティークロマトグラフィーや、HILIC 等で目的糖鎖を有するペプチドの単離を行った。単離した糖ペプチドを LC-ESI-MS 法で解析し、糖鎖構造を解析すると共に、ペプチドのフラグメントパターンからデータベースサーチをおこないタンパク質の同定を試みた。

4. 研究成果

(1)ロタウイルス結合糖鎖の解析

ロタウイルス結合糖鎖と宿主特異性の関係性を明らかにするため、ヒト・ウシに感染するウイルス株、ヒト・マウスへ感染するウイルス株、及びサルへ感染するウイルス株の結合糖鎖を糖鎖アレイ法で解析した。糖鎖アレイのバリエーションは、硫酸化糖鎖やシアロ糖鎖、血液型抗原を含む 40 種類とした。いずれのウイルス株もシアロ糖鎖に対する親和性が確認された。特に、ヒトへ感染性を示すウイルス株では、NeuAc α 2-3Gal 及び NeuGc に結合した。一方、サルに感染性を示すウイルスでは、シアル酸の結合様式影響を受けず、いずれのシアロ糖鎖にも強く結合した。また、ヒト・ウシに感染性を示すウイルス株では A 型抗原に対して強い親和性が確認されたが、その他のウイルス株では A 型抗原への強い結合は観察されなかった。また、いずれのウイルス株も、B 型抗原や硫酸化糖鎖に結合することが明らかになった(図 1)。



(2)ロタウイルス高感受性細胞表面の糖鎖解析

各ウイルス株が複数の糖鎖と結合することが明らかになった。さらに、結合糖鎖と宿主特異性の関係を明らかにするため、今回使用したいずれのロタウイルス株にも高い感受性を有するアカゲザル胎児腎細胞(MA104 細胞)の糖鎖を解析した。以前にも本細胞の一部の糖鎖を解析したが、本研究ではさらに詳細な解析を試みた。MA104 細胞上には、上記ウイルス株が結合した A 抗原や B 抗原等は殆ど観察されなかった。一方シアロ糖鎖の発現は MA104 細胞では確認されているため、上記のウイルス株と MA104 細胞の感染にはシアロ糖鎖の相互作用が重要になると考えられる。また、糖鎖アレイ解析で、今回用いた全てのロタウイルスが強く結合した硫酸化糖鎖も観察された。

(3)硫酸化・リン酸化糖鎖解析技術の開発

MA104 細胞の解析を進める中で、硫酸化糖鎖の測定は困難を極めた。硫酸化糖鎖は他の糖鎖に比べて発現量が低いため見過ごされる可能性が高い。また、性質の類似したリン酸化糖鎖との識別が容易ではない事も構造解析を困難にさせる。幾つかの宿主細胞及び組織中の硫酸化糖鎖の発現状況を解析することが想定していたが、上記の理由により、既存の方法では硫酸化糖鎖の正確な追跡は困難であると判断された。そこで、硫酸化糖鎖を正確に定量するため、分離分析手法の開発に取り組み、セロトニン固定化カラムと、アミノ基固定化ポリマーカラム(NH2 column)を組み合わせた新規分離分析手法を確立した。この方法により、生体試料から硫酸化糖鎖を効率的に濃縮し、また硫酸化糖鎖とリン酸化糖鎖の分離識別を達成した。この分析手法は本研究課題だけでなく、多くの研究課題で効果を発揮する手法であるため、学術論文としてまとめ報告した(Yamada K., et al. *Analytical Chemistry* 90, 8387 ~ 8395 (2018), Yamada K., et al. *Journal of proteome research*, in press)。

(4)ヒト結腸腺癌細胞上の糖鎖解析

当初解析を予定していた回腸組織試料の入手が困難であったため、ロタウイルス感染実験のモデル細胞として使用されている Caco-2 細胞や HT-29 細胞を含むいくつかの結腸腺がん細胞の糖鎖を解析した。これらの結腸腺癌細胞においてもロタウイルス結合糖鎖である硫酸化糖鎖やフコシル化糖鎖が観察された。しかし各糖鎖の発現量は細胞毎に大きく異なっていた。これらの結果から、同じヒトの結腸腺がん細胞であってもウイルスの感染時に利用される糖鎖は異なる可能性が考えられた。この現象が、ロタウイルスの組織への感染にも共通することなのか関心が持たれるため引き続き、ウイルス感染組織の糖鎖解析を継続したい。

(5)ウイルス結合糖鎖キャリア分子の特定

宿主細胞におけるロタウイルス結合糖鎖のキャリア分子の特定と、その発現量の測定に着手した。しかしながら、フコシル化糖鎖や硫酸化糖鎖のキャリア分子を網羅的に特定し、同分析系でその発現量を比較できる手法がないため、分析手法の確立を行った。糖タンパク質を断片化や、糖ペプチドの濃縮手法を検討すると共に、糖ペプチドのさらなる分画や定量を達成するため、ペ

プチドの誘導体化法について検討した。その結果、分析に適した標識化法及び、糖ペプチドの分離分析法を確立した。本法により、標的糖鎖を有するペプチドを単離し、タンパク質の同定及び定量が可能になった。分析系の確立で研究期間が終了となったため、今後本手法を用いて、複数のロタウイルス感染モデル細胞や感染部位となる回腸組織中のウイルス結合糖鎖のキャリア分子の特定及び発現状況を解析し、ウイルス感染性を決定する重要な分子を特定したい。

結論

今回の検討結果から、当初立てていた仮説「宿主特異性及び異種間伝播にウイルス認識糖鎖が関与する」とは別に「ロタウイルスは、異なる宿主種の細胞に感染する際に、異なる糖鎖を使用している」又は「宿主細胞が発現している糖鎖の中から都合の良いものを選択し、感染に利用する」という新たな仮説を支持するような結果が多く見受けられた。これらの結果は、ロタウイルスエントリーに関与する分子が複数存在するか或いは、1種の分子にロタウイルスの標的となる糖鎖が集積している可能性が考えられる。何れにしても、ロタウイルスエントリーが複数の糖鎖が関与している可能性が考えられる。また、ウイルス結合糖鎖を有しているキャリアタンパク質に関心が持たれるため、その特定を試みたが、技術的な問題から、研究期間内に達成することができなかった。一方、ウイルス標的糖鎖となりうる硫酸化糖鎖やフコシル化糖鎖のキャリアタンパク質を網羅的に同定し、発現量を比較できる技術開発に取り組み、キャリア分子特定の障害となっている技術課題は解決することができた。ウイルスが結合する糖タンパク質の種類が明らかになれば、糖鎖認識特異性とウイルス感染の関係をより明確にすることができると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Keita Yamada、Haruna Kayahara、Mitsuhiro Kinoshita、Shigeo Suzuki	4. 巻 90
2. 論文標題 Simultaneous Analysis of Sulfated and Phosphorylated Glycans by Serotonin-Immobilized Column Enrichment and Hydrophilic Interaction Chromatography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 8387 ~ 8395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.8b00714	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 Keita Yamada、Junko Nio-Kobayashi、Mizuho Inagaki	4. 巻 2132
2. 論文標題 Screening for Components/Compounds with Anti-Rotavirus Activity: Detection of Interaction Between Viral Spike Proteins and Glycans.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 585 ~ 595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0430-4_50.	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 Keita Yamada、Koji Suzuki、Yoshihiko Hirohata、Mitsuhiro Kinoshita	4. 巻 -
2. 論文標題 Analysis of Minor Acidic N-Glycans in Human Serum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of proteome research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jproteome.0c00079	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤 江美、大野 翔平、小林 純子、山田 佳太、中川 智行、矢部 富雄、鈴木 徹、中込 とよ子、中込 治、稲垣 瑞穂
2. 発表標題 ロタウイルス増殖抑制活性を示す牛乳ラクトフォリンの分子基盤
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田佳太, 鈴木光司, 廣畑好彦
2. 発表標題 ヒト血清中マイナー酸性糖鎖の網羅的解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019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
連携研究者	稲垣 瑞穂 (INAGAKI Mizuho) (50626356)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	