

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15176

研究課題名（和文）ウイルス感染における糖鎖リモデリングの意義解明に向けた技術基盤の構築

研究課題名（英文）Development of a technological basis for elucidating the significance of glycosylation alterations in viral infection

研究代表者

日尾野 隆大（Hiono, Takahiro）

北海道大学・獣医学研究院・講師

研究者番号：00775819

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ウイルス感染に伴う宿主細胞における糖鎖の変化の生物学的意義を探索するための技術基盤構築を目指した。具体的にはA型インフルエンザウイルスをモデルに、ウイルス感染細胞および感染細胞から放出されるウイルス粒子に付加する糖鎖の構造をレクチンマイクロアレイを用いて高感度かつ簡便に解析する手法を開発した。さらに開発した手法を応用し、SARS-CoV-2のSタンパク質に付加する糖鎖の構造を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した種々の糖鎖解析手法は、既存の技術と比較して少ないウイルス培養量や精製度の低い検体から糖鎖情報を取得することを可能にした。今後、本技術が広く普及し、さまざまなウイルスにおける糖鎖解析に利用されることによって、ウイルスの生活環や病原性発揮における糖鎖の意義解明が進むことが期待される。また、糖鎖の解析はウイルスベクターやワクチンの開発に生かされることも期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish a platform for investigating the biological significance of glycosylation alterations in host cells associated with the viral infection. Specifically, using the influenza A virus as a model, we developed a highly sensitive and simple method to analyze the glycans structures attached to virus-infected cells and virus particles released from infected cells using lectin microarrays. Furthermore, we applied the method to analyze the structure of glycans on the S protein of SARS-CoV-2.

研究分野：ウイルス学

キーワード：A型インフルエンザウイルス 糖鎖 SARS-CoV-2 レクチンアレイ グライコプロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

細胞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。細胞をおおう厚い糖鎖の層は「グリコカリクス」と呼ばれ、細胞を外部的刺激から保護する他にも、細胞間の相互作用においても重要な役割を果たしている。また細胞に分布する糖鎖は腫瘍化や炎症などの刺激で変化し、例えば、炎症時には TNF α の刺激によってその局所におけるシアル酸の量に変動する (Delmotte *et al.*, *J Biol Chem*, 2002)。グリコカリクスは細胞の最も外側にあることから、糖鎖はインフルエンザウイルス・ノロウイルスなど病原性ウイルスが宿主細胞に接着する際のレセプターとして利用されている (Shanker *et al.*, *Curr Opin Struct Biol*, 2017)。また、ウイルス自身もその表面に糖タンパク質を有している。ウイルス表面糖タンパク質における N 型糖鎖の付加は、ウイルスの抗原性や宿主向性を変化させる要因として報告されている (Imai *et al.*, *Nature*, 2012; Zhang *et al.*, *Vet Microbiol*, 2015)。宿主細胞の抗原認識細胞である樹状細胞は DC-SIGN を介してウイルスの持つ糖鎖を認識し、その病原体防御機構に利用しているが、反対にエボラウイルスなどは DC-SIGN をウイルスレセプターとして利用している (Raman *et al.*, *Curr Opin Struct Biol*, 2016)。このように、ウイルス感染において糖鎖はウイルス-宿主の関係を規定する極めて重要な因子である。一方、宿主の糖鎖合成機構は一定ではなくダイナミックに変化するものであるにもかかわらず、ウイルス感染が惹起する宿主糖鎖の変化、すなわち「ウイルス感染による糖鎖のリモデリング」についてはこれまでほとんど研究されてこなかった。

2. 研究の目的

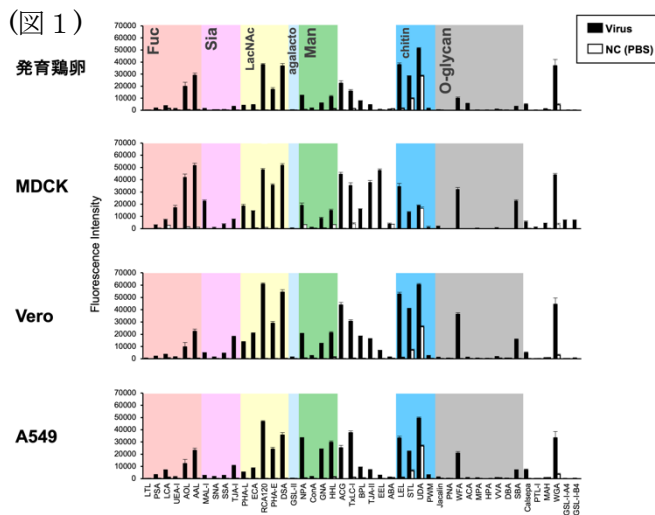
本研究ではモデルとして A 型インフルエンザウイルスを用い、その感染による糖鎖リモデリングの意義解明を達成するための技術的な基盤構築を目的とした。具体的には、A 型インフルエンザウイルス感染による糖鎖リモデリングとその背景となる分子基盤を明らかにするために、ウイルス粒子およびウイルス感染細胞の糖鎖を高感度かつ簡便に解析する手法の確立を目指した。本研究では、研究期間の後半で糖鎖リモデリングがウイルスの増殖に与える影響と、宿主免疫担当細胞とウイルスの相互作用に与える影響を評価する予定だったが、COVID-19 の発生及び SARS-CoV-2 の出現に伴って、緊急的に実験計画を変更し、SARS-CoV-2 の S タンパク質に付加する糖鎖の解析に取り組んだ。

3. 研究の方法

A 型インフルエンザウイルスを種々の培養細胞または発育鶏卵に接種し、ウイルス培養液を得た。ウイルス培養液から免疫沈降法でウイルスタンパク質を濃縮し、表面糖タンパク質ヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) を標的として、レクチンマイクロアレイ (LecChip ver1.0 および GlycoStation Reader 1200, グライコテクニカ社) による糖鎖プロファイリングに供した。また、SARS-CoV-2 S タンパク質の糖鎖解析にあたっては、ウイルス培養液のベータプロピオラクトン不活化産物をレクチンマイクロアレイによる糖鎖解析に、ショ糖クッション法とアセトン沈殿による精製物を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) による糖鎖解析に供した。

4. 研究成果

本研究では、まず最初に A 型インフルエンザウイルスの粒子に付加した糖鎖および感染細胞における糖鎖の変化を解析する手法の確立を試みた。ウイルス粒子に付加する糖鎖の解析においては、磁気ビーズを用いた免疫沈降によってウイルス粒子を捕捉し、ウイルスタンパク質を濃縮した。これを、レクチンアレイスライド (図 1) ガラスに供し、レクチンと結合した糖タンパク質のうち、HA のみを抗 HA ものクローン抗体で検出することによって、最終的に 10⁶ TCID₅₀ のウイルスを含む溶液から HA 特異的な糖鎖構造情報を取得することに成功した。本手法を用いて、3 種類の培養細胞 (イヌ腎臓由来 (MDCK) 細胞、サル腎臓由来 (Vero) 細胞、およびヒト肺がん上皮由来 (A549) 細胞) および発育鶏卵で調製したウイルス粒子上の糖鎖をレクチンマイクロアレイで解析した結果、それぞれの粒子上の糖鎖が微妙に異なっていることを見出した (図 1)。特に MDCK 細胞で調製したウイルス粒子



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiono Takahiro, Kuno Atsushi	4. 巻 145
2. 論文標題 C-Terminally tagged NA in replication-competent influenza A viruses reveals differences in glycan profiles between NA and HA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 5845 ~ 5853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0an00770f	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, Tomioka Azusa, Kaji Hiroyuki, Sasaki Michihito, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Kuno Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Combinatorial approach with mass spectrometry and lectin microarray dissected glycoproteomic features of virion-derived spike protein of SARS-CoV-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioRxiv	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) 10.1101/2021.04.10.439300	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kikutani Yuto, Okamatsu Masatoshi, Nishihara Shoko, Takase Yoden Sayaka, Hiono Takahiro, Vries Robert P., McBride Ryan, Matsuno Keita, Kida Hiroshi, Sakoda Yoshihiro	4. 巻 64
2. 論文標題 E190V substitution of H6 hemagglutinin is one of key factors for binding to sulfated sialylated glycan receptor and infection to chickens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 304 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12773	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 Kikutani Yuto, Okamatsu Masatoshi, Nishihara Shoko, Takase Yoden Sayaka, Hiono Takahiro, Vries Robert P., McBride Ryan, Matsuno Keita, Kida Hiroshi, Sakoda Yoshihiro	4. 巻 64
2. 論文標題 E190V substitution of H6 hemagglutinin is one of key factors for binding to sulfated sialylated glycan receptor and infection to chickens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 304 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12773	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, Matsuda Atsushi, Wagatsuma Takanori, Okamatsu Masatoshi, Sakoda Yoshihiro, Kuno Atsushi	4. 巻 527
2. 論文標題 Lectin microarray analyses reveal host cell-specific glycan profiles of the hemagglutinins of influenza A viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 132 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2018.11.010	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 日尾野隆大	4. 巻 34(2)
2. 論文標題 インフルエンザウイルスの糖質科学	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 195-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 日尾野隆大, 久野敦
2. 発表標題 A型インフルエンザウイルスのNAに付加する糖鎖の構造解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日尾野隆大, 久野敦
2. 発表標題 A型インフルエンザウイルスHAおよびNA上の糖鎖付加制御機構の解析
3. 学会等名 第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日尾野隆大、久野敦
2. 発表標題 A型インフルエンザウイルス粒子に付加する糖鎖の構造解析
3. 学会等名 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日尾野隆大、松田厚志、我妻孝則、岡松正敏、迫田義博、久野敦
2. 発表標題 レクチンマイクロアレイを用いたA型インフルエンザウイルス粒子上の糖鎖プロファイリング法の開発
3. 学会等名 第32回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiono Takahiro, Matsuda Atsushi, Wagatsuma Takanori, Okamatsu Masatoshi, Sakoda Yoshihiro, Kuno Atsushi
2. 発表標題 Lectin microarray analyses reveal strain- and host cell-specific glycan profiles of influenza A viruses
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------