

平成22年 4月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790357
 研究課題名 (和文) インフルエンザウイルス結合性アシアロ糖脂質の感染機構における機能
 グライコミクス
 研究課題名 (英文) Functional glycomics of influenza virus-binding asialoglycolipid
 on virus infection
 研究代表者
 高橋 忠伸 (TAKAHASHI TADANOBU)
 静岡県立大学・薬学部・助教
 研究者番号：20405145

研究成果の概要 (和文)：インフルエンザウイルスを含む一部のウイルスが、レセプターであるシアル酸を含有していない硫酸化糖脂質スルファチドへ特異的に結合することを報告している。本研究は、スルファチドがウイルス感染の受容体として機能しないこと、さらにインフルエンザウイルスの宿主や亜型に依存せず、感染細胞からの子孫ウイルス粒子の産生を強力に促進させることを明らかにした。今後、シアリダーゼ阻害剤とは異なる新規抗ウイルス薬のターゲットとして期待される。

研究成果の概要 (英文)：We demonstrated that sulfatide enhanced influenza A virus (IAV) replication through efficient translocation of the newly synthesized IAV nucleoprotein (NP) from the nucleus to the cytoplasm. Our findings suggest new therapeutic strategies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：糖鎖生物ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス、スルファチド、ヘマグルチニン、ウイルス増殖、ヌクレオプロテイン、ウイルス産生、パラインフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは、宿主細胞膜表面に存在しているシアル酸を受容体として結合することにより感染を開始する。一方、研究代表者の所属研究室では、インフルエンザウイルスが、シアル酸を含まない硫酸化糖

脂質スルファチドへも結合することを世界で初めて報告した (Suzuki T, *et al. Biochem. J.* 318, 389-393, 1996)。また、研究代表者はインフルエンザウイルスの表面糖タンパク質ノイラミニダーゼとスルファチドの関連性についても報告している (Suzuki T, *et*

al. *FEBS Lett.* 553, 355-359, 2003)。しかし、スルファチドがインフルエンザウイルス感染にどのように関わっているのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、インフルエンザウイルス感染におけるスルファチドの役割を解明することを目的とする。また、インフルエンザウイルス以外のウイルスのスルファチド結合性や機能を調査する。

3. 研究の方法

(1) スルファチド発現制御によるインフルエンザ A 型ウイルスの感染増殖性比較

スルファチドは転移酵素セラミドガラクトシルトランスフェラーゼ (CGT) とセレブロシドスルフォトランスフェラーゼ (CST) により、セラミドからガラクトシルセラミドを経て合成される。また、アリアルスルファターゼ A (ASA) により、スルファチドの硫酸基が特異的に分解されてガラクトシルセラミドへ代謝される (図 1)。これらの遺伝子を利用して、スルファチド発現を遺伝子レベルで制御した細胞を作製し、ウイルスの感染増殖性を比較した。スルファチド発現制御は以下の①～③を実施した。

① スルファチド高発現細胞の作製

CGT 欠損のためスルファチドが合成できないサル腎由来 COS7 細胞へ、スルファチド合成に必要な CGT と CST の両酵素遺伝子を導入した。スルファチド高発現細胞をスクリーニングした。

② スルファチド分解促進細胞の作製

高いウイルス増殖性を持つイス腎由来 MDCK 細胞のスルファチド発現を抑制するために、スルファチド分解酵素 ASA 遺伝子を導入した。細胞表面のスルファチド発現の減少が見られる細胞を作製した。

③ スルファチド発現抑制細胞の作製

CST の mRNA に対する RNA 干渉 (RNAi) 法を実施し、細胞表面のスルファチド発現の減少が見られる細胞をスクリーニングした。

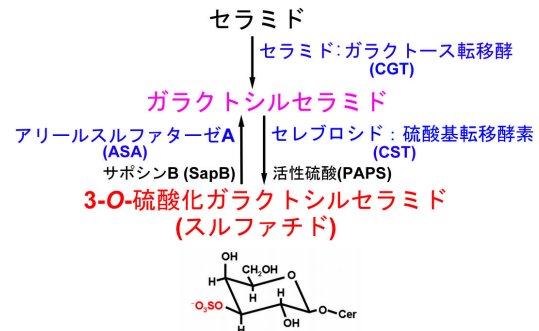


図 1 スルファチドの代謝経路

スルファチドの構造式を示す。スルファチド (赤字) はガラクトシルセラミドのガラクトース残基 3 位が硫酸化 (構造式の赤色の官能基) された糖脂質である。CGT、CST、ASA (青字) は、本研究で使用した遺伝子である。CGT、CST はスルファチド合成に関与する転移酵素であり、ASA はスルファチドの硫酸基を特異的に分解する酵素である。

(2) インフルエンザ A 型ウイルス感染における抗スルファチド抗体の効果

ウイルス感染増殖における抗スルファチド単クローン抗体の効果を細胞レベル、動物感染モデルで検討した。

(3) スルファチド発現制御下における細胞内ウイルスタンパク質の局在性の調査

スルファチド発現を制御したウイルス感染細胞のウイルスタンパク質の挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4) スルファチドと結合するウイルスタンパク質の特定

スルファチドが結合するウイルスタンパク質を同定するため、バキュロウイルス-タンパク質発現システムによりヘマグルチニン (HA) 糖タンパク質を大量に発現精製した。この HA の性質や抗原性およびスルファチド結合性の検討を行った。

(5) パラインフルエンザウイルスのスルファチド結合性の検討

インフルエンザウイルス以外の他のウイルス (呼吸器系病原体パラインフルエンザウイルス) のスルファチド結合性を検討した。また、スルファチド高発現細胞および親細胞に対するパラインフルエンザウイルスの感染増殖性を比較した。

4. 研究成果

(1) スルファチドはインフルエンザ A 型ウイルスの増殖を促進する

宿主細胞のスルファチドは、インフルエンザウイルスの増殖性を大きく促進した。また、スルファチドはウイルス感染初期の受容体ではないことが判明した。このスルファチドのウイルス増殖促進機能は、インフルエンザ A 型ウイルスの宿主（トリ、ヒト）や亜型（H1N1、H3N2、H5N3）などのウイルス株間の違いに関係なく見られた。

① スルファチド高発現細胞は高いインフルエンザ A 型ウイルス増殖性を示す

スルファチドが合成できない COS7 細胞へ、CGT 遺伝子および CST 遺伝子を導入してスルファチドを高発現させた細胞におけるウイルス増殖性は、親細胞におけるそれと比較して 500~3000 倍に増加した（図 2）。また、スルファチド高発現細胞におけるウイルス初期感染性は、親株におけるそれと比較して約 28%低下した。

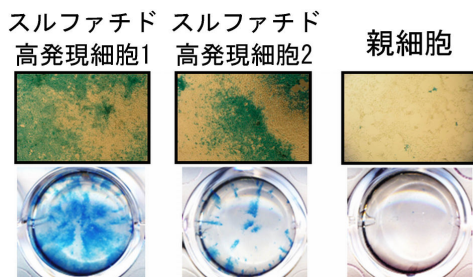


図 2 スルファチド高発現細胞でインフルエンザウイルスの増殖性は亢進する

スルファチド高発現細胞 2 株とその親株に、インフルエンザウイルス A/WSN/33 (H1N1) を増殖させた。感染細胞が青く染色されている。

② スルファチド分解促進細胞は低いインフルエンザ A 型ウイルス増殖性を示す

MDCK 細胞へ ASA 遺伝子を導入してスルファチド発現を減少させた細胞におけるウイルス増殖性は、親細胞株におけるそれと比較して約 60 倍の減少が見られた。

③ スルファチド発現抑制細胞は低いインフルエンザ A 型ウイルス増殖性を示す

MDCK 細胞の内在性 CST mRNA に RNAi 法を適用した細胞においてもスルファチド発現は減少し、ウイルス増殖性も低下した。

(2) 抗スルファチド抗体はインフルエンザ A 型ウイルスの増殖を細胞および動物の両レベルで抑制する

ウイルス感染細胞に抗スルファチド単

クローン抗体を添加すると、ウイルス増殖性は抑制された。さらに、マウスに 100% 致死量のウイルスを感染させた動物モデルにおいて、感染 1 日前から感染 5 日後まで抗スルファチド単クローン抗体を毎日 1 回経鼻投与した。抗スルファチド単クローン抗体は、感染マウスを 50% の生存率にまで回復させた。

(3) スルファチドはウイルスの核タンパク質の核外輸送を促進する

ウイルスが感染したスルファチド高発現細胞と親細胞内で新たに合成されるウイルス膜糖タンパク質 HA やノイラミニダーゼ (NA) の細胞膜表面移行性に大きな差は見られなかった。しかし、親細胞の核にウイルス核タンパク質 (NP) が留まっている一方で、スルファチド高発現細胞では新生 NP の核から細胞質への移行が活発に見られた。さらに、CST mRNA に対する RNAi 法を適用することによってスルファチド発現を抑制した MDCK 細胞では、新生 NP が核のみに局在していた。スルファチド発現が抑制されていない細胞の新生 NP の大部分は細胞質で見られた。抗スルファチド単クローン抗体を添加したウイルス感染細胞においても、新生 NP が核に留まっていた。また、スルファチドとウイルスの結合を阻害する抗 HA 単クローン抗体を添加したウイルス感染細胞においても、新生 NP が核に留まっていた。おそらく細胞表面へ移行した HA がスルファチドと結合すると、新生 NP の核外輸送が促進されるものと示唆される。

(4) インフルエンザ A 型ウイルスは HA を介してスルファチドと結合する

A/duck/HK/313/4/78 (H5N3) 株の H5 型 HA の C 末端に His タグ配列を付加した融合タンパク質を組換えバキュロウイルスにより昆虫細胞上へ発現させた。His タグアフィニティーカラムにより精製した HA は高い赤血球凝集活性を示し、特異的単クローン抗体が反応する抗原性を有していた。また、特異的単クローン抗体を反応させた HA の赤血凝集活性は阻害された。この HA はシアロ糖鎖とスルファチドの両方に対して糖脂質量依存的な結合性を示した。インフルエンザ A 型ウイルスは、HA を介してスルファチドと結合することが判明した（図 3）。

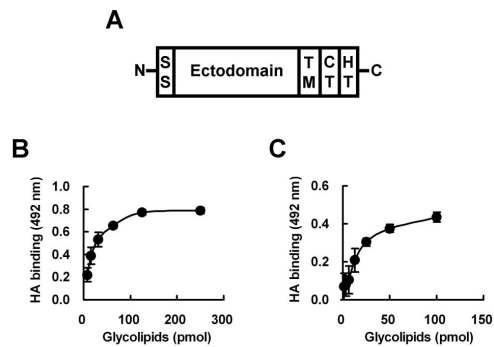


図3 スルファチドはインフルエンザA型ウイルスのHAに結合する

A、バキュロウイルス-タンパク質発現システムで作製したHAの構造。SS、シグナル配列；TM、膜貫通領域；CT、細胞質領域；HT、ヒスタジンタグ。B、硫酸化糖脂質スルファチド固相化ELISA法によるHA結合アッセイ。C、シアロ糖鎖 α 2,3シアリルパラグロボシド固相化ELISA法によるHA結合アッセイ（陽性コントロール）。昆虫細胞に発現させたH5型HAは、界面活性剤で抽出後、ヒスタジンタグアフィニティー精製を行った。このHAは、スルファチドに対する強い結合性が見られた。

(5) パラインフルエンザウイルスはスルファチドへ結合する

パラインフルエンザウイルスのヒトパラインフルエンザウイルス1型および3型、センダイウイルス、ニューキャッスル病ウイルスにおいて、スルファチドに対する結合性が確認された。さらに、ヒトパラインフルエンザ3型ウイルスを感染させたスルファチド高発現細胞は、ウイルス感染親細胞と比較して、ウイルス感染性の低下および多核巨細胞形成の抑制が見られた。スルファチドはパラインフルエンザウイルスの初期感染における受容体ではないが、細胞融合活性に関与することが示唆された。

(6) 本研究成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究成果は、インフルエンザA型ウイルスのスルファチド結合性の世界初の発見から、世界的に本テーマの独創性・優先性を維持しつつ得られたものである。具体的に、科学文献検索サイト「PubMed」において、キーワード「sulfatide」および「influenza virus」で検索すると、5報の論文がヒットする。そのうち4報が、研究代表者所属研究室から報告されたものである（研究代表者は3報に主として関わっている）。ウイルスとスルファチドの研究は、1990年代前半までエイズウイルスで報告されてきた。しかし、糖鎖科学研究の困難さや、ウイルス学との融合分野であるこ

とから成果が得られ難く、エイズウイルス感染におけるスルファチドの機能の統一的な結論はまだ明確にされていない。本研究成果は、他のウイルス感染におけるスルファチドの機能解明に対しても大きく貢献するものと期待される。

(7) 今後の展望

本研究テーマにより、①スルファチドがインフルエンザA型ウイルスの増殖を促進すること、②スルファチドはインフルエンザA型ウイルスの初期感染過程における受容体ではないこと、③HAがスルファチドへ結合すること、④スルファチドはウイルス新生NPの核外輸送を促進すること、⑤おそらく細胞膜表面のスルファチド（とHAの結合）が子孫ウイルス粒子の形成を促進することが判明した。これらをまとめると、ウイルス感染細胞で新たに合成されたHAが細胞膜表面へ移行すると、そこに存在するスルファチドと結合して細胞内へシグナルが開始され、ウイルスの新生NP（ウイルスゲノム）の核外輸送を促進する。そのため、子孫ウイルス粒子の形成が促され、ウイルスの増殖性が高まるものと考えられる（図4）。今後、インフルエンザウイルス以外のウイルス感染におけるスルファチドの機能解明を目指す。スルファチドとウイルスの結合阻害剤は、画期的な抗ウイルス剤として使用できる。その理由として、①HAに直接結合する阻害剤は、内在性スルファチドの発現・結合に直接作用する薬剤に比較して副作用の軽減が期待できること、②タミフルなどのウイルスシアリダーゼ阻害剤は子孫ウイルス粒子の形成は阻害されずに粒子の遊離だけが阻害されるが、スルファチド-ウイルス結合阻害剤は子孫ウイルス形成そのものを阻害できることから強い抗ウイルス効果が期待できること、③この阻害剤はアマンタジンやシアリダーゼ阻害剤に耐性のあるウイルス株に対しても利用できること、④ウイルス株に依存しないため、新型ウイルスのパンデミックに対しても対応できることが挙げられる。本テーマでバキュロウイルス-タンパク質発現システムにより作製したHAは、スルファチド-HA阻害剤のスクリーニングツールとして使用することができる。将来、本研究成果が、スルファチドを介した新しいウイルス感染経路を標的とする画期的抗ウイルス剤の開発基盤になることが期待される。

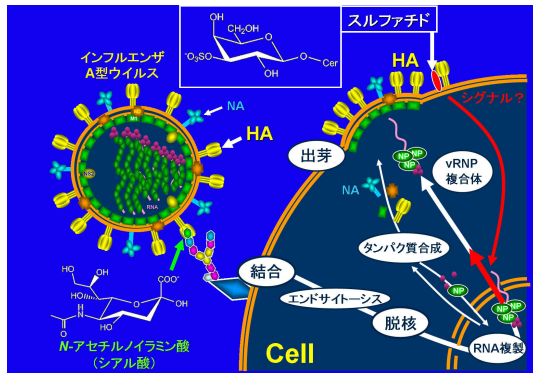


図 4 スルファチドを介したインフルエンザ A 型ウイルスの増殖促進機構

スルファチドと、インフルエンザウイルスの受容体であるシアル酸の構造を示した。感染細胞で新たに合成された HA は細胞膜表面へ移行し、そこでスルファチドと結合する。これにより、シグナルが細胞内へ伝達されて新生 NP の核外輸送が促される (赤矢印)。これは、子孫ウイルス粒子の形成および増殖性の促進につながる。

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 5 件)

- ① Tadanobu Takahashi, Hiroaki Satoh, Masahiro Takaguchi, Suguru Takafuji, Hideshi Yokoyama, Satoshi Fujii, Takashi Suzuki. Binding of sulfatide to recombinant hemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system. *J. Biochem.* in press, 2010, 査読有
- ② Tadanobu Takahashi and Takashi Suzuki. Role of membrane rafts in viral infection. *BENTAM OPEN, The Open Dermatology Journal* 3, 178-194, 2009, 査読有, <http://www.bentham-open.org/pages/gen.php?file=178TODJ.pdf&PHPSESSID=37e7c9d86b61dfdd520bad98b26f830c>
- ③ Tadanobu Takahashi and Takashi Suzuki. Role of sulfatide in virus infection and replication. *TRENDS IN GLYCOSCIENCE AND GLYCOTECHNOLOGY (TIGG)*, Official Journal of the Japanese Society of Carbohydrate Research, 学進出版, 121, 255-265, 2009, 査読有, http://www.jstage.jst.go.jp/article/tigg/21/121/255/_pdf

- ④ Tadanobu Takahashi, Kouki Murakami, Momoe Nagakura, Hideyuki Kishita, Shinya Watanabe, Koichi Honke, Kiyoshi Ogura, Tadashi Tai, Kazunori Kawasaki, Daisei Miyamoto, Kazuya I. P. J. Hidari, Chao-Tan Guo, Yasuo Suzuki, and Takashi Suzuki. Sulfatide Is Required for Efficient Replication of Influenza A Virus. *J. Virol.* 82, 5940-5950, 2008, 査読有, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395127/pdf/2496-07.pdf>
- ⑤ 鈴木 隆, 高橋忠伸, 鈴木康夫, インフルエンザウイルス感染におけるスルファチドの機能、共立出版 蛋白質 核酸 酵素 糖鎖情報の独自性と普遍性 Vol. 53 No. 12 pp. 1676-1682, 2008, 査読無

[学会発表] (計 17 件)

- ① 佐藤紘彰, 高橋忠伸, 横山英志, 藤井 敏, 鈴木 隆: トリインフルエンザウイルス H5 型ヘマグルチニンのバキュロウイルスを用いた大量産生系の確立、平成 21 年度日本薬学会東海支部例会、2009 年 11 月 23 日、四日市
- ② 高橋忠伸, 村上宏起, 本家孝一, 小倉 潔, 田井 直, 川崎一則, 左 一八, 郭 潮潭, 鈴木康夫, 鈴木 隆: インフルエンザウイルス感染におけるスルファチドの機能、平成 21 年度中部乳酸菌研究会、平 2009 年 11 月 7 日、東京都国立
- ③ 高橋忠伸, 高口仁宏, 鈴木 隆: パラインフルエンザウイルスの硫酸化糖脂質スルファチドへの結合、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京
- ④ 高橋忠伸, 伊藤一彦, 高口仁宏, 福島圭穰, 鈴木 隆: 硫酸化糖脂質スルファチドはパラインフルエンザウイルスに結合する、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日、神戸
- ⑤ 高橋忠伸, 鈴木 隆: ウイルス結合性シアロ硫酸化糖脂質を介したウイルス感染機構の解明、US フォーラム 2008、2009 年 8 月 5 日、静岡
- ⑥ 石坂繁行, 高橋忠伸, 池田 潔, 佐藤雅行, 鈴木 隆: 新規抗インフルエンザウイルス薬探索法の構築、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都
- ⑦ 高橋忠伸, 伊藤一彦, 高口仁宏, 鈴木隆: 新規抗ウイルス薬開発戦略を目指したパラミクソウイルス感染における硫酸化糖脂質スルファチドの機能解明、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都

- ⑧ 高橋忠伸、村上宏起、本家孝一、小倉 潔、田井 直、川崎一則、左 一八、郭 潮潭、鈴木康夫、鈴木 隆：硫酸化糖脂質スルファチドはインフルエンザウイルスの増殖を促進する
- ⑨ 高橋忠伸、村上宏起、本家孝一、小倉 潔、田井 直、川崎一則、左 一八、郭 潮潭、鈴木康夫、鈴木 隆：硫酸化糖脂質スルファチドはインフルエンザウイルスの増殖を促進する、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月10、12日、神戸
- ⑩ 伊藤一彦、高橋忠伸、高口仁宏、鈴木 隆：パラミクソウイルス感染における sulfatide の機能解析、平成20年度日本薬学会東海支部例会、2008年12月6日、静岡
- ⑪ 高橋忠伸、川崎一則、左 一八、郭 潮潭、鈴木康夫、鈴木 隆：宿主細胞のスルファチドはインフルエンザウイルスの増殖を促進する、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山
- ⑫ Takashi Suzuki, Chao-Tan Guo, Yasuo Suzuki, Tadanobu Takahashi: Sulfatide is required for efficient replication of influenza A virus, The Eighth China-Japan International Symposium on Health Sciences, November 18, 2008, Hangzhou, China
- ⑬ 伊藤一彦、高橋忠伸、高口仁宏、鈴木 隆：硫酸化糖脂質とパラインフルエンザウイルスの結合、糖鎖科学名古屋拠点 第6回若手の力、2008年9月10日、名古屋
- ⑭ 高橋忠伸、村上宏起、本家孝一、小倉 潔、田井 直、川崎一則、左 一八、郭 潮潭、鈴木康夫、鈴木 隆：スルファチドが関与するインフルエンザウイルス複製機構と新たな抗ウイルス薬戦略、第28回日本糖質学会年会、2008年8月18日、つくば
- ⑮ 高橋忠伸、村上宏起、本家孝一、小倉 潔、田井 直、川崎一則、左 一八、郭 潮潭、鈴木康夫、鈴木 隆：スルファチドはインフルエンザウイルスの増殖を制御する、第54回日本薬学会東海支部大会、2008年7月5日、名古屋
- ⑯ 高橋忠伸、村上宏起、本家孝一、小倉 潔、田井 直、川崎一則、左 一八、郭 潮潭、鈴木康夫、鈴木 隆：インフルエンザウイルス増殖機構におけるスルファチドの役割、第72回日本生化学会中部支部例会、2008年5月24日、岐阜
- ⑰ 高橋忠伸、橋本麻子、丸山真美、石田秀治、木曾 真、河岡義裕、左 一八、鈴木康夫、鈴木 隆：インフルエンザウイルスの増殖における Sulfatide の機能、第22回インフルエンザ研究者交流の会、

2008年5月20日、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://sys.u-shizuoka-ken.ac.jp/~biochem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 忠伸 (TAKAHASHI TADANOBU)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：20405145

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：