

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440014

研究課題名(和文) 鳥インフルエンザウィルスの種特異的な標的分子の同定を目指した鳥類組織の糖鎖解析

研究課題名(英文) Glycan structural analysis of avian tissues to identify targets of avian influenza viruses

研究代表者

鈴木 詔子 (Suzuki, Noriko)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：50401237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：鳥インフルエンザウィルス(IV)に由来するヘマグルチニン(HA)は、宿主細胞上のSia 2-3Galに結合し細胞内への侵入を誘導する。しかし、自然宿主であるカモに感染するIV由来のHAと家禽であるニワトリに感染するIVのHAでは、Sia 2-3Galの内側の糖鎖構造の違いによって特異性の異なることが報告されている。これは、カモとニワトリで発現している糖鎖に違いがあるためと考えられる。本研究では、このような鳥類組織中の糖鎖構造の違いを調べるため、組織サンプルからの糖鎖の精製および質量分析装置を用いた糖鎖構造解析の手法の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：Avian influenza viruses (IV) infect host cells by binding to Sia 2-3Gal using virus hemagglutinin (HA). However, it is reported that glycan binding preferences were different between HA from duck IV, which is not pathogenic to the natural host, and HA from chicken IV. These HAs discriminate the glycan structures attaching to Sia 2-3Gal, such as Sia 2-3Gal 1-3GalNAc or Sia 2-3Gal 1-4(Fuc 1-3)GlcNAc. These differences of HAs might be generated by adopting specific glycan structures expressed on host cells of different species through the virus infection, growth and accumulated mutations. The differences of glycan structures among these avian species have not been studied well, although glycan structures of them are potentially different from those of mammals. Thus, we tried to establish the method to analyze glycan structures from avian tissues using HPLC and mass spectrometric analysis.

研究分野：生化学、糖質科学

キーワード：糖鎖 組織 グライコミクス 糖タンパク質 生物種 質量分析 高速液体クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス (IV) は、野生の水鳥を自然宿主とし、ニワトリやウズラなどの家禽、ブタなどの家畜およびヒトをはじめとした様々な哺乳類に感染する。IV の表面に存在する2種類のスパイクタンパク質のうちヘマグルチニン (HA) は宿主細胞表面のシアル酸 (Sia) に結合し、ウイルスの細胞内侵入を誘導する。カモやニワトリに感染する鳥インフルエンザウイルス (トリ IV) の持つ HA は、Sia α 2-3Gal に特異性があるのに対し、ヒトインフルエンザウイルスの持つ HA は主に Sia α 2-6Gal に特異性があると報告されている。この HA の糖結合特異性がウイルスの宿主指向性に関与すると考えられている。

トリ IV のうち、自然宿主であるカモに常在するカモ IV は、宿主に病原性を示さない。一方、カモ IV はニワトリにほとんど感染しないが、何らかの理由によりニワトリへの感染能を獲得したニワトリ IV は、ニワトリ内で増殖と変異を繰り返すうち、高病原性へと変化する場合がある。高い致死性と強い伝播性を持つ高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染すると、鶏肉・鶏卵の安定した供給が脅かされ、経済的な打撃も大きい。そのため、カモからニワトリへの IV の感染指向性の変化について分子レベルでメカニズムを調べることは、非常に重要な課題である。

トリ IV の HA は、カモ由来およびニワトリ由来のいずれの場合も、上述のように Sia α 2-3Gal に特異性があることは知られていた。しかし、様々な構造を含む人工糖鎖に対して行った HA の糖結合実験の結果では、カモ HA とニワトリ HA の特異性は、Sia α 2-3Gal よりもその内側の糖鎖構造によって異なることが示唆されていた。これは、カモとニワトリでは IV の感染する組織の糖鎖の構造が異なることを反映している可能性がある。しかし、実際にこれらの宿主がどのような構造の糖鎖を発現しているのか、詳細に比較解析された例はない。したがって、鳥類の組織で発現されている糖鎖構造を網羅的に解析し、組織中のどのような構造の糖鎖が HA の糖結合特異性にする寄与するのか調べる必要が考えられた。

2. 研究の目的

(1) 鳥類組織中からの糖鎖の調製法の確立

これまでの研究から、鳥類には哺乳類に存在しない様々な構造の糖鎖が存在することが明らかにされている。また、糖鎖は、生物種によってのみならず、発現されている組織や細胞によって複雑で多様な構造を持つため、哺乳類で得られている知見が必ずしも参考にはならず、予想外の構造の糖鎖が検出される場合もある。にもかかわらず、鳥類の組織、とりわけカモの組織は入手がやや困難で、特定の組織や細胞を相当量確保するのは難しい。このため、まず微量なサンプルでも確実に糖鎖を回収/精製して分析できる方法

の確立が必要となった。

そこで本研究では、まず比較的入手の容易なニワトリの組織を用い、組織中から効率的に夾雑物を除去して糖鎖調製する手法を確立することを目的とした。

(2) 質量分析による検出法の確立

次に糖鎖の構造を解析するためには、微量な糖鎖を検出し、構造に関するより多くの情報を得る必要がある。糖鎖の微量検出には、質量分析法がよく利用されているが、糖鎖を高感度に検出するためには、糖鎖を化学修飾するのが一般的である。今日までに様々な化学修飾法が利用されているが、サンプルの性質や構造解析の目的により、使い分けなければならない。本研究の場合には、これまで分析されていない生物種のサンプルで、新規の構造の糖鎖を含有する可能性もあることを考慮する必要がある。そこで、複数の化学修飾法を組み合わせ、使用可能な質量分析装置とサンプルの性質に応じて最適な方法を検討することを目的とした。

(3) シアル酸結合様式の解析

HA の宿主細胞への結合にはシアル酸が必須であり、このシアル酸が隣接するガラクトースへ結合する際の様式の違いによって HA の特異性が異なることが報告されている。しかし、Sia α 2-3Gal と Sia α 2-6Gal は質量が同じため、通常は質量分析では区別ができない。糖鎖の構造解析を行う際には、この区別をするための手法がいくつかあるが、質量分析と組み合わせ、微量のサンプルを効率的に判別することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ組織からの糖鎖の調製

鳥インフルエンザウイルスの感染する組織は、腸管や気管である。しかし、カモから得られる上皮細胞のサンプルは非常に限られているため、糖鎖の調製を直接行う前に、比較的容易に入手可能な鳥類の組織サンプルから糖鎖を調製する手法を確立することを第一に行った。

鳥類組織のサンプルとして、ニワトリの肝臓を用いた。ホモジナイザーにより組織を破碎し、クロロホルム/メタノールを用いて脂質を抽出除去した後、グアニジン塩酸塩で変性させた糖タンパク質を還元アルキル化処理した。透析により変性剤を除いた後、トリプシン/キモトリプシン処理し、C18 固相化カラムにて生成されたペプチド/糖ペプチドを極性の高い水溶性物質から分離した。回収したペプチド/糖ペプチド画分に対し、グリコアミダーゼ F を用いて、N 型糖鎖を遊離させ、C18 固相化カラムにて、遊離糖鎖とペプチド/糖ペプチド (O 型糖鎖を含む) を分離した。O 型糖鎖は、糖ペプチドからアルカリ還元条件下に遊離させた。

(2) 完全メチル化した糖鎖の MALDI-TOF-MS による解析

水酸化ナトリウムにジメチルスルホキシドを加えて懸濁させ、ガラスバイアル内で予め乾燥させた遊離糖鎖サンプルに加えて室温で 30 分間反応させた。C18 固相化カラムにて塩を除き、50~80%アセトニトリルで完全メチル化した糖鎖を溶出させた。

MALDI 用のプレート上にて、10 mg/ml の DHB をマトリックスとして完全メチル化した糖鎖サンプルと混合し、MALDI-TOF-MS にて分析した。

(3) PA 化標識と HPLC による分取

(1)の方法により組織から調製した糖鎖に対し、還元末端を 2-アミノピリジンで標識した。Natsuka らの方法に従い (Natsuka et al, 2014, *PLOS ONE*)、イオン交換カラム、逆相カラム、および順相カラムを用いて、HPLC により組織中に含まれる各種の構造を持つ PA 化糖鎖を分取した。

(4) ESI-MS, MS/MS による解析

(3)の方法により分取した糖鎖をそれぞれ ESI-MS および MS/MS にて分析した。必要に応じて LC-MS, MS/MS の系を用い、グラファイトカーボンカラムで脱塩した後、アセトニトリルで溶出した PA 化糖鎖を分析した。

(5) 化学修飾によるシアル酸結合様式の同定

シアル酸 (Sia) のガラクトース (Gal) に結合する様式が、Sia α 2-3Gal か Sia α 2-6Gal であるかを質量分析装置で簡便に区別するために、Reiding らの方法 (Reiding et al, 2014, *Anal. Chem*) に従い、エステル化/ラクトン化反応を行った。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)水和物と 1-エチル-3-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)-カルボジイミド(EDC)をそれぞれ終濃度 0.5 M になるようにエタノールに溶かし、シアル酸の付加した糖鎖を加え、37°C で 1 時間反応させた。その後、サンプルを順相カラムで精製し、ESI-MS および MS/MS 法にて分析した。

4. 研究成果

(1) MALDI-TOF-MS による解析

精製された糖タンパク質や遊離糖鎖などと異なり、動物の組織中には、様々な夾雑物、例えば脂質や極性の高い多糖類などが存在する。夾雑物の除去が不十分であると、質量分析を行う際に、糖鎖のイオン化が阻害され分析が困難になる。このため、組織中から糖鎖のみを効率よく精製する必要がある。そこでまず、糖鎖を精製する方法として、C18 固相化カラムを用いる他、陽イオン交換樹脂の Dowex 50W や、グラファイトカーボンカラム、Sephacrose CL-4B を用いた方法を試みた。その結果、C18 固相化カラムと Dowex 50W を組み合わせた方法で、組織サンプル由来の糖鎖を精製すると、完全メチル化処理した糖鎖の

MALDI-TOF-MS による検出感度が向上した。

(2) ESI-MS, MS/MS による解析

完全メチル化法により、組織由来の糖鎖を丸ごと MALDI-TOF-MS により分析する方法は、組織中の主要な糖鎖構造の概観を知る上では、非常に有用である。しかし、(1)の結果から、組織中の糖鎖は高マンノース型が大半で、コンプレックス型やハイブリッド型の糖鎖は、検出されるがシグナルが相対的に弱くなることが明らかとなった。また、質量分析装置のみでは、異性体の区別がつかず、糖鎖の結合様式の判別が難しい。

そこで、糖鎖の還元末端側を PA で標識し、HPLC を用いて構造の違いに基づき糖鎖を分取する方法を試みた。DEAE カラム、ODS カラム、および Amide カラムの 3 種類のカラムを用いてこの順番に糖鎖を分取し、得られたフラクションに対して、ESI-MS および MS/MS 分析を行った。その結果、45 個の糖鎖画分に対して、その構成単糖の組成と糖鎖の分岐パターンを推定を行った。

しかしながら、HPLC および MS で検出されても微量であるため詳細な構造解析まで至らなかった糖鎖も多く含まれている。これらの糖鎖については、直接的な構造解析でなく、HPLC における溶出位置や MS/MS フラグメントパターンによる違いから構造を間接的に解析する方法で対応することが考えられる。このためには、より多くの糖鎖サンプルを解析し、未知サンプルとの比較解析が可能になるよう、各種糖鎖構造の HPLC プロファイルや MS データを収集していく必要がある。

(3) 化学修飾によるシアル酸結合様式の同定

質量分析ではシアル酸の存在は比較的容易に分かるが、シアル酸の結合様式はそのままでは判別が難しい。シアル酸の結合様式が Sia α 2-3Gal か Sia α 2-6Gal を判別する簡便な方法としては、 α 2,3-シアル酸結合を特異的に切断する酵素で処理する手法がある。しかし、市販の酵素のうち特異性の高いものは高価であり、酵素消化に時間を要した。また、糖鎖の構造によっては、 α 2,3-シアル酸結合が存在していても必ずしも酵素で切断されない場合もあることが判明した。

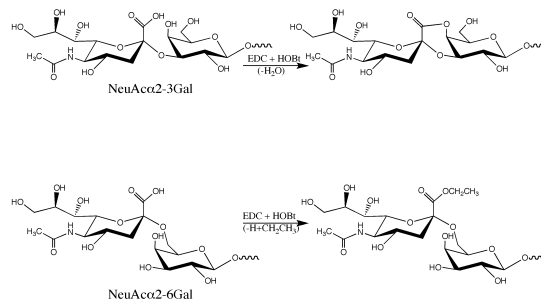


図 1 シアル酸のエステル化/ラクトン化

一方、シアル酸を持つ糖鎖を化学的に処理し、脱水によりエステル化またはラクトン化を誘導することでシアル酸の結合様式を簡単に判別する方法が、Reiding らによって報告されている。この方法では、図 1 のように、Siaα2-3Gal が存在するとラクトンが形成され、Siaα2-6Gal が存在するとエチルエステルが形成される。このため質量は、Siaα2-3Gal が存在すると水分子分(18.01)減少し、Siaα2-6Gal が存在するとエチルエステル化された分(28.03)増加する。

この手法を応用して、PA 化糖鎖に対しエステル化/ラクトン化試薬を混合し、反応生成物を ESI-MS, MS/MS により解析した。その結果、Siaα2-3Galβ1-4GlcNAc 配列を持つ糖鎖は、シアル酸 1 残基あたりラクトン化された分の質量の減少が観察され、Siaα2-6Galβ1-4GlcNAc 配列を持つ糖鎖は、シアル酸 1 残基あたりエチルエステル化された分の質量の増加が観察された。また、MS/MS 分析を行うと、Siaα-Gal-GlcNAc 配列に由来するフラグメントの質量電荷比 (m/z) は、657 であるが、ラクトン化されると 639 に、エチルエステル化されると、685 にフラグメントのシグナルが検出された。さらに、エステル化/ラクトン化することにより、PA 化糖鎖の HPLC における溶出位置も変化することが観察された。このことから、エステル化/ラクトン化したサンプルを LC-MS, MS/MS 分析し、短時間で Siaα2-3Galβ1-4GlcNAc 配列および Siaα2-6Galβ1-4GlcNAc の存在比を比較することが可能になると考えられる。

<引用文献>

① Natsuka S, Masuda M, Sumiyoshi W, Nakakita S. (2014) *PLOS ONE* 9, e102219

② Reiding KR, Blank D, Kuijper DM, Deelder AM, Wuhler M. (2014) *Anal. Chem.* 86, 5784-5793

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)

[学会発表] (計 3 件)

①

発表者名：鈴木詔子

発表タイトル：比較糖鎖生物学:これからの開拓領域

学会等名：生理学研究所研究会

発表年月日：2013 年 11 月 14 日

発表場所：愛知県・岡崎市

会場名：生理学研究所

②

発表者名：鈴木詔子

発表タイトル：人類が進化の過程で再構築した糖鎖構造:鳥類の糖鎖解析から見えてきたこと

学会等名：日本糖質学会

発表年月日：2013 年 8 月 5 日

発表場所：大阪府・大阪市

会場名：大阪国際交流センター

③

発表者名：鈴木詔子

発表タイトル：ハトの構造解析から始まった比較糖鎖生物学

学会等名：比較グライコーム研究会

発表年月日：2013 年 6 月 8 日

発表場所：愛知県・名古屋市

会場名：名古屋市立大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 詔子 (SUZUKI, Noriko)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：50401237

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

岡松 正敏 (OKAMATSU, Masatoshi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：00507163