

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860030

研究課題名(和文) ロタウイルスサーベイランスを目指したグライコタイピング法の開発

研究課題名(英文) Development of glyco-typing methods for Rotavirus surveillance

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) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、複数のロタウイルスが発現するウイルス結合糖鎖を解析し、ウイルス株の種類によって、結合糖鎖が大きく異なることを明らかにした。さらに、ウイルス発現糖鎖の解析に取り組み、ウイルス発現糖鎖プロファイルが従来報告されているものに比べて、複雑であることを明らかにした。この結果は、ロタウイルス表面糖鎖が変化に富むものであることを示唆している。また、ウイルス結合糖鎖及び発現糖鎖の解析は、ウイルスの識別に有用であることを示すものであると考えられる。さらに、ウイルスサーベイランスへの応用を期待し、ウイルス結合糖鎖とウイルス発現糖鎖の情報を簡易に且つ、同時に取得できるデバイスの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed some rotaviruses-glycans interaction, and revealed that rotavirus binding glycans are different depending on the type of virus strain. We also analyzed N-glycans expressed on rotavirus particles, and found that glycan profiles of rotavirus is more complicated than the one reported in the past. These studies suggested that analysis of virus binding glycans and virus expressing glycans is useful for identifying rotavirus strain. In addition, we developed a device that can analyze virus binding glycans and virus expressing glycans simultaneously. I hope that this device will be applied to rotavirus surveillance.

研究分野：分析化学

キーワード：ロタウイルス 糖鎖アレイ N-グリコリルノイラミン酸 ハイマンノース型糖鎖 硫酸化糖鎖 複合型糖鎖

1. 研究開始当初の背景

ロタウイルス感染症は、乳幼児が発症する代表的な下痢症の一つであり、発症者数は世界中で年間1億人にも上る。また、発展途上国を中心に、年間60万人以上の死者が出ている状況である。

ロタウイルスは、インフルエンザウイルス等と同様に非常に多くのウイルス株が存在し、変異しやすい性質を有している。したがって、ウイルス株の性質を評価し、識別できる技術の開発が必要である。また、変異による性質変化をするためには、サーベイランスの強化が必須である。

ロタウイルスには、ウイルス表面上に糖鎖を認識するVP8よばれるスパイクタンパク質が発現しており、この分子が宿主細胞上の糖鎖と結合することで感染を成立させることが示唆されている。一方、機能解析は進んでいないが、ウイルス表面タンパクのVP6には、糖鎖が発現する。ロタウイルスの変異は、糖鎖が関与するVP8やVP6上で生じやすいことから、ウイルス株によって、VP8が結合する糖鎖やVP6上に発現する糖鎖構造が変化しうる。したがって、ウイルス結合糖鎖の種類や発現糖鎖をプロファイルすることで、ウイルスの識別が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前述した、ロタウイルス結合糖鎖とロタウイルス発現糖鎖を解析することで、ウイルスの識別が可能であるという仮説を証明することである。さらに、サーベイランスへの応用を視野に入れ、ウイルス結合糖鎖と発現糖鎖情報を簡便に取得することが可能なデバイスを開発する。

3. 研究の方法

(1)ロタウイルス結合糖鎖によるウイルス識別の検証

申請者が開発した糖鎖アレイ作成技術(Yamada K et al. Anal Chem. 2013 85(6):3325-33)を用いて、ロタウイルス高感受性細胞であるMA104細胞の表面糖鎖プロファイルをミミックしたアレイを作製し、種類の異なる3種類のロタウイルス結合糖鎖解析した。

(2)ロタウイルス発現糖鎖の解析

ロタウイルスの発現糖鎖とウイルス株の種類の関係性を明らかにするため、ロタウイルス上に発現するアスパラギン結合型(N-結合型)糖鎖の構造解析を試みた。ウイルス表面の糖鎖解析を実施するためには、培養上清等からのウイルス精製法を確立しなければならぬため、解析に先立ち、ロタウイルス精製法について検討を行った。

(3)ウイルス結合糖鎖とウイルス表面糖鎖構造情報を簡便に取得するためのデバイス開発

ロタウイルス結合糖鎖と発現糖鎖の情報

を同時に取得することが可能なハイブリットアレイの開発を行った。ハイブリットアレイを実現するために問題となる、ガラス基板へのレクチンの固定化法を検討した。

4. 研究成果

(1)ロタウイルス結合糖鎖によるウイルス識別の検証

ロタウイルス高感受性細胞(MA104細胞)の表面糖鎖プロファイルをもとに、20種類の糖鎖を選択し、それらを固定化した糖鎖アレイを作成した。作成した糖鎖アレイを用いて、2種類のヒトロタウイルス(MO株と及びHAL1166株)と1種のサルロタウイルス(RRV株)の結合糖鎖をスクリーニングした(図. 1)。

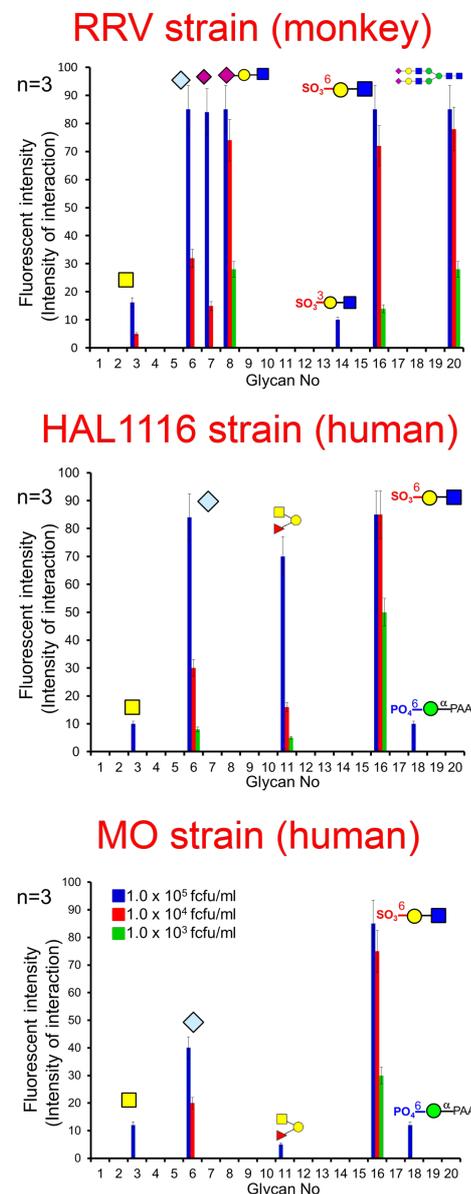


図 1. 3 種類のロタウイルスに結合糖鎖の解析結果

いずれのロタウイルスも、ガラクトースの

6 位が硫酸化された糖鎖及び、N-glycolylneuraminic acid(NeuGc)に強く結合した。この結果から、この2種類の糖鎖に対する親和性は多くのロタウイルス株で保存されており、ロタウイルスの感染、増殖において極めて重要な役割を担っていると考えられる。一方、各ウイルス株に特徴的な結合糖鎖も確認できている。

サル由来の RRV 株では、他の2種類のヒト由来ウイルスでは観察されない N-acetylneuraminic acid(NeuAc)との強い相互作用が見られる。ロタウイルス高感受性細胞を Neuraminidase で消化した場合、ヒト以外の動物種から単離されたロタウイルスの宿主細胞への感染効率が低下することが報告されている。したがって RRV 株の感染においては、NeuAc とウイルスの結合が非常に重要になると考えられる。

一方、HAL1166 株では、他の2種類のウイルスで観察されなかった A 型抗原と強い相互作用を示した。Hu らは、HAL1166 株由来のリコンビナントスパイクタンパク質(VP8)の認識糖鎖を解析した結果、A 抗原と結合することを見出しており (Nature. 485(7397):256-9)、今回の我々の結果と Hu らの報告は、関連している。また、MO 株ウイルスでは、GalNAc と結合することが事が特徴であった。

以上の検討結果をまとめると、3 種類のロタウイルスは複数の糖鎖と結合し、共通の結合糖鎖が存在するものの、各ウイルス種で異なる糖鎖との結合することが明らかになった。この結果から、ウイルス結合糖鎖情報を取得することで、ウイルス株の識別が可能であると考えられる。

(2)ロタウイルス発現糖鎖の解析

ロタウイルス表面糖鎖構造とウイルス株の種類の関係性を明らかにするため、ウイルス表面糖鎖解析法の検討を実施した。生体成分や培養上清中のロタウイルスの表面糖鎖プロファイルを取得するためには、生体試料からロタウイルスを単離する必要がある。したがって、本検討を始めるにあたってロタウイルスの単離法について検討した。超遠心法による単離や、塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法によって、ウイルス粒子の精製を実施し、糖鎖解析を試みた。しかしながら、糖鎖プロファイルの再現性が得られず、ウイルス株の違いによる糖鎖発現のパターンを識別することが困難であった。この理由として、培地中の糖タンパク質成分の除去が不完全であることが挙げられる。また、ロタウイルスの発現するアスパラギン結合型糖鎖は主に高マンノース型糖鎖のみと考えられているが、本検討では複合型糖鎖も確認される。これは新規の発見となるが、ウイルス以外の成分の混入の可能性が排除できないため、データを慎重に判断する必要があると考えられる。そこで、追加検討として、精製ロタウ

イルスを主成分とするロタウイルスワクチン中に含まれるウイルス粒子の糖鎖解析を行った。ワクチン中のロタウイルスから遊離させたアスパラギン結合型糖鎖を蛍光標識し、順相 HPLC を用いて解析した結果を図 2 に示す。

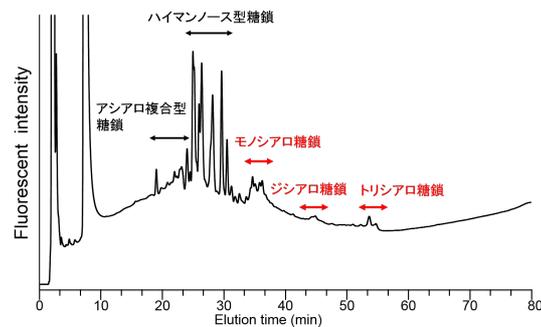


図 2. 順相 HPLC による、ロタウイルス表面の N-結合型糖鎖解析結果

HPLC で解析すると、溶出時間 20 分~30 分に観察される高マンノース型糖鎖が主要な糖鎖であることが分かる。また、アガラクトの複合型 2 本鎖糖鎖が溶出時間 20 分付近に観察される。さらに、溶出時間 30 分以降には、モノシアロ、ジシアロ、トリシアロ糖鎖が観察され、ロタウイルス表面上にこれらのシアロ糖鎖が存在することが分かる。この結果は、ロタウイルス表面糖鎖の生合成が、既存の報告に比べて複雑であることを示すものである。複雑な生合成を有するということは、糖鎖生合成に関わる要因の変化によって、発現する糖鎖構造も変化する可能性が高いため、ウイルス種の違いにより、発現糖鎖構造が変化する可能性は非常に高いと考えられる。また、ウイルスの糖鎖生合成は宿主細胞に依存するため、宿主動物の情報を得る上でウイルス表面糖鎖構造情報を取得することは有用になりうる。したがって今後も、ウイルス表面糖鎖解析を実施する予定である。

(3)ウイルス結合糖鎖とウイルス表面糖鎖構造情報を簡便に取得するためのデバイス開発

成果(1)ではウイルス結合糖鎖構造情報を取得することの有用性を、成果(2)では検討課題は残っているが、ウイルス発現糖鎖構造情報を取得することの有用性を確認することができたため、両者の情報を簡易且つ同時に取得することができるハイブリットアレイの作成を行った。ハイブリットアレイは現在実施している糖鎖アレイ解析に使用する糖鎖固定化チップに、種々のレクチンを固定化させたものである。このアレイに試料を添加することで、結合糖鎖情報と共に、レクチンとの相互作用の有無を確認することで、試料中の発現糖鎖情報を取得することができる。

ハイブリットアレイで問題となるのは、現在実施している糖鎖アレイの基盤上へのレ

クチンの固定化であるため、レクチン固定化法について検討を進めた。

種々の方法を検討した結果、ストレプトアビジンをアレイ基盤上に固定化し、ビオチニルレクチンを添加することで、効率的な固定化を達成した。コンカナバリン a(ConA)をスポットしたチップに、ロタウイルスと同じくハイマンノース型糖鎖を有するウシ由来 Ribonucleaseb の蛍光標識化体を添加すると、明瞭なシグナルが観察された(図 3)。

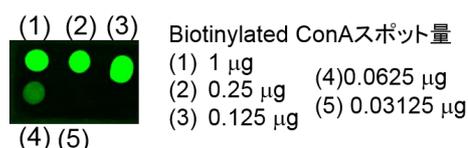


図 3. ConA の基板上への固定化結果

本法を用いることで、現在使用している糖鎖チップ上にレクチンを固定化した、ハイブリットアレイの作製が可能となった。また、レクチンの固定化が達成されたことで、本法を用いたウイルス表面糖鎖プロファイルの測定も可能になる。ウイルス抗体を利用したサンドイッチ法を用いることで、培地成分等の影響を受けないロタウイルス発現糖鎖の解析が可能になるため、成果(2)の研究に応用し、今後、本法を使用したロタウイルス表面糖鎖解析を進める予定である。また、ハイブリットアレイの測定メソッドの最適化を行っていく。

結論

本研究によって、ロタウイルス結合糖鎖情報を取得することで、ロタウイルス株の識別が可能であることが明らかになった。また、ロタウイルス表面糖鎖プロファイルが従来の報告より複雑であることを明にした。この結果は、ウイルス発現糖鎖構造情報の取得がウイルスの分類やサーベイランスに有用であるということを示唆するものと考えられる。またウイルス結合糖鎖と発現糖鎖情報を一度に解析できるハイブリットアレイの作製を達成した。今後ハイブリットアレイを用いて、さらに多くのウイルス種の解析やより早い測定メソッドの開発を実施していく。

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 7 件)

Yamada H, Matsumura C, Yamada K, Teshima K, Hiroshima T, Kinoshita M, Suzuki S, Kakehi K.

Combination of SDS-PAGE and intact mass analysis for rapid determination of heterogeneities in monoclonal antibody therapeutics.

Electrophoresis. 2017 ;38(9-10):

1344-1352. 査読有 DOI: 10.1002/elps.201700014

Higashi K, Wang CX, Yokoyama C, Yamada K, Saito K, Tachibana T

Application of Monoclonal Antibodies Against Mouse Dermokine.

Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy. 2017 ;36(1):15-19. 査読有 doi: 10.1089/mab.2016.0051.

山田 佳太

糖鎖がインフルエンザワクチンの効能を左右する, ファルマシア 2016 Vol. 52 No. 4 p-348, 2016 査読有, doi: 10.14894/faruawpsj.52.4_348

Higashi K, Fujii N, Kushida M, Yamada K, Suzuki N, Saito K, Tachibana T

Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells.

Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy. 2016 ;35(3), 148-154. 査読有 doi:10.1089/mab.2016.0012.

山田 佳太

感染性胃腸炎 ロタウイルス感染と糖鎖、最新医学、2015 ; 70 巻, 66(2280)-73(2287) 査読有

Yamada K, Kinoshita M, Jo Y, Inoue T, Aoshima M, Hasegawa K, Sei K, Kita S, Kakehi K

Structural analysis of carboxymethyl cellulose used as an antiadhesive material for surgical wound healing. Yakugaku Zasshi. 2014 ; 134(11), 1209-1217. 査読有, doi:10.1248/yakushi.14-00174

Higashi K, Asano K, Yagi M, Yamada K, Arakawa T, Ehashi T, Mori T, Sumida K, Kushida M, Ando S, Kinoshita M, Kakehi K, Tachibana T, Saito K

Expression of the clustered NeuAc 2-3Gal 0-glycan determines the cell differentiation state of the cells. The Journal of Biological Chemistry. 2014; 289(37),25833-25843 査読有, 10.1074/jbc.M114.550848

[学会発表](計 8 件)

山田佳太, 栢原春奈, 鈴木光司, 廣畑好彦, 木下充弘, 鈴木茂生, 坂崎文俊

リン酸化並びに硫酸化糖鎖の網羅的解析技術の開発, 第35回日本糖質学会年会, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県高知市) 2016年9月1日~3日

稲垣 瑞穂、大野 翔平、小林 純子、山田 佳

太、金丸 義敬、中込 とよ子、中込 治、鈴木 徹、「ロタウイルス増殖抑制活性に關与する牛乳ラクトフォリンの分子構造の特定」, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2016 年 3 月 27 日 ~ 30 日

山田佳太、栢原春奈、木下充弘、鈴木茂生、坂崎文俊、関 庚善、「硫酸化糖鎖及びリン酸化糖鎖の同時分析技術の開発-見落とされてきた糖鎖の高速分析法の確立を目指して-」, 第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪大谷大学(大阪府富田林市), 2015 年 10 月 17 日

岡本和之、城ヶ崎卓也、坂崎文俊、関 庚善、**山田佳太**、「糖鎖解析技術を用いたロタウイルスエンタリー機構の解析」, 第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪大谷大学(大阪府富田林市), 2015 年 10 月 17 日

山田佳太、「ウイルス感染症の予防を目指して - 糖鎖分析技術の応用 - 」, フォーラム 2015 衛生薬学環境トキシコロジー, 神戸学院大学(兵庫県神戸市), 2015 年 9 月 17 日 ~ 18 日 招待講演(教育講演)

山田 佳太、栢原 春奈、木下 充弘、鈴木茂生、坂崎 文俊、関 庚善、「糖鎖のリン酸化及び硫酸化にフォーカスしたグライコミクス技術の開発」, 日本薬学会第 135 年会, デザインクリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市), 2015 年 3 月 25 日 ~ 28 日

山田佳太、「ロタウイルス感染メカニズムの解析とその衛生科学的応用の可能性」, 関西衛生科学研究会 冬季研修・研究会, 日本食品分析センター(大阪府吹田市), 2015 年 2 月 24 日 招待講演

山田佳太、栢原春奈、木下充弘、稲垣瑞穂、矢部富雄、中込 治、中込とよ子、坂崎文俊、関 庚善、掛樋一晃、「ロタウイルスエンタリー機構の解明に向けたグライコミクスの展開」, 第 33 回日本糖質学会年会, 名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市), 2014 年 8 月 10 日 ~ 12 日

〔その他〕

ホームページ:

<http://www3.osaka-ohtani.ac.jp/ph/21/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし