

水鳥のインフルエンザ感染では糖鎖の硫酸・リン酸修飾が重要

～トリ卵白の大規模分析により、糖タンパク質の酸性糖鎖修飾パターンとの相関を解明～

ポイント

- ・硫酸化及びリン酸化糖鎖の迅速解析技術による 72 種の水鳥卵白解析を実施。
- ・ウイルス感染率が高い水鳥種ではリン酸化糖鎖が高度に発現していることが判明。
- ・鳥類内でのインフルエンザウイルスの伝播と進化の理解と制御戦略に繋がる発見。

概要

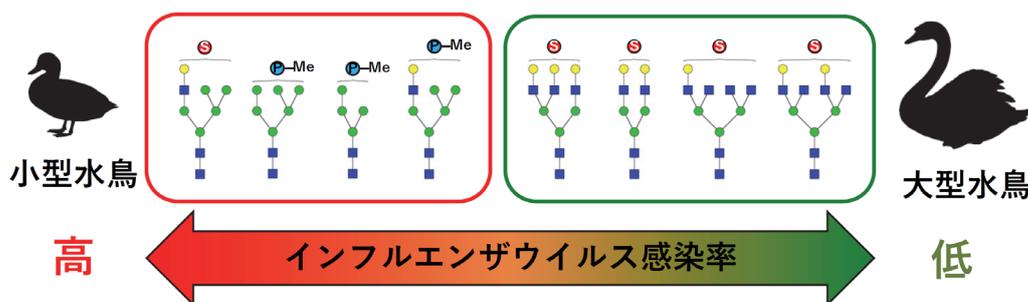
北海道大学大学院先端生命科学研究院の比能 洋教授及びブライアン M. モンタルバン博士（論文投稿時は北海道大学大学院生命科学院博士後期課程学生）の研究グループは、野生水鳥 72 種の卵白中の N-結合型糖鎖*¹（N-グリカン）について硫酸化及びリン酸化*²に焦点を当てた解析を行い、水鳥の種間における酸性修飾糖鎖構造の違いを発見しました。また、インフルエンザウイルス*³の感染率が高い水鳥種の卵白では、リン酸化ハイブリッド及び高マンノース型 N-グリカンが高度に発現していることを明らかにしました。

インフルエンザウイルスの感受性の違いを決定する因子として、ヒトとトリの間ではシアル酸*⁴という酸性糖の修飾が知られています。一方、鳥類内ではシアル酸修飾に加え、糖鎖の硫酸化修飾及びリン酸化修飾の重要性が、近年明らかとなってきました。鳥類においては、糖鎖の硫酸化及びリン酸化修飾構造と種間の特徴を徹底的に調査することが重要です。

研究グループは、同研究院の西村紳一郎教授が開発した糖鎖捕捉技術 Glycoblotting*⁵ を活用し、硫酸化及びリン酸化修飾を受けた微量糖鎖成分の迅速解析技術を開発しました。さらにこの技術を用いて同研究グループが管理している大規模野鳥卵白ライブラリを解析し、水鳥のインフルエンザ感染率に関する糖鎖修飾の潜在的重要性を見出し、提案しました。

この成果は、鳥類集団内でのインフルエンザウイルスの伝播と進化に影響を与える要因について体系的な理解をもたらし、感染対策への重要な指標を与えるものです。

本研究成果は、2024 年 1 月 3 日（水）公開の ACS Infectious Diseases 誌にオンライン掲載されました。



水鳥の体の大きさと酸性糖鎖構造とインフルエンザ感染率の関係

【背景】

あらゆる生命体は糖鎖で覆われており（糖衣）、微生物などの宿主識別対象としての多様性を担っています。タンパク質は糖鎖修飾経路であるゴルジ体を経由して細胞外に分泌されるため、細胞外のタンパク質のほとんどが糖鎖で修飾された糖タンパク質です。ゴルジ体でタンパク質に結合した糖鎖の一部は、さらにリン酸化や硫酸化修飾されます。タンパク質の糖鎖パターンとリン酸及び硫酸修飾は、タンパク質の動態、生体間の免疫や感染の標的となるため、構造情報はバイオマーカー*⁶となります。

インフルエンザウイルスの宿主認識にはヘマグルチニン*⁷とノイラミニダーゼ*⁸という二種の膜結合型タンパク質が関与しています。この2種のタンパク質はシアル酸という酸性糖の認識と加水分解により、ウイルスの感染と増殖後の発芽*⁹を実現していることが知られています。近年、ノイラミニダーゼで分解されない糖鎖の硫酸化やリン酸化もインフルエンザ感染の標的となり、インフルエンザの宿主選択に深く関与することが明らかとなってきました。

研究グループは、北海道大学の西村紳一郎教授が考案した糖鎖捕捉法である Glycoblotting 法を活用し、これまで分析することが困難であった微量の硫酸化及びリン酸化糖鎖を効率的に構造解析する技術の開発に成功しました。この技術を用いて、鳥類の分子分類学の祖であるシブリー博士*¹⁰らが収集した野鳥卵白ライブラリを解析しました。本研究は、同ライブラリを活用し卵白中の糖タンパク質糖鎖情報を標的とする Avian Glycobiology プロジェクト*¹¹の一環として行われました。

【研究手法・成果】

まず、卵白ライブラリから四つのカモ目水鳥科（waterfowl family; anhimidae, anseranatidae, dendrocygnidae, 及び anatidae）に属する72種の卵白を選別しました。続いて Glycoblotting 法により卵白中の糖鎖を選択的に捕捉分離し、シアル酸のカルボン酸を中性のメチルエステルにしました。リン酸基と硫酸基は分子量が同じですが、リン酸基も選択的にメチルエステル化され異なる分子量の一価の酸性基となります。この一価酸性を利用してリン酸化及び硫酸化修飾を受けた酸性糖鎖を他の中性糖鎖から分離し、一価の陰イオンとしてマトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）-質量分析（MS）することにより酸性糖鎖のスペクトルパターンを取得しました（図1）。

得られたそれぞれの卵白の酸性糖鎖 MALDI-MS スペクトルパターンとシブリー博士らによる鳥類分類情報を連結させ、多変量解析によりクラスター分類を行ったところ、2つの主要なクラスター（A及びB）に分類されました（図2）。クラスターAに属する水鳥種は、図2に点線表示した1800 m/z を超える質量を持つ酸性糖鎖、クラスターBの水鳥種は、1800 m/z 未満の酸性糖鎖に基づいてグループ化されていました。これら2つの主要クラスターは、さらに4つのクラスター（クラスター1A、2A、1B、及び2B）にサブグループ化されました。興味深いことに、クラスターAは4つの水鳥科の混合であるのに対し、クラスターBはもっぱらカモ科（anatidae）の種でした。さらに、主成分分析により大型鳥類に特徴的なガラクトース修飾された2、3、4分岐コンプレックス型糖鎖のグループと、小型鳥類に特徴的なガラクトース末端に乏しい糖鎖のグループに分類されました。

さらにインフルエンザウイルス罹患率データが豊富な16種の水鳥について、酸性糖鎖構造と罹患率の関係性を調査しました。まず、この16種の水鳥をウイルス高罹患率群（HVP）と低罹患率群（LVP）に分け、その違いを特徴づける酸性糖鎖量差を火山プロット*¹²として単変量解析したところ、3つのリン化糖鎖と1つのハイブリッド型硫酸化糖鎖が抽出されました（図3）。一方、部分的最小二乗回帰スコアはウイルス低罹患率群の特徴としてガラクトース修飾された2、3、4分岐コンプレックス型糖鎖を抽出しました。

【今後への期待】

本研究成果は鳥類集団内でのインフルエンザウイルスの伝播と硫酸化及びリン酸化修飾を受けた酸性糖鎖構造の違い（進化）について明確かつ系統的な差異を示すものです。これらの発見はインフルエンザウイルス伝播の中核を担う水鳥内におけるインフルエンザウイルスの伝播動態を理解する上で、酸性糖鎖の重要性を示しています。鶏などの家禽において酸性糖鎖が水鳥からのインフルエンザウイルスの伝播において重要な因子になることが報告されています。本研究で示されたインフルエンザウイルスの自然宿主である野生水鳥間の酸性糖鎖構造の違いとインフルエンザウイルス伝播率関係性は家禽やヒトへのインフルエンザウイルス伝播経路の理解と予測に向けた基盤となることが期待されます。

【謝辞】

本研究は科学研究費補助金（B: 22H02191）、JST A-STEP（JPMJTM20JB、JPMJTM20A7）からの支援を受けて実施しました。

論文情報

論文名 Glycoblotting-Based Ovo-Sulphoglycomics Reveals Phosphorylated N-Glycans as a Possible Host Factor of AIV Prevalence in Waterfowls（グライコブロットティング法を活用した Ovo-Sulphoglycomics により、リン酸化 N-結合型糖鎖が水鳥における A 型インフルエンザウイルス感染の潜在的宿主因子であることが明らかに）
著者名 Bryan M. Montalban¹、比能 洋²（¹北海道大学大学院生命科学院、²北海道大学大学院先端生命科学研究院）
雑誌名 ACS Infectious Diseases
DOI 10.1021/acsinfecdis.3c00520
公表日 2024 年 1 月 3 日（水）

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 教授 比能 洋（ひのうひろし）

T E L 011-706-9040 F A X 011-706-9042 メール hinou@sci.hokudai.ac.jp

U R L <https://sites.google.com/eis.hokudai.ac.jp/hinou>

配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

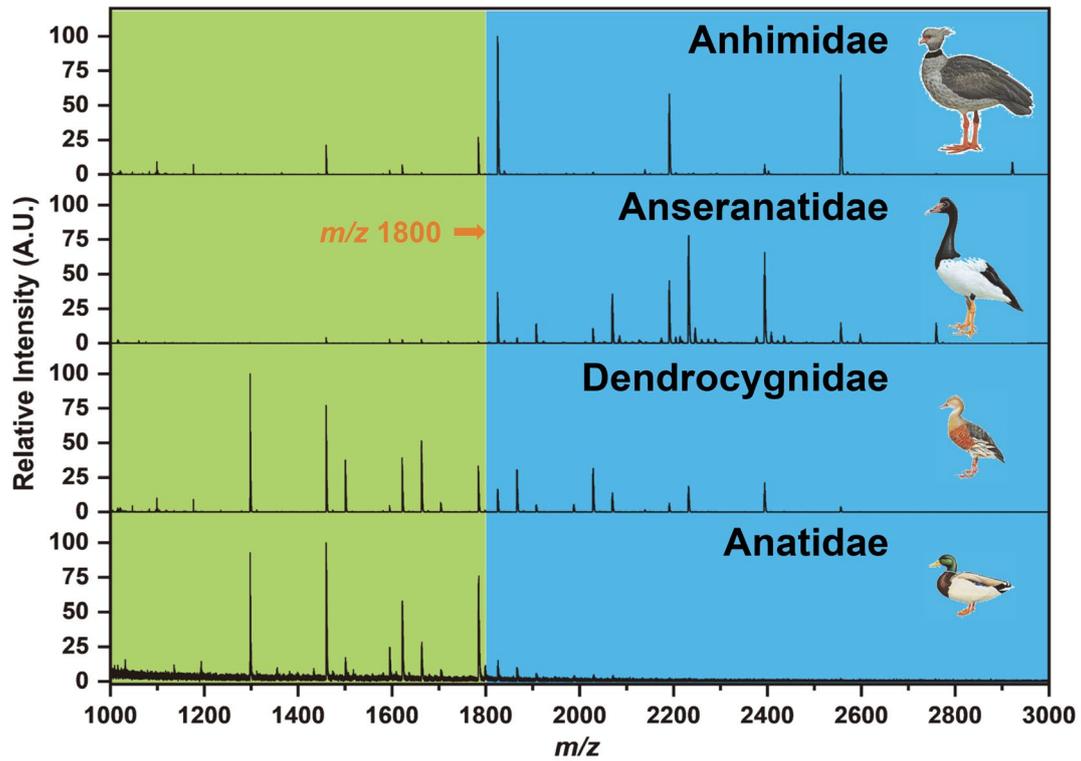


図 1. 調査した 4 つの水鳥科の卵白の酸性糖鎖スペクトルパターンの例

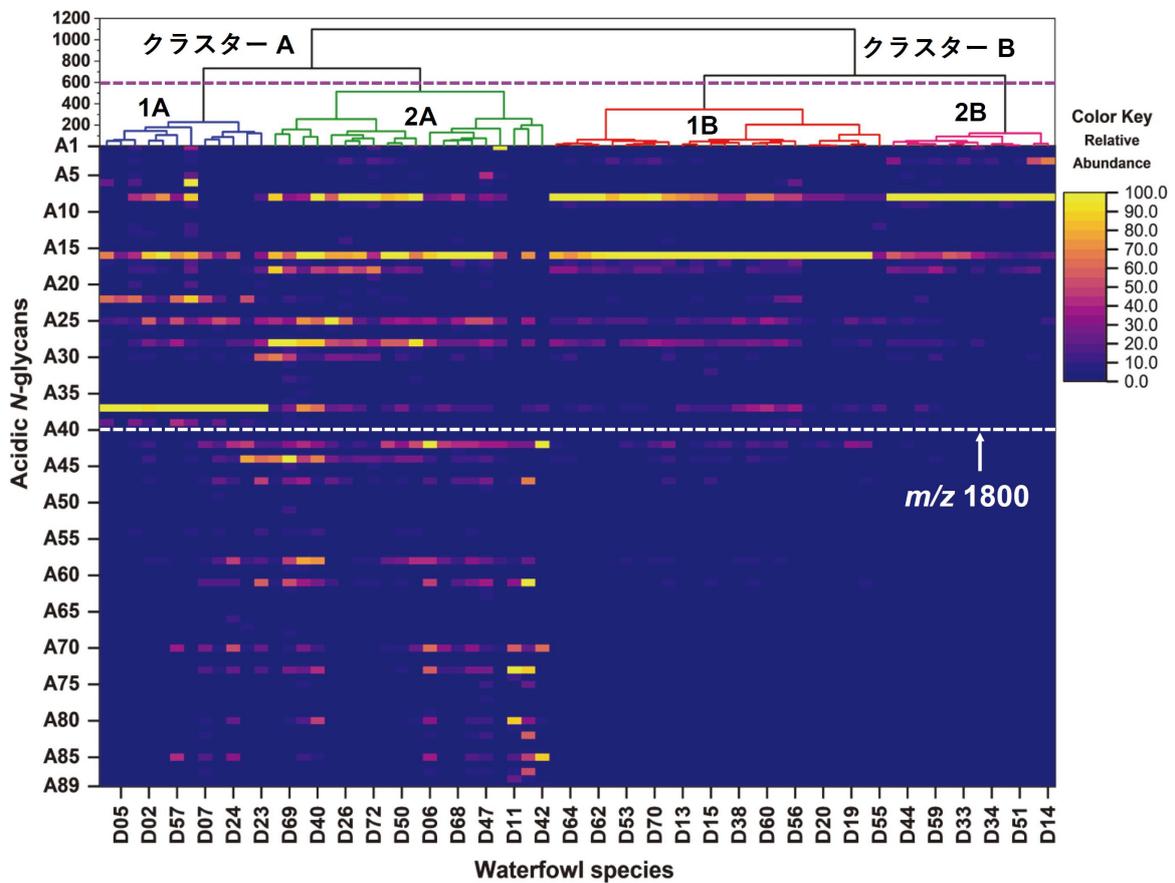


図 2. 72 種鳥類由来卵白の酸性糖鎖パターンを指標としたクラスター分析結果

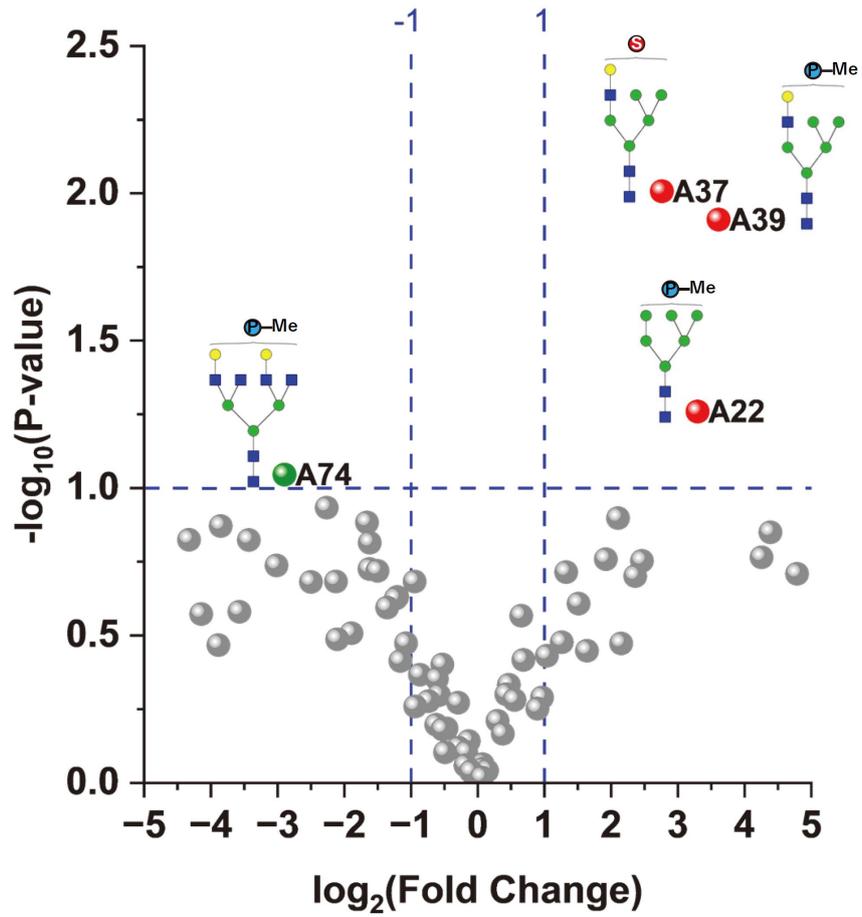


図 3. ウイルス高罹患率群と低罹患率群間の酸性糖鎖発現差の火山プロット

【用語解説】

- *1 糖鎖 … 糖が鎖状に繋がった分子。オリゴ糖とも呼ばれる。タンパク質や脂質と結合した複合糖質と呼ばれる状態で存在するものが多く、その構造解析には高度な知識と複雑な前処理工程が必要。
- *2 硫酸化とリン酸化 … 本リリースでは、糖鎖の硫酸化とリン酸化を指す。ゴルジ体で生じる糖鎖修飾。シアル酸修飾と同様に糖鎖に電荷をもたらすため、物理的及び生物学的に特徴的な識別対象となる。また、カルボン酸よりも強い酸性（小さな pK_a ）を有するためエステル化やアミド化修飾を受けにくく、質量分析による糖鎖構造解析ではその取扱い難易度から一般的に解析対象から除外されるため、その系統的機能解析が遅れている。
- *3 インフルエンザウイルス … インフルエンザの原因ウイルス。水鳥が自然宿主となり、世界中に伝播している。高病原性トリインフルエンザの家禽への伝播と世界的蔓延が問題となっており、さらに人に伝播し、新たなパンデミックが発生することが予想されている。
- *4 シアル酸 … 糖の一種。糖の非還元末端に結合するため、インフルエンザウイルスなど様々な病原体の宿主決定因子として認識される。カルボン酸を有する酸性糖。
- *5 Glycoblotting 法 … 北海道大学の西村紳一郎教授が考案した糖鎖捕捉技術。糖鎖は還元末端（アルデヒドまたはケトン基）を一つ有することに着目したクリック反応により糖鎖を他の生体高分子や低分子成分から分離するとともに、選択的の化学修飾を施すことができる。
- *6 バイオマーカー … 生物の固有の特徴や疾患などの状態変化の指標となるもの。PCR や抗原抗体反応によるコロナウイルスの診断もコロナウイルスの持つ特徴的な分子配列を指標としている。
- *7 ヘマグルチニン … 赤血球を凝集する性質を有するタンパク質の総称。インフルエンザウイルスの主な宿主決定因子。
- *8 ノイラミニダーゼ … シアル酸の加水分解酵素。インフルエンザウイルスの発芽の鍵因子であり、抗インフルエンザ薬であるタミフルやリレンザはノイラミニダーゼの選択的阻害剤である。
- *9 発芽 … ウイルス感染においては増殖後宿主細胞から分離する段階。
- *10 シブリー博士 … Charles Gald Sibley 博士（故人）；タンパク質の電気泳動や DNA-DNA 分子交雑法などの分子生物学的手法により、鳥類の分類学を形態観察から分子系統分類への変革を推し進めた。鳥卵白のタンパク質分類を推し進める過程で世界最大の鳥卵白コレクションを構築した。
- *11 Avian Glycobiology プロジェクト … Sibley 博士から卵白コレクションを受け継ぎタンパク質化学に生涯をささげたアメリカ国立衛生研究所（NIH）の M. Lascowski, Jr. 博士（故人）からさらにコレクションを受け継いだ Johns Hopkins 大学の Y. C. Lee 博士が開始した鳥類糖鎖構造及び機能解析プロジェクト。現在は北海道大学の西村教授及び比能教授のグループが卵白コレクションと共にこのプロジェクトを受け継ぎ実施している。
- *12 火山プロット … volcano plot とも称する。二群の違いを示すためのプロット法の一つ。二群に対する解析対象（今回は個々の酸性糖鎖）の発現比（Fold Change）を x 軸、統計的有意差（P-value）を y 軸として一般的に示す。