慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ウイルス変異体での細胞感染性に寄与する受容体糖鎖の解明
Sub Title	Elucidation of glycan receptors contributing to cell infectivity in virus mutants
Author	佐藤, 智典(Sato, Toshinori)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	複数のウイルス感受性細胞を用いて糖鎖プライマー法を用いた糖鎖プロファイリング、およびインフルエンザウイルス（IFV）やSARS-CoV-2に対する感受性評価を実施した。IFVのH1/H3/H5/H7/H9亜型間では細胞への感染効率やその序列に違いがみられた。細胞に発現している糖鎖とウイルス感受性との相関解析により、H1/H3/H5亜型では高い相関係数を示した共通の糖鎖が特定された。さらに、SARS-CoV-2のSタンパク質を提示した擬似ウイルスを用いて、武漢株と２種類のオミクロン株間での細胞への感染効率を比較した。相関解析により、３株に共通の糖鎖やオミクロン株に特徴的な糖鎖が特定された。 Using virus-susceptible cells, we evaluated the susceptibility to influenza virus (IFV) and SARS-CoV-2, and performed glycan profiling using saccharide primer method. Differences in the efficiency and the order of cell infection were observed between the H1/H3/H5/H7/H9 subtypes of IFV. By correlation analysis between glycans expressed in cells and virus susceptibility, common glycans showing high correlation coefficients among H1/H3/H5 subtypes were identified. Furthermore, using pseudoviruses displaying the S protein of SARS-CoV-2, we compared the efficiency of cell infection between the Wuhan strain and two types of Omicron strains. By correlation analysis, glycans common to the three strains and glycans characteristic of the Omicron strains were identified.
Notes	研究種目：挑戦的研究 (萌芽) 研究期間：2022～2023 課題番号：22K19116 研究分野：糖鎖生命工学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K19116seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2022～2023
課題番号：２２Ｋ１９１１６

研究課題名（和文）ウイルス変異体での細胞感染性に寄与する受容体糖鎖の解明

研究課題名（英文）Elucidation of glycan receptors contributing to cell infectivity in virus mutants

研究代表者
佐藤　智典（Sato, Toshinori）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：００１６２４５４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：複数のウイルス感受性細胞を用いて糖鎖プライマー法を用いた糖鎖プロファイリング、およびインフルエンザウイルス（IFV）やSARS-CoV-2に対する感受性評価を実施した。IFVのH1/H3/H5/H7/H9亜型間では細胞への感染効率やその序列に違いがみられた。細胞に発現している糖鎖とウイルス感受性との相関解析により、H1/H3/H5亜型では高い相関係数を示した共通の糖鎖が特定された。さらに、SARS-CoV-2のSタンパク質を提示した擬似ウイルスを用いて、武漢株と２種類のオミクロン株間での細胞への感染効率を比較した。相関解析により、３株に共通の糖鎖やオミクロン株に特徴的な糖鎖が特定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
交通機関の発達でグローバルな人的交流が活発になり、感染症の爆発的な拡大が危惧される時代になってきた。新型コロナウイルスに加えて、新型インフルエンザウイルスによるパンデミックの危険性も高まっていると考えられている。今回の研究では、ウイルス感染効率と宿主細胞で発現している糖鎖との相関解析を行なった。インフルエンザウイルスおよびSARS-CoV-2の細胞への感染性と相関性のある受容体糖鎖を特定して、これまでに出現してきた変異株間での受容体糖鎖の相違点を見出した。この成果は感染症対策の研究に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using virus-susceptible cells, we evaluated the susceptibility to influenza virus (IFV) and SARS-CoV-2, and performed glycan profiling using saccharide primer method. Differences in the efficiency and the order of cell infection were observed between the H1/H3/H5/H7/H9 subtypes of IFV. By correlation analysis between glycans expressed in cells and virus susceptibility, common glycans showing high correlation coefficients among H1/H3/H5 subtypes were identified. Furthermore, using pseudoviruses displaying the S protein of SARS-CoV-2, we compared the efficiency of cell infection between the Wuhan strain and two types of Omicron strains. By correlation analysis, glycans common to the three strains and glycans characteristic of the Omicron strains were identified.

研究分野：糖鎖生命工学

キーワード：インフルエンザウイルス　新型コロナウイルス　受容体糖鎖　糖鎖プライマー法　相関解析

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

世界中の 1 年間の死亡者 5,500 万人のうち感染症による死亡者は約 1,000 万人と言われている。主な感染症はエイズ、マラリア、結核であるが、それに加えてインフルエンザや新型コロナなどが知られている。近年の交通機関の発達によるグローバルな人的交流が活発になり、感染症の爆発的な拡大が発生する時代になってきた。インフルエンザでは、20 世紀以降 4 度の世界的大流行（パンデミック）が起こり、中でも 1918 年のスペイン風邪では世界中で 3,000 万人が死亡したと言われている。直近では、2009 年に H1N1pdm09 ウイルスによるパンデミックが起きている。毎年流行する季節性インフルエンザは、A 型の H1 や H3 亜型および B 型ウイルスにより引き起こされる。それに加えて、H5、H7、H9 亜型などの鳥由来の IFV が人に感染することが確認さており、新型インフルエンザとしてパンデミックの危険性が高まっていると考えられている。平成 20 年の厚生労働省のレポートでは、新型インフルエンザ発生時には国内での発症者数 3,200 万人、死亡者数は 17～64 万人、GDP 損失は 20～30 兆円になると見積もられている。高病原性 IFV の影響は人だけでなく家畜への影響も甚大であり、2013 年の中国では H7 亜型 IFV により 65 億ドルの損失が生じている。新型コロナウイルスでのパンデミックでは、2023 年 1 月時点で国内での感染者数は 3,000 万人、死者は 6 万人であった。武漢株やオミクロン株などの変異株の出現によりパンデミックが長期間継続することも大きな問題となった。このように高病原性ウイルスによるパンデミックが発生すると、人的および経済的に多大な損失が生じる。

パンデミックに対して我々が行うべき対策は、ワクチン、治療薬、さらに診断やサーベイランスにおけるウイルスの検出技術の開発である。そのためには、ウイルスが細胞に感染するメカニズムの解析、特に糖鎖受容体の解析を行う必要がある。これまでにマイクロアレイを用いた受容体糖鎖の解析は行われているが、詳細な感染機構を解明するためには、ウイルス感受性細胞間での比較グライコミクスにより宿主細胞に発現する受容体糖鎖を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルス(IFV)やコロナウイルス(CoV)などの RNA ウイルスでは遺伝子変異が生じやすく、宿主細胞の認識に関わるタンパク質に変異が生じて、細胞への感染性も変化する。そのようなウイルスタンパク質は、IFV ではヘマグルチニン、CoV では S タンパク質である。ウイルス変異体の細胞への感染性の変化を理解することは、ウイルスの感染機構の解明に加えて感染阻害剤や検出技術の開発への展開に寄与する。これらウイルスの感染では宿主細胞に提示されている糖鎖が受容体となっている。しかしながら、細胞に発現する糖鎖の解析が難しいことから、多様なウイルス変異株の細胞への感染性と糖鎖認識との関係性は解明されていないことが多い。そこで、本代表者が開発してきた糖鎖プライマー法を活用してウイルス感受性細胞間での比較糖鎖解析を行う。それに加えてウイルスの細胞への感染効率を定量的に評価する。最後に、細胞に発現する糖鎖とウイルス感受性との相関解析を行う（図 1）。これによりウイルス感染に関与する受容体糖鎖を細胞レベルで解明することを目的としている。

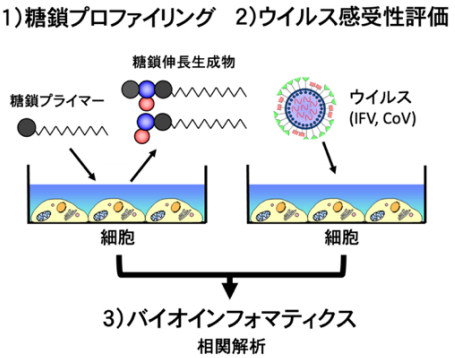
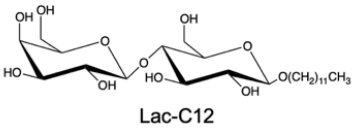


図 1 本研究の概要



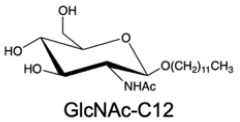


図 2 本研究で用いた糖鎖プライマー

3. 研究の方法

3-1. 糖鎖プライマー法による糖鎖プロファイリング

糖鎖プライマーとは、細胞中の糖鎖合成酵素の前駆体となる糖誘導体（アルキルグリコシド）である。本研究では糖鎖プライマーとして Lac-C12 と GlcNAc-C12 などを用いた（図 2）。Lac-C12 は糖脂質の生合成経路の糖鎖を、GlcNAc-C12

はラクト／ネオラクト系列の糖鎖を検出できる[1,2]。糖鎖プライマーを細胞と 2 日間培養して得られた糖鎖伸長生成物は、イオントラップ型質量分析装置（MS）を接続した LC–MS を用いて分析した。糖鎖の配列は MS/MS スペクトルおよび糖加水分解酵素により決定した。細胞として、MDCK、A549、HEK293、hCK、Vero、Hela、CHO 細胞などを用いた。

3-2. 細胞のウイルス感受性評価

人 IFV として H1N1 (A/Puerto Rico/8/34)および H3N2 (A/Panama/2007/99)、鳥 IFV として H5N3 (A/duck/Hong Kong/820/80)、H7N2 (A/duck/Hong Kong/293/1978) および H9N2 (A/duck/Hong Kong/448/1978)を用いた。CoV としては、S タンパク質を提示した擬似ウイルス ppSARS-CoV-2（武漢株、オミクロン株 BA.5、BQ.1.1）を用いた。細胞への感染は、ウイルス RNA のコピー数を real-time RT-PCR 法により定量的に評価した。

3-3. バイオインフォマティクスによる発現糖鎖とウイルス感受性との相関解析

用いた細胞における発現糖鎖(3-1)とウイルス感受性(3-2)との相関性をスピアマンおよびピアソンの相関係数により解析した。

4. 研究成果

4-1. 糖鎖プライマー法による糖鎖プロファイリング

LC-MS の結果より Lac-C12 由来糖鎖伸長生成物および GlcNAc-C12 由来糖鎖伸長生成物の糖鎖パネルを作成した。Lac-C12 由来糖鎖伸長生成物では、酸性糖鎖 22 種類および中性糖鎖 18 種類の糖脂質型の糖鎖が検出された。GlcNAc-C12 由来糖鎖伸長生成物では、酸性糖鎖 14 種類と中性糖鎖 12 種類のラクト／ネオラクト系列の糖鎖が検出された。また、発現量は MS のピーク面積として評価した。

4-2. IFV の感染性評価

各 IFV を細胞と 4 時間相互作用させた後の細胞内ウイルスコピー数を図 3 に示した。H1、H3、H5 亜型では感染効率の序列は類似していた。H7 と H9 亜型では細胞との親和性が 1000 分の 1 程度に低下し、細胞親和性の序列も異なっていた。

4-3. IFVでの相関解析

各細胞での発現糖鎖と IFV 感受性との相関解析の結果は表 1 に示した。H1、H3、H5 亜型においては NeuAc-Gal を含んだ酸性糖との相関性が高いことが示された。これはウイルスの主要な受容体がシアル化糖鎖であることと対応している[3]。特に、H1 と H3 亜型では NeuAcα2-6Gal 結合を有する糖鎖が高い相関性を示していた。IFV の人への感染では NeuAcα2-6Gal 含有糖鎖の関与が知られており、今回の相関解析においても亜型による糖鎖構造の特異性があることが示された。また、硫酸基を有した構造も高い相関性を有しており、スルファチドなど硫酸基を有する糖鎖がウイルス感染に関与しているという報告と対応している。H5 亜型では、H1 や H3 亜型と比較して相関性のある糖鎖が類似していた。さらに、H5 亜型では高い相関性を示したシアル化糖鎖の種類が増えていた。これら糖鎖はポリシア

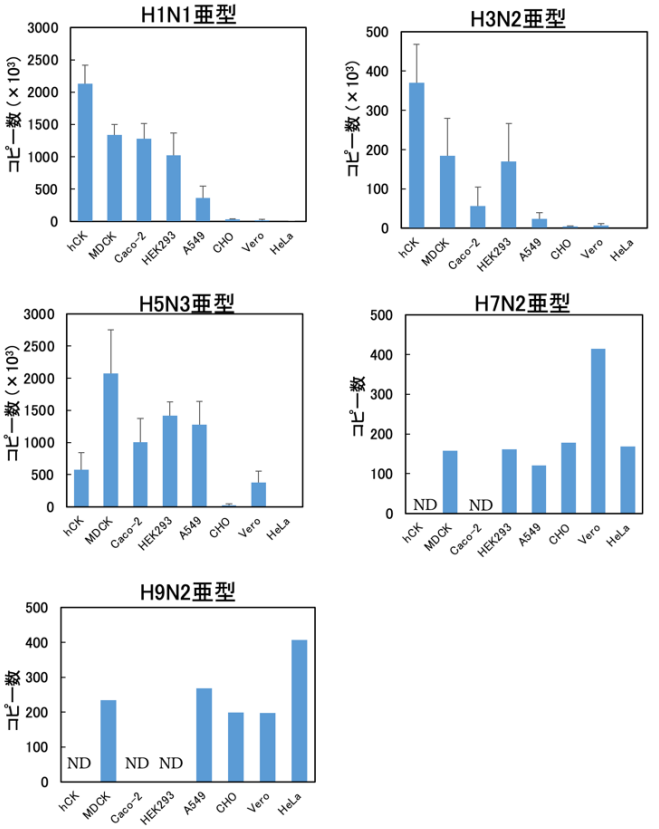


図 3　各 IFV の亜型における細胞への感染性の比較

ロガングリオシドと考えられ、脳内に多く存在していることから、感染後の病態に影響する可能性があるものと推察される。中性糖鎖では、Fuc-Lac などフコシル化糖鎖が高い相関性を示していた。このような糖鎖構造は受容体としては注目されていない。新たな受容体の可能性もあるが、ウイルスの細胞内への侵入や複製との関係も推察される。

表１　インフルエンザウイルスにおける相関解析のまとめ（赤字は酸性糖）

亜型	Lac-C12(P)由来糖鎖	GlcNAc-C12(P)由来糖鎖
H1, H3, H5 亜型に共通	Fuc-P, HSO_3+P, NeuAcα2-3P, NeuAc-Gal-HexNAc-P, NeuAc+(Gal-HexNAc)$_2$P	NeuAcα2-6Hex-P, HSO_3+Gal-P, NeuAc-Gal-(Fuc-)P, HSO_3 + Gal-(Fuc-)P, NeuAc-(HexNAc-)Gal-P, NeuAc + (Gal-HexNAc)$_2$-Gal-P, NeuAc + NeuAc-Gal-HexNAc-Gal-P
H1, H3 亜型に共通	NeuAcα2-6P	NeuAcα2-6Gal-HexNAc-Gal-P
H5 亜型	NeuAc-NeuAc-P, Ac + NeuAc-P, 2NeuAc + Gal-HexNAc-P, 3NeuAc + Gal-HexNAc-P	-
H7 亜型	Gal-HexNAc-(NeuAc)-P, Fuc-(HexNAc-)Gal-(Fuc-)HexNAc-P	
H9 亜型	HexNAc-(NeuAc)-P, Fuc-(Gal-)Gal-(Fuc-)HexNAc-P	Fuc-Gal-HexNAc-Gal-P

4-4. ppSARS-CoV-2 の感染性評価

感染条件の最適化実験を行い、感染時間（5 時間）、および細胞と相互作用させるウイルスコピー数を決定した。感染実験の結果は図 4 に示した。観察された取り込み効率の序列は、S タンパク質の受容体である ACE2 の発現との相関性はみられなかった。

4-5. ppSARS-CoV-2 での相関解析

相関係数より、相関性の見られた糖鎖を表 2 に示した。酸性糖に関しては、3 種類の株に共通の糖鎖として、Lac-C12 由来のシアリルラクトサミン NeuAc-Gal-HexNAc-P と GlcNAc-12 由来のジシアリルラクトサミン NeuAc-NeuAc-Gal-P などのシアル化糖鎖、および硫酸基を有する糖鎖との相関性が高かった。2 種類のオミクロン株では、Lac-C12 由来の NeuAc2-3P, NeuAc2-6P や NeuAc-NeuAc-P、GlcNAc-12 由来の NeuAc2-6Gal-P や NeuAc2-3Gal-(Fuc-)P などのシアル化糖鎖で高い相関性が見られた。糖脂質 GM1[4]や血液型糖鎖[5]が受容体として働くという報告があるが、本研究で用いた細胞ではこれら糖鎖の発現が少なく相関解析に反映できなかった。

中性糖ではフコースを有した複数の糖鎖での相関性が高いことが示された。特に、オミクロン株では Lac-C12 由来の Fuc-P の相関性が見られた。この糖鎖は IFV においても相関性が高いことが示されており、ウイルス感染において共通の

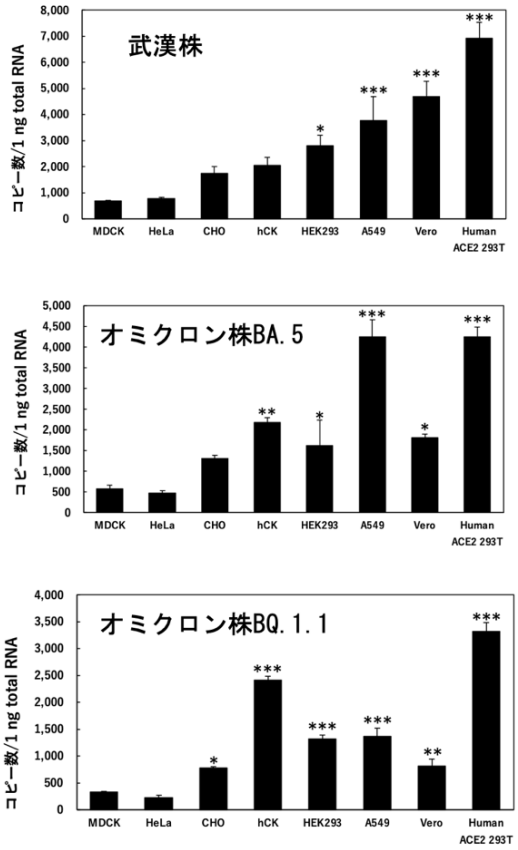


図 4 ppSARS-CoV-2 変異株における細胞への感染性の比較

機能を有していることが推察される。

表 2　ppSARS-CoV-2 における相関解析のまとめ（赤字は酸性糖）

ウイルス株	Lac-C12(P)由来糖鎖	GlcNAc-C12(P)由来糖鎖
3 株共通	NeuAc-Gal-HexNAc-P, HSO_3+HexNAc-P, Gal-Gal-Gal-Gal-P, Fuc-Gal-HexNAc-Gal-P, Fuc-Gal-(Fuc-)HexNAc-P	NeuAc-NeuAc-Gal-P, HSO_3-Gal-P
武漢株	HexNAc-(NeuAc-)P, NeuAc-Gal-HexNAc-Gal-P, NeuAc + HexNAc-Gal-HexNAc-P, Gal-HexNAc-Gal-P	-
オミクロン株 BA.5、 オミクロン株 BQ.1.1 共通	NeuAcα2-3P, NeuAcα2-6P, NeuAc-NeuAc-P, NeuAc-(Gal-HexNAc-)$_2$P, Fuc-P, HexNAc-HexNAc-Gal-P	NeuAcα2-6Gal-P, NeuAc-Gal-(Fuc-)P, NeuAcα2-6Gal-HexNAc-Gal-P, HSO_3-Gal-(Fuc-)P, HexNAc-(Fuc-)P, HexNAc-P

4-6. 研究成果のまとめ

本研究では、ウイルス感受性細胞に発現する糖鎖の解析を実施した。次に、IFV(H1, H3, H5, H7, H9 亜型)および SARS-CoV-2（武漢株、オミクロン株 BA.5, BQ.1.1）の細胞への感染性を RT-PCR 法により定量的に評価した。相関解析により、IFV では 5 種類の亜型間での糖鎖認識の変化について検討した。鳥 IFV である H5 亜型ではシアル酸の結合様式による認識性の変化は認められたが、それ以外の糖鎖認識性は人 IFV(H1, H3 亜型)との共通性は高かった。一方、鳥 IFV である H7 や H9 亜型では、他の亜型と比べて細胞への取り込み効率が非常に低く、相関性のあるシアル化糖鎖は少なかった。このことは H7 および H9 亜型は H5 亜型とは異なり、人への感染性を十分に獲得する前段階にあるウイルスであると推察できるかもしれない。

SARS-CoV-2 では武漢株と 2 つのオミクロン株間での比較解析を行った。三つの株間で共通の糖鎖も見られたが、オミクロン株では感染に関与する糖鎖の種類が増えており、特にシアル化糖鎖の多様性が高まっていることは注目に値すると考えられる。この様な傾向は IFV での受容体糖鎖の特徴に類似していた。オミクロン株では IFV の糖鎖認識に近づいて人の細胞に感染しやすくなっている可能性が示唆された。

以上の結果より、IFV や SARS-CoV-2 では変異により糖鎖認識が明確に変化していることが示された。相関解析により得られた糖鎖構造は、受容体としての機能に加えてウイルスの細胞内移行に寄与している可能性が考えられる。各糖鎖の機能解明を行うことで、ウイルスの感染機構の解明や感染阻害剤の開発などの感染症対策に寄与すると期待される。すでに、本代表者らは、糖鎖プライマー法を用いてウイルス感受性細胞から得られた受容体糖鎖を微粒子表面に提示させることで、インフルエンザウイルスを検出することに成功している[6]。これにより、感染症サーベイランスで行われている赤血球凝集アッセイ法に変わる新技術へと展開することが可能となった。本研究の成果を活用することで、より効率的な検出法へと展開できると期待される。

引用文献

[1] T. Sato, *et al.*, TIGG, **19**, 1-17 (2007)
[2] T. Sato, *et al.*, Carbohydr. Res., **343**, 831-838 (2008)
[3] JE. Stencel-Baerenwald, *et al*, Nature Reviewers Microbiol., **12**, 739-749 (2014)
[4] R. Uraki and Y Kawaoka, Nature Chem. Biol, **18**, 6-7 (2022)
[5] SC. Wu, *et al*, Blood, **142**, 742-747 (2023)
[6] T. Matsubara, *et al.*, ACS Applied Bio Materials, **5**, 2130-2134 (2022)

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Daiki Yamamoto, Hiroshi Hongo, Takeo Kosaka, Natsumi Aoki, Mototsugu Oya, Toshinori Sato	４．巻 40
２．論文標題 The sialyl-Tn antigen synthase genes regulates migration-proliferation dichotomy in prostate cancer cells under hypoxia	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Glycoconj. J.	６．最初と最後の頁 199-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10719-023-10104-z	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 Daiki Yamamoto, Katsumasa Sasaki, Takeo Kosaka, Mototsugu Oya, Toshinori Sato	４．巻 32
２．論文標題 Functional analysis of GCNT3 for cell migration and EMT of castration-resistant prostate cancer cells	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Glycobiology	６．最初と最後の頁 897-908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwac044	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4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 奥田 真由、大形 一真、松原　輝彦、佐藤 智典
２．発表標題 動物細胞での発現糖鎖とインフルエンザウイルス感受性の相関解析による感染に関与する糖鎖の探索
３．学会等名 第32回バイオ・高分子シンポジウム
４．発表年 2022年

１．発表者名 奥田 真由、大形 一真、松原 輝彦、佐藤 智典
２．発表標題 糖鎖プライマー法を用いた動物細胞の糖鎖発現解析とインフルエンザウイルス感受性との相関解析
３．学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
４．発表年 2022年

１．発表者名 鈴木 寧々、松原 輝彦、佐藤 智典
２．発表標題 ファージ提示法によるSARS-CoV-2スパイク糖タンパク質に結合するペプチドの探索
３．学会等名 日本化学会第103春季年会
４．発表年 2023年

１．発表者名 山本 大樹，小坂 威雄，大家 基嗣，佐藤 智典
２．発表標題 低酸素環境における前立腺がん細胞の細胞遊走-増殖ダイコトミーに関わる0-グリカンの解明
３．学会等名 第45回日本分子生物学会年会
４．発表年 2022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