

3. インフルエンザウイルスが結合する糖鎖分子の機能解明

高橋 忠伸

静岡県立大学 薬学部 生化学分野

インフルエンザ A 型ウイルスが結合する糖鎖分子として、シアル酸分子種の一つ *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) が最も知られている。細胞表面上の糖鎖末端の Neu5Ac は、インフルエンザ A 型ウイルスの感染を開始する受容体として機能する。一方、インフルエンザ A 型ウイルスの中には、Neu5Ac だけでなく、シアル酸の主な分子種の一つ *N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) にも結合するものがある。さらに、3-*O*-硫酸化ガラクトシルセラミド (スルファチド) は構造中にシアル酸を含んでいないにもかかわらず、インフルエンザ A 型ウイルスが強く結合する糖鎖分子である。Neu5Gc やスルファチドはウイルスが結合することから、感染時のウイルス受容体と考えられてきた。ところが、これらの糖鎖分子は感染時のウイルス受容体としての機能は認められず、ヒト細胞上の Neu5Gc は感染を阻害する機能があること、スルファチドはウイルス産生を促進する機能があることが分かってきた。これらの糖鎖分子の機能は、感染予防や新しい抗ウイルス薬の開発に利用できるものと期待される。

1. はじめに

糖鎖分子はウイルスの感染に重要な役割を持っている。インフルエンザ A 型ウイルス (influenza A virus, IAV) が宿主細胞の表面に結合するとき、その標的は糖鎖末端のシアル酸である。IAV の表面糖タンパク質であるヘマグルチニン (hemagglutinin, HA) がシアル酸を認識する。IAV が結合するシアル酸の主要な分子種は、*N*-アセチルノイラミン酸 (*N*-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) と *N*-グリコリルノイラミン酸 (*N*-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc) である (図 1)。IAV と結合するシアル酸は、ヒトで豊富に発現する Neu5Ac のことを意味することが一般的である。しかし、ウマ IAV については、ウマに豊富に

発現する Neu5Gc との結合について報告されている。HA は糖鎖末端のシアル酸とその直下のガラクトースとの結合様式の違い、すなわちシアル酸の炭素 2 位 (α アノマー型) とガラクトースの炭素 3 位 (Neu5Ac α 2,3Gal) あるいは炭素 6 位 (Neu5Ac α 2,6Gal) とのグリコシド結合の違いを識別することができる。ヒトを宿主とする IAV は、ヒトの上気道に多い Neu5Ac α 2,6Gal で、比較的長い糖鎖 (特に 5~7 糖) と優先的に結合する^{1,2)}。トリを宿主とする IAV は、ニワトリの呼吸器などに多い Neu5Ac α 2,3Gal と優先的に結合する。トリ IAV では比較的短い糖鎖に結合しやすいか、あるいは糖鎖のアシアロ部分の糖構造はあまり関係しない^{2,3)}。Neu5Ac α 2,3Gal と Neu5Ac α 2,6Gal に対するウイルス受容体結合特異性は、トリ IAV がヒトへ、あるいはヒト IAV がトリへ感染できない、ウイルスの宿主特異性を決める要因の一つと言われている。高病原性 H5N1 型トリ IAV の受容体結合特異性がトリ型の Neu5Ac α 2,3 Gal からヒト型の Neu5Ac α 2,6 Gal へシフトすることが、ヒト感染モデルであるフェレット間で高病原性 H5N1 型トリウイルスが空気伝播する能力を獲得する一つの要因であることが分かっている⁴⁾。呼吸器に Neu5Ac α 2,6 Gal を豊富に持つフェレットはヒトと同様に Neu5Gc を合成できず、シアル酸分子種の観点からもヒト感染モデルに適し

連絡先

〒 422-8526

静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

静岡県立大学 薬学部 生化学分野

TEL: 054-264-5722

FAX: 054-264-5723

E-mail: takahasi@u-shizuoka-ken.ac.jp

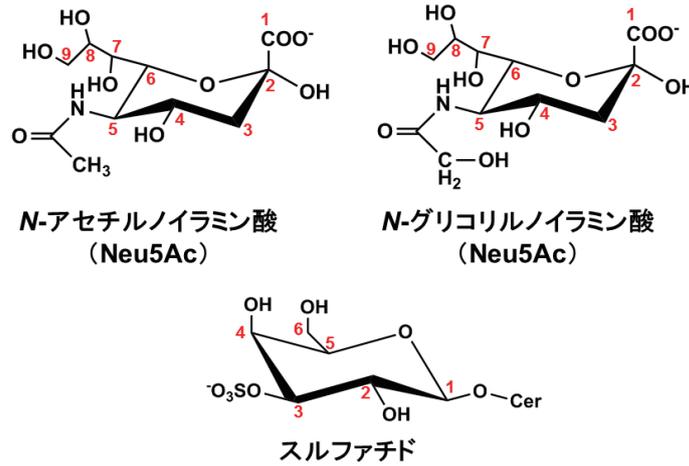


図1 IAV が結合する糖鎖の末端シアル酸 (Neu5Ac, Neu5Gc), スルファチドの構造
赤字の数字は糖の炭素原子の位置番号を示す。

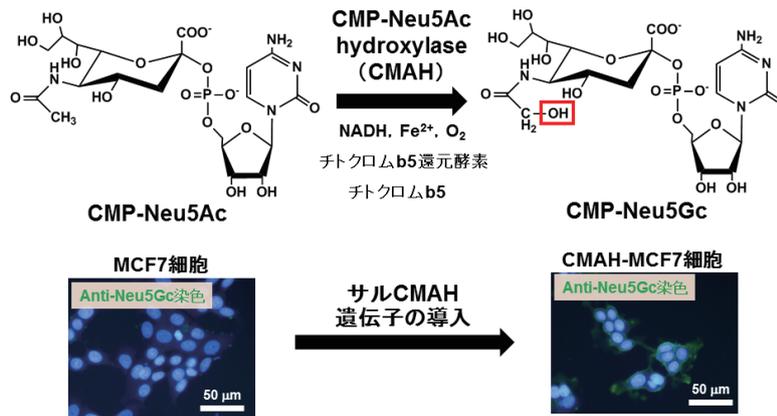


図2 Neu5Gcの生合成

赤枠内が CMAH による Neu5Ac 構造内の水酸化部位。図中の細胞の蛍光画像は、MCF7 細胞 (左) とサル CMAH 遺伝子を導入した CMAH-MCF7 細胞 (右) をパラホルムアルデヒド固定化後に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核染色 (青) と抗 Neu5Gc 抗体による Neu5Gc 染色 (緑) を行った。

ている⁵⁾。IAV の結合性が極めて高い糖鎖付加ポリグルタミン酸を使用して、ニワトリの気管ぬぐい液や排泄腔ぬぐい液のような検体中の高病原性 H5N1 型トリ IAV の受容体結合特異性を、数時間程度で高感度に測定する方法も報告されている⁶⁾。

もう一つのシアル酸分子種である Neu5Gc は、ヒト IAV^{7,8)}、ブタ IAV⁹⁻¹²⁾、カモ IAV¹³⁾、ウマ IAV¹⁴⁾ の多くが結合すること、さらに IAV が増殖できるブタ呼吸器上皮 (Neu5Ac mol : Neu5Gc mol = 47 : 53)⁹⁾、ウマ呼吸器上皮 (Neu5Ac と比較して Neu5Gc が 90% 以上)¹⁴⁾、ハト呼吸器 (Neu5Ac mol : Neu5Gc mol = 92.6 : 7.4)¹⁵⁾、カモ腸のクリプト細胞¹³⁾ に発現していることから、IAV 感染を開始させるウイルス受容体と信じられてきた。cytidine 5'-monophospho (CMP)-Neu5Ac から CMP-Neu5Ac hydroxylase (CMAH, EC 1.

14. 18. 2) とそのコファクターのチトクロム b5、チトクロム b5 還元酵素、NADH、2 価の鉄イオン、酸素によって、Neu5Ac 構造中の炭素 5 位の N-アセチル基が水酸化されて CMP-Neu5Gc が合成される (図2)^{16,17)}。CMP-Neu5Gc はシアル酸転移酵素 sialyltransferase の基質であり、Neu5Gc の糖鎖付加へ直接関与する。ヒト CMAH は、ゲノム上のコード領域の 92 塩基対が欠損したフレームシフト体で発現され、Neu5Gc 合成酵素能を持たない¹⁸⁻²⁰⁾。そのため、ヒト細胞は Neu5Gc を生合成できない。しかしながら、食物 (特にウシ・ブタ赤身肉や牛乳) に含まれる外来性の Neu5Gc が、ヒトの組織へ代謝的に取り込まれる^{21,22)}。IAV の増殖場所になりえる健常ヒトの肺気管支上皮内腔に、抗 Neu5Gc 抗体による免疫染色像が認められている²³⁾。Neu5Gc が IAV 感染を開始する受容体になりえるのなら、

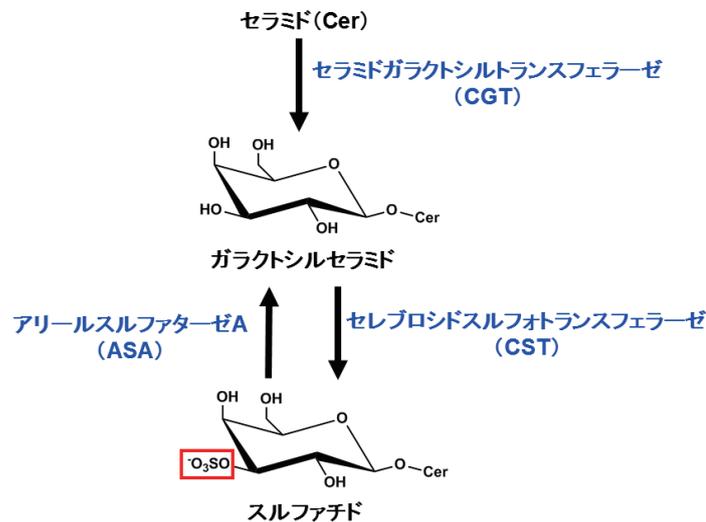


図3 スルファチドの生合成

赤枠内がCSTによるガラクトース構造内の硫酸化部位.

外来性の Neu5Gc のヒト組織への取り込みが, Neu5Gc 結合性を示すヒト IAV やブタなどの IAV のヒトへの感染伝播に影響することが考えられる. また, Neu5Gc に結合するヒト IAV がブタなどの動物に感染する際に Neu5Gc を受容体として利用するのなら, ブタの体内で IAV 間の遺伝子交雑を介して 1968 年にパンデミックを発生させた香港かぜのようなヒト IAV をベースとした新型 IAV の発生を促進させる恐れがある^{24,25)}. 実際に香港かぜウイルスには Neu5Gc 結合性が確認されている⁷⁾. そこで筆者らは, Neu5Gc が生合成できないヒト細胞において Neu5Gc を発現させた細胞を作製して感染性を比較することで, Neu5Gc が IAV 感染の受容体であるのか検証した.

また, IAV が結合する糖鎖分子として, シアル酸を含まない 3-O-硫酸化ガラクトシルセラミド (スルファチド, 又は SM4s と呼ぶ) が知られていた (図 1)²⁶⁾. スルファチドは Thudichum によってヒト脳から分離され, 哺乳動物では最初の硫酸化糖脂質として 1884 年に報告された²⁷⁾. スルファチドの代謝前駆体であるガラクトシルセラミドに硫酸基転移酵素の 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS):cerebroside sulfotransferase (CST, EC 2.8.2.11) が作用することで, ガラクトース残基の 3 位の炭素に結合した水酸基が硫酸化され, スルファチドが合成される^{28,29)}. このときの硫酸基は, 活性硫酸 PAPS から供与される. ガラクトシルセラミドは, 糖転移酵素の uridine diphosphate (UDP)-galactose:ceramide galactosyltransferase (CGT, EC 2.4.1.45) の作用により, UDP-ガラクトースからセラミド (Cer) へガラクトースが転移することで合成される^{30,31)}. CST 及び CGT は細胞内のゴルジ装置に発現して

いる. また, スルファチドは硫酸基分解酵素の arylsulfatase A (ASA, EC 3.1.6.8) の作用により硫酸基が特異的に切断され, ガラクトシルセラミドへ代謝される (図 3). ASA は主にリソソームに発現している. ASA 酵素活性の維持にはスフィンゴ脂質活性化タンパク質 saposin B (SapB) を必要とする^{32,33)}. スルファチドは細胞膜, ゴルジ装置, リソソームに多く存在している. さらにスルファチドは免疫, 神経, 糖尿病, 血栓形成, がん, 感染症などの疾患分野に関与する多くの生物活性を有する³⁴⁾. スルファチドはシアル酸を含まないが IAV が結合すること, さらに初代培養細胞のヒト気管支上皮 NHBE 細胞を絨毛細胞に分化させたときの絨毛にスルファチド発現が見られることから³⁵⁾, IAV 感染の受容体として機能するものと考えられていた. 筆者らは, IAV 感染におけるスルファチドの機能が受容体であるのか, あるいは別の機能があるのかを解析した.

2. IAV 感染における Neu5Gc の機能

2-1. HA の Neu5Gc 認識機構

IAV の表面糖タンパク質である HA は Neu5Ac 及び Neu5Gc のシアル酸分子種を認識して結合する. Neu5Ac 又は Neu5Gc を末端に持つネオラクト系列の合成糖脂質 (図 4) を展開したシリカゲル薄層板を用いたヒト IAV の受容体結合アッセイ (TLC ウイルス結合アッセイ) において, 検討したすべてのヒト IAV 株で Neu5Ac 結合性が見られた一方で, A/Memphis/1/1971 (H3N2) 株のみが Neu5Gc に結合性を示さなかった⁷⁾. 筆者らは, Neu5Gc 結合性を示すヒト IAV と Neu5Gc 結合性を持たない A/

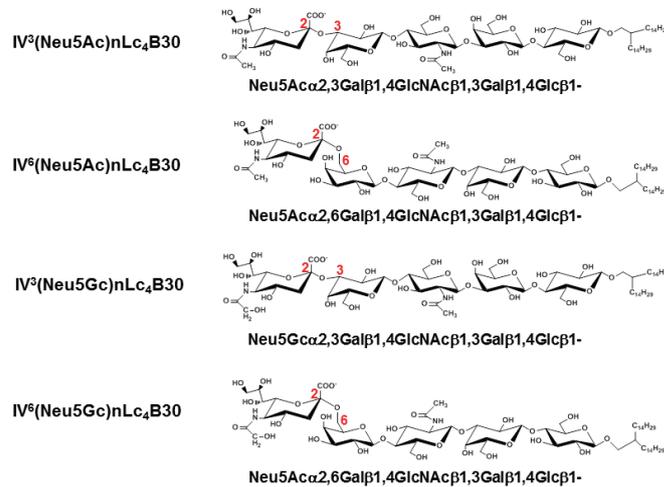


図 4 シアル酸分子種に対する IAV 結合性を評価するために使用した合成糖脂質

図中の赤字は、末端シアル酸と直下のガラクトースが α 2,3- 又は α 2,6- グリコシド結合を形成する炭素原子の位置番号を示す。

| ヒトIAV (H3N2) | HAの受容体結合部位の周囲の残基 | | | | | Neu5Ac結合 | | Neu5Gc結合 | |
|--------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 137 | 144 | 155 | 158 | 193 | α 2,3 | α 2,6 | α 2,3 | α 2,6 |
| A/Memphis/1/1971 | Asn | Gly | Thr | Glu | Ser | X | O | X | X |
| A/Hong Kong/1/1968 | Asn | Gly | Thr | Gly | Ser | O | O | O | O |
| A/Aichi/2/1968 | Asn | Asp | Thr | Gly | Ser | O | O | O | O |
| A/Memphis/102/1972 | Asn | Asp | Tyr | Gly | Ser | X | O | X | O |
| A/Tokyo/6/1973 | Asn | Asp | Tyr | Gly | Asn | X | O | X | O |
| A/Kumamoto/55/1976 | Ser | Asp | Tyr | Gly | Asp | O | O | O | O |
| A/Yamanashi/2/1977 | Ser | Asp | Tyr | Gly | Asp | O | O | O | O |
| A/Texas/1/1977 | Tyr | Asp | Tyr | Glu | Asn | X | O | X | O |
| A/Bangkok/1/1979 | Tyr | Asp | Tyr | Glu | Asn | X | O | X | O |

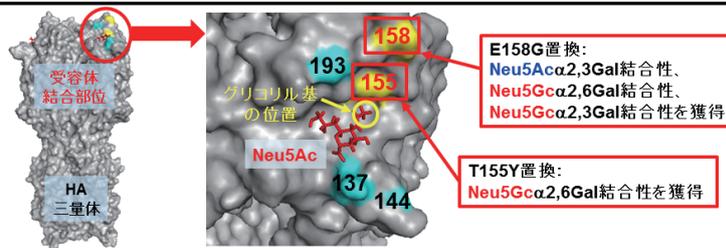


図 5 ヒト IAV の H3 型 HA の Neu5Gc 結合性を決めるアミノ酸置換

ヒト IAV の H3 型 HA の受容体結合部位の周囲のアミノ酸残基とシアル酸分子種結合性を比較した。テーブル内の赤枠は、A/Memphis/1/1971 株に Neu5Gc 結合性が無いことを示す (上)。A/Memphis/1/1971 株が Neu5Gc 結合性を獲得するアミノ酸残基の置換と HA の三量体立体構造上 (PDB ID, 1hgg) の位置 (下)。HA のアミノ酸残基は灰色の surface model で示した。HA の受容体結合部位に結合した Neu5Ac は赤色の stick model で示した。置換したアミノ酸残基の中で、Neu5Gc 結合性を獲得させるものを黄色、Neu5Gc 結合性に関与しなかったものを水色で示した。

Memphis/1/1971 株の H3 型 HA のアミノ酸配列を比較し、HA の受容体結合部位の周囲から、Neu5Gc 結合性に関与が疑われる 137, 144, 155, 158, 193 番目 (A/Memphis/1/1971 株の H3 型 HA のアミノ酸番号) の 5 個のアミノ酸残基を選定した (図 5)。Neu5Gc 結合性を持たない A/

Memphis/1/1971 株の HA に、N137Y, G144D, T155Y, E158G, S193N の各アミノ酸置換を導入した。リバーズジェネティクス法により³⁶⁾、A/WSN/1933 (H1N1) 株の HA 遺伝子のみを A/Memphis/1/1971 株の各アミノ酸置換を含む HA 遺伝子に置換した IAV を作製した。これらの

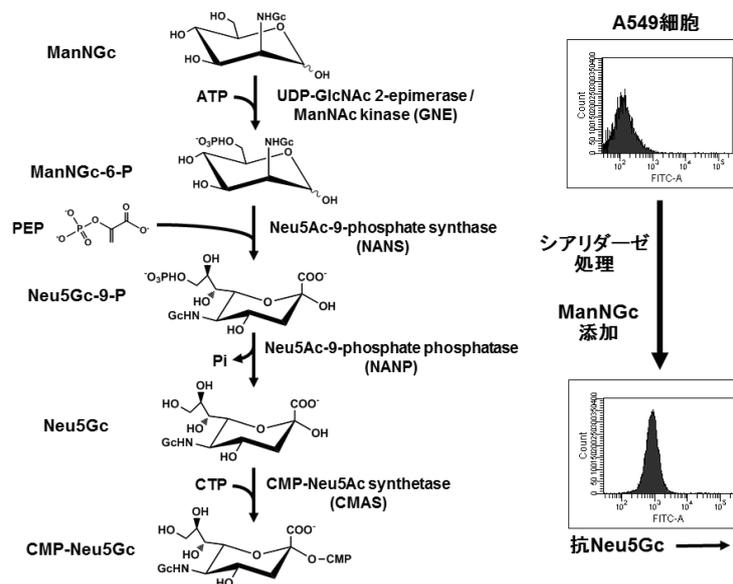


図6 ManNGc から CMP-Neu5Gc への代謝

細胞内の ManNGc から CMP-Neu5Gc への代謝は、ManNAc から CMP-Neu5Ac への代謝と同じ経路とされる。ManNGc から Neu5Gc までの経路は細胞質内、CMP-Neu5Gc 合成は核内、CMP-Neu5Gc から糖鎖への Neu5Gc 付加はゴルジ装置で行われる。糖構造中のグリコシル基は Gc と省略した。右のヒストグラムは、A549 細胞をシアリダーゼ処理後、未添加（上）及び ManNGc を添加（下）して 3 日間培養したときの細胞表面（パラホルムアルデヒド固定）の Neu5Gc 発現量を抗 Neu5Gc 抗体染色によりフローサイトメーターで測定したものの。

IAV に対して、図 4 に示した合成糖脂質を用いて TLC ウイルス結合アッセイ及びマイクロプレートに固相化した合成糖脂質に対する ELISA ベースの IAV 結合アッセイ (solid-phase ウイルス結合アッセイ) を行った。HA に T155Y あるいは E158G のアミノ酸置換を導入した IAV で Neu5Gc 結合性が見られた。155 番目のアミノ酸置換は、1986 年に Anders らの報告で Neu5Gc 結合性への関与が示唆されていたアミノ酸置換と一致していた³⁷⁾。HA に N137Y あるいは S193N のアミノ酸置換を導入した IAV は、A/Memphis/1/1971 株と同様に Neu5Ac α 2,6Gal のみに強い結合性を示した。HA に G144D のアミノ酸置換を導入した IAV は、使用した合成糖脂質にほとんど結合性を示さなかった。HA の T155Y のアミノ酸置換により、IAV は Neu5Gc α 2,6Gal への結合性を新たに獲得した。興味深いことに、HA の E158G のアミノ酸置換により IAV は Neu5Gc α 2,6Gal だけでなく、Neu5Gc α 2,3Gal と Neu5Ac α 2,3Gal への結合性も新たに獲得した。HA ホモ三量体の立体構造上で 155 番目のアミノ酸残基は、受容体結合部位に結合した Neu5Ac の *N*-アセチル基において Neu5Gc 合成時に水酸化される部位の極めて近傍に位置していた。158 番目のアミノ酸残基も Neu5Ac の *N*-アセチル基において Neu5Gc 合成時に水酸化される部位の近傍に位置していたが、155 番目と比べてやや離れた場所に位置していた (図 5)⁸⁾。E158G 置換によりアミノ酸の側鎖が小さくなる

ため、155 番目のアミノ酸残基に影響して Neu5Gc 結合性を獲得するとともに、シアロ糖鎖へのアクセスが向上して Neu5Ac α 2,3Gal や Neu5Gc α 2,3Gal への結合性も獲得したのかもしれない。この研究により、A/Memphis/1/1971 株が Neu5Gc 結合性を獲得するためには、H3 型 HA 上の T155Y あるいは E158G 置換が必要であることが分かった。

2-2. Neu5Gc を発現するヒト細胞の作製

ヒトは Neu5Gc 合成酵素をコードする CMAH 遺伝子を欠損しているため、Neu5Gc を生合成できない。そこで、アフリカミドリザル腎由来 COS7 細胞からクローニングしたサル CMAH 遺伝子をヒト細胞に安定発現させて、Neu5Gc を生合成できるヒト細胞を作製した。なおサル CMAH は、バキュロウイルスタンパク質発現システムにより分泌型タンパク質に改変して発現・精製後、CMP-Neu5Ac と NADH とともに、チトクロム b5 及びチトクロム b5 還元酵素の供給源としてラット肝ミクロソーム画分、さらに 2 価の鉄イオンと反応させることで CMP-Neu5Gc を生成した (図 2)^{16,17)}。COS7 細胞に由来するサル CMAH が Neu5Gc 合成酵素活性を示すことを確認した³⁸⁾。また *N*-グリコシダーゼ F 処理により分子量が低下したことから、サル CAMH が Asn-X (X は Pro 以外の任意のアミノ酸) -Ser 又は -Thr 配列中の Asn 残基に糖鎖が結合した *N* 型糖タンパク質であることも明らかにした³⁸⁾。サル CMAH

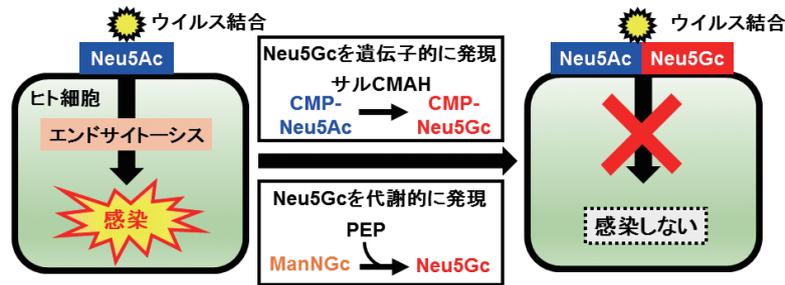


図7 IAV 感染におけるヒト細胞上の Neu5Gc の機能

ヒト細胞は CMAH 遺伝子欠損のため、Neu5Gc を生合成できない。IAV は細胞表面に結合後、エンドサイトーシスにより細胞内へと侵入して感染する (左)。サル CMAH 遺伝子の導入及び ManNGc の添加により、それぞれヒト細胞で遺伝子的及び代謝的に Neu5Gc を発現できる。Neu5Gc 結合性を示す IAV は Neu5Gc 発現細胞の表面に結合するが、エンドサイトーシスされずに感染が抑制される (右)。

遺伝子を導入するヒト細胞は、ヒト乳がん由来 MCF7 細胞を選択した。細胞における IAV の増殖には、アポトーシスシグナルのカスパーゼ 3 の活性化が必要と報告されている。カスパーゼ 3 の活性化は、感染細胞内で新しく合成された IAV 核タンパク質 (nucleoprotein, NP) を、核内から核外へ核膜を介して効率的に輸送させるために重要な宿主因子である³⁹⁾。感染細胞でウイルスが効率的に増殖すると新生ウイルスが感染拡大して感染細胞数が増加し、初期の感染性を正確に把握できない恐れがある。感染時の受容体機能の検証として、ウイルスの感染性をできる限り正確に評価するため、感染後にウイルスが増殖しない細胞が適している。MCF7 細胞はカスパーゼ 3 遺伝子を欠損しており、感染性の評価に適した細胞と考えられる⁴⁰⁾。サル CMAH 遺伝子を安定発現させた MCF7 細胞 (CMAH-MCF7 細胞) では、Neu5Gc $\alpha 2,3\text{Gal}$ を認識するが Neu5Ac $\alpha 2,3\text{Gal}$ は認識しないニワトリ抗 Neu5Gc 抗体^{13,14,41,42)}により細胞表面の Neu5Gc 発現が確認された (図 2)。細胞に含まれるシアル酸分子種は、硫酸処理によりシアル酸のグリコシド結合を酸加水分解後、遊離したシアル酸を直接 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) 蛍光標識して逆相分析カラム HPLC により定量した^{9,43)}。細胞のタンパク質量 1 mg あたりのシアル酸分子種の含量は、親 MCF7 細胞で Neu5Ac は 1.90 nmol、Neu5Gc は 0.15 nmol、CMAH-MCF7 細胞で Neu5Ac は 1.54 nmol、Neu5Gc は 1.71 nmol であった。親細胞に検出される微量な Neu5Gc 含量は、細胞培養培地に添加したウシ血清中に含まれる Neu5Gc の代謝的な取り込みに由来するものと考えられる。細胞表面の糖鎖末端のシアル酸結合様式を、 $\alpha 2,6$ 型は *Sambucus nigra* (elderberry) レクチン SNA で、 $\alpha 2,3$ 型は *Maackia amurensis* レクチン MAL-I で検出した。これらのレクチンは Neu5Ac と Neu5Gc の両方を検出できる⁴⁴⁾。MAL-I は Ser や Thr 残基に糖鎖が結合した O 型糖鎖の $\alpha 2,3$ 型を検出できないので、これを検出できる *Maackia*

amurensis レクチン MAL-II も使用した⁴⁵⁾。両細胞間で細胞表面への MAL-I 結合量は同程度であった。一方、SNA 及び MAL-II 結合量は親細胞と比べて CMAH-MCF7 細胞で大きくなっており、見かけ上は $\alpha 2,6$ 型及び O 型糖鎖の $\alpha 2,3$ 型が細胞表面に増加した結果を示した。ただし、レクチンの結合性に糖鎖末端のシアル酸分子種を考える必要がある。例えば、MAL-I は Neu5Gc あるいは Neu5Ac $\alpha 2,6\text{Gal} \beta 1,4 \text{GlcNAc} \beta 1,2\text{Man} \beta 1,3(\text{Neu5Gc}$ あるいは Neu5Ac $\alpha 2,6\text{Gal} \beta 1,4\text{GlcNAc} \beta 1,2\text{Man} \beta 1,6)\text{Man} \beta 1,4\text{GlcNAc} \beta 1,4\text{GlcNAc}$ 構造において末端シアル酸分子種が Neu5Ac よりも Neu5Gc で 4~5 倍低い結合性を示し⁴⁴⁾、さらに MAL-II は O 型糖鎖のコア 1 構造として知られる Neu5Ac $\alpha 2,3\text{Gal} \beta 1,3\text{GalNAc}$ よりも Neu5Gc $\alpha 2,3\text{Gal} \beta 1,3\text{GalNAc}$ に 1.49 倍高い結合性を示す⁴⁵⁾。CMAH-MCF7 細胞におけるレクチン結合量の変動は Neu5Gc を含む糖鎖の増加に大きく影響していると予想されるが、シアル酸分子種が変化するとき、必ずしも $\alpha 2,3$ 型及び $\alpha 2,6$ 型の量の変化に直接的に反映しないものと思われる。

IAV の感染性に Neu5Gc 発現が与える影響が、他のヒト細胞株においても同様な結果を示すのか確認する必要がある。Neu5Gc や N-グリコリルマンノサミン (N-glycolylmannosamine, ManNGc) を細胞に添加すると、細胞内に取り込まれて CMP-Neu5Gc まで代謝され、Neu5Gc 含有糖鎖が合成される。しかし、遊離シアル酸はその負電荷と親水性の性質から、細胞内へ効率的に取り込ませる実験には適さないと考えられてきた。そのため代謝的に Neu5Gc を発現させる実験では、伝統的に ManNGc が使用されてきた²¹⁾。ManNGc の水酸基をアセチル化することで細胞膜の透過性を高めた ManNGc pentaacetate も使用される。細胞内に取り込まれた ManNGc pentaacetate は、細胞内のエステラーゼによりアセチル基が分解されて ManNGc へと変換される。細胞内の ManNGc から CMP-Neu5Gc への代謝は、N-アセチルマンノサミン (N-acetylmannosamine, ManNAc)

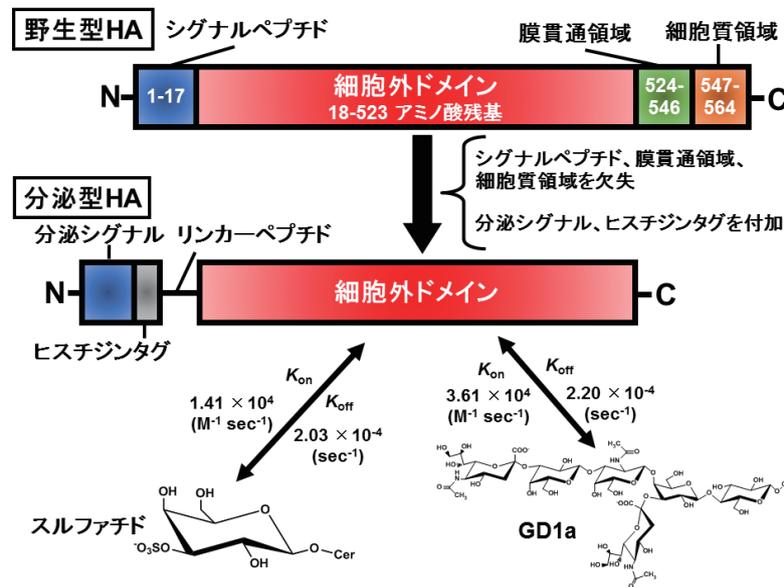


図8 バキュロウイルススタンプ質発現システムによる分泌型 HA の作製とスルファチド結合パラメータ

野生型 HA の膜貫通領域及び細胞質領域を除去して可溶化した。さらにシグナルペプチドを分泌シグナルと精製・検出用のヒスチジンタグに置き換えて分泌型 HA を作製した。分泌型 HA のスルファチド結合パラメータ及びガングリオシド GD1a 結合パラメータの K_{on} , K_{off} を QCM により測定した。

から CMP-Neu5Ac への代謝と同じ経路とされる。細胞質内の ManNGc は、UDP-GlcNAc 2-epimerase (別名 ManNAc kinase) (GNE) により ManNGc-6-phosphate へ、さらにこれと phosphoenolpyruvic acid (PEP) から Neu5Ac-9-phosphate synthase (NANS) により Neu5Gc-9-phosphate へ変換される。これに Neu5Ac-9-phosphate phosphatase (NANP) が作用すると Neu5Gc となり、核内で CMP-Neu5Ac synthetase (CMAS) により CTP と反応して CMP-Neu5Gc が生成される (図 6)⁴⁶⁾。CMP-Neu5Gc はゴルジ装置に運ばれ、シアル酸を糖鎖末端に転移する酵素 sialyltransferase の基質になる。本研究では、ヒト肺がん由来 A549 細胞に ManNGc を添加することで代謝的に Neu5Gc を発現させた。糖鎖への Neu5Gc の転移を促進するため、ManNGc 添加前に細胞上の Neu5Ac α 2,3Gal 及び Neu5Ac α 2,6Gal (さらに Neu5Ac α 2,8Neu5Ac) のシアル酸を *Arthrobacter ureafaciens* のシアリダーゼで切断した。A549 細胞表面上の Neu5Gc 発現量はニワトリ抗 Neu5Gc 抗体染色により比較し、ManNGc 添加による Neu5Gc 発現量の増加を確認した (図 6)。

2-3. IAV 感染における Neu5Gc の受容体機能の評価

ヒト IAV の TLC ウイルス結合アッセイにおいて、A/Aichi/2/1968 (H3N2) 株は Neu5Ac α 2,3Gal, Neu5Gc α 2,3Gal, Neu5Ac α 2,6Gal 及び Neu5Gc α 2,6Gal, A/Memphis/102/1972 (H3N2) 株は Neu5Ac α 2,6Gal 及び Neu5Gc α 2,6Gal, A/Memphis/1/1971 (H3N2) 株は Neu

5Ac α 2,6Gal のみに結合性が見られる⁷⁾。TLC ウイルス結合アッセイや solid-phase ウイルス結合アッセイにおいて、A/equine/Miami/1963 (H3N8) 株, A/equine/Fontainebleau/1/1979 (H3N8) 株, A/equine/Tennessee/5/1986 (H3N8) 株, A/equine/Ibaraki/1/2007 (H3N8) 株などウマ IAV は一般的に Neu5Gc α 2,3Gal に結合性を示す^{14,47)}。Neu5Gc を発現するヒト細胞を作製したので、Neu5Gc を生合成できない親細胞との間でこれらのウイルスの感染性を比較した。Neu5Gc 結合性を示すヒト IAV の A/Aichi/2/1968 (H3N2) 株, A/Memphis/102/1972 (H3N2) 株, ウマ IAV の A/equine/Miami/1963 (H3N8) 株, A/equine/Fontainebleau/1/1979 (H3N8) 株, A/equine/Tennessee/5/1986 (H3N8) 株の感染性は、親 MCF7 細胞を 100% としたとき CMAH-MCF7 細胞で 5~46% 程度まで低下した。A/equine/Ibaraki/1/2007 (H3N8) 株は親 MCF7 細胞で感染 (50% tissue infectious dose, TCID₅₀ は 10^{5.41}) が見られたのに対し、CMAH-MCF7 細胞で感染 (TCID₅₀ < 10²) は検出できなかった。一方、Neu5Gc 結合性を持たないヒト IAV の A/Memphis/1/1971 (H3N2) 株の感染性は、両細胞間で同程度であった。このため、ヒト IAV 感染における Neu5Ac (特に Neu5Ac α 2,6Gal) の受容体機能は、両細胞間で有意な差はないものと示唆される。ManNGc 添加により Neu5Gc を代謝的に発現させた A549 細胞においても、未添加及び ManNAc 添加 A549 細胞と比べて、A/Memphis/102/1972 (H3N2) 株と A/equine/Fontainebleau/1/1979 (H3N8) 株の有意な感染低下が見られた。Neu5Gc が感染

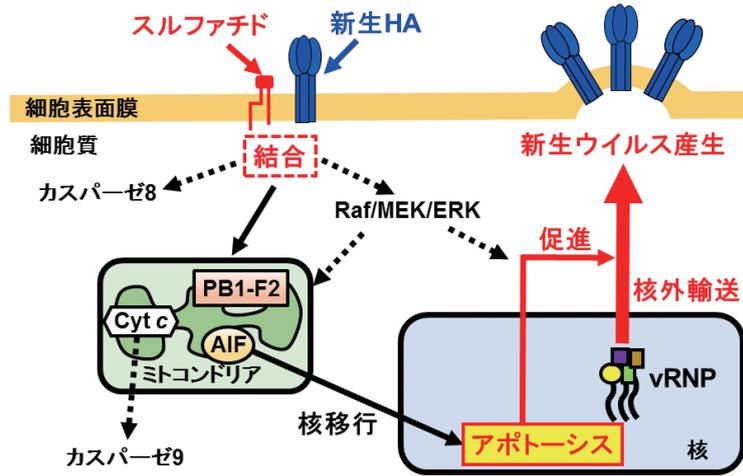


図9 スルファチドを介した IAV 増殖促進機構
点線矢印は推定される経路を示す。

における受容体として機能するのなら、Neu5Gc 発現によって感染性の増加が予想される。しかしその予想に反して、Neu5Gc を発現したヒト細胞で、Neu5Gc 結合性を示す IAV の感染は低下していた。

A/Memphis/1/1971 (H3N2) 株の HA の T155Y アミノ酸置換は Neu5Gc α 2,6Gal への結合性を獲得させる⁸⁾。A/WSN/1933 (H1N1) 株の HA 遺伝子のみを A/Memphis/1/1971 株の野生型 HA 遺伝子及び T155Y 置換を導入した HA 遺伝子に置換した IAV を作製し、親 MCF7 細胞と CMAH-MCF7 細胞の間の感染性を比較した。A/Memphis/1/1971 株の野生型 HA を持つ IAV の感染性は、両細胞間で同程度であった。T155Y 置換の HA を持つ IAV の感染性は、親 MCF7 細胞を 100% とすると CMAH-MCF7 細胞で 19 ~ 27.9% まで低下した。親 MCF7 細胞と CMAH-MCF7 細胞に高感染価のこれらの IAV を吸着させ、固定化後に抗 NP 抗体染色によりウイルスの細胞侵入を検出したところ、CMAH-MCF7 細胞で T155Y 置換の HA を持つ IAV が細胞表面に留まっていた。Neu5Gc に結合性を示す IAV は細胞表面の Neu5Gc と結合すると、細胞内への侵入が抑制されるものと示唆される (図 7)⁴⁸⁾。ブタ初代呼吸器細胞へ ManNGc を添加して Neu5Gc を発現させたとき、ブタ IAV の感染性は顕著に低下するため、ブタ IAV の感染に重要な受容体は Neu5Ac であると報告されている⁴⁹⁾。Neu5Gc が生合成できる哺乳動物において、Neu5Gc 結合性を示す IAV は Neu5Ac の発現比率が高い細胞や組織へ選択的に感染する可能性が考えられる。ブタとヒトの細胞で同様な結果が得られていることから、Neu5Gc 発現の感染阻害作用が哺乳動物細胞で共通した機構であるかもしれない。

2-4. IAV 感染における Neu5Gc 機能の考察

CMAH-MCF7 細胞の表面では、親 MCF7 細胞と比べて SNA と MAL-II の結合が増加している。しかし今までの結果は、Neu5Gc 発現による IAV の感染阻害作用が、シアル酸結合様式 (Neu5Ac α 2,3Gal 及び Neu5Ac α 2,6Gal) の差というよりもむしろ Neu5Gc 発現に起因することを示している。ヒト細胞上に発現した Neu5Gc は IAV の結合分子ではあるが、感染を抑制する「偽受容体」として機能するものと考えられる。IAV は細胞表面の受容体に結合後、エンドサイトーシスを介して細胞内へ侵入する。Neu5Gc 含有糖鎖は、IAV のエンドサイトーシス機構に関与しないのかもしれない。IAV 表面の 10% が細胞表面に接触すると、IAV は 600 ~ 4,500 個のシアル酸をカバーできるものと見積もられている⁵⁰⁾。Neu5Gc 結合性を示す IAV の 1 粒子は、Neu5Gc 発現細胞上で Neu5Ac と Neu5Gc の両方に結合するはずである。IAV 粒子に結合するシアル酸の Neu5Gc 比率が高いと、IAV のエンドサイトーシス効率が著しく低下するのかもしれない。ヒト初代呼吸器細胞では、ヒトとトリの IAV は細胞上のシアル酸結合様式を標的にすることで、特定の細胞へと感染が制限される⁵¹⁾。ヒトが Neu5Gc を合成できないにもかかわらず、健康ヒトの肺気管支上皮内腔に抗 Neu5Gc 抗体による免疫染色像が認められている²³⁾。これは食事の Neu5Gc に由来するものとされる。食物 (特にウシ・ブタ赤身肉や牛乳) に含まれる外来性の Neu5Gc がヒトの肺気管支上皮へ代謝的に取り込まれることで^{21,22)}、Neu5Gc 結合性を示す IAV の感染が制限されることも十分考えられる。Neu5Gc 含有食品や食品成分としての Neu5Gc の摂取は、IAV の感染予防につながる事が期待される。Neu5Gc 結合性を示す IAV の感受性が、ウシ・ブタ赤身肉のような Neu5Gc 含有量の多い食品を継続的に摂

取するヒトでは低く、シアル酸を含まない野菜や Neu5Gc を含まないニワトリ肉を積極的に摂取するヒトでは高いといった、IAV 感受性の個人差が生じてくるかもしれない。

進化的にはヒトに近い遺伝子を持つチンパンジーにまで発現している CMAH が、ヒトに至る過程で消失した仮説の一つに感染症への耐性がある。Neu5Gc を生合成できないヒトは、Neu5Gc を生合成できるウシやブタを家畜とするようになった。これらの家畜動物で重篤な下痢症状を起こす病原体の *E. coli* K59, 伝染性胃腸炎ウイルス, ウシロタウイルス株などは Neu5Gc に結合する。また、重篤な胃腸症状を引き起こす腸管出血性大腸菌のサブチラーゼ毒素も Neu5Gc へ特異的に結合するため、Neu5Gc 含量の多いブタやウシの赤身肉を汚染するとされる⁵²⁾。ヒトは Neu5Gc を合成しないことで、家畜動物を介したこれらの感染症や毒素に耐性を持つようになったとされる^{20,53)}。ただし、ヒトが Neu5Gc 豊富な食事を摂取すると、腸管上皮や腎臓の脈管に Neu5Gc が発現し、サブチラーゼ毒素に感受性になる⁵²⁾。一方で CMAH 欠損により、Neu5Ac 結合性のヒトマラリア娘虫体、コレラ毒素、ヘリコバクターピロリなどはヒトに感受性になったとされる⁵³⁾。このように、ヒトの CMAH 欠損及び Neu5Gc 発現は感染症や毒素の感受性を制御しているものと考えられている。ヒト IAV は Neu5Gc 結合性を持たない株でさえ Neu5Ac 結合性を示すこと、さらにヒト細胞の Neu5Gc 発現は Neu5Gc 結合性を示す IAV の感染を抑制することから、ヒトの CMAH 欠損に至る進化は IAV の感受性を高めるように作用したと思われる。IAV は家畜のトリやブタの感染症でもあるが、シアル酸結合様式の特異性など異宿主間の感染バリアが存在しているため⁵⁴⁾、上記のヒト CMAH 欠損の仮説「家畜動物の感染症への耐性化」には当てはまらないようである。

3. IAV 感染増殖におけるスルファチドの機能

3-1. シアル酸を含まない糖脂質スルファチドと IAV の結合

IAV がシアロ糖鎖末端のシアル酸に結合することは広く知られている。一方、IAV は、シアル酸を含まない硫酸化糖脂質であるスルファチドにも結合する²⁶⁾。IAV のスルファチドへの結合は、抗 HA モノクローナル抗体により阻害された。そのため、スルファチドと結合するウイルス側因子は、シアル酸と同様に HA であることが示唆される^{55,56)}。HA がウイルス側のスルファチド結合因子であることを示すため、スルファチド結合性の高いトリ IAV の A/duck/Hong Kong/313/4/1978 (H5N3) 株の HA に精製・検出用のヒスチジンタグを付加し、バキュロウイルススタンパク質発現システムにより生産及び精製してスルファチド結合性を解析した。この HA は赤血球凝集活性や α 2,3 シアリルパラグロブシド (Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β 1,1Cer) への結合性を示し、シアル酸結合能が維持されていることを確認した。HA の立体構造を

認識して A/duck/Hong Kong/313/4/1978 (H5N3) 株の赤血球凝集活性を阻害する抗 H5 型 HA モノクローナル抗体は、バキュロウイルススタンパク質発現システムで生産した HA の赤血球凝集活性も阻害した。一方、A/Memphis/1/1971 (H3N2) 株の赤血球凝集活性を阻害する抗 H3 型 HA モノクローナル抗体では、その赤血球凝集阻害活性は見られなかった。バキュロウイルススタンパク質発現システムで生産した HA がウイルスと同様の抗原性を持つことが確認された。この HA のスルファチド結合性は、スルファチド固相化マイクロプレートを利用した ELISA 法により確認された。スルファチド結合性は抗 H5 型 HA モノクローナル抗体で阻害されたが、抗 H3 型 HA モノクローナル抗体では阻害されなかった。IAV とスルファチドの間の結合は HA を介していることが分かった⁵⁷⁾。

ここでバキュロウイルススタンパク質発現システムにより生産した HA は、膜糖タンパク質の疎水性膜貫通領域を含む。そのため HA の回収精製の操作には細胞の破碎が必要である。さらにこの HA は溶液中で可溶化せずに凝集するため、常に界面活性剤 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate (CHAPS) の添加も必要になる。HA の生産性及び精製効率を向上させ、HA のスルファチド結合パラメータを測定するために十分な HA 量の回収をめざすことにした。HA の C 末端側にある膜貫通領域と細胞質内領域を除去し、シグナルペプチド領域をバキュロウイルス gp64 分泌シグナル及びヒスチジンタグで置き換えることで、可溶性の分泌型 HA を作製した (図 8)。これによりバキュロウイルスの感染した昆虫細胞の培養上清のみから細胞を破碎せずに HA を回収精製できるようになり、さらに界面活性剤の添加も不要になったことから、HA の生産性、精製効率、精製後の実験操作への適用性が格段に向上した。この分泌型 HA にも、赤血球凝集活性、抗原性、 α 2,3 型シアロ糖脂質のガングリオシド GD1a [Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Ac α 2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer] 及びスルファチドへの結合性が維持されていることを確認した。分泌型 HA は HA の細胞外ドメインであることから、スルファチドと結合している領域は HA の細胞外ドメインであることが分かった。水晶振動子マイクロバランス (quartz crystal microbalance, QCM) を用いて、分泌型 HA のスルファチド結合パラメータの結合速度定数 K_{on} ($M^{-1} sec^{-1}$), 解離速度定数 K_{off} (sec^{-1}), 解離定数 K_d (M) を測定した。分泌型 HA のスルファチドに対する K_{on} , K_{off} , K_d は、それぞれ 1.41×10^4 , 2.03×10^{-4} , 1.44×10^{-8} であった。ガングリオシド GD1a に対する K_{on} , K_{off} , K_d は、それぞれ 3.61×10^4 , 2.20×10^{-4} , 6.10×10^{-9} であった (図 8)。GD1a でシアル酸がない構造のアシアロ糖脂質 GA1 (Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc β 1,1Cer) への結合性は見られなかった。分泌型 HA のスルファチド結合パラメータはシアル酸を持つガングリオシド GD1a と比べて、 K_{off}

はほぼ同程度だが、 K_{on} では約2.6倍小さい値を示した。IAVの宿主細胞表面への吸着時、IAVは実際の受容体であるシアル酸を持つ糖鎖へ優先的に結合するものと考えられる⁵⁸⁾。

3.2. IAV 感染増殖におけるスルファチドの機能解析

IAV 感染増殖におけるスルファチドの機能を解析するため、ガラクトシルセラミドの発現がないためにスルファチドが欠損しているアフリカミドリザル腎由来 COS7 細胞を用いて⁵⁹⁾、スルファチド高発現細胞の作製を試みた。学術研究機関や衛生検査機関において IAV の培養や感染実験で一般的に使用されるイヌ腎由来 MDCK 細胞は、スルファチドを豊富に発現している。MDCK 細胞から CST 遺伝子及び CGT 遺伝子をクローニングし、COS7 細胞に導入した(図 3)。CGT 及び CST 遺伝子を安定発現している 2 株の COS7 細胞 (SulCOS1 細胞, SulCOS2 細胞) の細胞表面のスルファチド発現を、フローサイトメーターを用いた抗スルファチドモノクローナル IgM 抗体 (GS-5)⁶⁰⁻⁶²⁾ の染色により確認した。スルファチド高発現により、IAV の A/WSN/1933 (H1N1) 株の感染性がわずかに低下した一方で、IAV の増殖性及び感染細胞の IAV 産生は大きく増加した。MDCK 細胞にヒト ASA 遺伝子の導入または CST mRNA に対する RNA 干渉法によりスルファチド発現を低下させると、IAV 増殖性は大きく減少した。また、GS-5 を感染 4 時間以降の MDCK 細胞に添加したとき、IAV 増殖性及び感染細胞の IAV 産生は大きく減少した。SulCOS1 細胞においても、GS-5 添加により IAV 増殖性及び感染細胞の IAV 産生は大きく減少した。新たに合成された HA が感染細胞表面に発現するのは感染 5~6 時間後であること、抗体を積極的に細胞内へ取り込む処理はしていないことから、感染細胞表面に移行した新生 HA とスルファチドの結合が IAV 産生を促進したものと示唆される。また、スルファチドは IAV 感染の受容体としては機能していないことが分かった⁵⁵⁾。先に述べた HA のスルファチド結合パラメータは、IAV の細胞表面吸着時にスルファチドよりもシアロ糖鎖へ優先的に結合することを示していた。さらに、単糖構造のスルファチドの糖鎖としての長さは、複数の単糖構造で構成される一般的なシアロ糖鎖と比べて極めて短い。IAV が細胞表面吸着時に優先して接触する糖鎖受容体として、短いスルファチドは適していないものと考えられる。反対に、細胞内で合成されて細胞表面に移行した新生 HA は長いシアロ糖鎖よりも短いスルファチドに接触しやすい。糖鎖分子の長さの点で、新生 HA がスルファチドと結合することは理にかなっているものと考えられる。

スルファチド高発現が、感染細胞の IAV 産生を促進する機構について解析するため、感染細胞に発現する IAV 表面糖タンパク質の HA 及びノイラミニダーゼ (neuraminidase, NA) と IAV 内部タンパク質の NP の分

布を各モノクローナル抗体の染色により調べた。A/Memphis/1/1971 (H3N2) 株の感染 7 時間後、HA と NA は親 COS7 細胞とスルファチドを高発現させた SulCOS1 細胞ともにゴルジ装置及び細胞膜表面に局在していた。NP は親 COS7 細胞で核に局在していたが、SulCOS1 細胞では核外に輸送されて細胞質に局在していた。SulCOS1 細胞への GS-5 添加や MDCK 細胞への CST mRNA に対する RNA 干渉法により、感染細胞内の新生 NP の核外輸送は抑制されて核に局在した。感染細胞の核内で NP は、ウイルス RNA ゲノムとウイルス RNA ポリメラーゼのサブユニット (PB1, PB2, PA) とともに viral ribonucleoprotein (vRNP) 複合体を形成し、核膜を介して細胞質へ輸送されて新生 IAV 粒子の内部構成成分となる。細胞表面に移行した新生 HA とスルファチドの結合は、感染細胞の核内で形成された vRNP 複合体の核外輸送を促進して IAV 産生を大きく増加させるものと示唆される⁵⁵⁾。

3.3. スルファチドの IAV 増殖促進機構

スルファチドの高発現により、A/WSN/1933 (H1N1) 株感染細胞の初期アポトーシスの指標である phosphatidylserine (PS) の膜表面内側から外側への露出が促進された。ミトコンドリアの膜電位消失が見られることから、このアポトーシスシグナルはミトコンドリアを介していることが分かった。カスパーゼ 8 及びカスパーゼ 9 の活性化は見られたが、一方でアポトーシスの代表的な指標であるカスパーゼ 3 の活性化は見られなかった。そこで、ミトコンドリアに局在するアポトーシス誘導因子 (apoptosis inducing factor, AIF) について調べた。AIF は核へ移行するとカスパーゼ 3 活性化を介さずにアポトーシスを誘導できる⁶³⁾。SulCOS1 細胞では、IAV 感染により AIF の核移行が見られた。ミトコンドリアの膜安定化剤であるシクロスポリン A⁶⁴⁾ や GS-5 の添加は、PS の細胞表面露出、ミトコンドリア膜電位消失、AIF の核移行、NP の核外輸送を抑制した。シクロスポリン A の添加や AIF mRNA に対する RNA 干渉法により IAV 増殖性は減少した。新生 HA とスルファチドの結合は、これらのアポトーシスシグナルを介してアポトーシスを促進するとともに、NP の核外輸送を促進して IAV 産生を増加させることが分かった。

スルファチドを介したアポトーシスにミトコンドリアの膜電位消失がかかわることから、IAV の RNA ポリメラーゼサブユニットの一つをコードする PB1 遺伝子からフレームシフト体として合成される PB1-F2 ペプチドの関連性が疑われた。PB1-F2 ペプチドは、ヒトリンパ腫由来 U937 細胞においてミトコンドリアに移行して膜電位を消失させてアポトーシスを誘導する⁶⁵⁾。そこで、PB1-F2 ペプチドの発現をノックアウトした 2 株の A/WSN/1933 (H1N1) を作製した。一方の IAV 株は PB1 遺伝子の 120

番目をチミンからシトシンへ変異させ、PB1-F2 ペプチドの開始コドンになる Met を Thr へと置換させた。なお、PB1 タンパク質自体のアミノ酸配列には影響しない。もう一方の IAV 株は PB1 遺伝子の 144 番目をグアニンからアデニンへ変異させ、PB1-F2 ペプチドに終止コドンを導入して 8 アミノ酸残基のみが合成されるようにした。なお、PB1 タンパク質の 40 番目は Met から Ile へと置換される⁶⁵⁾。PB1-F2 ノックアウトにより、感染細胞の PS の細胞表面露出、ミトコンドリアの膜電位消失、AIF の核移行、NP の核外輸送、IAV 産生のすべてが抑制された⁶⁶⁾。IAV 感染細胞の表面に発現した HA が、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の Raf/MEK/ERK 経路を介して NP の核外輸送を促進することが報告されている⁶⁷⁾。SulCOS1 細胞においても、MAPK の Raf/MEK/ERK 経路の阻害剤 U0126 を添加することで、IAV 増殖性は大きく減少した⁶⁶⁾。細胞表面における新生 HA とスルファチドの結合は、MAPK の Raf/MEK/ERK 経路を介してアポトーシスシグナルを活性化させるものと示唆される。アポトーシスが IAV 感染細胞の NP の核外輸送を促進することも報告されている³⁹⁾。この報告では、アポトーシスシグナルのカスパーゼ 3 の活性化が、NP の核外輸送の促進に重要であるとされる。筆者の結果は、アポトーシスであるならば NP の核外輸送の促進にカスパーゼ 3 の活性化は必ずしも必要ないことを示している。感染細胞内に発現した PB1-F2 ペプチドのアポトーシス誘導作用も、MDCK 細胞や A549 細胞では見られない⁶⁵⁾。IAV が利用するアポトーシスシグナルは、細胞の種類に依存しているものと考えられる。ここで、スルファチドを介した IAV 産生促進機構をまとめる。感染細胞表面に発現した新生 HA はスルファチドと結合し、MAPK の Raf/MEK/ERK 経路を活性化するものと思われる。カスパーゼ 8 は細胞表面の死受容体の刺激によって活性化が開始される⁶⁸⁾。カスパーゼ 8 が活性化することから、スルファチド発現が死受容体の感受性増加にも関与しているものと考えられる。PB1-F2 ペプチドが発現したミトコンドリアでは膜電位が消失し、AIF が核へ移行してアポトーシスが誘導される。カスパーゼ 9 はアポトーシスシグナルでミトコンドリアから細胞質へ放出されるチトクロム c (Cyt c) によって活性化される⁶⁸⁾。ミトコンドリアの膜電位消失は Cyt c を放出させ、カスパーゼ 9 を活性化させたものと考えられる。アポトーシスは vRNP の核外輸送を促進し、新生 IAV の形成を増加させる。これにより IAV 増殖性は大きく促進する (図 9)。

3.4. IAV 感染増殖におけるスルファチド機能の考察

感染細胞表面の HA とスルファチドの結合は新生 IAV の形成を促進することから、HA とスルファチドの間の結合を阻害することで新生 IAV の形成を抑制できるはずである。スルファチドを標的とする結合化合物あるいは発現

抑制は、スルファチドが多機能分子であるため重篤な副作用を起こす可能性がある。一方 HA に特異的に結合する化合物は、ウイルス特異的で副作用の発現を抑えることができる。そのため「HA のスルファチド結合阻害剤」が感染細胞で新生 IAV の形成を阻害する新規薬剤になるものと期待される。一般的な抗 IAV 薬のシアリダーゼ阻害剤は、感染細胞表面の新生 IAV の放出を抑制するが、新生 IAV の形成自体は阻害しない。また、市販の抗 IAV 薬オセルタミビルに代表されるシアリダーゼ阻害剤に対する耐性 IAV は、研究上だけでなく自然界においても分離されている⁶⁹⁾。新型 IAV のパンデミック発生時、ウイルスの大規模な抗原変化によって、既存のワクチンの効果は期待できないものと予想される。検討したすべての IAV で、その亜型や宿主(ヒト, トリ, ブタ, ウマ)にかかわらず、スルファチド結合性が確認されている³⁵⁾。亜型に依存せず HA に作用するスルファチド結合阻害剤は、新型 IAV やシアリダーゼ阻害剤に耐性を持つ IAV に有効で、感染細胞の新生ウイルス形成を直接阻害することから強力な治療効果が期待できる。現在、HA のスルファチド結合部位の同定とスルファチド結合阻害剤の探索を行っている。HA のスルファチド結合機構を詳細に明らかにすることで、最適な結合阻害剤の設計が展開できるものと考えている。

IAV 以外のウイルスでは、ワクチニアウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (human parainfluenza virus type 3, hPIV3)、エイズウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) -1 もスルファチドと強力に結合する。スルファチドはワクチニアウイルスの受容体の一つと疑われている⁷⁰⁾。hPIV3 はシアル酸を介して吸着した宿主細胞表面で細胞膜と膜融合を起こす。また感染細胞に発現したウイルス表面タンパク質を介して、感染細胞周囲の細胞と膜融合を起こして多核巨細胞を形成する。スルファチドは hPIV3 膜-細胞膜間及び細胞膜-細胞膜間の膜融合を抑制することで、hPIV3 の感染性の低下や多核巨細胞形成の抑制を起こす⁷¹⁾。神経や腸の組織の CD4 陰性細胞に HIV-1 が感染するとき、ガラクトシルセラミドやスルファチドが結合受容体として機能するとされていた⁷²⁾。一方で、CD4 陽性の単球由来マクロファージや U937 細胞に HIV-1 が感染するとき、スルファチドの明確な役割は認められていない⁷³⁾。CD4 陰性細胞でガラクトシルセラミド陽性の HT-29 細胞やガラクトシルセラミド陰性の RD 細胞でスルファチドを添加すると HIV-1 感染は阻害される⁷⁴⁾。さらに、ガラクトシルセラミドやスルファチドの脂質単分子膜に HIV-1 表面タンパク質 gp120 を添加すると gp120 が結合することから、両糖脂質とも gp120 の結合分子であった。しかし、単分子膜に結合した gp120 はガラクトシルセラミドの単分子膜では貫通するが、スルファチドの単分子膜では貫通しない。ガラクトシルセラミドとスルファチドを混合した単分子膜では、gp120 の貫通は阻害される。つまり、ガラ

クトシルセラミドに結合した HIV-1 は CXCR4 などの共受容体にも結合し、細胞内への侵入プロセスが始まる。一方、スルファチドに結合した HIV-1 は共受容体に結合できず、細胞内へ侵入できない。さらにスルファチドは、HIV-1 感染においてガラクトシルセラミドへの結合と競合する⁷⁵⁾。マウスへのスルファチド投与は、げっ歯類とヒトの間で高い保存性のある CD1d 依存性免疫経路を刺激し、HIV-1 増殖を抑制するインターフェロン I 産生を促すと示唆されており、抗レトロウイルス療法の新規候補に考えられている^{76,77)}。スルファチド構造を模した硫酸化ガラクトースのデンドリマーは、HIV-1 感染阻害作用を示す⁷⁸⁾。スルファチド構造を模した化合物は、IAV の感染阻害剤や吸着剤にも利用できるかもしれない。このように、スルファチドは IAV 以外のウイルス感染機構にも影響している。スルファチドは hPIV3 や HIV-1 が結合する糖鎖分子ではあるものの、IAV と同様に感染における受容体としては機能していないようである。

スルファチドは免疫、神経、糖尿病（インスリン分泌）、血栓形成、がん、細菌やウイルスの感染症などに関わる生体分子である³⁴⁾。ウイルス感染症からスルファチドの機能を解明することは、スルファチドが制御する多くの生物現象及び疾患の理解に貢献し、新しい治療法や予防法の開発につながっていくものと期待される。

4. おわりに

筆者は、宿主細胞側の糖鎖を改変する糖鎖生物学的アプローチとウイルス側を改変するウイルス学的アプローチから、IAV を含むウイルスの糖鎖結合機構及び感染増殖機構の解析を進めてきた。IAV が結合する糖鎖分子である Neu5Gc とスルファチドは、研究開始の当初はウイルス感染における受容体として機能するものと想定していた。しかし、どちらの糖鎖分子も感染における受容体の機能を示す結果は得られなかった。「ウイルスが結合する分子（さらに感染標的の部位に発現している分子）＝感染受容体」と想定されることが多いが、本研究結果はこの想定が必ずしも成立するわけではないことを示す一例である。本研究はウイルス側因子として、Neu5Ac、Neu5Gc 及びスルファチドの糖鎖分子を認識して結合する IAV 表面タンパク質 HA に着目している。一方で筆者は、もう一つの IAV 表面タンパク質 NA についても、その酵素活性「シアリダーゼ」の性状解析や蛍光イメージング剤の開発を精力的に行ってきた⁷⁹⁻⁸²⁾。シアリダーゼは糖鎖末端からシアル酸を切断する酵素である。今後、糖鎖生物学の視点からウイルスにおける糖鎖分子の「結合」と「切断」の機能解明に取り組んでいきたい。さらに、これらの機能や糖鎖構造情報に基づいた抗ウイルス剤やウイルス検出剤などの利用技術を確立していきたい。

謝 辞

学部学生・大学院生時代を通して糖鎖生物学とウイルス学の融合分野「glycovirology（糖鎖ウイルス学）」をご指導頂き、この研究分野へ導いて下さった静岡県立大学薬学部名誉教授・中部大学客員教授の鈴木康夫先生には深く感謝申し上げます。IAV のリバースジェネティクス法をご指導頂き、米国ウィスコンシン大学留学では大変お世話になりました。東京大学医科学研究所の河岡義裕先生、和歌山県立医科大学の五藤秀男先生にはここにあらためて感謝申し上げます。貴重な合成糖脂質を分与頂いた京都大学の木曾真先生、岐阜大学の石田秀治先生、ManNGc を合成して頂いた広島国際大学の池田 潔先生、大坪忠宗先生、ウマ IAV でご協力頂いた JRA の山中隆史先生、スルファチド研究でご協力頂いた田井 直先生、小倉 潔先生、産業技術総合研究所の川崎一則先生、高知大学の本家孝一先生に感謝申し上げます。日頃の研究を支えて頂いた静岡県立大学薬学部生化学分野の皆様へ感謝致します。そして今回の杉浦奨励賞の応募期間中に入院していた私のごく短い一時退院時間に合わせて、ご多忙の中で本賞にご推薦下さいました静岡県立大学薬学部生化学分野教授の鈴木 隆先生に深く感謝申し上げます。

また、研究費をご助成頂きました糖鎖科学名古屋拠点、浜松科学技術研究振興会、日本科学協会 笹川科学研究助成 (20-403, 23-439)、静岡総合研究機構 静岡 SOE 助成、持田記念医学薬学振興財団、東京生化学研究会、ホクト生物科学振興財団、武田科学振興財団、薬学研究奨励財団、中部電気利用基礎研究振興財団、中谷医工計測技術振興財団、中部科学技術センター、日本ワックスマン財団、島原科学振興会、昭和大学医学・医療振興財団、上原記念生命科学財団、高橋産業経済研究財団、泉科学技術振興財団、倉田記念日立科学技術財団、双葉電子記念財団、光科学技術研究振興財団、東海産業技術振興財団、薬理研究会、材料科学技術振興財団、ふじのくに地域・大学コンソーシアム、GSK ジャパン、野口研究所、赤枝医学研究財団、杉山報公会、旗影会、フジクラ財団、静岡県立大学教員特別研究推進費、JSPS 科研費、若手研究 (B) JP20790357、基盤研究 (C) JP23590549、若手研究 (A) JP15H05644、挑戦的萌芽研究 JP26670064、JP16K15151、そして一部をご助成頂きました発酵研究所 (代表 鈴木 隆)、水谷糖質科学財団 (代表 鈴木 隆)、静岡県立大学グローバル COE プログラム「健康長寿科学教育研究の戦略的新展開」(事業推進担当者 鈴木康夫、鈴木 隆)、科学技術振興機構 戦略的創造事業 (CREST)「ウイルス感染における糖鎖機能の解明と創薬への応用」(代表 鈴木康夫)、科学技術振興機構 研究成果最適展開支援事業 A-step (代表 鈴木 隆) に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Hidari KI, Murata T, Yoshida K, Takahashi Y, Minami-jima YH, Miwa Y, Adachi S, Ogata M, Usui T, Suzuki Y, Suzuki T.: Chemoenzymatic synthesis, characterization, and application of glycopolymers carrying lactosamine repeats as entry inhibitors against influenza virus infection. *Glycobiology* 18:779-788, 2008.
- 2) Ogata M, Hidari KI, Kozaki W, Murata T, Hiratake J, Park EY, Suzuki T, Usui T.: Molecular design of spacer-*N*-linked sialoglycopolypeptide as polymeric inhibitors against influenza virus infection. *Biomacromolecules* 10:1894-1903, 2009.
- 3) Ogata M, Hidari KI, Murata T, Shimada S, Kozaki W, Park EY, Suzuki T, Usui T.: Chemoenzymatic synthesis of sialoglycopolypeptides as glycomimetics to block infection by avian and human influenza viruses. *Bioconjug Chem* 20:538-549, 2009.
- 4) Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, Li C, Kawakami E, Yamada S, Kiso M, Suzuki Y, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y.: Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486:420-428, 2012.
- 5) Ng PS, Böhm R, Hartley-Tassell LE, Steen JA, Wang H, Lukowski SW, Hawthorne PL, Trezise AE, Coloe PJ, Grimmond SM, Haselhorst T, von Itzstein M, Paton AW, Paton JC, Jennings MP.: Ferrets exclusively synthesize Neu5Ac and express naturally humanized influenza A virus receptors. *Nat Commun* 5:5750, 2014.
- 6) Takahashi T, Kawakami T, Mizuno T, Minami A, Uchida Y, Saito T, Matsui S, Ogata M, Usui T, Sriwilaijaroen N, Hiramatsu H, Suzuki Y, Suzuki T.: Sensitive and direct detection of receptor binding specificity of highly pathogenic avian influenza A virus in clinical samples. *PLoS One* 8:e78125, 2013.
- 7) Masuda H, Suzuki T, Sugiyama Y, Horiike G, Murakami K, Miyamoto D, Jwa Hidari KI, Ito T, Kida H, Kiso M, Fukunaga K, Ohuchi M, Toyoda T, Ishihama A, Kawaoka Y, Suzuki Y.: Substitution of amino acid residue in influenza A virus hemagglutinin affects recognition of sialyl-oligosaccharides containing *N*-glycolylneuraminic acid. *FEBS Lett* 464:71-74, 1999.
- 8) Takahashi T, Hashimoto A, Maruyama M, Ishida H, Kiso M, Kawaoka Y, Suzuki Y, Suzuki T.: Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA contributing to the recognition of molecular species of sialic acid. *FEBS Lett* 583:3171-3174, 2009.
- 9) Suzuki T, Horiike G, Yamazaki Y, Kawabe K, Masuda H, Miyamoto D, Matsuda M, Nishimura SI, Yamagata T, Ito T, Kida H, Kawaoka Y, Suzuki Y.: Swine influenza virus strains recognize sialylsugar chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *FEBS Lett* 404:192-196, 1997.
- 10) Gambaryan AS, Karasin AI, Tuzikov AB, Chinarev AA, Pazynina GV, Bovin NV, Matrosovich M.: Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. *Virus Res* 114:15-22, 2005.
- 11) Takemae N, Ruttanapumma R, Parchariyanon S, Yoneyama S, Hayashi T, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Uchida Y, Kondo S, Yagi H, Kato K, Suzuki Y, Saito T.: Alterations in receptor-binding properties of swine influenza viruses of the H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs. *J Gen Virol* 91:938-948, 2010.
- 12) Bradley KC, Jones CA, Tompkins SM, Tripp RA, Russell RJ, Gramer MR, Heimbürg-Molinari J, Smith DF, Cummings RD, Steinhauer DA.: Comparison of the receptor binding properties of contemporary swine isolates and early human pandemic H1N1 isolates (novel 2009 H1N1). *Virology* 413:169-182, 2011.
- 13) Ito T, Suzuki Y, Suzuki T, Takada A, Horimoto T, Wells K, Kida H, Otsuki K, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y.: Recognition of *N*-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the α 2,3 linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks. *J Virol* 74:9300-9305, 2000.
- 14) Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE Jr, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y.: Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* 74:11825-11831, 2000.
- 15) Liu Y, Han C, Wang X, Lin J, Ma M, Shu Y, Zhou J, Yang H, Liang Q, Guo C, Zhu J, Wei H, Zhao J, Ma Z, Pan J.: Influenza A virus receptors in the respiratory and intestinal tracts of pigeons. *Avian Pathol* 38:263-266, 2009.
- 16) Kawano T, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Suzuki A.: Biosynthesis of *N*-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates. Purification and characterization of the key enzyme of the cytidine monophospho-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylation system. *J Biol Chem* 269:9024-9029, 1994.
- 17) Muchmore EA, Milewski M, Varki A, Diaz S.: Biosynthesis of *N*-glycolylneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of *N*-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. *J Biol Chem* 264:20216-20223, 1989.
- 18) Chou HH, Takematsu H, Diaz S, Iber J, Nickerson E, Wright KL, Muchmore EA, Nelson DL, Warren ST, Varki A.: A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11751-11756, 1998.
- 19) Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Suzuki A.: The molecular basis for the absence of *N*-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem* 273:15866-15871, 1998.
- 20) Varki A.: *N*-glycolylneuraminic acid deficiency in humans. *Biochimie* 83:615-622, 2001.
- 21) Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A.: Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem* 280:4228-4237, 2005.
- 22) Wang B.: Sialic acid is an essential nutrient for brain

- development and cognition. *Annu Rev Nutr* 29:177-222, 2009.
- 23) Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E.: Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12045-12050, 2003.
 - 24) Kida H, Shortridge KF, Webster RG.: Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* 162:160-166, 1988.
 - 25) Yasuda J, Shortridge KF, Shimizu Y, Kida H.: Molecular evidence for a role of domestic ducks in the introduction of avian H3 influenza viruses to pigs in southern China, where the A/Hong Kong/68 (H3N2) strain emerged. *J Gen Virol* 72:2007-2010, 1991.
 - 26) Suzuki T, Sometani A, Yamazaki Y, Horiike G, Mizutani Y, Masuda H, Yamada M, Tahara H, Xu G, Miyamoto D, Oku N, Okada S, Kiso M, Hasegawa A, Ito T, Kawaoka Y, Suzuki Y.: Sulphatide binds to human and animal influenza A viruses, and inhibits the viral infection. *Biochem J* 318:389-393, 1996.
 - 27) Eckhardt M.: The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol Neurobiol* 37:93-103, 2008.
 - 28) Honke K, Tsuda M, Hirahara Y, Ishii A, Makita A, Wada Y.: Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase. *J Biol Chem* 272:4864-4868, 1997.
 - 29) Hirahara Y, Tsuda M, Wada Y, Honke K.: cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse cerebroside sulfotransferase. *Eur J Biochem* 267:1909-1917, 2000.
 - 30) Bosio A, Binczek E, Le Beau MM, Fernald AA, Stoffel W.: The human gene CGT encoding the UDP-galactose ceramide galactosyl transferase (cerebroside synthase): cloning, characterization, and assignment to human chromosome 4, band q26. *Genomics* 34:69-75, 1996.
 - 31) Kapitonov D, Yu RK.: Cloning, characterization, and expression of human ceramide galactosyltransferase cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 232:449-453, 1997.
 - 32) Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer HE, O'Brien JS, von Figura K.: Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J Biol Chem* 264:1252-1259, 1989.
 - 33) Kolter T, Sandhoff K.: Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:81-103, 2005.
 - 34) Takahashi T, Suzuki T.: Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J Lipid Res* 53:1437-1450, 2012.
 - 35) Takahashi T, Suzuki T.: Role of sulfatide in influenza A virus replication. *Biol Pharm Bull* 38:809-816, 2015.
 - 36) Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y.: Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9345-9350, 1999.
 - 37) Anders EM, Scalzo AA, Rogers GN, White DO.: Relationship between mitogenic activity of influenza viruses and the receptor-binding specificity of their hemagglutinin molecules. *J Virol* 60:476-482, 1986.
 - 38) Takahashi T, Kawagishi S, Funahashi H, Hayashi N, Suzuki T.: Production and Purification of Secretory Simian Cytidine Monophosphate-*N*-acetylneuraminic Acid Hydroxylase Using Baculovirus-Protein Expression System. *Biol Pharm Bull* 38:1220-1226, 2015.
 - 39) Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T, Pleschka S, Ludwig S.: Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* 22:2717-2728, 2003.
 - 40) Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B.: Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res* 7:1474-1480, 2001.
 - 41) Hirabayashi Y, Suzuki T, Suzuki Y, Taki T, Matsumoto M, Higashi H, Kato S.: A new method for purification of anti-glycosphingolipid antibody. Avian anti-hematoside (NeuGc) antibody. *J Biochem* 94:327-330, 1983.
 - 42) Hirabayashi Y, Higashi H, Kato S, Taniguchi M, Matsumoto M.: Occurrence of tumor-associated ganglioside antigens with Hanganutziu-Deicher antigenic activity on human melanomas. *Jpn J Cancer Res* 78:614-620, 1987.
 - 43) Hara S, Takemori Y, Yamaguchi M, Nakamura M, Ohkura Y.: Fluorometric high-performance liquid chromatography of *N*-acetyl- and *N*-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal Biochem* 164:138-145, 1987.
 - 44) Song X, Yu H, Chen X, Lasanajak Y, Tappert MM, Air GM, Tiwari VK, Cao H, Chokhawala HA, Zheng H, Cummings RD, Smith DF.: A sialylated glycan microarray reveals novel interactions of modified sialic acids with proteins and viruses. *J Biol Chem* 286:31610-31622, 2011.
 - 45) Padler-Karavani V, Song X, Yu H, Hurtado-Ziola N, Huang S, Muthana S, Chokhawala HA, Cheng J, Verhagen A, Langereis MA, Kleene R, Schachner M, de Groot RJ, Lasanajak Y, Matsuda H, Schwab R, Chen X, Smith DF, Cummings RD, Varki A.: Cross-comparison of protein recognition of sialic acid diversity on two novel sialoglycan microarrays. *J Biol Chem* 287:22593-22608, 2012.
 - 46) Hinderlich S, Weidemann W, Yardeni T, Horstkorte R, Huizing M.: UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (GNE): A Master Regulator of Sialic Acid Synthesis. *Top Curr Chem* 366:97-137, 2015.
 - 47) Yamanaka T, Tsujimura K, Kondo T, Matsumura T, Ishida H, Kiso M, Hidari KI, Suzuki T.: Infectivity and pathogenicity of canine H3N8 influenza A virus in horses. *Influenza Other Respir Viruses* 4:345-351, 2010.
 - 48) Takahashi T, Takano M, Kurebayashi Y, Masuda M, Kawagishi S, Takaguchi M, Yamanaka T, Minami A,

- Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T.: *N*-glycolylneuraminic acid on human epithelial cells prevents entry of influenza A viruses that possess *N*-glycolylneuraminic acid binding ability. *J Virol* 88:8445-8456, 2014.
- 49) Bateman AC, Karamanska R, Busch MG, Dell A, Olsen CW, Haslam SM.: Glycan analysis and influenza A virus infection of primary swine respiratory epithelial cells: the importance of NeuAc α 2-6 glycans. *J Biol Chem* 285:34016-34026, 2010.
 - 50) Xiong X, Coombs PJ, Martin SR, Liu J, Xiao H, McCauley JW, Locher K, Walker PA, Collins PJ, Kawaoka Y, Skehel JJ, Gamblin SJ.: Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. *Nature* 497:392-396, 2013.
 - 51) Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD.: Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:4620-4624, 2004.
 - 52) Byres E, Paton AW, Paton JC, Löfling JC, Smith DF, Wilce MC, Talbot UM, Chong DC, Yu H, Huang S, Chen X, Varki NM, Varki A, Rossjohn J, Beddoe T.: Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature* 456:648-652, 2008.
 - 53) Varki A.: Loss of *N*-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Am J Phys Anthropol Suppl* 33:54-69, 2001.
 - 54) Suzuki Y.: Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28:399-408, 2005.
 - 55) Takahashi T, Murakami K, Nagakura M, Kishita H, Watanabe S, Honke K, Ogura K, Tai T, Kawasaki K, Miyamoto D, Hidari KI, Guo CT, Suzuki Y, Suzuki T.: Sulfatide is required for efficient replication of influenza A virus. *J Virol* 82:5940-5950, 2008.
 - 56) Takahashi T, Suzuki T.: Role of sulfatide in virus infection and replication. *Trends Glycosci Glycotechnol* 21:255-265, 2009.
 - 57) Takahashi T, Satoh H, Takaguchi M, Takafuji S, Yokoyama H, Fujii S, Suzuki T.: Binding of sulphatide to recombinant haemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system. *J Biochem* 147:459-462, 2010.
 - 58) Takahashi T, Kawagishi S, Masuda M, Suzuki T.: Binding kinetics of sulfatide with influenza A virus hemagglutinin. *Glycoconj J* 30:709-716, 2013.
 - 59) Ogura K, Kohno K, Tai T.: Molecular cloning of a rat brain cDNA, with homology to a tyrosine kinase substrate, that induces galactosylceramide expression in COS-7 cells. *J Neurochem* 71:1827-1836, 1998.
 - 60) Ding Z, Kawashima H, Suzuki Y, Suzuki T, Ward PA, Miyasaka M.: A sulfatide receptor distinct from L-selectin is involved in lymphocyte activation. *FEBS Lett* 418:310-314., 1997
 - 61) Shikata K, Suzuki Y, Wada J, Hirata K, Matsuda M, Kawashima H, Suzuki T, Iizuka M, Makino H, Miyasaka M.: L-selectin and its ligands mediate infiltration of mononuclear cells into kidney interstitium after ureteric obstruction. *J Pathol* 188:93-99, 1999.
 - 62) Suzuki Y, Nishi H, Hidari K, Hirabayashi Y, Matsumoto M, Kobayashi T, Watarai S, Yasuda T, Nakayama J, Maeda H, Katsuyama T, Kanai M, Kiso M, Hasegawa A.: A new monoclonal antibody directed to sialyl α 2-3lactoneotetraosylceramide and its application for detection of human gastrointestinal neoplasms. *J Biochem* 109:354-360, 1991.
 - 63) Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G.: Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14:729-739, 2000.
 - 64) Chang LK, Johnson EM Jr.: Cyclosporin A inhibits caspase-independent death of NGF-deprived sympathetic neurons: a potential role for mitochondrial permeability transition. *J Cell Biol* 157:771-781, 2002.
 - 65) Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O' Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW.: A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7:1306-1312, 2001.
 - 66) Takahashi T, Takaguchi M, Kawakami T, Suzuki T.: Sulfatide regulates caspase-3-independent apoptosis of influenza A virus through viral PB1-F2 protein. *PLoS One* 8:e61092, 2013.
 - 67) Marjuki H, Alam MI, Ehrhardt C, Wagner R, Planz O, Klenk HD, Ludwig S, Pleschka S.: Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase C α -mediated activation of ERK signaling. *J Biol Chem* 281:16707-16715, 2006.
 - 68) Kuwano K, Yoshimi M, Maeyama T, Hamada N, Yamada M, Nakanishi Y.: Apoptosis signaling pathways in lung diseases. *Med Chem* 1:49-56, 2005.
 - 69) Baranovich T, Webster RG, Govorkova EA.: Fitness of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses. *Curr Opin Virol* 1:574-581, 2011.
 - 70) Perino J, Foo CH, Spehner D, Cohen GH, Eisenberg RJ, Crance JM, Favier AL.: Role of sulfatide in vaccinia virus infection. *Biol Cell* 103:319-331, 2011.
 - 71) Takahashi T, Ito K, Fukushima K, Takaguchi M, Hayakawa T, Suzuki Y, Suzuki T.: Sulfatide negatively regulates the fusion process of human parainfluenza virus type 3. *J Biochem* 152:373-380, 2012.
 - 72) Cook DG, Fantini J, Spitalnik SL, Gonzalez-Scarano F.: Binding of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) gp120 to galactosylceramide (GalCer): relationship to the V3 loop. *Virology* 201:206-214, 1994.
 - 73) Seddiki N, Ramdani A, Saffar L, Portoukalian J, Gluckman JC, Gattegno L.: A monoclonal antibody directed to sulfatide inhibits the binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein to macrophages but not their infection by the virus. *Biochim Biophys Acta* 1225:289-296, 1994.
 - 74) Delézay O, Koch N, Yahi N, Hammache D, Tourres C, Tamalet C, Fantini J.: Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epi-

- thelial cell line HT-29. AIDS 11:1311-1318, 1997.
- 75) Fantini J, Hammache D, Delézay O, Piéroni G, Tamalet C, Yahi N.: Sulfatide inhibits HIV-1 entry into CD4⁻/CXCR4⁺ cells. Virology 246:211-220, 1998.
- 76) Sundell IB, Halder R, Zhang M, Maricic I, Koka PS, Kumar V.: Sulfatide administration leads to inhibition of HIV-1 replication and enhanced hematopoiesis. J Stem Cells 5:33-42, 2010.
- 77) Sundell IB, Cortado RV, Koka PS.: Sulfatide--a new candidate for ART treatment in HIV-1 infection. J Stem Cells 7:61-72, 2012.
- 78) Kensinger RD, Catalone BJ, Krebs FC, Wigdahl B, Schengrund CL.: Novel polysulfated galactose-derivatized dendrimers as binding antagonists of human immunodeficiency virus type 1 infection. Antimicrob Agents Chemother 48:1614-1623, 2004.
- 79) Takahashi T.: Function of Glycochains in Virus Infection. YAKUGAKU ZASSHI 134:889-899, 2014.
- 80) Kurebayashi Y, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Takahashi S, Takano M, Agarikuchi T, Sato T, Matsuda Y, Minami A, Kanazawa H, Uchida Y, Saito T, Kawaoka Y, Yamada T, Kawamori F, Thomson R, von Itzstein M, Suzuki T.: Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells. Sci Rep 4:4877, 2014.
- 81) Takahashi T, Suzuki T.: Low-pH Stability of Influenza A Virus Sialidase Contributing to Virus Replication and Pandemic. Biol Pharm Bul 38:817-826, 2015.
- 82) Takahashi T.: Properties of and a new technique for fluorescent detection of influenza virus sialidase. Trends Glycosci Glycotechnol 27:E49-E60, 2015.

Functional analysis of glyco-molecules that bind with influenza virus

Tadanobu TAKAHASHI

Department of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka-shi, Shizuoka 422-8526, Japan.

E-mail: takahasi@u-shizuoka-ken.ac.jp

Influenza A virus (IAV) recognizes terminal sialic acid of sialoglyco-conjugates on host cells through the viral envelope glycoprotein hemagglutinin (HA), followed by initiation of entry into the cells. Molecular species of sialic acid are largely divided into two moieties: *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc). A receptor for IAV infection generally means Neu5Ac. Almost all equine IAVs and some human, swine, and duck IAVs bind not only to Neu5Ac but also to Neu5Gc. In nonhuman animals, Neu5Gc has been detected in swine and equine tracheas and the duck colon, which are the main replication sites of mammalian and avian IAVs. Therefore, Neu5Gc in these sites has been suggested to be a functional receptor for IAV infection. Humans cannot synthesize Neu5Gc due to a genetic defect of the Neu5Gc-synthesizing enzyme. We evaluated the receptor function of Neu5Gc in IAV infection in human cells. Our results indicated that Neu5Gc expression on the surface of human cells is not a functional receptor for IAV infection and that it has a negative effect on infectivity of IAV possessing Neu5Gc binding ability. IAV also binds to non-sialo 3-*O*-sulfated galactosylceramide (sulfatide). Sulfatide has been suggested to be a functional receptor for IAV infection. However, we have shown that sulfatide is not a functional receptor for IAV infection and that the binding of HA with sulfatide enhances progeny virus production. It is expected that functions of these glyco-molecules can be used in prevention and development of new drugs against IAV.