

1. インフルエンザウイルスの鳥型レセプター検出における諸問題

日尾野 隆大¹⁾, 高瀬 明²⁾, 山本 一夫³⁾

1) 北海道大学 大学院獣医学研究院

2) 創価大学 糖鎖生命システム融合研究所 (GaLSIC)

3) 東京大学 大学院新領域創成科学研究科

インフルエンザウイルスはシアル酸を含む糖質を受容体とする。細胞表面の糖鎖の構造はインフルエンザウイルスの宿主指向性を規定する主要な因子であり、したがって、インフルエンザウイルスの自然界における生態や異種宿主間伝播機構の解明を目的として、多くの生物種で標的組織における受容体の分布が調べられてきた。一方、受容体である糖鎖の認識プローブとして汎用されてきたレクチンは、抗体とは異なり、その結果の解釈には注意が必要である。特に、インフルエンザウイルスの鳥型レセプターと呼ばれる Sia2-3Gal 認識プローブとして用いられてきたイヌエンジュ (*Maackia amurensis*) 由来レクチンについては、その糖結合に関する特性を十分に理解しないまま汎用されており、これが混乱を招いている。我々は、宿主動物における鳥型レセプターの分布についてどの程度正確に把握できているのだろうか。本稿では、イヌエンジュ由来レクチンにまつわる諸問題の解説を通じて、インフルエンザウイルスレセプターについて再考する機会を提供したい。

1. はじめに

インフルエンザウイルスはこれまで知られている A, B, C および D 型のすべてがシアル酸を含む糖質を受容体とする。シアル酸は9個の炭素原子を持つ酸性アミノ糖の一種であり、一般には糖タンパク質または糖脂質に付加した糖鎖の先端部分、すなわち非還元末端に存在する。特に A 型インフルエンザウイルスの表面糖タンパク質ヘマグルチニン (HA) は末端シアル酸 (Sia) が α 2-3 または α 2-6 結合でガラクトース (Gal) に結合している糖鎖構造 (Sia2-3Gal および Sia2-6Gal) を認識する¹⁾。シアル酸とガラクトースの結合様式はインフルエンザウイルスの宿主指向性を規定する主要な因子である (図 1)。したがって、インフルエンザウイルスの自然界における生態や異種宿主

間伝播機構の解明を目的として、多くの生物種で標的組織における Sia2-3Gal および Sia2-6Gal の分布が調べられてきた。我が国においては、世界に先駆けてヒト²⁾、カモおよびブタ³⁾ の感染標的組織における Sia2-3Gal および Sia2-6Gal の分布を報告してきた。一方でこれら糖鎖の認識プローブとしてはレクチンが汎用されてきたが、その結果の解釈には注意が必要である。本稿では、特に Sia2-3Gal 認識プローブとして用いられてきたイヌエンジュ (*Maackia amurensis*) 由来レクチンにまつわる諸問題の解説を通じて、インフルエンザウイルスレセプターについて再考する機会を提供したい。

2. インフルエンザウイルスの受容体特異性とレクチン染色

Sia2-3Gal はインフルエンザウイルスの鳥型レセプター、Sia2-6Gal はヒト型レセプターとして知られる。これは、ヒトから分離されたウイルスは Sia2-6Gal 構造を優位に認識し、カモから分離されたウイルスは Sia2-3Gal 構造を優位に認識することに由来する¹⁾。また、ヒトの上部気道には Sia2-6Gal が²⁾、カモの結腸には Sia2-3Gal が優位に分布しており³⁾、これらの受容体特異性と宿主組織における糖鎖分布の差異が、ヒトとカモのインフルエンザウイルスに対する感受性を隔てる要因の一つとして説明

連絡先

〒060-0818

北海道札幌市北区北18条西9丁目

北海道大学 大学院獣医学研究院 微生物学教室

TEL: 011-706-5208

FAX: 011-706-5208

E-mail: hiono@vetmed.hokudai.ac.jp

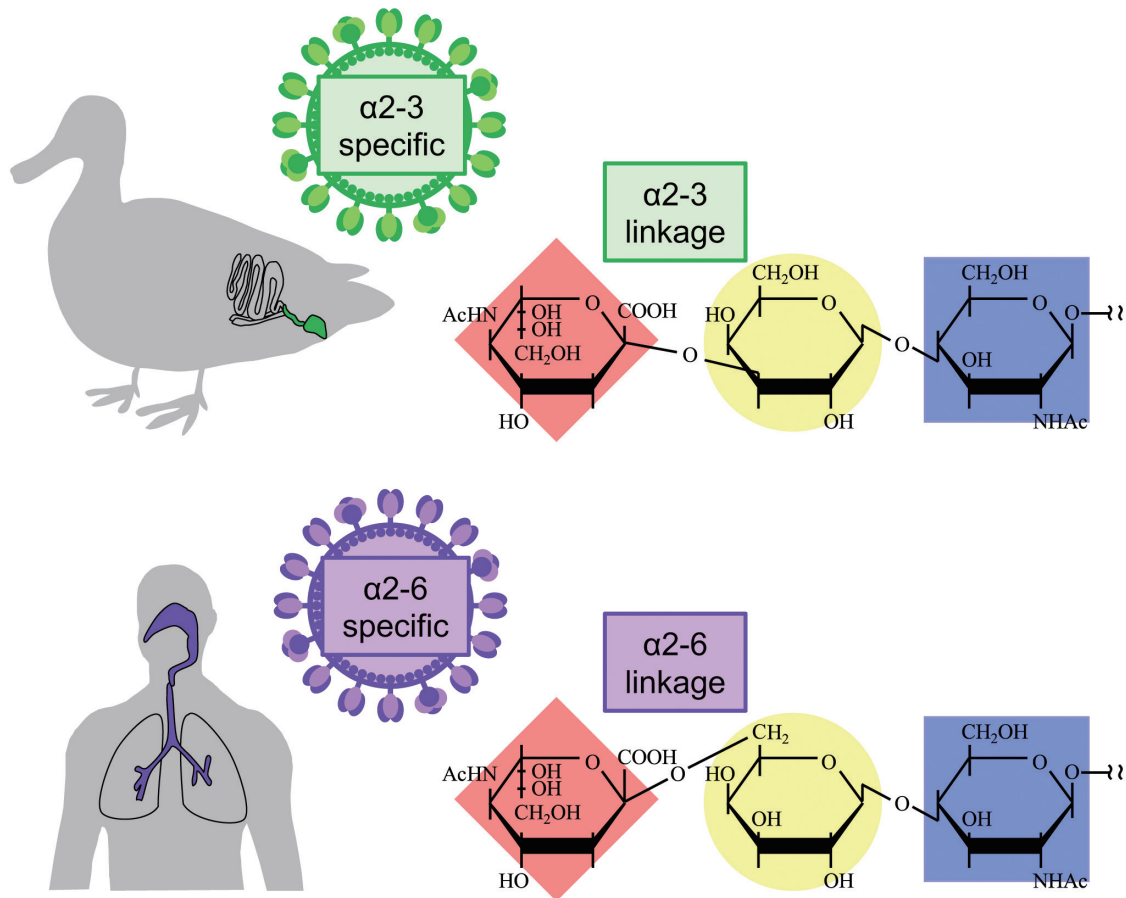


図1 インフルエンザウイルスの糖結合特異性と宿主向性

鳥、特にインフルエンザウイルスの自然宿主である野生のカモ類から分離されるウイルスは、糖鎖末端のシアル酸とガラクトースが $\alpha 2-3$ 結合した糖鎖 (Sia $\alpha 2-3$ Gal) に結合し、ヒトから分離されるウイルスは $\alpha 2-6$ 結合した糖鎖 (Sia $\alpha 2-6$ Gal) に結合する。カモの結腸には Sia $\alpha 2-3$ Gal が優位に分布し、ヒトの上部気道には Sia $\alpha 2-6$ Gal が優位に分布する。

される。特に H3 亜型のインフルエンザウイルスでは HA のアミノ酸配列モチーフと糖結合特異性の関係が明快であり、226 位と 228 位のアミノ酸がグルタミン / グリシンの場合は Sia $\alpha 2-3$ Gal と、ロイシン / セリンの場合は Sia $\alpha 2-6$ Gal と優位に結合する^{4,5)}。

これまでインフルエンザウイルス受容体としてのシアロ糖の検出には植物レクチン、特にイヌエンジュとセイヨウニワトコ (*Sumbucus nigra*) に由来するレクチンが用いられてきた。すなわち、イヌエンジュレクチン (本稿では *Maackia* レクチンと総称する) は Sia $\alpha 2-3$ Gal の認識プローブとして⁶⁾、セイヨウニワトコレクチン (SNA) は Sia $\alpha 2-6$ Gal の認識プローブとして用いられている⁷⁾。レクチンを用いた組織染色では、比較的ウイルス学研究者にも馴染みのある免疫染色に類似した手技によって、特定の糖鎖構造を検出することができる。近年は質量分析による糖鎖解析技術の発展がめざましく、こちらの方法では、詳細な糖鎖組成が得られる点や網羅性など、レクチン染色では得られない大きなメリットがあるが、同質量の異性体、例えば、

Sia $\alpha 2-6$ Gal と Sia $\alpha 2-3$ Gal を通常の方法では区別できないなど、欠点もある⁸⁻¹⁰⁾。一方で、ウイルス学研究者にとって圧倒的にアクセスしやすく、かつ「受容体検出」という目的において極めて重要になる組織レベル、細胞レベルでの局在情報が得られるレクチン染色は、今後も引き続き「ウイルス受容体としての糖鎖」を検出するためのツールとしては最も一般的に用いられていくことが予想される。

3. *Maackia* レクチンにまつわる諸問題について

イヌエンジュはマメ科の植物である。マメ科植物の持つレクチンは L-type lectin (L は legume, マメ科植物を意味する) と呼ばれ、植物レクチンの中で最も大きなレクチンファミリーを形成している。マメ科植物はその特徴として、ゲノム上にわずかにアミノ酸配列が異なるレクチンをコードする遺伝子が多数重複している。この様な一つの個体を持つ、特性とアミノ酸配列が非常に似通ったレクチンをお互いにイソレクチンと呼ぶ。*Maackia* レクチンには少なくとも 2 つのイソレクチンが知られている⁶⁾。一つは MAA-I,

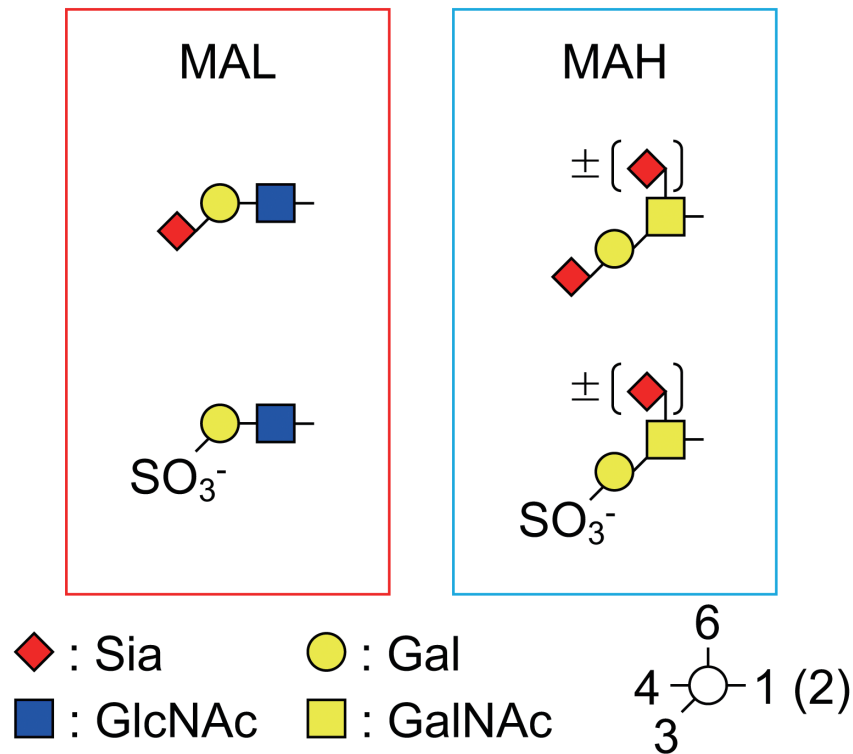


図2 MAL および MAH の糖認識特異性

MAL と MAH が認識する糖鎖の構造を模式的に示した。図形の色と形は単糖の組成を、配置は結合様式を表す。MAL と MAH はそれぞれ対応する「シアル酸を持たない硫酸化糖鎖」にも結合する。

MAL-I, MAL, または MAM などと呼称されるレクチンで、強い mitogen 活性を有するとともに、白血球を凝集するレクチンとして同定されてきた。もう一つは MAA-II, MAL-II, MAH などと呼称されるレクチンで、強い赤血球凝集活性を有する一方で mitogen としての活性は弱い。本稿では前者を MAL (*Maackia amurensis* leucoagglutinin), 後者を MAH (*Maackia amurensis* hemagglutinin) と呼ぶこととする。これら2つのイソレクチンは糖結合特異性も異なり、MAL は Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc (GlcNAc は *N*-アセチルグルコサミン) 構造を、他方 MAH は Sia α 2-3Gal β 1-3GalNAc (GalNAc は *N*-アセチルガラクトサミン) や Sia α 2-3Gal β 1-3 (Sia α 2-6) GalNAc (di-sialyl T 抗原) を認識する (図2)^{6,11)}。これら構造は、Sia α 2-3Gal β は共通であるが、他の部分が異なっている。特に、Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc は主に *N*型糖鎖の末端に、Sia α 2-3Gal β 1-3GalNAc は Sialyl-T 抗原、Sia α 2-3Gal β 1-3 (Sia α 2-6) GalNAc は di-sialyl T 抗原として *O*型糖鎖の形でタンパク質上に提示される。したがって、MAL は主として *N*型糖鎖上の、MAH は *O*型糖鎖上の Sia α 2-3Gal β を認識していると理解して差し支えない。

しかし、先に述べたようにマメ科レクチンにはしばしば特異性の異なるイソレクチンが存在し、これらの明確な定義がなされないまま販売されているという悩ましい実態が

ある。その詳細は参考文献に委ねるが¹¹⁾、第一に、購入できる *Maackia* レクチンは MAL と MAH の混合物であり、しかもその割合はメーカーやロットによって異なっている。しかも、これらの市販品で用いられている MA [L] や MA [A] という表記は L=Lectin や A=Agglutinin (凝集素) の略号であって、特定のイソレクチンを意味していない。第二に、*Maackia* レクチンのイソレクチンを MAA-I, MAA-II などと区別した表記をしている論文、市販品があるが、これらは精製手法の詳細が不明であり、著者の1人である山本らが分離・報告している MAL, MAH とどの程度同質かはわからない。少なくとも、MAL と MAH はリガンドとなる糖鎖を用いたアフィニティ精製では分離不可能である。マメ科レクチンは主に4量体を形成しているが、イソレクチン同士は構造的にも酷似しているため、ヘテロ2量体や4量体を作る可能性もある。山本らは、低 pH 条件下でのイオンクロマトグラフィを用いて、MAL および MAA の高度精製に成功しているが、その収率は低く、知る限りではこの方法を用いて2つのイソレクチンを分離生成しているメーカーはない。第三に、販売されている会社のカタログ情報には誤った糖結合特異性が記載されたり、研究者側が記載している情報を誤解していたりすることにより、*Maackia* レクチンに関する誤った情報が一人

表1 レクチン染色に基づく Sia2-3Gal および Sia2-6Gal の分布解析の例

文献 種	組織	材料	染色法	SAα2-3Gal*	SAα2-6Gal*	シアリダーゼ処理による確認
2) ヒト	鼻粘膜, 副鼻腔, 咽頭, 気管, 気管支, 細気管支, 肺胞	パラフィン包埋	蛍光染色	MAA II (Vector)	SNA (Vector)	-
12) ヒト	鼻咽頭, 気管, 肺	パラフィン包埋	蛍光染色	MAA (EY) MAA (Roche) MAA I (Vector) MAA II (Vector)	SNA I (EY)	+ (Data not shown)
3) ブタ, アヒル	気管, 結腸	凍結	蛍光染色	MAA (Boehringer)	SNA (Boehringer)	-
13) ブタ	気管, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓, 骨格筋, 大腸, 小腸, 結腸	パラフィン包埋	蛍光染色	MAA I (Vector) MAA II (Vector)	SNA (Vector)	+
14) ブタ, マイクロミニブタ	鼻前庭, 鼻甲介, 喉頭, 気管, 気管支, 肺	パラフィン包埋	免疫染色	MAA II (Vector)	SNA I (EY)	-
15) ブタ	鼻, 気管, 気管支, 細気管支, 肺胞	パラフィン包埋	免疫染色	MAA I (Vector) MAA II (Vector)	SNA (Roche)	-
16) ウズラ	鼻甲介, 気管, 肺, 結腸	凍結	蛍光染色	MAA II (Vector)	SNA (Vector)	-
17) ニワトリ, ウズラ, アカアシワシヤコ, シチメンチョウ, キンケイ, ダチョウ, マガモ"	鼻甲介, 気管, 肺, 十二指腸, 空回腸, 盲腸, 結腸	パラフィン包埋	免疫染色	MAA II (Vector)	SNA (Vector)	+ (Data not shown)
18) ニワトリ, アヒル	気管, 肺, 心臓, 腎臓, 脳, 骨格筋, 小腸, 大腸	パラフィン包埋	蛍光染色	MAA I (Vector) MAA II (Vector)	SNA (Vector)	+ (Data not shown)

*()内はレクチンの供給元を示す. Vector: Vector Laboratories、EY: EY Laboratories、Roche: Roche Diagnostics、Boehringer: Boehringer Mannheim Biochemicals.

歩きして議論がなされている。Geisler と Jarvis は MAL および MAH がそれぞれ $SO_3^-3-Gal\beta 1-4GlcNAc$ や $SO_3^-3-Gal\beta 1-3GalNAc$ といったシアル酸を含まない硫酸化糖鎖を認識することを指摘しているが¹¹⁾、既報で使用されている *Maackia* レクチンが、どの程度これらに反応するのかわかり不明である。少なくとも山本らが自家調整した MAL および MAH と、これらに対応する市販品では、組織をシアリダーゼで処理したあとの染色性が異なり、*Maackia* レクチンの調整方法はその糖鎖認識の範囲に大きな影響を与えていると考えられる。これらの誤解やそれを用いた多くの論文の結論を再評価するには、遺伝子レベルに遡り単一の組換え体レクチンを取得するなどのアプローチが必須である。

4. *Maackia* レクチンを用いた実験結果の食い違いについて

表1にこれまでレクチン染色によって明らかにされてきたインフルエンザウイルス受容体に関する知見の一部を例として示す^{2,3,12-18)}。インフルエンザウイルスの受容体を検出する目的としては MAH が MAL よりも汎用される傾向

にある。これはカモのウイルスが $Sia\alpha 2-3Gal\beta 1-3GalNAc$ を $Sia\alpha 2-3Gal\beta 1-4GlcNAc$ よりも優位に認識するという報告に基づいていると考えられる¹⁹⁾。しかし、MAL ではなくあえて MAH を選択するにあたって、本レクチンが主として O 型糖鎖を認識しているという点が十分に考慮されているかは、議論の余地があると考えられる。また興味深いことに、各々の研究において最終的に結論づけた $Sia\alpha 2-3Gal/Sia 2-6Gal$ の分布は、同一動物種においてもしばしば報告者が異なれば一致しない。例えば Shinya らはヒト呼吸器上皮においては全般的に $Sia 2-6Gal$ の分布が優位な一方で、II 型肺胞上皮細胞に限局して $Sia 2-3Gal$ が優位に分布していることを報告しているが、Nicholls らの報告では、 $Sia\alpha 2-3Gal$ の分布は呼吸器上皮のより広い範囲で認められ、特定の細胞に限局しないとされている^{2,12)}。II 型肺胞上皮細胞は H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染し、重篤な下気道症状を引き起こす際の主要な標的細胞であり²⁰⁾、高病原性鳥インフルエンザウイルスが結合する $Sia\alpha 2-3Gal$ がこの細胞に限局して分布するという事は、このようなウイルスの細胞指向性を Shinya らの報告はよく

説明している。一方で、Nichollsらは① *Maackia* レクチンはメーカーによって異なる染色性を示すこと、② *Maackia* レクチンが硫酸化糖鎖にも結合していること、③ 少なくともMALについてはシアリダーゼ処理後も完全にはシグナルが消失しないことに言及しており、我々もヒトにおける「鳥型レセプター」の分布については再考の余地があると考える。

ShinyaらとNichollsらのケースは用いているレクチンや染色条件などに違いが有り、ここに異なる結論が導き出された原因を求めることができる。一方で、Costaら¹⁷⁾およびKuchipudiら¹⁸⁾によるニワトリの気道におけるMAHの染色性についての報告は、どちらもVector Laboratories社のもの(MAA-II)を用いている(KuchipudiはMAL-Iも併用している)。しかし、Kuchipudiらは「気道の線毛上皮はMAHで染色されない」、Costaらは「気道の線毛上皮はMAHで染色される」と食い違った報告をしている。これらが単に「個体差」という言葉では片付けられないことは、少なくとも複数個体を実験に用いることで確認できるだろう。一方で、組織染色に用いた個体や材料に起因するもの(系統、性別、週齢による差異や組織の採材部位による差異)であるかの検証を網羅的に解析することは現実的にはかなり難しい。再現性を担保する上でも、動物の入手場所や週齢、性別(性成熟に至っている個体ならば)など個体に関する情報は、可能な限り公開すべきだろう。実験条件の細かな違いに目を向けると、Costaらはビオチン化MAHを用いた免疫酵素法を用いている一方で、Kuchipudiらは蛍光色素で直接標識されたレクチンを用いているので、実験手法の違いや検出感度、レクチンのロットごとの反応性の差異がこの様な違いを生んでいる可能性もある。なお、レクチンの反応条件はCostaらが15 µg/mlで4℃一晚、Kuchipudiらが10 µg/mlで4℃一晚と比較的近い。また、染色方法は異なっているものの、どちらもホルマリン固定パラフィン切片を用いており、抗原の賦活化に関する記述はない。

5. *Maackia* レクチンで検出できない 多様な鳥型レセプター

基本的な鳥型レセプター構造であるSia2-3Galβ1-4GlcNAcには、さらにフコース(Fuc)の付加が起こりシアリルルイスX抗原(Sia2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAc: SiaLeX)が作られることがある。このようなSia2-3Gal含有糖鎖の構造多様性はインフルエンザウイルスの種特異性に影響を与えている。実際に、ニワトリとカモにおけるインフルエンザウイルスの標的組織におけるSiaLeXの発現を調べると、ニワトリ気管上皮細胞にはSiaLeXが分布している一方で、SiaLeXの発現はカモの結腸では認められない²¹⁾。また、ウイルス側の受容体特性に着目すると、H5亜型低病原性鳥インフルエンザウイルスでは、ニワト

りから分離されたウイルスの一部においてHAがSiaα2-3Galβ1-4GlcNAcではなくSiaLeXを優位に認識する一方で、カモから分離されたウイルスのHAはSiaLeXを認識しない²²⁾。我々は、Sia2-3Gal含有糖鎖の構造多様性が、鳥におけるインフルエンザウイルスの感受性を規定する因子であることを示した。筆者らに引き続き、GuoらはH5亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスにおいても一部のウイルスがSiaLeXとSiaα2-3Galβ1-4GlcNAcの両方を認識することを報告している²³⁾。一方でこれらのウイルスはむしろ水禽類に対する親和性が高いと考えられており、インフルエンザウイルスにおけるSiaLeXの認識がその組織向性や宿主域の拡大にどう寄与しているかについては今後明らかにしていく必要がある。

さて、ここで問題となるのはMALやMAHはSiaLeXを認識できないということである²¹⁾。従って、*Maackia* レクチンのみを用いて動物組織における「ヒト型レセプター/鳥型レセプター」の検出、区別を試みている既存研究では、SiaLeXのような受容体糖鎖分子を見落としている。実際に人の呼吸器でも炎症状態にある時にSiaLeXが多く発現するという報告もあり²⁴⁾、人がこの様な「*Maackia* レクチンで検出できない鳥型レセプター」をどの程度有しているかは不明である。過去にヒトから分離されたウイルスは、Siaα2-6Galへの結合能を獲得していることから、ヒトにおける機能的なインフルエンザレセプターはSiaα2-6Galであることは疑う余地はない。一方で、ヒトパラインフルエンザウイルスI型や流行性耳下腺炎ウイルスはSiaα2-3Galを含む糖鎖に高い親和性を示すことが知られている²⁵⁻²⁷⁾。従ってヒトにおけるSiaα2-3Galの真の分布を明らかにすることによって、鳥・ヒト間におけるインフルエンザウイルスの伝播や、パラインフルエンザ、流行性耳下腺炎の病態発現におけるこれら糖鎖の役割が明らかになっていくことが期待される。

6. *Maackia* レクチンとインフルエンザウイルスHAの 糖認識の差異

レクチンは、特定の構造を有する糖鎖に結合するため、あたかも抗体のようなイメージを持たれがちであるが、実際には両者の特性はやや異なる。まず、レクチンは抗体と比較してターゲット分子との結合力が圧倒的に弱い(諸説あるが、レクチンと糖鎖の相互作用はKd=10⁻⁷-10⁻³ M、抗体と抗原の場合はKd=10⁻⁹-10⁻⁷ Mとも言われる²⁸⁾)。また、糖鎖とレクチンの結合は、抗体と比べると「あいまいで広い」と言われており、ターゲットとなる糖鎖の構造が変わると、レクチンとの結合が全く失われることもあるが、時には結合が弱くなる場合も強くなる場合もある。したがって、レクチン染色のデータを元に組織における糖鎖構造を推定するためには、プローブとして用いるレクチンと糖鎖の結合特性、即ち結合の有無や強弱がどのような糖鎖構

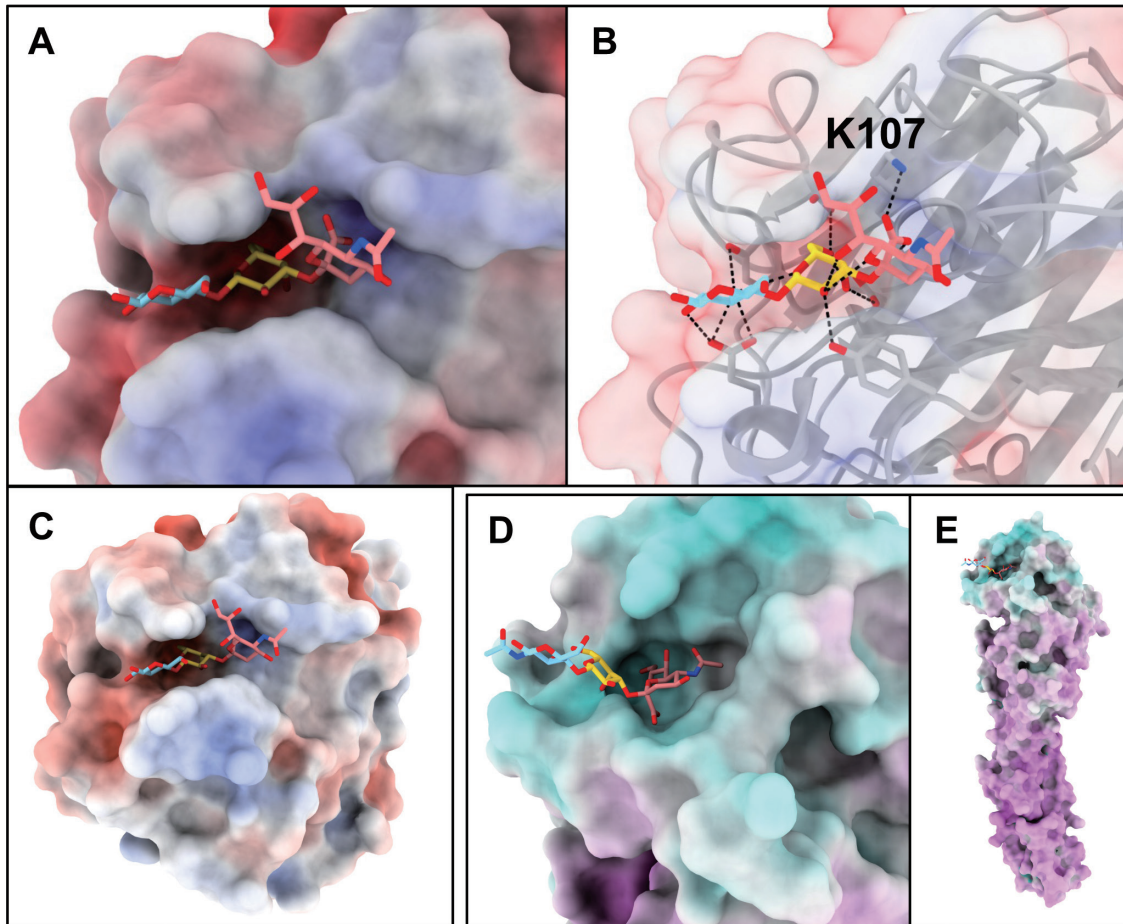


図3 MAL および HA と糖鎖の結合

MAL と $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ (A-C; PDB 1DBN) または HA と $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ (D,E; PDB 4BGY) の共結晶構造を示す。糖鎖は赤: Sia, 黄: Gal, 青: Glc (NAc) で示す。タンパク質は表面モデルで示し, APBS (<https://server.poissonboltzmann.org/>) で計算した表面電荷に応じて色分けした (青/シアンが陽電荷, 赤/マゼンダが陰電荷)。B では表面モデルに加えて, タンパク質の主鎖をリボンモデルで示し, 糖鎖とタンパク質における水素結合を点線で示した。MAL の 107 位にあるリジン残基はシアル酸のカルボキシル基と水素結合を形成している。

造に影響を受け規定されるかについて理解が求められる。図3にMALと $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ の共結晶構造を示す²⁹⁾。結合した糖鎖はタンパク質で作られた比較的深い溝に配置されている。糖鎖とタンパク質の位置関係について細かく見ていくと, $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ は非還元末端のSiaではなく、Galがポケットの奥深くへと突き刺さるような位置にあり、Siaはむしろ挟み込まれるような場所に位置している。Siaの近くにはポジティブなチャージを持つリジン残基が配置しており、シアル酸のネガティブチャージと相互作用することで、糖鎖とレクチンの結合を強めていることが予想される。一方で、シアル酸とMALの相互作用がこのチャージに大きく依存しているならば、MALが、Galの3位にネガティブチャージをもつ硫酸基が結合した構造、即ち $\text{SO}_3\text{-3-Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ のようなシアル酸を持た

ない硫酸化糖鎖を認識するという事は想像に難くない。興味深いことに、糖鎖結合部位のうち、シアル酸が位置する部分の近傍は弱くポジティブにチャージしているのに対して、他の部分は電氣的に中性、またはむしろネガティブにチャージしている。一方でインフルエンザウイルスのHAと $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ の共結晶構造をみると、その様相は随分異なる³⁰⁾。まず、HAはMALと比較して圧倒的に糖鎖結合ポケットが浅く、Siaのそれぞれの官能基がタンパク質と相互作用するような形で糖鎖が配置されている。特にGlcNAcは、ほぼポケットからはみ出しており、何らかの修飾を受け入れる余地があるようにも思える。この点はMALとは大きく異なり、Glcは比較的しっかりと溝に挟み込まれている。このようにMALとHA、それぞれにおける糖鎖との結合を立体的に眺めてみると、MAL

は本質的に Gal を認識し, Sia (または Gal の C3 位におけるネガティブチャージの存在) がレクチンと糖鎖の結合を飛躍的に強めている一方で, HA は本質的に Sia を認識しているという両者の違いが理解できる。

7. 結局我々はどうすればよいのか

さて, ここまでインフルエンザウイルスの鳥型レセプター検出における諸問題を挙げてきたが, これらの問題を踏まえて, 結局我々ウイルス研究者はどうすればよいのだろうか. 現状, 確実にシアル酸糖鎖を認識する高品質な *Maackia* レクチンを一般の販売会社から購入することは極めて難しい. したがって, *Maackia* レクチンがシアル酸を含む糖鎖を認識しているか確認するためには, シアリダーゼ消化によって染色性が消失 / 低下していることを確認する必要がある. また, 複数の糖鎖認識プローブによる染色の結果を総合して判断することも有効である. Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc の認識プローブとしては, Hidari らが HYB4 というモノクローナル抗体を樹立している³¹⁾. 本抗体は富士フィルム和光純薬から入手可能なため, 最近国内の研究者でも *Maackia* レクチンに代えて, または加えてこちらの抗体を用いることが口コミで広まっている. ただしこの抗体は GM3 という糖脂質を免疫原として得られたクローンであり, 糖タンパク質に加えて糖脂質上の Sia α 2-3Gal β も認識することに注意する必要がある.

どの糖鎖認識プローブを使用する場合も最低限実施したほうが良いのは, シアリダーゼ処理によってシグナルが消失するかを調べることである. 前述のように *Maackia* レクチンは, シアル酸を持たない硫酸化糖鎖に結合する性質が有り, 染色前の組織切片にシアリダーゼ処理を施しても陽性シグナルが消えない場合, そのシグナルはシアル酸を持たない硫酸化糖鎖に対するもの, または非特異反応であることが想定される. HYB4 や SiaLeX に対する抗体(我々は KM93 というクローンを使っている)も組織切片にシアリダーゼ処理を施せば, もちろんシグナルが消失する. 非特異反応を見分ける目的でもシアリダーゼ処理は有用である. このような染色の結果を論文で公表する際には是非お願いしたいのが, 「シアリダーゼ処理後の染色像を合わせて公表していただきたい」ということである. 筆頭著者自身も以前の論文でシアリダーゼ処理後の染色像を出していないことは, ここに懺悔しておくが, シアリダーゼ処理に関する記述がある論文でも, その結果は「data not shown」となっており, その研究で用いたプローブがどの程度の交差反応性を示していたのか第三者的に検証することができない事例が多い. 今後, シアリダーゼ処理前後の染色像等の情報が読者に提供されることで, 用いたレクチンの性質が研究者全体で共有され, 正しい理解に繋がっていくものと期待される.

インフルエンザウイルスの受容体研究および *Maackia*

レクチンの解析については, 歴史的にも日本の研究チームが貢献してきたところが大きい. それ故, 本稿で議論してきた諸問題については日本の研究者が解決しなくてはならないと筆者らは強く感じている. ウイルス学研究者の皆様におかれては, 本稿をきっかけにインフルエンザウイルスの受容体について再び興味を持っていただき, 是非その解決にご協力いただければと思う.

謝辞

本稿執筆の機会を与えていただきました編集委員長の苅和宏明先生はじめ編集委員の先生方に深謝いたします. 本稿の執筆にあたり, アドバイス, 激励など多方面に渡るサポートをしてくださった創価大学 西原祥子先生に厚く御礼申し上げます.

本稿に関連し, 開示すべき利益相反関係にある企業等はありません.

参考文献

- 1) Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*. 127(2):361-73, 1983.
- 2) Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 440(7083):435-6, 2006.
- 3) Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Journal of virology*. 72(9):7367-73, 1998.
- 4) Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor Specificity in Human, Avian, and Equine H2 and H3 Influenza Virus Isolates. *Virology*. 205(1):17-23, 1994.
- 5) Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, Skehel JJ, Wilson IA, Wiley DC. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*. 304(5921):76-8, 1983.
- 6) Kawaguchi T, Matsumoto I, Osawa T. Studies on Hemagglutinins from *Maackia amurensis* Seeds. *Journal of Biological Chemistry*. 249(9):2786-92, 1974.
- 7) Shibuya N, Goldstein IJ, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 262(4):1596-601, 1987.
- 8) Chen S, Qin R, Mahal LK. Sweet systems: technologies for glycomic analysis and their integration into systems biology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 56(3):301-20, 2021.
- 9) Narimatsu H, Kaji H, Vakhrushev SY, Clausen H, Zhang H, Noro E, Togayachi A, Nagai-Okatani C, Kuno A, Zou X, Cheng L, Tao S-C, Sun Y. Current Technologies for Complex Glycoproteomics and Their Applications to Biology/Disease-Driven Glycoproteomics.

- J Proteome Res. 17(12):4097–112, 2018.
- 10) Peng W, Gutierrez Reyes CD, Gautam S, Yu A, Cho BG, Goli M, Donohoo K, Mondello S, Kobeissy F, Mechref Y. MS - based glycomics and glycoproteomics methods enabling isomeric characterization. *Mass Spec Rev.* 2021;43:21713, 2021.
 - 11) Geisler C, Jarvis DL. Letter to the Glyco-Forum: Effective glycoanalysis with *Maackia amurensis* lectins requires a clear understanding of their binding specificities. *Glycobiology.* 21(8):988–93, 2011.
 - 12) Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JM. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: Evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respiratory Research.* 8:1–10, 2007.
 - 13) Nelli RK, Kuchipudi SV, White GA, Perez BB, Dunham SP, Chang K-C. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res.* 6(1):4, 2010.
 - 14) Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M, Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, da Silva Lopes TJ, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y. The Microminipig as an Animal Model for Influenza A Virus Infection. Schultz-Cherry S, editor. *J Virol.* 91(2), 2017.
 - 15) Trebbien R, Larsen LE, Viuff BM. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virol J.* 8(1):434, 2011.
 - 16) Yamada S, Shinya K, Takada A, Ito T, Suzuki T, Suzuki Y, Le QM, Ebina M, Kasai N, Kida H, Horimoto T, Rivaille P, Chen LM, Donis RO, Kawaoka Y. Adaptation of a Duck Influenza A Virus in Quail. *Journal of Virology.* 86(3):1411–20, 2012.
 - 17) Costa T, Chaves AJ, Valle R, Darji A, van Riel D, Kuiken T, Majó N, Ramis A. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Vet Res.* 43(1):28, 2012.
 - 18) Kuchipudi SV, Nelli R, White GA. Differences in influenza virus receptors in chickens and ducks: Implications for interspecies transmission. *J Mol Genet Med.* 03(01), 2009.
 - 19) Gambaryan A, Yamnikova S, Lvov D, Tuzikov A, Chinarev A, Pazynina G, Webster R, Matrosovich M, Bovin N. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology.* 334(2):276–83, 2005.
 - 20) Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K, Peiris M, Nicholls JM, Chokephaibulkit K, Vanprapar N, Auewarakul P. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerging infectious diseases.* 11(7):1036–41, 2005.
 - 21) Hiono T, Okamatsu M, Nishihara S, Takase-Yoden S, Sakoda Y, Kida H. A chicken influenza virus recognizes fucosylated α 2,3 sialoglycan receptors on the epithelial cells lining upper respiratory tracts of chickens. *Virology.* 456–457:131–8, 2014.
 - 22) Hiono T, Okamatsu M, Igarashi M, McBride R, de Vries RP, Peng W, Paulson JC, Sakoda Y, Kida H. Amino acid residues at positions 222 and 227 of the hemagglutinin together with the neuraminidase determine binding of H5 avian influenza viruses to sialyl Lewis X. *Arch Virol.* 161(2):307–16, 2016.
 - 23) Guo H, de Vries E, McBride R, Dekkers J, Peng W, Bouwman KM, Nycholat C, Verheije MH, Paulson JC, van Kuppeveld FJM, de Haan CAM. Highly Pathogenic Influenza A(H5Nx) Viruses with Altered H5 Receptor-Binding Specificity. *Emerging infectious diseases.* 23(2):220–31, 2017.
 - 24) Davril M, Degroote S, Humbert P, Galabert C, Dumur V, Lafitte J-J, Lamblin G, Rousset P. The sialylation of bronchial mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or from chronic bronchitis is related to the severity of airway infection. *Glycobiology.* 9(3):311–21, 1999.
 - 25) Fukushima K, Takahashi T, Ito S, Takaguchi M, Takano M, Kurebayashi Y, Oishi K, Minami A, Kato T, Park EY, Nishimura H, Takimoto T, Suzuki T. Terminal sialic acid linkages determine different cell infectivities of human parainfluenza virus type 1 and type 3. *Virology.* 464–465:424–31, 2014.
 - 26) Kubota M, Matsuoka R, Suzuki T, Yonekura K, Yanagi Y, Hashiguchi T. Molecular Mechanism of the Flexible Glycan Receptor Recognition by Mumps Virus. Dutch RE, editor. *J Virol.* 93(15):2019.
 - 27) Kubota M, Takeuchi K, Watanabe S, Ohno S, Matsuoka R, Kohda D, Nakakita S, Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Shiroishi M, Yanagi Y, Hashiguchi T. Trisaccharide containing α 2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113(41):11579–84, 2016.
 - 28) Hirabayashi J, Yamada M, Kuno A, Tateno H. Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem Soc Rev.* 42(10):4443, 2013.
 - 29) Imberty A, Gautier C, Lescar J, Pérez S, Wyns L, Loris R. An Unusual Carbohydrate Binding Site Revealed by the Structures of Two *Maackia amurensis* Lectins Complexed with Sialic Acid-containing Oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry.* 275(23):17541–8, 2000.
 - 30) 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(7449):392–6, 2013.
 - 31) Hidari KIPJ, Yamaguchi M, Ueno F, Abe T, Yoshida K, Suzuki T. Influenza virus utilizes N-linked sialoglycans as receptors in A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 436(3):394–9, 2013.

The issues in detection of avian-type receptors for influenza viruses

Takahiro HIONO¹⁾, Sayaka TAKASE-YODEN²⁾, Kazuo YAMAMOTO³⁾

1) Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University

2) Glycan and Life Systems Integration Center (GaLSIC), Soka University

3) Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

Influenza viruses utilize sialic acid-containing glycoconjugates as receptors. The distribution of receptors in host tissues has been investigated in many species to understand the ecology of influenza viruses in nature and the mechanisms of interspecies transmission of the viruses. On the other hand, lectins, which have been widely used to detect these receptor molecules, have many different characteristics from antibodies and thus, require special attention in interpreting the results of lectin staining. In particular, lectins derived from *Maackia amurensis*, which has been used to detect Sia α 2-3Gal, the avian-type receptor for influenza viruses, have been used without fully understanding its characteristics. This led to some confusion in interpreting the distribution of influenza virus receptors in host tissues. How accurately do we know the distribution of avian-type receptors in host animals? In this article, we would like to suggest reviewing the influenza virus receptors by providing issues related to *Maackia* lectins.

