

# 機能的グリコミクスによる感染症の克服

## Control of infectious disease by functional glycomics

鈴木 隆 Takashi SUZUKI

薬学研究科薬学専攻生化学教室 教授  
Professor, Department of Biochemistry, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

## Profile

2006年 静岡県立大学薬学部教授  
1996年 静岡県立大学薬学部助教授  
1998年 米国 St. Jude Children's Research Hospital 客員研究員 (文部省在外研究員)  
1994年 静岡県立大学薬学部講師  
1991年 静岡県立大学薬学部助手  
1984年 静岡県立大学薬学部助手  
1984年 静岡県立大学薬学部研究科博士課程修了  
1979年 静岡薬科大学卒業

2006 Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka  
1996 Associate Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka  
1998 Visiting Scholar, Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis  
1994 Assistant Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka  
1991 Research Associate, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka  
1984 Researcher, Shino Test Institute  
1984 Ph.D., Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Shizuoka College of Pharmacy  
1979 Graduate from Shizuoka College of Pharmacy

## Contact

T E L 054-264-5725  
+81-54-264-5725  
e-mail suzuki@u-shizuoka-ken.ac.jp  
U R L http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~biochem/

## 序論

インフルエンザA型ウイルス(IAV)のシアロ糖鎖結合性は、ウイルスの感染性や宿主域を規定する重要な因子の一つと考えられているが、IAVがシアロ糖分子種をどのように見分けているのかほとんど明らかになっていない。また、IAVはウイルスの分離に汎用されているMDCK細胞などの上皮細胞に豊富に存在する硫酸化糖脂質の一種であるスルファチドに結合性を示すが、ウイルス感染におけるスルファチドの役割はこれまで不明であった。本研究では、H3型 hemagglutinin (HA) についてシアロ糖分子種の認識に関わるアミノ酸を同定するとともに、子孫ウイルスの産生に sulfatide が重要な役割をもつことを明らかにした。さらに、食品成分の抗ウイルス作用を評価するため、柑橘類由来成分から調製された glucosyl hesperidin (GH) と緑茶に含まれる stricinin の抗インフルエンザウイルス作用について検討した。

## 成果

- H3型 hemagglutinin (HA) の155番目の Thr から Tyr へのアミノ酸変異と158番目の Glu から Gly へのアミノ酸変異が、5-N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) と 5-N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) の認識に重要であることが判明した(図1)。
- sulfatide を欠損する COS-7 細胞に ceramide galactosyltransferase と cerebroside sulfotransferase の遺伝子を導入することで、sulfatide を恒常的に発現させた変異細胞を作製し、IAV の感染増殖性を比較した結果、IAV の吸着や侵入に相違は認められなかったにも関わらず、sulfatide 発現細胞から産生された新生ウイルス量は、COS-7 細胞と比較して数千倍に増加することが判明した(図2)。さらに、感染細胞内で新たに合成されたウイルスヘマグルチニン(hemagglutinin:HA)は細胞膜表面へ移行後、細胞膜の sulfatide と結合することで、ウイルス核酸タンパク質複合体の核外輸送を誘導し、新生ウイルスの粒子形成を促進していることを見出した。また、sulfatide と HA 間の結合を阻害する抗 sulfatide 単クローナル抗体は、ウイルスの重型を問わず、強力なウイルス増殖抑制効果とウイルス NP の核外輸送阻害効果を示すことが判明した。
- GH は IAV のシアリダーゼ活性を阻害することで、*in vitro* において IAV 感染を阻害することが判明した。
- stricinin は fusion 過程を阻害することで IAV に対し強力な抗ウイルス作用を示した(表1)。

## 展望

本研究の成果は、インフルエンザウイルスの伝播機構、宿主域を規定する要因、パンデミックの発生におけるシアロ糖分子種の重要性と sulfatide の機能を理解するために寄与するだけでなく、抗インフルエンザ剤の開発や新たなパンデミックの監視のために有益な情報を提供するものと思われる。

## Introduction

The binding specificity of influenza A virus (IAV) for sialyloligosaccharide moieties on the cell surface is a critical factor determining the ability to infect different host species. However, the molecular mechanism of H3 hemagglutinin (HA) specificity for two major molecular species of sialic acid, 5-N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and 5-N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) is not clear. Sulfatide, which binds to IAV, is abundantly expressed in various mammalian organs, including the intestine and trachea. However, the function of sulfatide in IAV infection remains unknown.

We determined which amino acids residues contribute to recognition of molecular species of sialic acid and demonstrated that sulfatide is critical in enabling host cells to produce progeny viruses. We also examined the antiviral effects of glucosyl hesperidin and stricinin on the replication of IAVs *in vitro*.

## Results

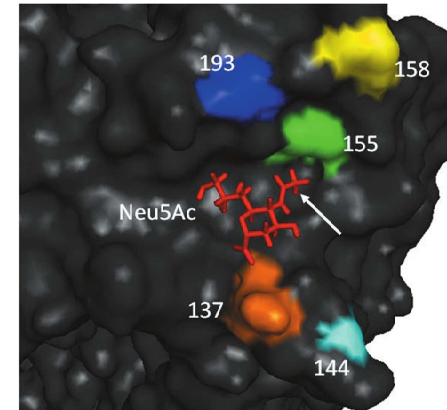
We found that single amino acid substitutions of H3 HA at position 155 from Thr to Tyr and at position 158 from Glu to Gly play a critical role in recognition of two major molecular species of sialic acids (Fig. 1).

We also found that sulfatide-enriched COS-7 cells remarkably promote multiple replications of IAV in comparison with parent COS-7 cells, in which little replication of IAV occurs (Fig. 2). Delivering HA to the cell surface in association with sulfatide induces translocation of newly synthesized IAV ribonucleoprotein complexes from the nucleus to cytoplasm. Treatment of IAV-infected cells with an anti-sulfatide monoclonal antibody, which blocks the binding of IAV and sulfatide, resulted in significant reduction in IAV replication and accumulation of the viral nucleoprotein in the nucleus. GH prevented IAV replication by inhibition of viral sialidase activity, which is involved in the entry and release stages of IAV infection.

Stricinin had an antiviral effect on enveloped viruses, including IAV, which was mediated by inhibition of viral fusion (Table 1).

## Perspectives

Our findings will be helpful in understanding the significance of molecular species of sialic acid and the role of sulfatide in viral transmission, host range restriction, and pandemics, and provides useful information for the development of anti-influenza virus agents and surveillance of pandemic potential.



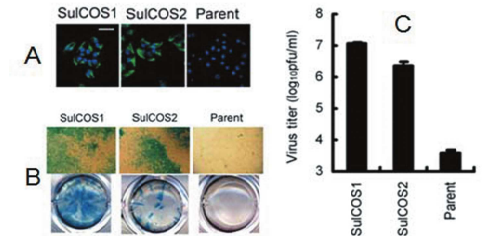
[図1] シアロ糖のHA受容体結合領域。シアロ糖分子の種認識に関わるアミノ酸の部位を示している。矢印はNeu5AcのN-アセチル基である。このモデルはPyMol分子画像表示システム1.1r1 (Delano Scientific LLC.)で作成した。

[Figure 1] Receptor-binding pocket with sialic acid. This shows the location of altered residues within and neighboring the receptor-binding pocket with sialic acid. The arrow indicates the N-acetyl group of Neu5Ac. We generated the model by using PyMol Molecular Graphics System 1.1r1 (Delano Scientific LLC.).

Strain	Stricinin		EGCG		Amantadine	
	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	SI <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	SI <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	SI <sup>b</sup>
A/Memphis/1/71 (H3N2)	0.17 ± 0.024	30	0.52 ± 0.039	15	3.18 ± 0.095	N.D. <sup>c</sup>
A/Aichi/268 (H3N2)	0.19 ± 0.042	26.8	0.35 ± 0.033	22.3	6.62 ± 0.107	N.D. <sup>c</sup>
A/Duck/HK/313/478 (H3N3)	0.22 ± 0.017	23.2	0.55 ± 0.056	14.2	0.59 ± 0.089	N.D. <sup>c</sup>
A/Shizuoka/838/2009 (Pandemic H1N1)	0.09 ± 0.021	66.7	0.12 ± 0.019	65	>50	N.D. <sup>c</sup>
A/PR/8/34 (H1N1)	0.28 ± 0.037	18.2	N.D. <sup>c</sup>	N.D. <sup>c</sup>	N.D. <sup>c</sup>	N.D. <sup>c</sup>
A/swine/Hokkaido/1085 (H3N2)	0.24 ± 0.022	21.3	N.D. <sup>c</sup>	N.D. <sup>c</sup>	N.D. <sup>c</sup>	N.D. <sup>c</sup>

## 代表的な発表論文と研究業績 / Major Publications and Achievements

- A. Minami, H. Shimizu, Y. Meguro, N. Shibata, H. Kanazawa, K. Ikeda, T. Suzuki; Imaging of sialidase activity in rat brain sections by a highly sensitive fluorescent histochemical method. *NeuroImage*, 58, 34-40 (2011)
- T. Takahashi, Y. Kurebayashi, K. Ikeya, T. Mizuno, K. Fukushima, H. Kawamoto, Y. Kawaoka, Y. Suzuki, T. Suzuki; The low-pH stability discovered in neuraminidase of 1918 pandemic Influenza A Virus enhances virus replication. *PLoS One* 5 (12), e15556 (2010)
- R. K. Saha, T. Takahashi, Y. Kurebayashi, K. Fukushima, A. Minami, N. Kinbara, M. Ichitani, Y. M. Sagesaka, T. Suzuki; Antiviral effect of stricinin on influenza virus replication. *Antiviral Res.* 88, 10-18 (2010)
- T. Takahashi, A. Hashimoto, M. Maruyama, H. Ishida, M. Kiso, Y. Kawaoka, Y. Suzuki, T. Suzuki; 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)
- R. K. Saha, T. Takahashi, T. Suzuki; Glucosyl hesperidin prevents influenza A virus replication *in vitro* by inhibition of viral sialidase. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1188-1192 (2009)
- T. Takahashi, K. Murakami, M. Nagakura, H. Kishita, S. Watanabe, K. Honke, K. Ogura, T. Tai, K. Kawasaki, D. Miyamoto, K. I. P. J. Hidari, C.-T. Guo, Y. Suzuki, T. Suzuki; Sulfatide is required for efficient replication of influenza A virus. *J. Virol.*, 82, 5940-5950 (2008)



[図2] スルファチド発現COS-7細胞におけるインフルエンザウイルスの増殖性。(A) 共焦点レーザー顕微鏡によるスルファチド発現細胞(SuICOS1, SuICOS2)と親細胞のスルファチド(緑色)と核(青)の蛍光染色像を示す。図中の白線の長さは50 μm。(B) IAV感染24時間後におけるウエル内のウイルス感染増殖細胞(下段:黄色)とその光学顕微鏡像(上段:緑色。倍率40倍)を示す。(C) 多段階増殖により産生されたIAV感染細胞培養上清中のウイルス量を示す。ウイルス量は plaque assay により算出した。

[Figure 2] Multiple replications of IAV in sulfatide-enriched COS-7 cells. (A) Fluorescent observation of sulfatide (green) and nucleus (blue) in sulfatide-enriched cell clones and parent cells. Scale bar is 50 μm. (B) Observation of infected cells (blue) in a well (lower panel) or under an optical microscope at a magnification of ×40 (upper panel) at 24 h postinfection. (C) We measured virus multiple replication titers in the supernatant from infected cells of (B) by a plaque assay.

[表1] A型インフルエンザウイルスに対する stricinin, EGCG 及び amantadine の抗ウイルス作用の比較。50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)はウイルス感染細胞のフォーカスフォーミングアッセイにより算出し、平均値±平均値の標準誤差で表した。選択指数(SI)は50%細胞毒性濃度の平均値をIC<sub>50</sub>の平均値で除した値を示している。\*N.D.は測定していないことを示している。

[Table 1] Anti-viral activity of stricinin, epigallocatechin gallate, and amantadine against IAV strains. Virus-infected cells were determined by a focus-forming assay and the concentration causing 50% inhibition of antigen-positive cell number (IC<sub>50</sub>) calculated from the dose-response curve. IC<sub>50</sub> is presented as mean ± S.E.M. (n = 3). Selectivity index (SI) is presented as the ratio of 50% cytotoxic concentration to IC<sub>50</sub>. \*N.D., not determined.