



Carbohydrates of influenza virus hemagglutinin : structures of the whole neutral sugar chains

松本, 明

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1984-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0477

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000477>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍） まつもと あきら 松本明 （大阪府）
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 医博い第424号
 学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当
 学位授与の日付 昭和59年3月31日
 学位論文題目 Carbohydrates of Influenza Virus Hemagglutinin:
 Structures of the Whole Neutral Sugar Chains
 （インフルエンザウィルス赤血球凝集素の糖質）
 全中性糖鎖の構造

審査委員 主査 教授 西塚 泰 美
 教授 藤田 拓 男 教授 杉山 武 敏

論文内容の要旨

緒 言

インフルエンザウィルス赤血球凝集素（HA）は、ノイラミニダーゼと同じくウィルス殻のスパイクを構成する膜内在性の糖蛋白質である。HAが宿主細胞形質膜のシアル酸を持つ部分に特異的に結合する事により、ウィルス粒子が宿主細胞表面に吸着し、ウィルス殻と細胞膜が融合してウィルスRNAが宿主細胞内に浸入する。一方HAはインフルエンザウィルスの主要な表面抗原であり、その抗原決定基の変化がインフルエンザの流行と密接な関係を持っている。A2ホンコン型インフルエンザウィルスのHAは分子量22万、S-S結合で結ばれた2種のサブユニットからなり、ブロメラインにより膜結合性のC末端部のみを残してウィルスから遊離される。1975年 Skehel らによりブロメライン消化HA（BHA）が結晶化され、またBHAはHAの糖質のすべてを含んでいることが明白になった。

1981年 Wilson らによりX線解析法でBHAの立体構造が明らかにされた。私は共同研究者の協力のもとにBHAの糖鎖構造を決定したので報告する。

試料および方法

- ① BHAの精製 BHAはBrand と Skehel の方法によりA2ホンコン型ウィルスから調整したものを用いた。
- ② 糖鎖の遊離およびアイソトープ標識 BHAの糖鎖は無水ヒドラジン分解法により遊離され、N-アセチル化の後その10%をNaB〔³H〕₄により還元末端標識して酵素逐次分解等の解析に用い、90%はNaB〔²H〕₄により還元しメチル化分析に用いた。

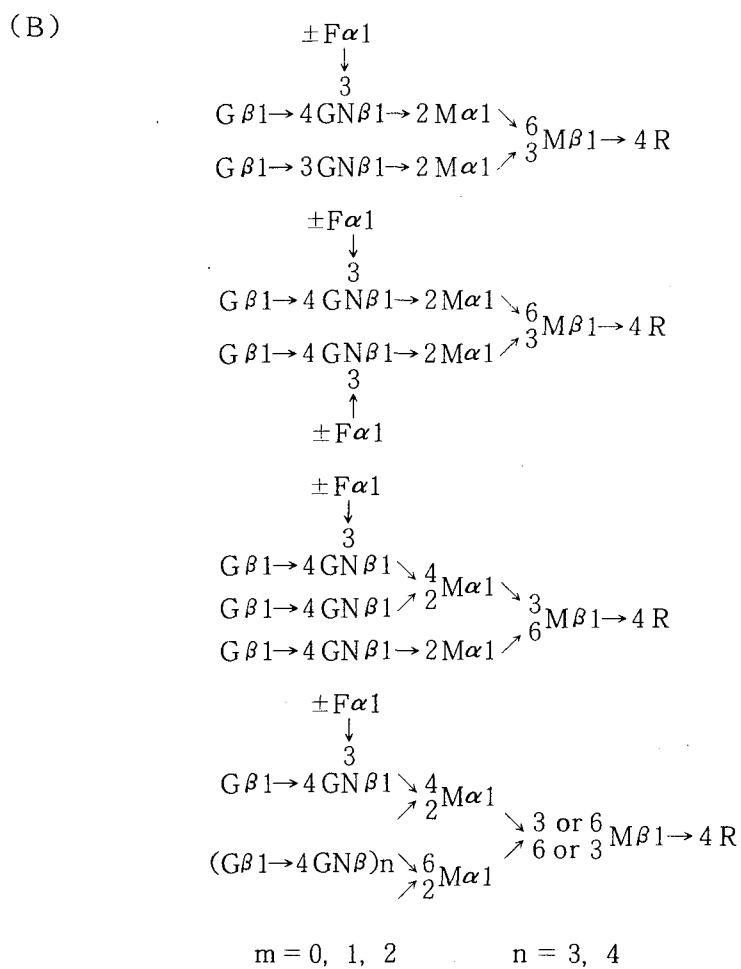
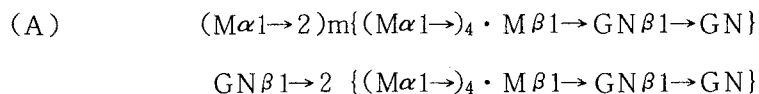
③ 糖鎖の分離 標識糖鎖は高圧濾紙電気泳動により中性糖鎖と酸性糖鎖に分画された。中性糖鎖は濾紙クロマトグラフィーにより更に分離精製された。一部は更にコンカナバリンAセファロースを用い結合画分と素通り画分に分画された。こうして得られた各画分は基質特異性の異なる種々のエキソグリコシダーゼで逐次分解して、それぞれのBio-Gel P-4によるゲル濾過での溶出位置の変化を知ることにより各糖鎖の構成単糖の種類、配列順序、及び一部の結合様式を決定した。また構成単糖の厳密な結合様式は各画分を箱守法でメチル化してガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーで解析することにより決定した。

結 果

① BHAの糖鎖の20%を占める酸性画分はシアリダーゼ処理によっても全く中性化せず、種々のスルファターゼ処理により一部が中性化した。

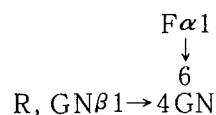
② 中性糖鎖の主要構造を図1に示す。中性糖鎖の73%は高マンノース型糖鎖(図1A)、残りは種々の特徴を持つ複合型糖鎖(図1B)であった。

図 1



省略記号

G, ガラクトース
GN, N-アセチルグルコサミン
F, フコース
M, マンノース



考 察

HAはノイラミニダーゼの存在によりその糖鎖にシアル酸を持たず、Printerらにより酸性糖鎖の陰性残基が硫酸基ではないかと推定されてきた。今回種々のスルファターゼ処理で酸性画分の一部が中性化した事実はこの可能性を高めるものである。

HAのアミノ酸配列はDopheideらにより明らかにされ、7か所のアスパラギン結合糖鎖結合部位が判明した。そのうち5か所は複合型糖鎖が結合し、硫酸基を持つ糖鎖は特定の一か所であると単糖組成分析の結果から推定されているが、私の結果によれば全体に占める複合型糖鎖は27%に過ぎず、残りの2か所にすべての高マンノース型糖鎖が結合していると考えるのは無理があり、また20%を占める酸性糖鎖がただ1か所に結合しているとは考え難い。高マンノース型、複合型のいずれをも結合させうる結合部位を想定しなければ説明できないが、このことは従来の膜糖質解析がプロナーゼ等で遊離した糖ペプチドの単糖組成分析によってなされたものであるため、分子レベルでの糖鎖構造の解析が困難であることを意味している。

決定した13種類の糖鎖構造のうち4種類を占める高マンノース型糖鎖は、いずれもアスパラギン結合糖鎖生成過程の中間産物である。複合型糖鎖の構造は多彩で側鎖にGal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β をもつ2本鎖糖鎖、母核 β -マンノースにGlcNAc β 1 \rightarrow 4結合を持つ2本鎖糖鎖、側鎖GlcNAc β にFuc α 1 \rightarrow 3結合を持つ2本鎖、3本鎖、及び4本鎖糖鎖などである。これはインフルエンザウィルスと同じく鶏卵尿膜のうちで培養されるHVJのウィルス殻蛋白であるHANA蛋白とF蛋白の糖鎖が2本鎖構造のみであり、母核 β -マンノースにGlcNAc β 1 \rightarrow 4結合を持つ糖鎖が存在しない事と全く異なる。従ってHAの糖鎖は、vesicular stomatitis virusの例で示唆された様に、宿主細胞膜糖鎖の単なるreplicaではない事を意味していると言えよう。

論文審査の結果の要旨

インフルエンザウィルス赤血球凝集素は膜内在性の糖蛋白質で、ウィルスの宿主細胞への感染成立に必須であるばかりでなく、その抗原性の変化がインフルエンザの流行と密接な関係がある。最近、細胞の相互の認識現象に、膜糖蛋白質の糖鎖が関与していることを示唆する知見が種々提出されているが、本ウィルスの宿主選択性や感染成立に関与する赤血球凝集素の糖鎖の意義を知るには、その糖鎖構造を解明することが必要である。この赤血球凝集素は陰性荷電を有するにかかわらずシアル酸を含んでいないこともその構造決定の興味をそそる点である。

本研究では、まず凝集素から無水ヒドラジン分解法により糖鎖のみを分離し、これを濾紙クロマトグラフィー、および高圧濾紙電気泳動により精製した。次いでそれらを種々のエキソグリコシダーゼ処理後、ゲル濾過により構成単糖配列を知り、糖鎖の厳密な結合様式はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーで解析するなどの方法により13種類の糖鎖構造を決定している。

得られた糖鎖構造のうち4種類は糖鎖生成段階の中間産物と考えられる高マンノース型糖鎖、残りは多彩な側鎖構造を持つ複合型糖鎖であった。従来のプロナーゼ等で遊離した糖ペプチドの単糖組

成分析の結果から推定された高マンノース型、および複合型糖鎖結合部位の数は今回得られた結果と一致せず、従来の解析法の分子レベルでの構造決定の限界を示すものと思われる。また同一の宿主細胞で培養されるHVJウィルスの2種の膜蛋白質の糖鎖構造と比較すると、今回得られた構造と異なるものがほとんどで、vesicular stomatitis virusの様に単なる宿主の糖鎖構造のレプリカではないと考えられる。また、酸性糖鎖のスルファターゼ処理の結果から、本ウィルスの陰性荷電が硫酸基によるものであることが示唆された。

このようにウィルスはその糖鎖の生合成段階で、宿主の糖転移酵素を必ずしもそのまま利用しているとは限らず、ウィルス自身が別の転移酵素、あるいは宿主の転移酵素に何らかの修飾を加える物質を産生している可能性が強い。また、本研究はインフルエンザウィルスでは硫酸基を糖に配位させる反応系が想定されるなど、一般細胞には存在しないウィルス糖鎖生合成のメカニズム解明の端緒となる成績を得た価値ある研究の集積であると認める。

よって、本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。