



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on functions of envelope glycoproteins in replication and pathogenicity of influenza A viruses
Author(s)	小林, 大樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第16956号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16956
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99801
Type	doctoral thesis
File Information	Daiki_Kobayashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：小林 大樹

Name: Daiki Kobayashi

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on functions of envelope glycoproteins
in replication and pathogenicity of influenza A viruses
(インフルエンザ A ウイルスの複製および病原性発揮における
表面糖タンパク質の機能に関する研究)

インフルエンザ A ウイルスは哺乳動物および鳥に広範な宿主域を持ち、主に急性の呼吸器感染症を引き起こす。本ウイルスの表面にはヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の 2 種類の表面糖タンパク質が存在する。HA は標的細胞表面上のシアロ糖を認識しウイルス感染を惹起する一方、NA は糖鎖から末端のシアロ酸を切断しウイルスの細胞からの遊離を促進する。したがって、HA と NA の相反する機能のバランスはインフルエンザ A ウイルスの感染環の維持に重要である。

鳥インフルエンザはインフルエンザ A ウイルスに起因する家禽のウイルス性疾病である。カモを含む野生の水禽類からはすべての血清亜型のインフルエンザ A ウイルスが分離されることから、野生水禽はインフルエンザ A ウイルスの自然宿主と考えられる。カモの有する非病原性の鳥インフルエンザウイルスがアヒルなどの水生家禽やニワトリ以外の陸生家禽に伝播する過程を経るとニワトリへの感染性を獲得することがある。また、ウイルスが鶏群内で感染伝播を繰り返すと、HA 亜型が H5 あるいは H7 のウイルスではニワトリに対して致死的な病原性を示す、高病原性鳥インフルエンザウイルスが出現することがある。そのため、本疾病の制御のためには鳥インフルエンザウイルスの宿主間伝播およびニワトリにおける病原性獲得機構の解明が必須である。

野生のカモ類で維持伝播している非病原性の鳥インフルエンザウイルスは主に $\alpha 2,3$ シアロ糖を受容体として認識する。一方、 $\alpha 2,6$ シアロ糖を受容体として認識するヒト由来インフルエンザウイルスの HA には、 $\alpha 2,6$ シアロ糖を提示する糖鎖の幹部分の伸長や分岐に特異性を示すものがあるが、鳥インフルエンザウイルスではこれらに対する特異性が明らかになっていない。本稿第一章では、鳥インフルエンザウイルスの組換え HA とウイルス粒子を用いて、長さや局所密度の異なる $\alpha 2,3$ シアロ糖に対する結合特異性を比較した。様々な長さや局所密度を持つ $\alpha 2,3$ シアロ糖を合成糖鎖ポリマーにより再現するため、糖鎖の伸長は末端のシアリルラクトースに長さの異なるポリエチレングリコール鎖を結合し、糖鎖の密度は糖鎖モノマー間に重合するアクリルアミドの数を変えることで模倣した。組換え HA は糖鎖密度が高いポリマーに強く結合したものの、糖鎖密度が最も高いポリマーに対する結合性は低かった。この観察結果は、ポリマー上の多くの $\alpha 2,3$ シアロ糖が HA との結合に関与していないと考えられ、著しく高い密度の糖鎖は HA との結合を弱めると考えられる。一方、ウイルス粒子は低い密度の糖鎖に対しても高い結合性を示した。これはウイルス粒子上に存在する複数の HA が糖鎖と多価相互作用することにより低い密度の糖鎖に対する結合性を補う、クラスター効果に起因すると考えられた。本手法を用いることにより、ウイルス粒子と糖鎖の結合における複雑な相互作用や糖鎖密度によるクラスター効果の評価を可能にした。

鳥インフルエンザウイルスの NA の酵素活性部位を含む頭部と膜貫通領域をつなぐ、ストーク領域はニワトリ由来株においてアミノ酸欠失を認めることがある。先行研究では、非病原性鳥インフルエンザウイルスから遺伝子改変 (rgVac2-P0) とニワトリでの接種継代を経て、ニワトリに致死的な病原性を示す株 (Vac2-P3L4) が得られ、この株は NA ストーク領域のアミノ酸が 5 か所の N 型糖鎖付加部位を含む形で欠失していた。そのため、本稿第二章では NA ストーク領域の糖鎖の欠損およびアミノ酸の欠失が本ウイルスのニワトリに対する病原性を高める分子基盤を明らかにすることを目的とした。まず、アミノ酸置換により糖鎖のみを欠損した NA 遺伝子をクローニングし、他の遺伝子分節は継代後の株を由来に持つ組換えウイルス (rgVac2-P3L4/P0NA Δ Glyco) を作出した。このウイルスを接種したニワトリは様々な転機を示し、またウイルス遺伝子の不安定性が認められた。遺伝子の不安定性を

代償するアミノ酸置換を加えた変異株を用いてニワトリに対する病原性を比較したところ、糖鎖欠損ウイルスは糖鎖を持つ親株と比較してニワトリに対して高い病原性を示した。ストーク領域の糖鎖付加部位における糖鎖占有率を解析したところ、継代前のウイルスの NA ストーク領域には 3-4 か所に糖鎖が付加しており、この NA を持つウイルスの赤血球遊離能が高い一方、糖鎖欠損ウイルスはアミノ酸欠失ウイルスと同様に赤血球遊離能が低かった。以上より、NA ストーク領域の糖鎖欠損はアミノ酸欠失と同様に NA の機能を低下させ、ウイルスのニワトリに対する病原性を増強させることを明らかにした。

インフルエンザ A ウイルスの NA はウイルス粒子上でシアル酸を遊離する機能を持つが、細胞内での成熟過程や機能は明らかになっていない。本稿第三章では NA の細胞内での機能を調べるため、インフルエンザ A ウイルスに感染した犬腎臓由来株化細胞（MDCK 細胞）の表面の糖鎖構造をレクチンにより解析した。その結果、ウイルスに感染した MDCK 細胞では非感染細胞と比較して、末端にガラクトースや α 1-2 フコースを持つ糖鎖が増加していた。 α 1-2 フコース転移酵素はゴルジ体内に局在し、シアル酸転移酵素と拮抗することから、ウイルス感染細胞内で NA はシアル酸を遊離する機能を持つことが示唆された。また、ウイルス感染細胞上の糖鎖の経時的変化を観察したところ、感染 5 時間以降、脱シアリル化と α 1-2 フコースの転移を認め、感染細胞内でのウイルスタンパク質の発現と経時的に一致した。これらの観察結果より、NA が粒子形成前の感染細胞内ですでに活性を有しており、脱シアリル化によりシアル酸転移酵素と拮抗する α 1-2 フコース転移酵素に糖鎖修飾の機会を与えていることを示した。また、NA の細胞内での機能は感染細胞から出芽するウイルスのシアロ糖との相互作用を減らし、ウイルス放出を促進していると考えられる。さらに、NA の細胞内機能は細胞外での機能に加えて、感染細胞表面のシアロ糖を減らし、インフルエンザ A ウイルスの重感染の阻害に寄与していると考えられる。

以上、本研究により明らかになった知見は、インフルエンザ A ウイルスの生態と病原性発揮機構の解明に貢献するとともに、抗ウイルス薬の開発に対して新たな視点を提供するものである。本研究結果がインフルエンザ A ウイルス感染症の制圧および制御に資することが期待される。