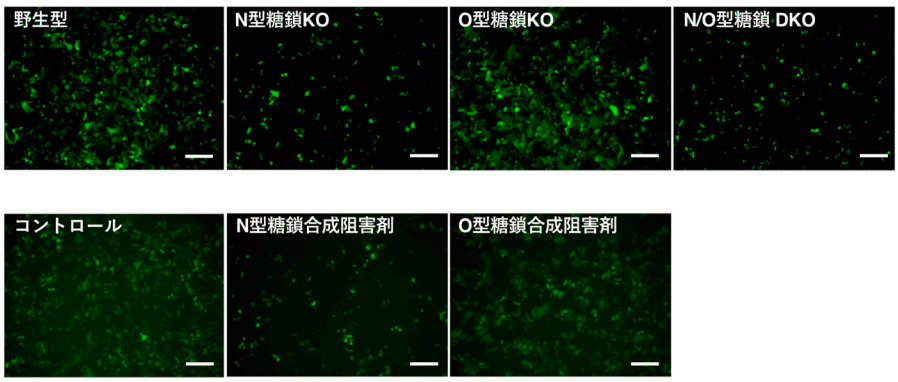
135　ムンプスウイルスの神経指向性を規定する分子機構	加藤　大志

【目的】流行性耳下腺炎（ムンプス）は小児の代表的なウイルス性感染症で、耳下腺の腫脹・疼痛を主症状とし、加えて無菌性髄膜炎や精巣炎、難聴などの重篤な合併症を伴う疾患である。ムンプスの原因はパラミクソウイルスに分類されるムンプスウイルス（Mumps virus : MuV）である。飛沫を介して感染したウイルスは、ウイルス血症により全身の標的組織へと伝播し、ウイルス増殖に伴う局所的な炎症を引き起こす。MuV は他のパラミクソウイルスには見られない特徴的な組織指向性（耳下腺、中枢神経、膵臓、生殖器など）を示すが、それを規定するウイルスならびに宿主因子については明らかになっていない。パラミクソウイルス科ウイルスは呼吸器症状から全身症状まで多様な病態を引き起こすことが知られているが、多くのパラミクソウイルスの組織指向性ならびに感染病態は細胞侵入過程に規定されることが知られている。そこで本研究では、他のパラミクソウイルスと同様に、MuV 感染においても組織指向性および感染病態がウイルスの細胞侵入過程に規定されると仮定し、MuV の感染受容体の解析を通して、MuV の組織指向性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】各種糖鎖を欠損した細胞または合成等を阻害する阻害剤を処理した細胞に AcGFP 発現の組換え MuV（rMuV/AcGFP）を感染させた。感染効率は蛍光顕微鏡による観察に加え、FACS による定量解析によって評価した。293T 細胞を用いて発現・精製した HN タンパク質を bait に糖鎖アレイスクリーニングを実施した。

【結果】近年 MuV の受容体結合タンパク質である Hemagglutinin-neuraminidase（HN）タンパク質の X 線構造解析が行われ、HN タンパク質がα2,3 結合型シアル酸を含む三糖構造と結合することが明らかになった。そこで MuV 感染におけるシアロ糖鎖の重要性について解析を行った。α2,3-Sialidase（0.2 U/mL）を用いて、細胞表面のα2,3 結合型シアル酸を除去した HeLa 細胞に rMuV/AcGFP を感染させた。感染 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡によって観察した結果、未処理細胞と比較して、Sialidase 処理細胞における感染効率は約 1／20 に低下していた。次にα2,3 結合型シアル酸が付加されるバックボーンについて検討を行った。N 型糖鎖および O 型糖鎖の合成に必須の MGAT1 および C1GalT1 をそれぞれ単独または両方ノックアウトした HeLa 細胞に rMuV/AcGFP を感染させた。その結果、N 型糖鎖を欠損させた HeLa 細胞において、有意に MuV の感染性が低下した。さらに N 型糖鎖および O 型糖鎖の合成を阻害する化合物を用いて検討した結果、N 型糖鎖合成阻害剤である 1-dMM 処理細胞において、有意に MuV の感染が抑制され、MuV の感染には O 型糖鎖よりも N 型糖鎖として付加されるシアロ糖鎖が重要であることが示された。MuV の感染受容体糖鎖に関して、さらに詳細な特徴を明らかにするために、HN タンパク質と相互作用する糖鎖種を、糖鎖アレイを用いて探索した。その結果、MuV の HN タンパク質はヘパラン硫酸およびヘパリンに対して強い親和性を有することが示された。そこで、ヘパラン硫酸を欠損させた HeLa 細胞を用いて、MuV の感染性を評価した結果、野生型 HeLa 細胞に比べて、ヘパラン硫酸を欠損した HeLa 細胞では MuV の感染性が有意に亢進した。すなわちヘパラン硫酸は MuV の感染受容体ではなく、HN タンパク質と結合することで感染阻害効果を有する因子であることが明らかとなった。

MuV 感染における N 型糖鎖の需要性



135. ムンプスウイルスの神経指向性を規定する分子機構

加藤　大志

国立感染症研究所 ウイルス第三部 第三室

Key words：ムンプスウイルス，受容体，HN タンパク質，シアロ糖鎖

緒　言

流行性耳下腺炎（ムンプス）は小児の代表的なウイルス性感染症で、耳下腺の腫脹・疼痛を主症状とし、加えて無菌性髄膜炎や精巣炎、難聴などの重篤な合併症を伴う疾患である。合併症の中でも無菌性髄膜炎は患者の 3～10%で認められ、発熱や頭痛、嘔吐などの症状を呈し、時に入院加療を要する。ムンプスに対しては生ワクチンによる予防が唯一の対策であるが、我が国では 1989 年から 1993 年にかけて接種された MMR（麻疹 - ムンプス - 風疹）ワクチンの無菌性髄膜炎の発生率の高さが問題となり、ムンプスワクチンは現在任意接種ワクチンとなっている。そのため接種率は 40%程度に低迷しており、4～5 年ごとに全国的な流行を繰り返している。また特異的な治療薬はなく、治療はそれぞれの症状に応じた対症療法のみである。そのためムンプスに対する一刻も早い新規ワクチンまたは新規治療薬の開発が望まれているが実用化の目処は立っていない。

ムンプスの原因はパラミクソウイルスに分類されるムンプスウイルス（Mumps virus：MuV）である。飛沫を介して感染したウイルスは、ウイルス血症により全身の標的組織へと伝播し、ウイルス増殖に伴う局所的な炎症を引き起こす［1］。MuV は他のパラミクソウイルスには見られない特徴的な組織指向性（耳下腺、中枢神経、膵臓、生殖器など）を示すが、それを規定するウイルスならびに宿主因子については明らかになっていない。パラミクソウイルス科ウイルスは呼吸器症状から全身症状まで多様な病態を引き起こすことが知られているが、多くのパラミクソウイルスの組織指向性ならびに感染病態は細胞侵入過程に規定されることが知られている。例えば麻疹ウイルスの主な標的組織は血球系細胞（特にリンパ球）および上皮系組織であるが、それぞれに特異的に発現するタンパク質 SLAM および Nectin-4 を受容体とすることが、ウイルスの組織指向性および感染病態につながると考えられている［2］。また、ヒトパラインフルエンザウイルスやセンダイウイルスなどの呼吸器パラミクソウイルスにおいては、細胞侵入に必要な F タンパク質の開裂を呼吸器で発現するプロテアーゼ（TMPRSS2）に依存することが、呼吸器系組織に高い親和性を持つ要因となっている［3］。そこで本研究では、他のパラミクソウイルスと同様に、MuV 感染においても組織指向性および感染病態がウイルスの細胞侵入過程に規定されると仮定し、MuV の感染受容体の解析を通して、MuV の組織指向性の分子メカニズムを明らかにすることとした。

方法および結果

1.　MuV 感染におけるシアロ糖鎖の重要性

古くから MuV の受容体はシアル酸（糖鎖）であると考えられてきたが、近年 MuV の受容体結合タンパク質である Hemagglutinin-neuraminidase（HN）タンパク質の X 線構造解析が行われ、HN タンパク質がα2,3 結合型シアル酸を含む三糖構造と結合することが明らかになった［4］。そこで MuV 感染におけるシアロ糖鎖の重要について、まず解析を行った。α2,3-Sialidase（0.2 U/mL）を用いて、細胞表面のα2,3 結合型シアル酸を除去した HeLa 細胞に AcGFP 発現の組換え MuV（rMuV/AcGFP）を感染させた。感染 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡によって観察した結果、未処理細胞と比較して、Sialidase 処理細胞における AcGFP 陽性細胞の数が減少した（図 1）。また FACS を用いて、AcGFP 陽性細胞の定量解析を実施したところ、感染効率は約 1／20 に低下していた。

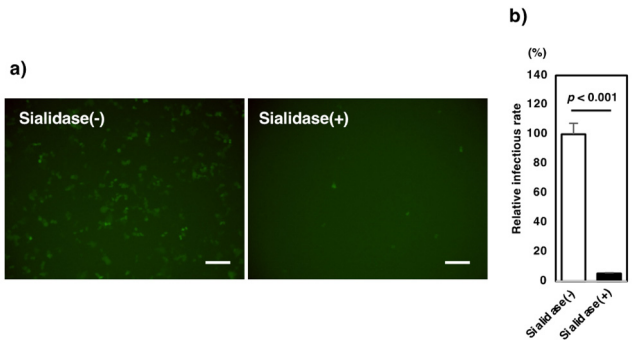


図 1. MuV 感染におけるα2,3 結合型シアル酸の重要性

α2,3-Sialidase 処理または非処理 HeLa 細胞へ rMuV/AcGFP を感染させ、感染効率を感染 24 時間後の AcGFP の発現を指標に、蛍光顕微鏡および FACS で解析。

a）蛍光顕微鏡観察像。スケールバー：100μm。

b）FACS による定量解析。Student *t*-test。

2. MuV の感染受容体のバックボーン解析

糖鎖はタンパク質または脂質に結合し、それぞれ糖タンパク質および糖脂質と呼ばれる。糖タンパク質はさらに結合様式によって N 型糖鎖と O 型糖鎖に分けられる。そこで MuV の受容体糖鎖となるα2,3 結合型シアル酸が付加されるバックボーンについて検討を行った。N 型糖鎖および O 型糖鎖の合成に必須の MGAT1 および C1GalT1 をそれぞれ単独または両方ノックアウトした HeLa 細胞に rMuV/AcGFP を感染させた［5］。その結果、N 型糖鎖を欠損させた HeLa 細胞において、有意に MuV の感染性が低下した（図 2）。さらに N 型糖鎖および O 型糖鎖の合成を阻害する化合物を用いて検討した結果、N 型糖鎖合成阻害剤である 1-dMM 処理細胞において、有意に MuV の感染が抑制された。

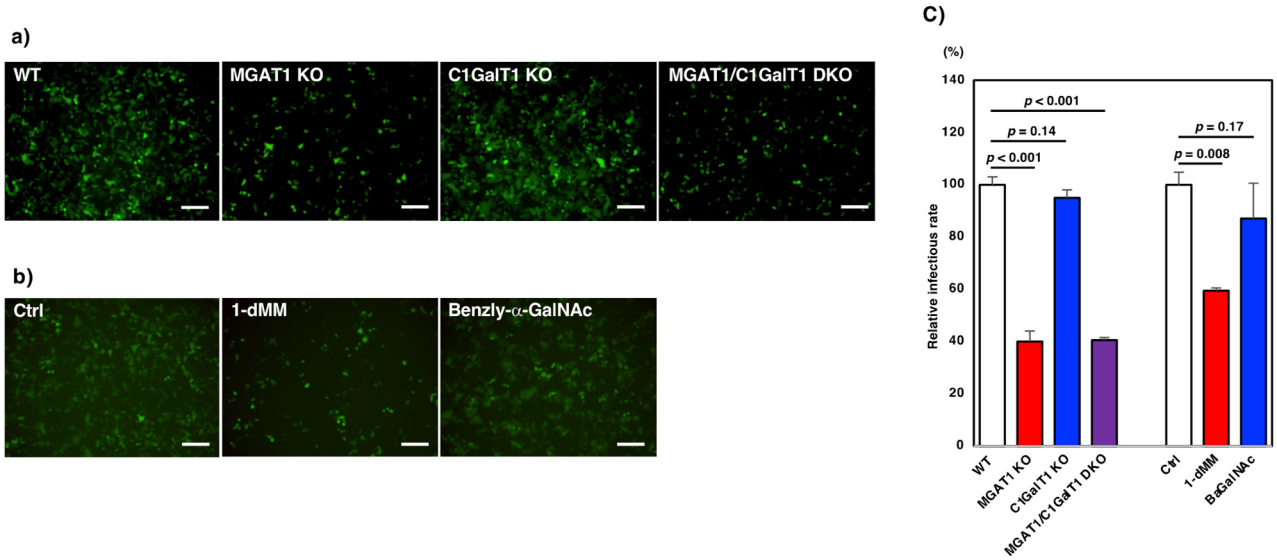


図 2. MuV 感染の感染受容体のバックボーン解析

N 型および O 型糖鎖ノックアウト（KO）HeLa 細胞、または N 型および O 型合成害剤処理 HeLa 細胞へ rMuV/AcGFP を感染させ、感染効率を感染 24 時間後の AcGFP の発現を指標に、蛍光顕微鏡および FACS で解析。MGAT1 KO：N 型糖鎖 KO 細胞、C1GalT1 KO：O 型糖鎖 KO 細胞、MGAT1/ C1GalT1 DKO：N 型および O 型糖鎖 Double KO 細胞。1-dMM：N 型糖鎖合成阻害剤、Benzly-a-GalNac：O 型糖鎖合成阻害剤。

a、b）蛍光顕微鏡観察像。スケールバー：100μm。

c）FACS による定量解析。Student *t*-test。

3. MuV HN タンパク質と相互作用する糖鎖種の探索と MuV 感染への関与

MuV の感染受容体糖鎖に関して、より詳細な特徴を明らかにするために、HN タンパク質と相互作用する糖鎖種を、糖鎖アレイを用いて探索した。293T 細胞を用いて発現・精製した HN タンパク質を bait に糖鎖アレイスクリーニングを実施した。その結果、MuV の HN タンパク質はα2,3 結合型シアル酸よりもヘパラン硫酸およびヘパリンに対して強い親和性を有することが示された（図 3）。そこで、MuV 感染におけるヘパラン硫酸の役割について検討するために、ヘパラン硫酸を欠損させた HeLa 細胞を用いて、MuV の感染性を評価した。その結果、野生型 HeLa 細胞に比べて、ヘパラン硫酸を欠損した HeLa 細胞では MuV の感染性が有意に亢進することが明らかになった。

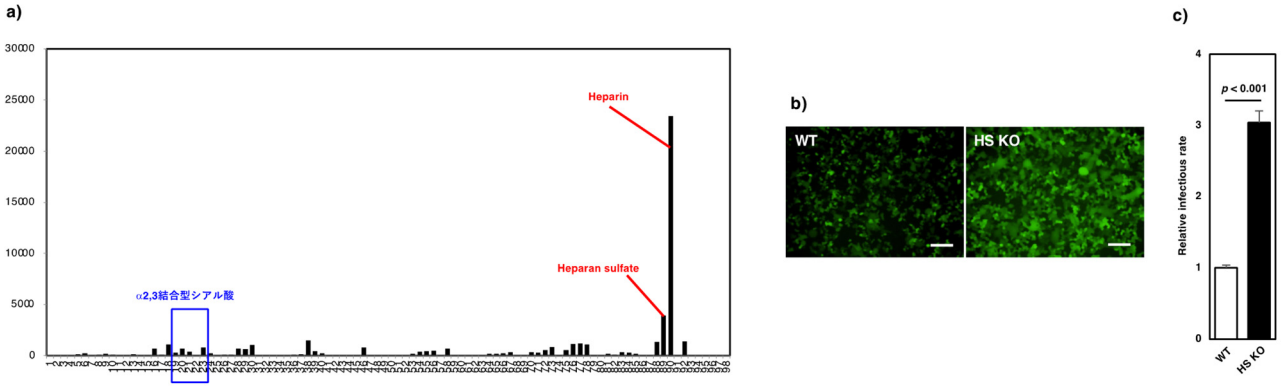


図 3. MuV HN タンパク質と相互作用する糖鎖種の探索と MuV 感染への関与

a）各種糖鎖と HN タンパク質との結合性。

b, c）ヘパラン硫酸（HS）ノックアウト（KO）HeLa 細胞へ rMuV/AcGFP を感染させ、感染効率を感染 24 時間後の AcGFP の発現を指標に、蛍光顕微鏡および FACS で解析。b）蛍光顕微鏡観察像。スケールバー：100μm。c）FACS による定量解析。Student *t*-test。

考　察

MuV の感染受容体がシアロ糖鎖であることは古くから考えられていたが、分子レベルでの詳細な解析についてはほとんど行われていなかった。本研究ではまず HeLa 細胞を用いて、MuV の細胞侵入にα2,3 結合型シアル酸が必須であることを確認した。一方、O 型糖鎖として付加されたα2,3 結合型シアル酸は MuV の受容体となり得ないことが示されたことから、MuV の感染機構の解明には、シアロ糖鎖が付加するバックボーンに関するより詳細な研究が求められる。また、MuV の HN タンパク質と親和性が高い糖鎖種として、プロテオグリカンであるヘパラン硫酸およびヘパリンが同定された。ノックアウト細胞の解析から、これらは MuV の感染受容体ではなく、HN タンパク質と結合することで感染阻害効果を有する因子であることが明らかとなった。他のパラミクソウイルスの例を考えると MuV の細胞侵入の分子メカニズムを明らかにすることは、MuV の特徴的な組織指向性の理解、さらにムンプスの病態理解や抗ムンプス薬開発へつながることから、今後さらなる研究の進展が望まれる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立感染症研究所細胞化学部の山地俊之先生である。また糖鎖アレイ解析は産業技術総合研究所生命工学領域の舘野浩章先生に実施していただいた。

文　献

1) Rubin S, Eckhaus M, Rennick LJ, Bamford CG, Duplex WP. Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. J Pathol. 2015 Jan; 235(2):242-52. DOI: 10.1002/path.4445

2) Takeda M, Tahara M, Nagata N, Seki F. Wild-Type Measles Virus is Intrinsically Dual-Tropic. Front Microbiol. 2012 Jan 13;2:279. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00279. eCollection 2011

3) Abe M, Tahara M, Sakai K, Yamaguchi H, Kanou K, Shirato K, Kawase M, Noda M, Kimura H, Matsuyama S, Fukuhara H, Mizuta K, Maenaka K, Ami Y, Esumi M, Kato A, Takeda M. TMPRSS2 is an activating protease for respiratory parainfluenza viruses. J Virol. 2013 Nov;87(21):11930-5. DOI: 10.1128/JVI.01490-13.

4) Kubota M, Takeuchi K, Watanabe S, Ohno S, Matsuoka R, Kohda D, Nakakita SI, Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Shiroishi M, Yanagi Y, Hashiguchi T. Trisaccharide containing alpha2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Oct 11;113(41):11579-11584. DOI: 10.1073/pnas.1608383113.

5) Yamaji T, Hanamatsu H, Sekizuka T, Kuroda M, Iwasaki N, Ohnishi M, Furukawa JI, Yahiro K, Hanada K. A CRISPR Screen Using Subtilase Cytotoxin Identifies SLC39A9 as a Glycan-Regulating Factor. iScience. 2019 Jan 25;11:409-424. DOI: 10.1016/j.isci.2018.12.039.