

1. ウイルスとグリカン

—糖鎖ウイルス学 (Glycovirolgy) のすすめ—

鈴木 康夫

はじめに

グリカン (Glycan) を日本語に翻訳すると「糖鎖」という言葉があてはまる。すなわち、グリカン (Glycan) は、炭水化物 (carbohydrate) や糖 (sugar) という言葉が意味するところと異なり、「くさり」を強く意識した言葉である。すなわち、グリカン (Glycan) とは、糖が連なることによる新しい機能性、構造的な発現を意識した言葉であると言える。Proteoglycan と呼ばれる生体分子がある。これは Glycan の仲間であり糖タンパク質 (glycoprotein) のようなタンパク質の仲間ではない。すなわち、少量のタンパク質 (protein) を含む glycan なのである。含むとは、単に共存しているのではなく共有結合している複合分子であることを意味する。Glycan から由来する言葉に Glyco という接頭語がある。これも「糖鎖の」と訳される場合が多く、糖の鎖を強く意識した言葉である。ここでは、ウイルス学における糖鎖研究の必要性、重要性を紹介すると同時に、著者らの研究と絡めて糖鎖ウイルス学 (Glycovirolgy) と呼ぶべき研究分野の進展、育成の必要性について述べる。

ゲノムからタンパク質そして糖鎖へ

2003年、4月、日英米など6カ国でヒトゲノム解読計画の完了が宣言された。これにより生命科学は確かに新たな段階に入ったと言える。ゲノムに含まれる遺伝子はタンパ

ク質を作り、生命活動を担う。しかし、良く見れば、動物細胞に含まれるタンパク質の50%以上に糖鎖が付加されている。タンパク質は翻訳後に様々な修飾を受ける。例えば、糖鎖付加、リン酸化、メチル化、硫酸化、グリケーションなどである。この中で近年、最も多くの研究が始められている領域は糖鎖付加に関するものである。タンパク質や脂質に糖鎖が付加されることにより、様々な新しい機能や物性が発現される。言い換えれば、タンパク質や脂質の物性や機能は糖鎖付加により大きく変換される。これにより、タンパク質は三次元的に安定な構造を付与されたり、プロテアーゼなどから保護される。また、ウイルスなどの場合は、自分のスパイクタンパク質に糖鎖を付加させることにより、宿主の免疫監視機構から逃れたり、宿主細胞が持つ糖鎖を認識するレクチンに捕捉させ宿主細胞への侵入を容易にしている場合もある。また、糖鎖自身に血液型活性や細胞接着機能があることも分かって来た。タンパク質や脂質への糖鎖付加は、糖転移酵素により行われる。現在までに、110種ほどの糖転移酵素の遺伝子がクローニングされているが、この半数以上は日本人によりクローニングされている。

ウイルス感染における糖鎖の役割

Encyclopedia Virology (ed. R.G. Webster, A. Granoff, Academic Press, 1994) によれば、動物から分離されるウイルスはおよそ570種であり、それらのおよそ2/3は宿主細胞膜と同様の膜 (エンベロープ) を持つ。この膜には、宿主由来のリン脂質や糖脂質、コレステロールなどの複合脂質の他、そこに埋め込まれているウイルス特異的糖タンパク質スパイクが存在する。このスパイクは、ウイルスが宿主に吸着したり、ウイルスが宿主から発芽により遊離したりする上で必須の役割を果たすし、そこに付加される糖鎖は、ウイルスのスパイクの3次元構造の維持、機能発現にやはり必須である。

一方、宿主細胞膜上の糖鎖は、極めて多様であると同時に、極めて高い種特異性を持っている。また、全てのウイルスは、宿主細胞中でのみ増殖するため、必ず宿主 (細胞)

静岡県立大学薬学部, CREST, JST, 21世紀 COE プロ
 グラム
 (〒422-8526 静岡市谷田52-1)
 Virus and Glycan—An Exhortation of Glycovirolgy—
 Yasuo Suzuki
 University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sci-
 ences
 52-1 Yada, Shizuoka-shi 422-8526
 TEL: 054-264-5725
 FAX: 054-264-5721
 e-mail: suzukiy@u-shizuoka-ken.ac.jp

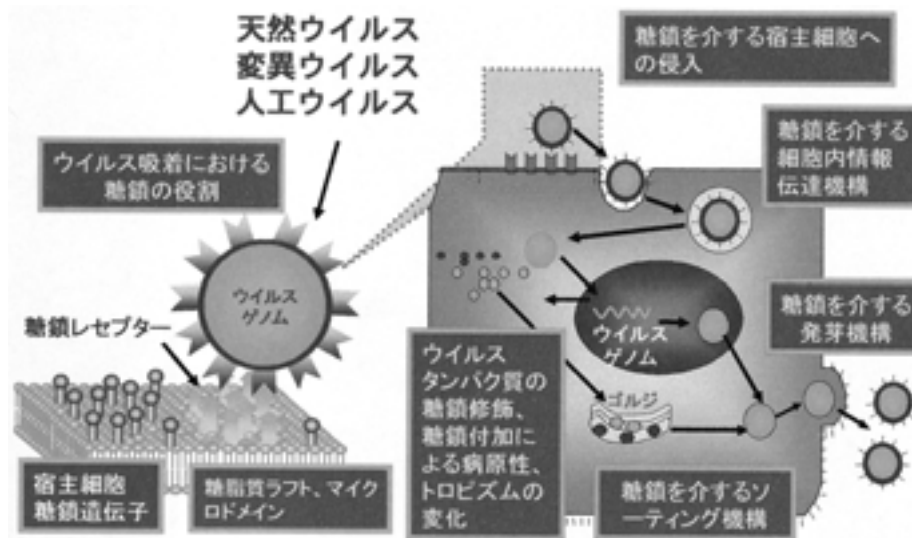


図1 ウイルスの感染増殖過程で起きる様々な糖鎖を介するステップ

域、宿主特異性を持っている。ウイルスが宿主特異性を発揮する機構を調べていくと、それが、宿主細胞膜糖鎖の特異性、多様性を反映している場合が極めて多いことに気付く。我々は、その表現系として、多くのエンベロープウイルスが宿主細胞膜の糖鎖を特異的受容体として認識・結合する事実を明らかにしてきた¹⁻⁵⁾。さらに、極めて抗原決定領域の変異が起こりやすい、例えば、インフルエンザウイルスの場合でも、受容体糖鎖への結合に関わるスパイクタンパク質上の受容体結合ポケット内の変異は起こりにくいことも見いだしてきた⁶⁾。これらの事実、受容体糖鎖の疑似化合物による受容体結合ポケットのブロックは、変異を克服出来る画期的抗ウイルス薬のシーズとなり得ることを意味している。従って、様々なウイルス感染において、糖鎖の役割は極めて大きく、且つ多様であり、糖鎖を標的とした抗ウイルス薬の開発は非常に有効であると位置づけられる⁷⁾。

さらに、糖タンパク質スパイクを持つウイルスが宿主細胞に感染、遊離する過程に置いて、受容体への吸着→侵入→脱殻→ウイルスタンパク質合成→糖鎖付加→細胞内交通による送達→パッケージング→発芽(出芽)→子ウイルスの遊離など様々なステップがあり、ほとんど全ての段階でウイルスタンパク質糖鎖が構造的、機能的に関わることになる。しかし、この分子機構の多くは未解明である。各ステップにおける糖鎖の役割(図1)が明らかにされれば、これらのステップを特異的にブロックする糖鎖関連化合物、糖転移酵素阻害剤などが開発され、より幅広い視野で画期的抗ウイルス薬の開発が可能となる。

重要なウイルス疾患の治療に期待される糖鎖化合物

宿主細胞側の糖鎖は極めて多様性に富むと同時に、個体

の種、さらに組織、個々の細胞における糖鎖の発現には、高い特異性が見られる。言い換えれば、自然界の糖鎖には極めて多種類の構造があると同時に、その発現は非常に限局的、特異的であるという特性が見られる⁸⁾。一方、ウイルスはそれぞれある幅を持った宿主域を持つと同時に、標的となる宿主細胞に対する認識や宿主細胞表面に存在する受容体分子に対する認識に対しては極めて高い特異性を持っている。この事実を考えると、ウイルスは進化の過程で、感染の場を拡大する上で、宿主側の糖鎖の多様性を利用して来た可能性が考えられ、一方で、ウイルスが持つ高い標的宿主細胞受容体認識特異性は、宿主細胞糖鎖発現の高い特異性を反映しているのではないかと考えられるのである。従って、糖鎖を受容体とするウイルスは予想外に多いと考えられ、今後の研究により、糖鎖を受容体とするウイルスの種類は拡大していくものと考えられる。

デングウイルスは、ヒトとカ(熱帯シマカ、ヒトスジシマカ)の間でのみ生活環を形成すると言われている。最近、著者ら⁹⁾は、ヒト細胞およびカ細胞におけるデングウイルスの受容体が、糖鎖である可能性を見いだした。この糖鎖はヒトとカでは同一ではないが、デングウイルスはいずれの糖鎖にも共通して結合出来、しかも、ウイルスの宿主細胞への感染を阻止できることを見いだした。この糖鎖は化学合成可能であり、全く新しい、糖鎖性抗デング熱薬の開発が期待できる。

著者らは、上記デングウイルスの他に、ヒトの間で流行し、小児にしばしば重篤な病状を起こす、パラインフルエンザウイルスの受容体シアロ糖鎖構造¹⁰⁾、小児下痢の原因ウイルスであるロタウイルスの糖鎖性受容体の構造¹¹⁾、脳炎を起こすJCウイルスの糖鎖性受容体の精密構造¹²⁾、ヒトインフルエンザA、B¹⁻⁵⁾、C型ウイルス¹³⁾など、ヒトの

重要な疾患原因ウイルスの宿主受容体が糖鎖であることを明らかにしつつある。これに関連して、最近、著者らは、試験した全てのインフルエンザ A 型ウイルス（ヒト、カモ、ブタ、ウマ由来）および B 型ウイルス（ヒト由来）と結合し、感染を阻止する、受容体シアロ糖鎖を持つスフィンゴ糖脂質を発育鶏卵しょう尿膜から見出した。このシアロ糖脂質（ガングリオシド）は、同一分子内にシアル酸 2-3 Gal, シアル酸 2-6 Gal の両末端を持ち、自然界における全てのインフルエンザウイルス共通の受容体である可能性も示唆された¹⁴⁾。

著者らは、これまでに、A, B 型インフルエンザウイルスヘマグルチニンが認識するレセプター糖鎖はシアリルラクト系 I（シアル酸 α 2-6(3)Gal β 1-3GlcNAc β 1-）および II 型（シアル酸 α 2-6(3)Gal β 1-4GlcNAc β 1-）糖鎖であることを見出してきた^{1-5,13)}。そして、このシアロ糖鎖誘導体はウイルスレセプターと競合する新しい抗インフルエンザ薬として期待されることから、天然および化学合成したいくつかのウイルス中和活性を持つインフルエンザウイルスヘマグルチニンに対する新しいシアロ糖鎖阻害剤を見出してきた⁷⁾。最近、著者らは、これに関して興味ある 2 つの抗インフルエンザ活性分子をデザインした^{15,16)}。インフルエンザウイルスヘマグルチニンはホモ 3 量体構造をとっている。この 3 量体の各レセプター結合ポケットへフィットするシアロ糖鎖は、ウイルスの感染を有効に阻止出来ることが期待される。著者ら¹⁴⁾は、西村ら（北大・院・理）と共同で、3 本のシアリルラクトース（Neu 5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-）を環状のペプチド上に配置したユニークな分子に強い抗インフルエンザ活性を見いだした。このユニークな構造は、ヘマグルチニンの 3 量体の各受容体結合ポケットへの結合を可能とし、ヘマグルチニン 3 量体ブロッカーとしてのシアロ糖鎖創薬が可能であることを示した。また、著者ら¹⁵⁾は、シアル酸の 3 位炭素に F（フッ素）導入したシアル酸含有ホスファチジルエタノールアミン（3-F-シアリルホスファチジルエタノールアミン）は、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに抵抗性となり、且つ、ウイルスのヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼへ結合性を示し、ウイルスの感染初期（宿主細胞膜への吸着、リソソーム/エンドソーム内での脱殻）および後期（宿主細胞からの発芽、ウイルス粒子の遊離）のいずれをも強力に阻止できることを見出した。

ウイルススパイクタンパク質に付加される糖鎖もスパイクの機能発現、構造維持に極めて重要である。最近、森、山西らは、ヒトヘルペスウイルス 6 型の宿主受容体である CD46 へ結合するウイルス側のリガンドの同定に成功した。その実体は、ウイルスエンベローブ糖タンパク質である glycoprotein H (gH), glycoprotein Q (gQ), glycoprotein L (gL) の複合体 (gH-gQ-gL) であったが、興味深いことに、この複合体が CD46 へ結合する上で、複合体へ

の糖鎖付加が必須であることが判明した^{17,18)}。これは、ウイルス側のスパイク糖タンパク質糖鎖が受容体認識に重要な役割を果たしていることを如実に示している例である。さらに、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) のスパイク糖タンパク質、GP120 には沢山のシアル酸含有の糖鎖が付加されている。この糖タンパク質スパイクをシアリダーゼ処理し、シアル酸を除去するとウイルスの感染性が著しく上昇すること、サル HIV (SIVmac239) では、ウイルススパイク糖鎖を部分的にでも欠失したものは、宿主にスパイクタンパク質に対する中和抗体が誘導され、宿主免疫応答による病態の制御が可能になることが、塩田、永井らにより報告されている¹⁹⁻²²⁾。これらの結果は、ウイルススパイクタンパク質の糖鎖修飾が、ウイルスの感染性のみならず、ウイルス疾患の病態の発現にまで深く関わることを示している。

肝芽腫細胞株 Huh 6 に B 型肝炎ウイルス (HBV) ゲノム DNA をトランスフェクトして作製された HB611 細胞は HBe 抗原, HBs 抗原および HBV 粒子を培養上清中に生産する。Miyoshi ら^{23,24)}はバイセクティング *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を *N*-結合型糖鎖に付加する糖転移酵素, *N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) 遺伝子を HB611 に導入したクローンを作製した。これらのクローンにおいては高い GnT-III 活性が見られるとともに、バイセクティング GlcNAc を認識するレクチンである E-PHA との反応性が上昇していた。さらに、HBV 遺伝子の発現を解析したところ、HBV mRNA (3.5kb, 2.4kb), HBs 抗原および HBe 抗原の発現が顕著に減少していた。この結果は、細胞中に発現する糖転移酵素がウイルス感染細胞中のウイルス抗原の増殖に関わっており、この発現を制御することで、ウイルス感染症治療の可能性を示す例と言える。

糖鎖ウイルス学 (Glycovirolgy) のすすめ

ヒトゲノム解読完了宣言後の医薬開発では、ポストゲノム創薬が最も期待される領域となることは確実である。言うまでもなく、ポストゲノム産物の中で、タンパク質は核酸に次ぐ第 2 の生命鎖としてまた、糖鎖は第 3 の生命鎖として重要な位置を占める。この中で、糖質・糖鎖は、上記のように、様々なウイルスの受容体として、ウイルスにとって必須な構成分子として、ウイルス感染細胞内情報伝達分子として重要かつ多彩な機能が明らかにされ始めている。糖鎖生物学とウイルス学をカバーする領域を糖鎖ウイルス学 (Glycovirolgy) と呼ぶことが出来る。この 6 月には第 1 回 Glycovirolgy の国際会議がスエーデンで行われた。著者も日本側組織委員としてこの会議の発進に関わった。今後、糖鎖は、ウイルス感染症と深く関わる分子として 21 世紀における極めて重要な研究標的、創薬標的となることが確実で、我が国における糖鎖ウイルス学 (Glycovi-

rology) 領域の進展, 専門家の育成, 増加が望まれる。

おわりに

近年, アメリカを始め, 我が国においても糖鎖機能の組織的解明を目指す Functional Glycomics が国家プロジェクトとして台頭しつつある。今まで, 糖鎖に関する研究は, 構造の多様性, 複雑性のため, さらに, 遺伝子の直接産物ではないために機能研究が困難であるなどの理由で比較的地味であった。しかし, ポストゲノム時代における糖鎖研究の重要性が理解され始めている。今後, 糖鎖研究は, 他分野との融合領域 (糖鎖ウイルス学もその一つである) を重視したシステム糖鎖生物学 (Systems Glycobiology) へと発展することが予測される。

文 献

- 1) 鈴木康夫: インフルエンザウイルスの受容体と宿主変異の分子機構 ウイルス(日本ウイルス学会)51:193-200, 2002.
- 2) Yasuo Suzuki: Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains. Prog. Lipid Res., 33, 429-457 (1994).
- 3) Yasuo Suzuki, Toshihiro Ito, Takashi Suzuki, Robert E. Holland, Thomas M. Chambers, Makoto Kiso, Hideharu Ishida, Yoshihiro Kawaoka, Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. J. Virol., 74(24), 11825-11831 (2000).
- 4) Suzuki Y, Nagao Y, Kato H, Matsumoto M, Nerome K, Nakajima K, Nobusawa E Human influenza A virus hemagglutinin distinguishes sialyloligosaccharides in membrane-associated gangliosides as its receptor which mediates the adsorption and fusion processes of virus infection. Specificity for oligosaccharides and sialic acids and the sequence to which sialic acid is attached. J. Biol. Chem. 261(36): 17057-17061 (1986).
- 5) Suzuki, Y., Matsunaga, M., Matsumoto, M., *N*-acetylneuraminyl-lactosylceramide, GM 3 NeuAc, a new influenza virus receptor which mediates the adsorption-fusion processes of viral infection: Binding specificity of influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) to membrane-associated GM 3 with different molecular species of sialic acid. J. Biol. Chem., 260, 1362-1365 (1985).
- 6) Suzuki, Y., Kato, H., Naeve, C. W., Webster, R. G.: Single-amino-acid substitution in an antigenic site of influenza virus hemagglutinin can alter the specificity of binding to cell membrane-associated gangliosides. J. Virol., 63(10), 4298-4302 (1989).
- 7) 鈴木康夫: 新しい抗インフルエンザ薬 インフルエンザ 4, No 3. 213-225 (2003).
- 8) コールドスプリングハーバー糖鎖生物学 (Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999, ed. A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth: 鈴木康夫監訳), 丸善, 2003
- 9) 青木千恵, 左 一八, 森田公一, 長谷部太, 宮本大誠, 鈴木 隆, 鈴木康夫: デング熱ウイルス結合性糖鎖分子の構造およびその性状解析 日本ウイルス学会, 第51回学術集会・総会, 抄録集 pp.154, 2003)
- 10) Takashi Suzuki, Allen Portner, Ruth Ann Scroggs, Makoto Uchikawa, Noriko Koyama, Kazuko Matsuo, Yasuo Suzuki, Toru Takimoto, Receptor specificities of human respiroviruses. J. Virol., 75(10), 46-4-4613 (2001).
- 11) Chao-Tan Guo, Osamu Nakagomi, Masami Mochizuki, Hideharu Ishida, Makoto Kiso, Yasuhiro Ohta, Takashi Suzuki, Daisei Miyamoto, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Yasuo Suzuki: Gangliosides GM 1 a on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. J. Biochem., 126, 683-688, 1999.
- 12) Rika Komagome, Hirofumi Sawa, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Shinya Tanaka, Walter J. Atwood, Kazuo Nagashima: Oligosaccharides as receptor for JC virus. J. Virol., 76, 12992-13000 (2002)
- 13) Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Xu, G., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Yamada, A.: Structural determination of gangliosides that bind to influenza A, B, and C viruses by an improved binding assay: strain-specific receptor epitopes in sialo-sugar chains. Virology, 189(1), 121-131 (1992).
- 14) 左 一八, 水野理恵子, 近 一夫, 安藤 進, 鈴木 隆, 宮本大成, 鈴木康夫: インフルエンザウイルスのレセプター糖鎖分子への結合特異性に関する研究 第23回日本糖質学会年会 (横浜) 要旨集 pp.45 (2002).
- 15) Ohta, T., Miura, N., Fujitani, N., Nakajima, F., Niikura, K., Chao-Tan Guo, Suzuki, T., Suzuki, Y., Monde, K., Nishimura, S.-I. Glycotentacles: Synthesis of cyclic glycopeptides toward a tailored blocker of influenza virus hemagglutinin. Angew. Chem. Int. Ed., 42(42) 586-5189 (2003).
- 16) Chao-Tan Guo, Xue-Long Sun, Osamu Kanie, Kennedy F. Shortridge, Takashi Suzuki, Daisei Miyamoto, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Chi-Huey Wong, Yasuo Suzuki, An *O*-glycoside of sialic acid derivatives that inhibits both hemagglutinin and sialidase of influenza viruses. Glycobiology, 12(3)183-190 (2002).
- 17) Yasuko Mori, Xuwei Yang, Pilailuk Akkapaiboon, Toshiomi Okuno, Koichi Yamanishi: Human Herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associate with human CD46. J. Virol., 77, 4992-4999, 2003.
- 18) Yasuko Mori, Tsukasa Seya, Hong Lan Huang, Pilailuk Akkapaiboon, Panadda Dhepakson, Koichi Yamanishi: Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. J. Virol., 76, 6750-6761, 2002.
- 19) Huiling Hu, Tasuo Shioda, Chikaya Moriya, Xiaomi Xin, Mohammad K. Hasan, Koichi Miyake, Takashi Shimada, Yoshiyuki Nagai: Infectivities of human and other primate lentiviruses are activated by desialylation of the virion surface. J. Virol., 70, 7462-7470, 1996)
- 20) Xiaomi Xin, Tatsuo Shioda, Masao Fukushima, Huiling Hu, Shin-ichi Oka, Aikichi Iwamoto, Yoshiyuki Na-

- gai : Facilitation of HIV-1 isolation from patients by neuraminidase. *Arch. Virol.*, **143**, 85–95, 1998.
- 21) Shinji Ohgimoto, Tasuo Shioda, Kazuyasu Mori, Emi E. Nakayama, Hailing Hu, Yoshiyuki Nagai : Location-specific unequal contribution of the N-glycans in SIV gp 120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity. *J. Virol.*, **72**, 8365–8370, 1998.
- 22) Kazuyasu Mori, Yasuhiro Yasutomi, Shinji Ohgimoto, Tadashi, Nakasone, Shiki Takamura, Tasuo Shioda, Yoshiyuki Nagai : A quintuple deglycosylation mutant of SIVmac239 in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild type strain. *J. Virol.*, **75**, 4023–4028, 2001.
- 23) Miyoshi, E., Ihara, Y., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T., and Taniguchi, N. : Transfection of *N*-acetylglucosaminyltransferase III gene suppresses expression of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line, HB611. *J. Biol. Chem.* **270**, 28311–28315 (1995)
- 24) Miyoshi E, Nishikawa A, Ihara Y, Hayashi N, Fusamoto H, Kamada T, Taniguchi N. : Selective suppression of *N*-acetylglucosaminyltransferase III activity in a human hepatoblastoma cell line transfected with hepatitis B virus. *Cancer Res.* **54**(7) : 1854–1858 (1994).