

2. ムンプスウイルス糖鎖受容体とその認識機構

橋口 隆生

京都大学ウイルス・再生医科学研究所 ウイルス制御分野

ムンプスウイルス (MuV) は、耳下腺炎、睾丸炎、卵巣炎、髄膜炎、脳炎、難聴などを引き起こす重要なヒトの病原体である。流行性耳下腺炎 (おたふくかぜ) はワクチンで予防できる疾患だが、世界中で散発的に発生しており、ワクチン接種率の高い地域でも発生が確認される。MuV は全身に感染するだけでなく、腺組織や中枢神経系に特異的なトロピズムを持っているが、そのメカニズムは未解明な部分が多く残されている。本トピックスでは、糖鎖受容体、特に最近同定された三糖コア受容体構造、及び、糖鎖受容体とウイルス受容体結合蛋白質の相互作用に焦点を当て、MuV による柔軟な糖鎖受容体認識機構および糖鎖分布とトロピズムとの相関性についてまとめ、MuV の病原性について考察する。

1. はじめに

流行性耳下腺炎 (おたふくかぜ) は、ムンプスウイルス (MuV: mumps virus) によって引き起こされる呼吸器感染症で、世界中で流行が確認されている。2~4 週間の潜伏期間の後、発熱、頭痛、倦怠感などの軽度の症状が現れ、その後、両側の耳下腺が腫れるのが特徴である。MuV は、まず上気道粘膜や局所リンパ節に感染し、全身へと広がる^{1,3)}。MuV は、腺組織や神経組織を中心に、腎臓や心臓、関節組織へのトロピズムを示す。耳下腺炎は、感染の約 70% に現れ、稀に顎下腺や舌下腺などの他の唾液腺にも感染することがある。睾丸炎は成人男性の感染者の 20~30% に認められ、ほとんどが精巣上体炎と併発する。睾丸炎の約 15% は精巣の萎縮に進み、生殖能力の低下につながる可能性が指摘されている^{3,4)}。成人女性の感染者の 5% に卵巣炎が認められ、睪腺炎は 4% の症例で報告されている。中枢神経系への影響も MuV 感染症の一般的な症状である。最

も一般的な神経学的症状は無菌性髄膜炎で、1~10% の症例に見られる。脳脊髄液多血症は感染者の最大 50% で報告されており、サイトカインレベルの上昇は髄膜炎の炎症を反映する^{3,5,6)}。脳炎は 0.02-0.3% 程度の症例で確認される。感音性難聴 (ムンプス難聴) はよく知られた合併症で、以前は 1/15,000~1/20,000 の症例で発生すると推定されていたが、最近の研究では約 1/1,000~1/300 の頻度で発生する可能性が示唆されている^{1,7)}。ムンプス難聴の大部分は重度で治療に抵抗性となる⁸⁾。特異的な治療法はないが、効果的な弱毒生ワクチンがあり、小児期の MuV 感染や若い人の重篤な合併症を予防することができる¹⁾。

腺組織や神経組織へのユニークなトロピズムを持つにもかかわらず、トロピズムを説明できる分子メカニズムはまだ十分に解明されていない。トロピズムは、ウイルスのライフサイクルの複数の段階で、宿主細胞との相互作用に応じて影響を受けるが、特にウイルス侵入における細胞受容体への結合が、ウイルスのトロピズムと病原性を規定する重要な決定因子の一つとなることが知られている。

2. ムンプスウイルス

MuV は、パラミクソウイルス科オルソブラウイルス属に属するエンベロープ型の非分節マイナス鎖 RNA ウイルスである。ゲノムは 15,384 塩基で構成され、nucleo- (N) 蛋白質、phospho- (P) 蛋白質、matrix (M) 蛋白質、small hydrophobic (SH) 蛋白質、fusion (F) 蛋白質、hemagglutinin- neuraminidase (HN) 蛋白質、large (L) 蛋白質の構造蛋白質が含まれる¹⁾。SH および HN 遺伝子の塩基配列に基づいて、MuV は 12

連絡先

〒606-8507

京都府京都市左京区聖護院川原町 53

ウイルス再生研 2 号館 111 号室

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 ウイルス制御分野

TEL: 075-751-4049

E-mail: takaoh@infront.kyoto-u.ac.jp

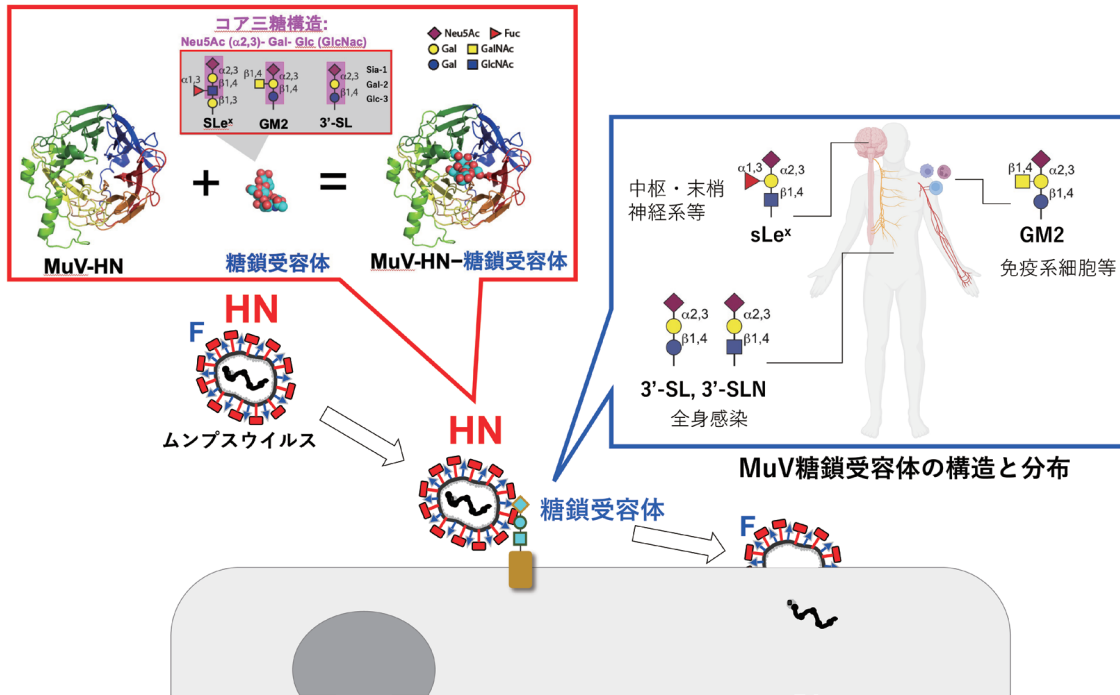


図 ムンプスウイルスによる柔軟な糖鎖認識機構と人体における糖鎖受容体分布. MuV-HN 蛋白質の構造はリボンモデルで示してある (N 末端から C 末端にかけて虹色). β プロペラ構造の上部中央にあるポケットでコア三糖構造をもつ複数の糖鎖受容体モチーフを柔軟に認識する.

の遺伝子型に分類されている⁹⁾. N 蛋白質は L 蛋白質と P 蛋白質からなる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体とともにリボ核蛋白質 (RNP) 複合体を形成し、ウイルスの複製と転写に重要な役割を果たす^{2,10)}. M 蛋白質はウイルス粒子形成および出芽で主要な役割を果たす^{2,10)}. SH 蛋白質は TNF- α 誘導性アポトーシス経路を阻害することで、宿主の抗ウイルス反応の回避を促進すると考えられている^{1,2)}. ムンプスウイルスの細胞侵入は 2 つのエンベロープ糖蛋白質 (HN と F) に依存している. HN 蛋白質が受容体結合を担うのに対し、F 蛋白質は膜融合の役割を果たす¹⁰⁾. 本トピックスでは、糖鎖アレイを用いて同定された MuV 糖鎖受容体の構造的バリエーション・MuV HN 蛋白質と糖鎖受容体の複合体構造情報・機能的相互作用解析・感染実験に基づいた MuV 受容体認識機構について最新の知見をまとめた. さらに、人体における糖鎖分布や最近同定された宿主因子に基づいて、MuV のトロピズムについて考察した.

3. 糖鎖受容体と MuV-HN 蛋白質の相互作用

MuV-HN 蛋白質は、N 末端の細胞内領域、膜貫通領域、ストック領域、および C 末端の受容体結合ドメインからなるタイプ II 膜糖蛋白質である. MuV-HN 単量体の受容体結合ドメインは、6 枚の β シートが円を描くようにして配置された構造 (β プロペラ構造) をしており、 α 2,3 結合したシアル

酸を含む複合糖鎖に特異的な親和性を示す (図). その特異性は、ヒト呼吸器に存在する主要なシアリル化糖鎖を代表する糖鎖を用いた小規模な糖鎖アレイ^{11,12,13)}を用いた実験や¹⁴⁾、米国の糖鎖コンソーシアム (Consortium for Functional Glycomics (CFG) (<http://www.functionalglycomics.org>)) の大規模糖鎖アレイを用いた結合実験によって示されている^{14,15)}. また、MuV-HN 受容体結合ドメインと糖鎖受容体アナログである α 2,3-結合シアリルラクトース (3'-SL) との構造解析により、 β プロペラ構造の上部中央にあるポケットが糖鎖受容体の認識部位であることが証明された¹⁴⁾.

MuV-HN と糖鎖受容体の相互作用では、非還元末端のシアル酸 (Sia-1) が 7 つの“活性部位アミノ酸残基”のうち 5 つと相互作用することが示された. これらのアミノ酸残基は、その他のウイルスや細胞のシアリダーゼで高度に保存されており、シアル酸の相互作用に関与することが知られている¹⁶⁾. 糖鎖受容体の Sia-1 は、MuV の活性部位アミノ酸残基、すなわち、Arg180, Glu407, Arg422, Arg512, Tyr540 に加えて、高度に保存されたアミノ酸残基 Lys242, Glu264, Tyr323 とも相互作用することが示された. 構造解析により初めて明らかになったこととして、MuV-HN との直接的な相互作用が、Sia-1 だけでなく、糖鎖の非還元末端から 2 番目および 3 番目の位置にあるガラクトース (Gal-2) およびグルコース (Glc-3) 部分でも確認されたことである (図). これらの結果から、三糖構造

が糖鎖受容体と MuV-HN 蛋白質との相互作用に重要であることが明らかになった¹⁴⁾。MuV-HN と 3'-SL の結合は、3'-SL の Glc-3 と MuV-HN の Tyr369 の間の相互作用によって安定化されている。この相互作用は Tyr369 と隣接する Phe370 および Tyr268 との連鎖的なスタッキング相互作用によりサポートされている。この Glc-3 と Tyr369 の相互作用の重要性は、MuV 細胞侵入機能を評価するために行った融合アッセイにおいて、MuV-HN Y369A のアミノ酸置換が膜融合活性を著しく低下させた結果からも裏付けられた。また、MuV-HN と糖鎖受容体との結合親和性を、等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimeter: ITC) を用いた熱力学的解析により定量化したところ、MuV-HN と二糖構造 (Sia α 2,3Gal) の平衡解離定数 (Kd) は約 500 μ M であった。一方、MuV-HN と三糖構造 (Sia α 2,3Gal β 1,4Glc) の Kd は約 50 μ M であり、MuV-HN と三糖との結合力が二糖との結合力に比べて約 10 倍程度強いことを示しており、三糖構造の重要性を示す結果となった¹⁴⁾。さらに、核磁気共鳴 (NMR) 技術を用いて、HN 蛋白質-糖鎖受容体の相互作用における糖鎖受容体構造と親和性を特定してマッピングできるという利点をもつ飽和移動差 (STD) NMR 解析では、X 線結晶構造から得られた知見と同様に、MuV-HN が Sia-1 に加えて 3 糖 (NeuAc2,3Gal1,4GlcNAc: Sia1-Gal-2-GlcNAc-3) の非還元末端から 2 番目および 3 番目と相互作用することが確認された¹⁷⁾。より長いシアリルグリカン (Neu-Ac2,3Gal1,4GlcNAc1,3Man1,6(NeuAc2,3Gal1,4GlcNAc1,2Man1,3)Man1, 3GlcNAc1,4GlcNAc-Asn) を用いた構造解析では、MuV-HN 蛋白質と相互作用するエピトープは、非還元末端の三糖部分のみマッピングされていた¹⁷⁾。これらの解析により、三糖構造がコアレセプターユニットであり、糖鎖の伸長は MuV-HN との結合に影響しないことが確認された。糖鎖アレイ解析や NMR 解析では、糖鎖の枝分かれが MuV-HN との親和性を低下させることが示されているが [36, 50]、これはおそらく立体障害によるものであると考えられる。これらの構造的・機能的知見はすべて、「 α 2,3 結合型シアリル酸を含む三糖構造」が MuV の必要かつ十分な受容体ユニットとして機能することを支持する結果となっている。

4. 三糖をコア構造とする MuV 糖鎖受容体

上述した単純な三糖構造に加え、糖鎖の非還元末端から 3 番目の位置にある GlcNAc-3 がフコース修飾された三糖 (Neu5Ac2,3Gal1,4(Fuc1,3)GlcNAc) は、シアリルルイス x (sLe^x) として知られている (図)。また、糖鎖の非還元末端から 2 番目の位置にある Gal-2 が GalNAc 修飾された三糖 (Neu5Ac2,3(GalNAc1,4)Gal1,4GlcNAc) は、Sda- グリカンとして知られている (図)。これらの単糖で修飾された 2 つの糖鎖構造も MuV 糖鎖受容体として報告された¹⁵⁾。Sda- グリカンの非還元末端モチーフは、GalNAc と Neu5Ac が

ともに Gal に結合しており、GM2 ガングリオシドのオリゴ糖エピトープ (Neu5Ac2,3(GalNAc1,4)Gal1,4GlcCer) として知られている¹⁸⁾。MuV-HN と sLex pentaose (Neu5Ac2,3Gal1,4 (Fuc1,3) GlcNAc1,3Gal) との複合体の構造解析から、分岐したフコース (Fuc-3') が MuV-HN の Tyr369 と相互作用していることがわかった。さらに、MuV-HN が GM2- ガングリオシド糖 (GM2-GS: Neu5Ac2,3 (GalNAc1,4) Gal1-4Glc) に結合した MuV-HN の複合体構造では、分岐した GalNAc 部分 (GalNAc-2') と Glu569 および Ser539 の側鎖との相互作用が確認された。MuV-HN と 3'-SL 複合体で観察された相互作用は、sLe^x pentaose と GM2-GS の三糖部分で完全に保存されていることがわかった¹⁵⁾。このことは、Neu5Ac2,3Gal1,4Glc (または GlcNAc) が MuV のコア受容体を構成している一方で、MuV-HN 受容体結合ドメイン構造中の受容体結合ポケットは、コア三糖モチーフに単糖修飾された糖鎖を柔軟に受け入れることができることを示している (図)。

さらに、3'-SL, sLe^x pentaose, GM2-GS の存在下で MuV を培養細胞に感染させると、いずれも MuV 細胞侵入が阻害された¹⁵⁾。この結果は、これらの糖鎖構造が受容体として機能することを支持するものであり、阻害効果は sLex pentaose が最も大きく、次いで 3'-SL と GM2-GS であった。糖鎖受容体との相互作用に関与するアミノ酸残基は、Tyr369 とスタッキング相互作用を形成する Phe370 が遺伝子型 K でロイシンに置換されている以外は、すべての遺伝子型で保存されており、12 の遺伝子型すべての MuV が受容体として利用していることが示唆された。

5. 人体における MuV の糖鎖受容体の分布

MuV の全身感染に関与する糖鎖構造としては、3'-シアリルラクトサミン (3'-SLN: Neu5Ac2,3Gal1,4GlcNAc), 3'-SL, sLex などが考えられる^{14,15)} (図)。3'-SLN は、O- および N- 結合型糖蛋白質の非還元末端糖鎖構造として存在し、sLe^x pentaose のコア三糖部分を構成している。3'-SL の非還元末端から 3 番目の位置のグルコースがアセチル化された糖鎖構造を示しており、非還元末端から 3 番目の糖が構造的に異なるにもかかわらず、3'SLN と 3'-SL は共に MuV のコア受容体ユニットとして機能している¹⁴⁾。3'-SL は、GM3 と呼ばれるガングリオシドの非還元末端構造を構成しており、肝臓、腎臓、筋肉、脂肪組織、血球、甲状腺など、脊椎動物の神経外組織の大部分に存在する主要なガングリオシドである¹⁹⁾。MuV-HN の 3'-SLN に対する親和性は、MuV が人体の様々な組織に存在する O- および N- 結合型糖鎖の非還元末端のシアリル三糖モチーフを利用していることを示唆している。

sLe^x は、典型的にはリンパ球や神経栄養細胞の表面に存在し、血管内皮に発現するセレクチンによる認識を介して、細胞の接着や浸潤に役割を果たしている^{20,21)}。正常な

ヒトの組織における sLe^x の発現は非常に低いとされているが、いくつかの報告は、口腔粘膜や乳房組織 [56]、心臓、腎臓、肺などの組織での発現を示している (<http://www.functionalglycomics.org>). sLe^x は、高度にグリコシル化されたムチンやスフィンゴ脂質の非還元末端構造にも見られる²²⁾。MuV による全身感染は、気道に隣接する局所リンパ節への感染に続いて起こる。免疫細胞は sLex モチーフの糖鎖を持っていることから、免疫細胞はウイルスを全身に拡散させる「キャリア」として機能すると考えられる²³⁾ (図)。

GM2-GS は、MuV による神経感染に関与していると考えられる²³⁾ (図)。GM2 は、哺乳類の中樞神経、末梢神経、副腎およびメラノーマ、膠芽腫、腎細胞癌などの腫瘍に見られるガングリオシドである [12, 60, 61]。GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b は、正常なヒト脳のガングリオシドの 95% を占め、GM2 は残りの 5% に含まれる [62, 63]。GM2-GS は、sLe^x や 3'-SL に比べて MuV の侵入を抑制する効果が相対的に低いことから¹⁵⁾、GM2 の受容体機能は、ウイルス力価が高い環境に限定されている可能性がある。

最近の研究により、MuV が受容体として好む糖鎖構造の詳細が明らかになってきた。しかし、人体内の糖鎖受容体の分布だけでは、MuV が示すユニークなトロピズムのすべてを説明することはできず、MuV の感染を促進する未知の宿主因子がさらに存在する可能性がある。

6. まとめと今後の展望

MuV は α 2,3 シアリル三糖をコア受容体構造として利用し、標的細胞に侵入する (図)。また、sLe^x や GM2 のようなコア構造に修飾を加えた糖鎖にも柔軟に結合することができる (図)¹⁵⁾。細胞侵入時の膜融合には、陰イオンが MuV-HN ヘッドドメインの 4 量体化を促進することで膜痛号のトリガーを担っていることが示されている²⁴⁾。細胞侵入後、MuV の複製と転写は、Hsp70 や Hsp90 などの宿主因子との相互作用によって最適化される^{25) 26)} (図 3)。感染細胞内で新たに発現したウイルス糖蛋白質に対しては、LAMP ファミリー分子がプロテアーゼ furin と協力して、MuV-F 蛋白質の開裂をサポートする²⁴⁾。これらの受容体や宿主因子の分布は、MuV のトロピズムを部分的に説明するものではあるが、MuV の病態を完全に理解するためには多くの疑問が残されている。例えば、他のパラミクソウイルスと同様の生活環を持つにもかかわらず、腺組織や中枢神経系への親和性が MuV に特有なのはなぜか。MuV が臓器に直接感染することによって組織が損傷を受けるのか、あるいは、免疫反応の二次的な影響によって組織が損傷を受けるのか。特定の組織での MuV の生活環を制限する他の受容体や宿主因子が存在するのか、などについては、今後の研究の進展が望まれる。将来的には、これらの疑問を解決することで MuV のユニークなトロピズムと病因の理解が深まることが期待される。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Rubin, S. A., Sauder, C. J. & Carbone, K. M. in *Fields Virology*. 6 ed. Vol. I (eds D.M. Knipe *et al.*) Ch. 35, 1024-1041 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
- 2) Rubin, S., Eckhaus, M., Rennick, L. J., Bamford, C. G. & Duprex, W. P. Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. *J Pathol* **235**, 242-252, doi:10.1002/path.4445 (2015).
- 3) Hviid, A., Rubin, S. & Muhlemann, K. Mumps. *Lancet* **371**, 932-944, doi:10.1016/S0140-6736(08)60419-5 (2008).
- 4) Lenman, A. *et al.* Polysialic acid is a cellular receptor for human adenovirus 52. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E4264-E4273, doi:10.1073/pnas.1716900115 (2018).
- 5) Sulik, A., Kroten, A., Wojtkowska, M. & Oldak, E. Increased levels of cytokines in cerebrospinal fluid of children with aseptic meningitis caused by mumps virus and echovirus 30. *Scand J Immunol* **79**, 68-72, doi: 10.1111/sji.12131 (2014).
- 6) Wilfert, C. M. Mumps meningoencephalitis with low cerebrospinal-fluid glucose, prolonged pleocytosis and elevation of protein. *N Engl J Med* **280**, 855-859, doi:10.1056/NEJM196904172801603 (1969).
- 7) Hashimoto, H., Fujioka, M., Kinumaki, H. & Kinki Ambulatory Pediatrics Study, G. An office-based prospective study of deafness in mumps. *The Pediatric infectious disease journal* **28**, 173-175, doi:10.1097/INF.0b013e31818a8ca8 (2009).
- 8) Morita, S. *et al.* The clinical features and prognosis of mumps-associated hearing loss: a retrospective, multi-institutional investigation in Japan. *Acta Otolaryngol* **137**, S44-S47, doi:10.1080/00016489.2017.1290826 (2017).
- 9) WHO. Mumps virus nomenclature update: 2012. *Weekly epidemiological record* **87**, 217-224 (2012).
- 10) Plemper, R. K. L., R.A. in *Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th ed (ed P.M. Howley, Knipe, D.M., Whelan, S., Eds.) 504-558 (Wolters Kluwer, 2020).
- 11) Imamura, T. *et al.* Antigenic and receptor binding properties of enterovirus 68. *J Virol* **88**, 2374-2384, doi: 10.1128/JVI.03070-13 (2014).
- 12) Walther, T. *et al.* Glycomic analysis of human respiratory tract tissues and correlation with influenza virus infection. *PLoS Pathog* **9**, e1003223, doi: 10.1371/journal.ppat.1003223 (2013).
- 13) Nakakita, S. & Hirabayashi, J. Preparation of Glycan Arrays Using Pyridylaminated Glycans. *Microarray Technology: Methods and Applications* **1368**, 225-235, doi:10.1007/978-1-4939-3136-1_16 (2016).
- 14) Kubota, M. *et al.* Trisaccharide containing alpha2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 11579-11584, doi:10.1073/pnas.1608383113 (2016).
- 15) Kubota, M. *et al.* Molecular Mechanism of the Flexible

- Glycan Receptor Recognition by Mumps Virus. *J Virol* **93**, doi:10.1128/JVI.00344-19 (2019).
- 16) Colman, P. M., Hoyne, P. A. & Lawrence, M. C. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* **67**, 2972-2980 (1993).
 - 17) Forgione, R. E. *et al.* Structural basis for Glycan-receptor binding by mumps virus hemagglutinin-neuraminidase. *Sci Rep-Uk* **10**, doi:ARTN 1589 10.1038/s41598-020-58559-6 (2020).
 - 18) Varki.A. *et al.* *Essentials of Glycobiology, 3rd edition* (Cold Spring Harbor (NY), 2017).
 - 19) Prokazova, N. V., Samoilova, N. N., Gracheva, E. V. & Golovanova, N. K. Ganglioside GM3 and its biological functions. *Biochemistry (Mosc)* **74**, 235-249, doi:10.1134/s0006297909030018 (2009).
 - 20) Jin, F. & Wang, F. The physiological and pathological roles and applications of sialyl Lewis x, a common carbohydrate ligand of the three selectins. *Glycoconj J* **37**, 277-291, doi:10.1007/s10719-020-09912-4 (2020).
 - 21) Phillips, M. L. *et al.* ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* **250**, 1130-1132, doi:10.1126/science. 1701274 (1990).
 - 22) Francis, L. W. *et al.* Highly glycosylated MUC1 mediates high affinity L-selectin binding at the human endometrial surface. *J Nanobiotechnology* **19**, 50, doi: 10.1186/s12951-021-00793-9 (2021).
 - 23) Kubota, M. & Hashiguchi, T. Unique Tropism and Entry Mechanism of Mumps Virus. *Viruses* **13**, doi: 10.3390/v13091746 (2021).
 - 24) Kubota, M. *et al.* Disruption of the Dimer-Dimer Interaction of the Mumps Virus Attachment Protein Head Domain, Aided by an Anion Located at the Interface, Compromises Membrane Fusion Triggering. *Journal of Virology* **94**, doi:ARTN e01732-19. 10.1128/JVI.01732-19 (2020).
 - 25) Katoh, H. *et al.* Heat shock protein 70 regulates degradation of the mumps virus phosphoprotein via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* **89**, 3188-3199, doi:10.1128/JVI.03343-14 (2015).
 - 26) Katoh, H. *et al.* Heat Shock Protein 90 Ensures Efficient Mumps Virus Replication by Assisting with Viral Polymerase Complex Formation. *J Virol* **91**, doi:10.1128/JVI.02220-16 (2017).

