

デングウイルス感染に関わる糖鎖分子の構造と機能

1. はじめに

大規模開発や人口の都市集中など社会的・経済的变化に伴う地球環境の急激な変化により、近年、エイズ、重症急性呼吸器症候群（SARS）、高病原性鳥インフルエンザや西ナイル熱、デング熱などのウイルス感染症など、危険度の高い新興・再興ウイルス感染症が人間社会に出現している。ウイルス感染初期における宿主受容体分子間との相互作用は、ウイルス感染による病態形成に必須であるのみならず、ウイルスの異種間感染にも不可欠なプロセスである。熱帯・亜熱帯地域を中心に近年、急速に流行域を拡大しているデングウイルスは、ヒトに対して熱性疾患、時に重篤な出血性疾患を引き起こす原因病原体である。このウイルスはヒトと節足動物（蚊）との間で特徴的な感染環を形成しているが、その異種間感染機構をはじめとして病態形成の分子機構は十分に解明されていない。

本稿では、筆者らの研究成果を含めて、デングウイルス初期感染に関与する宿主糖鎖分子の構造と機能について概説する。

2. デングウイルスの生態

デング熱・出血熱は、推定年間約1億人の感染者、約50万人のデング出血熱患者が存在する熱帯・亜熱帯地域における最大のウイルス感染症である¹⁾。現在、日本国内での発生はないが、ウイルス媒介可能なヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) が我が国には常在しており、本ウイルス感染症は、輸入感染症として改正感染症法で全数把握の四類感染症に分類されている。

デングウイルスは主としてネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) がベクターとなりヒトへ媒介される。蚊とヒトの間で感染環が維持されており、ヒトは終末宿主ではない。ウイルスは、蚊の腸で増殖し、唾液腺に移行する。このような感染蚊は健常人の吸血時、皮下にウイルスを接種することとなる。ウイルスは皮膚の樹状細胞で増殖した後、単球・マクロファージ系の細胞に感染・増殖すると考えられているが、標的細胞・組織等は十分に明らかにされていない^{1,2)}。

デングウイルスには四つの血清型（1~4型）が存在す

る。特定の血清型ウイルスの初感染により体内に感染中和抗体が誘導され、同一型のウイルスに対して終生免疫が成立する。初感染時、比較的子後良好なデング熱を発症する。異なる血清型に対する中和抗体は短期間で消失するため、別の血清型ウイルスの再感染が起きる（二次感染）。異なる血清型ウイルスによる二次感染では、初感染時に産生された抗体との交差反応性により形成されたウイルス-抗体複合体が、Fc receptor を介して効率よく宿主細胞内に取り込まれ、ウイルス感染増強が起きる。このような宿主側応答が、より重篤なデング出血熱、デングショック症候群の主な原因の一つであると考えられている^{1,3)}。

3. デングウイルスの性状：形態、遺伝子構造

デングウイルスは、直径約50 nmの球形をしたエンベロープウイルスである。ウイルス膜上には、エンベロープ糖タンパク質（Eタンパク質）が存在する（図1）。Eタンパク質は宿主細胞膜上の受容体分子と結合する機能タンパク質であり、また中和抗体が認識するタンパク質として宿主防御免疫誘導の主体となる⁴⁾。

ウイルスゲノムは約11 kbの一本鎖（+）RNAであり、3種類の構造タンパク質（C, PrM, E）遺伝子と7種類の非構造タンパク質（NS1~NS5）遺伝子をコードしている。5'末端にキャップ構造を持つ非翻訳領域と3'末端にpoly（A）化されていない非翻訳領域を有する。NS3タンパク質はセリンプロテアーゼおよびヘリカーゼ活性を有する多機能タンパク質である。NS5タンパク質はRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を持つ。これらは抗デングウイルス薬剤の標的タンパク質として研究が進んでいる⁵⁾。

ウイルス感染は、Eタンパク質が宿主細胞膜上に存在する受容体分子と結合することによって開始される。吸着したウイルス粒子は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。リソソームとの融合によりエンドソーム内のpHが低下すると、Eタンパク質の膜融合ペプチドの働きにより、エンドソーム膜とウイルス膜が融合、ヌクレオカプシドが細胞質へ入り、最終的にウイルスゲノムが細胞質に放出されることとなる。

4. 宿主受容体分子

デングウイルスをはじめ、フラビウイルス科ウイルスのEタンパク質の立体構造が明らかにされている⁶⁻⁸⁾。Eタンパク質は機能的に三つのドメイン（ドメインI, II, III）に分かれており、ドメインIはヒンジ領域と呼ばれ、他の二つの機能的ドメインを連結している。この領域の可動性は

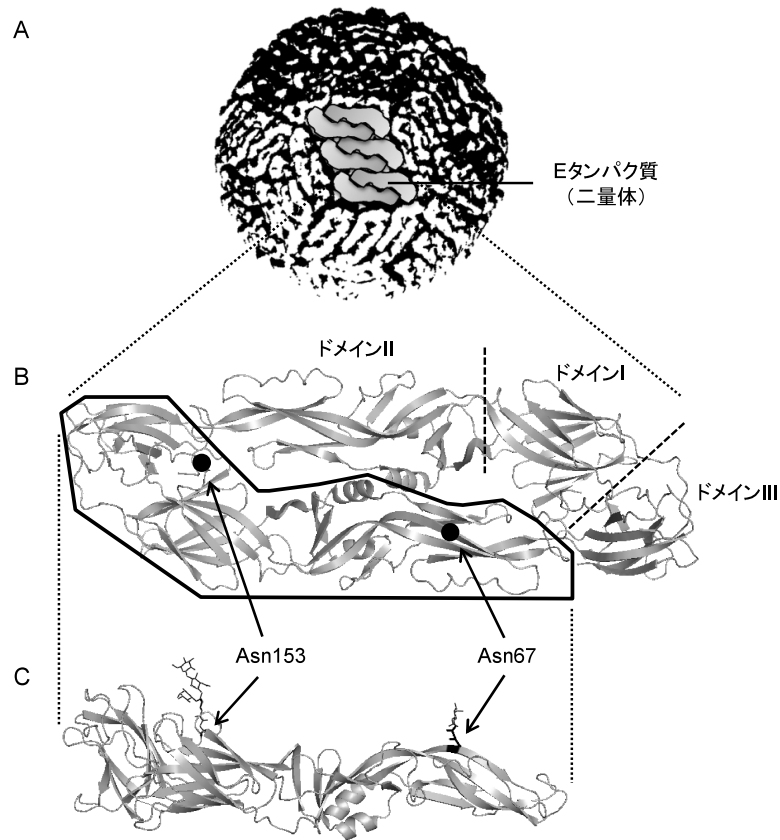


図1 デングウイルス粒子構造とEタンパク質立体構造

A: デングウイルス粒子構造 (RCSB PDB (www.pdb.org) of PDB ID 1K4R⁷の画像を改変)

B: Eタンパク質二量体構造 (PDB ID 1OKE⁸, PyMolで作成)

C: Eタンパク質単量体構造 (横方向から, PDB ID 1OKE⁸, PyMolで作成)

Asn67 & Asn153: N結合型糖鎖付加部位.

高く、外部 pH の変化にともなう E タンパク質構造変化を担っている。ドメイン II は、膜融合活性を有するペプチド配列を含むとともに、疎水性に富む領域を介して E タンパク質の二量体化に寄与している。ドメイン III は、宿主細胞膜上に存在する受容体分子との結合に関わると推定されている (図 1)。

これまでにデングウイルスの受容体分子として動物レクチンおよび糖鎖分子が報告されている。E タンパク質上には N 結合型糖鎖付加部位が存在しており、実際に糖鎖付加が認められている (図 1)⁹。蚊の体内で増殖したデングウイルスの E タンパク質は昆虫細胞特有の糖鎖付加を受ける。昆虫細胞では、マンノースのコア糖鎖構造の非還元末端に、ガラクトースの代わりに GalNAc 残基を付加させることで、哺乳動物細胞とは異なる糖鎖が伸長する⁹。デ

ングウイルスは、DC-SIGN (dendritic-cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin, CD209) 陽性樹状細胞で増殖する^{10,11}。DC-SIGN は、ハイマンノース型糖鎖を主に認識することが知られているが、その他に Le^x 糖鎖 [Galβ1-4 (Fucα1-3)GlcNAc-R] や LDNF 糖鎖 (GalNAcβ1-4 (Fucα1-3)GlcNAc-R などとも反応することが報告されている¹²)。非還元末端 GalNAc 残基を有する昆虫に特徴的な糖鎖が、DC-SIGN で認識されると考えられる。

宿主細胞膜上に発現している受容体分子に関する報告は少なく、その実体は十分に明らかにされていない。その中で、細胞膜ヘパラン硫酸 (HS) などの硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) が、デングウイルスに対するウイルス受容体の一つである可能性が報告されている¹³。実際、高度硫酸化 GAG であるヘパリンは、デングウイルスの細

胞への感染を阻害すること、組換え体Eタンパク質とヘパリンが高親和性結合することが示され、硫酸化繰り返し多糖分子がウイルス侵入に関与する可能性が示されている。ヘパリンは、デングウイルスのみならず日本脳炎ウイルスなどのフラビウイルスやHIVなどの宿主細胞への吸着・侵入にも関与することが報告されている¹⁴⁾。最近、デングウイルス感染に関与する宿主因子の網羅的探索研究が行われた¹⁵⁾。報告された宿主因子には、糖代謝、糖鎖合成に関係する遺伝子が複数含まれており、これまでの報告と同様に、デングウイルス初期感染、特に宿主への吸着・侵入過程には細胞表面糖鎖分子が重要な働きをしていることが強く示唆されている。

5. ウイルスの細胞内侵入に関与する糖鎖構造

1) デングウイルス結合性非硫酸化糖鎖分子

デングウイルス受容体分子として細胞表面に発現している複合糖質分子が強く示唆されていた。我々はウイルス感受性細胞から、デングウイルス結合性糖鎖分子の探索を試みた。デング2型ウイルスは、硫酸基を持たない中性糖鎖分子である neolactotetraosylceramide (nLc₄Cer, Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1' Cer) に対して特異的な結合性を示した (図2)¹⁶⁾。興味深いことにデングウイルスが増殖する昆虫細胞由来培養細胞株から単離された中性糖脂質に対して、同様にウイルス結合性が観察された。糖鎖構造解

析および標準物質との比較から、昆虫由来のウイルス結合性糖鎖の構造が、GalNAcβ1-4GlcNAcβ1-3Manβ1-4Glcβ1-1' Cer であると解明された。異なる種由来のウイルス感受性細胞から単離された糖脂質の非還元末端糖鎖構造の類似性は、この糖鎖構造が種を超えてウイルスの感染・増殖に関わることを示唆している。nLc₄を多価に結合した化学合成デンドリマーが、デングウイルス感染を有効に阻害することが示された¹⁶⁾。このことは、nLc₄糖鎖がウイルス初期感染時に機能している可能性を示唆している。

2) デングウイルス結合性硫酸化糖鎖分子

デングウイルスは、Eタンパク質を介してヘパリンなどの高度硫酸化GAG分子に結合することが知られており、この結合には糖鎖自体の構造は影響しない¹⁷⁾。一方、GAGの硫酸化の割合がそれほど高くない場合、ウイルスの結合には、ある程度の糖鎖構造依存性が観察される。ヘパリン硫酸はウイルスに対して結合性を示すが、コンドロイチン硫酸(A, B, C; 硫酸基の位置異性体)、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸は結合性を示さない。また、硫酸基を持たないヒアルロン酸も結合性はない。コンドロイチン硫酸には、繰り返し基本糖鎖構造単位に2分子の硫酸基が結合した異性体分子(D, E)があり、近年生物学的機能が注目されている。我々はデングウイルスに対するコンドロイチン硫酸DおよびEの結合性を検討した。その結果、デング2型ウイルスがコンドロイチン硫酸Eに対して強力に

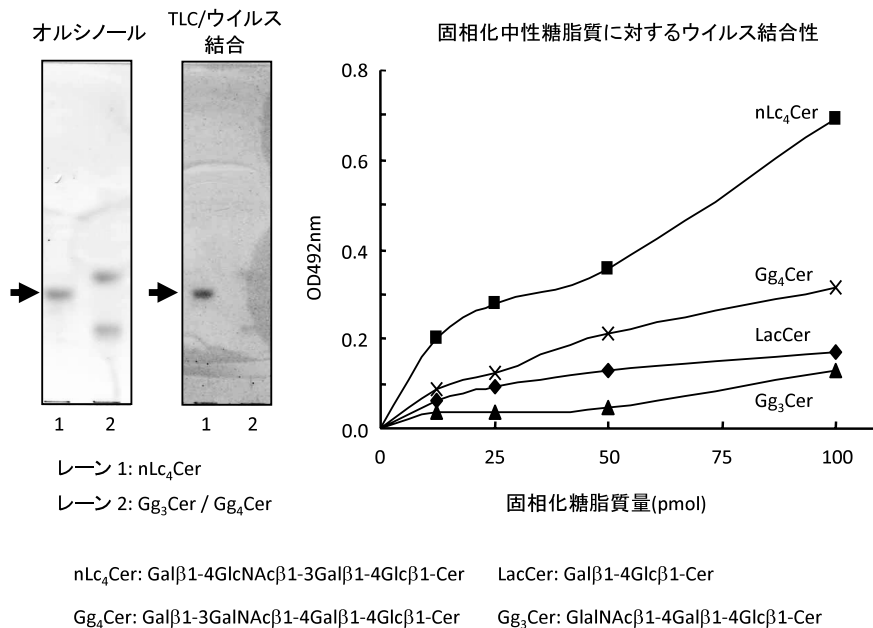


図2 中性糖脂質に対するデング2型ウイルスの結合

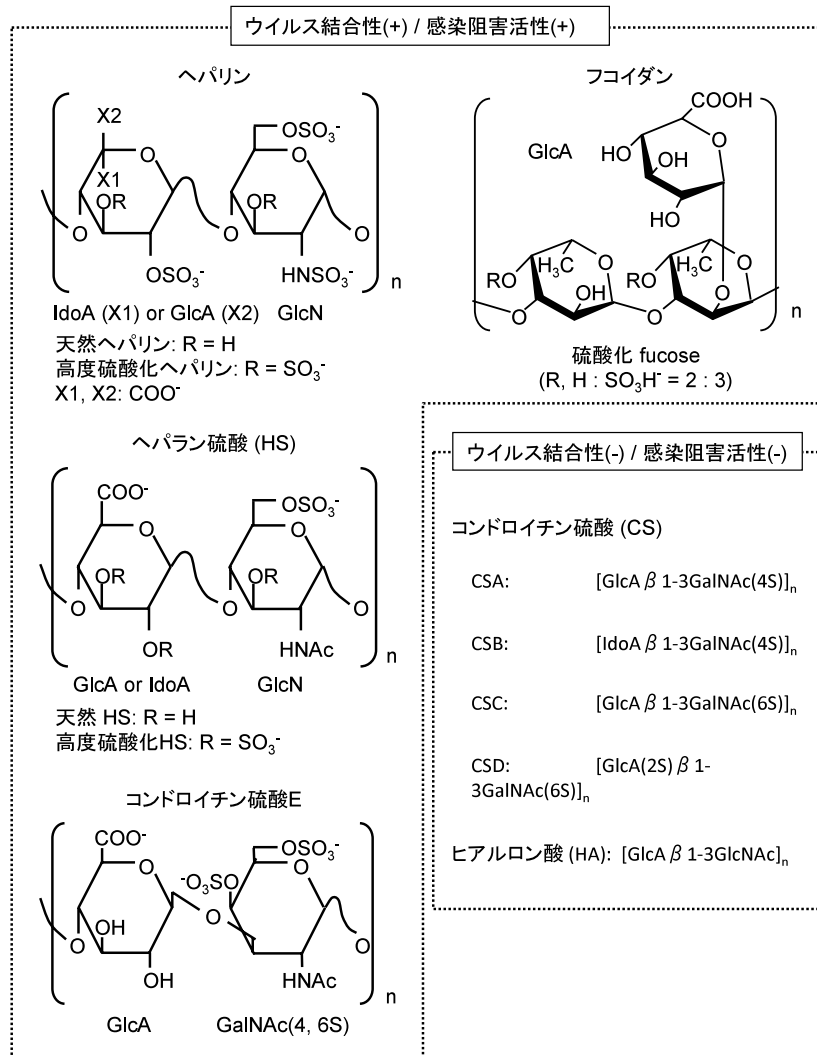


図3 デングウイルス感染阻害作用を示す硫酸化多糖の構造

結合することが明らかとなった(図3)。ウイルスは硫酸基の位置異性体であるコンドロイチン硫酸Dに対しては全く結合性を示さなかった。ヘパリンに対する結合性とコンドロイチン硫酸Eは、デングウイルスに対して交叉結合性を示したことから、これら2種類のGAGにはデングウイルス結合にかかわる共通構造があることが推定された。コンドロイチン硫酸Eは、デングウイルス感染もヘパリンと同程度に阻害することから、ヘパリンとの共通構造がウイルス感染に機能的に働いていることが考えられる(投稿論文準備中)。

コンドロイチン硫酸Eとヘパリンに共通する機能的糖鎖構造についての知見がいくつか報告されている。その中

である種のヘパリン結合性タンパク質のコンドロイチン硫酸Eに対する結合性および機能に関する知見は興味深く、これら2種類のGAGが機能的に類似の糖鎖構造を含むことを示唆している。

海藻(*Cladosiphon okamuranus*)由来硫酸化多糖であるフコイダンがデング2型ウイルスの感染をヘパリンと同等に阻害することを見出した¹⁸⁾。この化合物は、硫酸化フコースのポリマーにグルクロン酸残基が分枝した構造を有している。ウイルス阻害活性を示す糖鎖分子の構造解析結果から、デングウイルス感染阻害作用には従来報告されてきた硫酸基のみならず、グルクロン酸残基が必須であることが示された。

6. おわりに

我々は、ウイルス初期感染に関わるユニークな糖鎖分子の構造情報を基に、これらの糖鎖分子の生体内での分布、局在、生合成機構、ウイルス-糖鎖間相互作用を包括的に解明することで、ウイルスに対する宿主側因子としての糖鎖の機能発現およびその制御機構を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。上述したデングウイルス感染に関わる機能的糖鎖構造を基に、現在、低分子糖鎖誘導体を創製し、デングウイルス感染阻害効果およびウイルスEタンパク質機能制御を検討している。また、ウイルス初期感染に関わる機能的糖鎖分子をGAG以外から見出した。そして、その糖鎖合成酵素をウイルス非感染細胞に導入することで、ウイルス感受性細胞に転換することに成功している。今後、異なる宿主間に伝播し、流行拡大を続けるデングウイルスの異種間感染機構の解明、ひいてはデングウイルス侵入阻害剤の開発への展開を目指している。

謝辞

本稿で紹介した我々の研究成果は、所属研究室の前教授であり、現中部大学健康科学部 鈴木康夫教授、ならびに所属研究室のスタッフ、学生の方たちの協力なくしては得られなかったものである。ここに深く感謝いたします。また、共同研究者である長崎大学熱帯医学研究所 森田公一教授、埼玉大学大学院理工学研究科 照沼太陽教授、松岡浩司准教授、滋賀大学教育学部 杉田陸海教授、糸乗 前教授、愛知医科大学分子医科学研究所 木全弘治教授、杉浦信夫准教授、広島国際大学薬学部 池田 潔教授、ヤクルト中央研究所 長岡正人博士には多大なご協力をいただきました。深く感謝いたします。

- 1) Halstead, S.B. (2007) *Lancet*, **370**, 1644-1652.
- 2) Mackenzie, J.S., Gubler, D.J., & Petersen, L.R. (2004) *Nat. Med.*, **10**, S98-S109.
- 3) Pierson, T.C. & Diamond, M.S. (2008) *Expert Rev. Mol. Med.*, **10**, e12.
- 4) Zhang, W., Chipman, P.R., Corver, J., Johnson, P.R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T.S., Strauss, J.H., Rossmann, M.G., & Kuhn, R.J. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 907-912.
- 5) Clyde, K., Kyle, J.L., & Harris, E. (2006) *J. Virol.*, **80**, 11418-

- 11431.
- 6) Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., & Rossmann, M.G. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 13-22.
- 7) Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., Baker, T.S., & Strauss, J.H. (2002) *Cell*, **108**, 717-725.
- 8) Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S.C. (2004) *Nature*, **427**, 313-319.
- 9) Tomiya, N., Narang, S., Lee, Y.C., & Betenbaugh, M.J. (2004) *Glycoconjugate J.*, **21**, 343-360.
- 10) Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., & Desprès, P. (2003) *EMBO Rep.*, **4**, 723-728.
- 11) Pokidysheva, E., Zhang, Y., Battisti, A.J., Bator-Kelly, C.M., Chipman, P.R., Xiao, C., Gregorio, G.G., Hendrickson, W.A., Kuhn, R.J., & Rossmann, M.G. (2006) *Cell*, **124**, 485-493.
- 12) van Die, I., van Vliet, S.J., Nyame, A.K., Cummings, R.D., Bank, C.M.C., Appelmelk, B., Geijtenbeek, T.B.H., & van Kooyk, Y. (2003) *Glycobiology*, **13**, 471-478.
- 13) Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., & Marks, R.M. (1997) *Nat. Med.*, **3**, 866-871.
- 14) Liu, J. & Thorp, S.C. (2002) *Med. Res. Rev.*, **22**, 1-25.
- 15) Sessions, O.M., Barrows, N.J., Souza-Neto, J.A., Robinson, T. J., Hershey, C.L., Rodgers, M.A., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., Yang, P.L., Pearson J.L., & Garcia-Blanco, M.A. (2009) *Nature*, **458**, 1047-1050.
- 16) Hidari, K.I.P.J., Aoki, C., Itonori, S., Yamada, A., Takahashi, N., Kasama, T., Hasebe, F., Islam, M.A., Hatano, K., Matsuoka, K., Taki, T., Guo, C.-T., Takahashi, T., Sakano, Y., Suzuki, T., Miyamoto, D., Sugita, M., Terunuma, D., Morita, K., & Suzuki, Y. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)*, **139**, 607-614.
- 17) Marks, R.M., Lu, H., Sundaresan, R., Toida, T., Suzuki, A., Imanari, T., Hernáiz, M.J., & Linhardt, R.J. (2001) *J. Med. Chem.*, **44**, 2178-2187.
- 18) Hidari, K.I.P.J., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K., & Suzuki, T. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **376**, 91-95.

左 一八, 鈴木 隆
(静岡県立大学薬学部生化学分野,
グローバル COE プログラム)

Structure and function of glycoconjugates involved in dengue virus infection
Kazuya I.P.J. Hidari and Takashi Suzuki (Department of Biochemistry, University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Sciences, Global COE program, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka-shi, Shizuoka 422-8526, Japan)