

令和元年5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19563

研究課題名(和文) ムンプスウイルスの特徴的な腺組織・神経トロピズムの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of the mumps virus tropism to glandular and nervous tissues

研究代表者

柳 雄介 (Yanagi, Yusuke)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：40182365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ムンプスウイルスは膜融合によって細胞に侵入し、増殖する。その膜融合に関わっているウイルスF蛋白質は、宿主細胞の蛋白質分解酵素furinによって前駆体から開裂されて膜融合能を持つ成熟型になる。我々は、遺伝子の発現クローニングにより、furinによるF蛋白質の開裂に必要な宿主蛋白質を同定した。この分子が、ムンプスウイルスのトロピズム(細胞・組織特異性)にどのように関わっているかは、今後の研究課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

流行性耳下腺炎(おたふくかぜ、ムンプス)の原因であるムンプスウイルスは、唾液腺炎以外に精巣炎、卵巣炎、乳腺炎、膵炎、髄膜炎、脳炎、難聴などを起こす。予防のための生ワクチンが存在するが、副反応が起こることがあるため、わが国では任意接種になっている。そのため、ワクチン接種率は低く、毎年数十万人の患者が出ている。特異的な治療薬はない。本研究では、ムンプスウイルスが標的細胞に感染する際に必要な細胞側の蛋白質を同定した。この蛋白質の働きを詳細に解析することにより、ムンプスウイルスの細胞感染メカニズムが明らかになるだけでなく、抗ウイルス薬開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mumps virus (MuV) is an enveloped negative-stranded RNA virus in the family Paramyxoviridae. Two viral envelope glycoproteins, the hemagglutinin-neuraminidase (HN) and the fusion (F) protein, mediate membrane fusion. The MuV F protein (MuV-F) is initially synthesized as an inactive precursor F0, and then activated by the host cell protease furin which cleaves F0 into heterodimers F1 and F2. Efficient membrane fusion and MuV-F processing were observed in HEK293 and Vero cells, but not in the cell line X and furin-deficient LoVo cells, upon expression of the HN and F proteins. Co-transfection of the furin-expressing plasmid restored membrane fusion in LoVo cells, but not in the cell line X, indicating that furin alone is not sufficient for the cleavage of MuV-F. By the cDNA library screening, we identified the proteins that confer on the cell line X the ability to cleave MuV-F and cause membrane fusion. These proteins may play an important role in the MuV-F processing.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ムンプスウイルス 膜融合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

流行性耳下腺炎(おたふくかぜ、ムンプス)は、パラミクソウイルス科に属するムンプスウイルスの感染により起こる。本ウイルスには予防のための生ワクチンが存在するが、ワクチンで副反応が起こることがあるため、わが国では任意接種になっている。そのため、ワクチン接種率は低く、毎年数十万人の患者が出ている。ムンプスウイルスは、耳下腺をはじめとする唾液腺、精巣、卵巣、乳腺、膵臓などの腺組織を主な標的とする。また、中枢神経系に感染し、髄膜炎、脳炎、難聴を起こす。入院加療を要する髄膜炎の合併は特に重要で、流行性耳下腺炎と診断された患者全体の1~2%が発症する。また、難聴は患者の0.1~1%にみられ、わが国で年間700~2,300人が発症していると推定されている。このように、ムンプスウイルス感染症は、今なお医学上重要な問題である。

多くのパラミクソウイルスは、細胞上の糖鎖末端に普遍的に存在するシアル酸を受容体として細胞に感染することが知られており、呼吸器を主な標的としている。一方、パラミクソウイルスの中にも麻疹ウイルスのように、蛋白質受容体であるSLAM(CD150)あるいは細胞接着分子nectin 4を介して、SLAMを発現する免疫細胞、nectin 4を発現する上皮細胞に感染するものもある。ムンプスウイルスは、他のパラミクソウイルス同様、その受容体はシアル酸とされているが、なぜ腺組織や神経系にトロピズム(細胞・組織特異性)を示すか明らかではない。

2. 研究の目的

我々は、ムンプスウイルスに対する受容体はシアル酸単体ではなく、2,3結合型のシアル酸-ガラクトース-グルコース(N-アセチルグルコサミン)で構成される3糖構造が、受容体のコア構造として機能していることを最近明らかにした(、)。したがって、この3糖を含む特異的な糖鎖構造が腺組織や神経系に存在し、それをムンプスウイルスが認識しているという可能性が考えられる。一方、ムンプスウイルスの感染には、糖鎖だけでなく何らかの蛋白質が関与しており、その発現の有無が標的臓器や細胞を決定しているということも考えられる。

ムンプスウイルスを含むパラミクソウイルスは、ウイルスのエンベロープと細胞膜の膜融合により標的細胞内に侵入する。また、受容体を持つ細胞に感染すると細胞融合を起こす。様々な培養細胞をスクリーニングしたところ、ムンプスウイルスによる膜融合に関わっている2つのエンベロープ蛋白質(受容体と結合するHN蛋白質と、膜融合能をもつF蛋白質)の発現によって細胞融合を起こさないヒト“細胞株X”が見つかった。この細胞は、シアル酸を受容体とする他のパラミクソウイルスのHN蛋白質とF蛋白質を発現させると細胞融合を起こした。また、2,3結合型シアル酸は細胞表面に発現していた。“細胞株X”の親細胞は、ムンプスウイルスのHN蛋白質とF蛋白質の発現によって細胞融合を起こした。

これらのことから、ムンプスウイルスの感染には、2,3結合型シアル酸を含む糖鎖に加えて、何らかの蛋白質が関与しており、“細胞株X”にはそれが欠損しているという仮説を立てた。この“細胞株X”で欠損している機能を明らかにすることを通して、ムンプスウイルスの特徴的なトロピズムの分子基盤を解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

ムンプスウイルスによる膜融合に関わる宿主蛋白質を同定するために、ムンプスウイルス感受性のVero細胞のcDNAライブラリーを作製した。cDNAプールを、非感受性の“細胞株X”に導入し、それに緑色蛍光蛋白質(GFP)を発現する組み換えムンプスウイルスを感染させ、GFP陽性の融合細胞の形成を指標に発現クローニングを行った。陽性のcDNAプールに含まれるcDNA

の数を減らしスクリーニングを繰り返すことにより、最終的に単一の cDNA を同定した。同定された遺伝子にコードされている蛋白質について、培養細胞への遺伝子導入による膜融合の誘導、ウイルス蛋白質との結合を解析した。

4 . 研究成果

ムンプスウイルスのF蛋白質は、Foと呼ばれる前駆体として合成された後、宿主細胞内に存在するプロテアーゼ furin の働きで F1、F2 という二つのサブユニットに開裂されることにより膜融合能を発揮できるようになる。HN蛋白質とF蛋白質の発現によって膜融合を起こさないヒト “細胞株X” では、膜融合に必要なF蛋白質の開裂がほとんど起こっていなかった。しかし、furin の発現や活性に異常はなく、同じく furin によって開裂される麻疹ウイルスや他のパラミクソウイルスのF蛋白質は “細胞株X” でも開裂が起こった。一方、furin 欠損細胞株 (LoVo細胞) では、F蛋白質の開裂や膜融合は起こらなかったが、furin 遺伝子を導入することで開裂や膜融合が起こるようになった。しかし、“細胞株X” では、furin 遺伝子を導入しても開裂や膜融合は認められなかった。したがって、ムンプスウイルスのF蛋白質開裂には、furin に加え、“細胞株X” で欠失している他の宿主因子が必要と考えられた。

F蛋白質の開裂に必要なこの宿主因子を明らかにするために、膜融合とF蛋白質開裂が起こる Vero細胞のcDNAライブラリーを作製し、HN蛋白質とF蛋白質の発現で “細胞株X” に融合を誘導できる遺伝子を発現クローニングにより同定した。この遺伝子がコードする蛋白質は、構造と機能が類似したファミリーを形成しており、それらのメンバーはいずれも “細胞株X” においてF蛋白質開裂と膜融合を可能にした。また、これらの蛋白質は、共免疫沈降実験でF蛋白質と相互作用できることが示された。さらに、多くの細胞株では、HNおよびF遺伝子の導入やムンプスウイルス感染で、発現が増加するのに対し、“細胞株X” では元々の発現が低い上に誘導もほとんど起こらなかった。

以上の結果は、これらの蛋白質の発現が、ムンプスウイルス F蛋白質が furin によって開裂されるために必要であることを示している。様々な細胞種におけるこれらの蛋白質の発現および発現調節や、どのようなメカニズムで furin によるF蛋白質の開裂を可能にしているかについては今後さらに研究が必要である。この宿主蛋白質は、ムンプスウイルスの特徴的なトロピズムに関わっている可能性があるとともに、抗ウイルス薬の標的になるかもしれない。

< 引用文献 >

Kubota M, Takeuchi K, Watanabe S, Ohno S, Matsuoka R, Kohda D, Nakakita S, Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Shiroishi M, Yanagi Y, Hashiguchi T. Trisaccharide containing 2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113:11579-11584, 2016.

Kubota M, Matsuoka R, Suzuki T, Yonekura K, Yanagi Y, Hashiguchi T. Molecular mechanism of the flexible glycan-receptor recognition by mumps virus. *J Virol*. 93: pii: e00344-19, 2019.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Ayako Ueo, Marie Kubota, Shinji Ohno, Takao Hashiguchi, Yusuke Yanagi. Identification of host factors supporting mumps virus entry and membrane fusion, 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/virus/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：橋口 隆生

ローマ字氏名：Hashiguchi, takao

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。