

麻疹ウイルス細胞融合に関与する遺伝子領域

星 明 祥¹⁾²⁾ 中 山 哲 夫²⁾¹⁾東京医科大学小児科学講座²⁾北里生命科学研究所ウイルス感染制御 I

【要旨と結論】 最近の麻疹ウイルス野生株は B95a 細胞で細胞融合を示すが、Vero 細胞では細胞融合を認めないことが知られている。しかし Edmonston (Edm) 株や昔の分離株は B95a 細胞と Vero 細胞の両方に細胞融合を認める。こうした細胞親和性の差が麻疹ウイルスのどの蛋白領域に起因するかを明らかにすることを目的とし、最近分離株である MVi/Tokyo.JPN/87-K (87-K) 及び MVi/Tokyo.JPN/99-Y (99-Y) と Edm 株を用い、Hemagglutinin (H) 蛋白と Fusion (F) 蛋白の発現実験を行った。その結果、麻疹ウイルス細胞融合能の差は H 蛋白に依存することが明らかとなり、Edm 株と最近分離株 (87-K 及び 99-Y) の H 蛋白キメラプラスミドによる発現実験の結果から、H 蛋白の 481 アミノ酸位がチロシン (Y) であることが Vero 細胞における細胞融合に必要なことが判明した。またその前半の領域 390 と 416 アミノ酸位が共にアスパラギン (N) になると、Vero 細胞における細胞融合が減弱することが推定された。

はじめに

麻疹は、全世界でいまなお流行を続け、年間約 3,300 万人が麻疹に罹患し、約 88 万人は麻疹に関連して死亡していると推察されている。その死因の大部分は脱水や二次感染によるものと考えられているが、重篤な合併症を引き起こすことでも知られている。主な合併症として、肺炎 (間質性肺炎、巨細胞性肺炎)、胃腸炎、クループ、細気管支炎、心筋炎、脳炎などがある。脳炎は、1,000 人から 2,000 人に 1 人発症するといわれている。また麻疹ウイルスは持続感染することが知られており、自然麻疹罹患数年後に人格変化、ミオクローニー発作を伴い進行性の中樞神経病変を起こす亜急性硬化性汎脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis; SSPE) を 100 万人中 8.5 人の割合で発症する可能性がある。そして麻疹の治療に特異的なものはなく、対症療法が中心となる。輸液、抗生剤投与等を満足に行えない低開発国における麻疹の流行は、特にその乳幼児において脅威である。そのため、生ワクチンの世界的な普及は重要な課題となっている。またこれまで、

麻疹に罹患すると終生免疫を獲得するといわれてきたが、孤島や頻りに流行を繰り返さない地域では Booster 効果が得られず、その血中抗体価は減少するとの報告がある。最近では麻疹ワクチンを接種していても免疫能が低下し、麻疹に罹患する Secondary vaccine failure が問題となっている。その原因は個体の免疫能の減衰と考えられるが、ウイルス側の因子も考慮する必要がある¹⁾²⁾。

麻疹ウイルスは一本鎖 negative sense RNA ウイルスで、パラミキソウイルス科のなかのモルビリウイルス属の一つであり、6 種類の構造蛋白 N: nucleocapsid, P: phosphoprotein, M: matrix, F: fusion (F 蛋白)、H: hemagglutinin (H 蛋白)、L: polymerase と少なくとも 2 種類の非構造蛋白 C, V で構成される³⁾。

麻疹ウイルスはエンベロープを有し、そのウイルス粒子表面には H 蛋白と F 蛋白がスパイク状に並んでいる。H 蛋白は CD46 や最近発見された麻疹ウイルスレセプターである signaling lymphocyte-activation molecule (SLAM) に結合し、H 蛋白に隣接する F 蛋白との共働作用により、F 蛋白の fusion domain を細

2002 年 11 月 29 日受付、2003 年 1 月 16 日受理

キーワード: 麻疹ウイルス、H 蛋白、細胞融合、Vero 細胞、B95a 細胞

(別刷請求先: 〒193-0998 東京都八王子市館町 1163 番地 東京医科大学八王子医療センター 星 明祥)

胞の脂質二重膜に結合させ細胞融合を起こしウイルス粒子内の Ribonucleocapsid (RNP) が細胞内に流入しウイルス遺伝子の複製、転写、翻訳が始まり、ウイルスの感染が始まる。Polymerase 活性は L 蛋白に存在し、N、P 蛋白と結合しウイルスの転写、複製を開始する。N 蛋白は genome RNA を取り巻き安定化させている²⁾。麻疹ウイルスが細胞に感染する際には、細胞レセプターに結合し細胞融合を起こすことが一番重要な step である。

麻疹ウイルス Edmonston 株 (Edm 株と略す) は 1954 年に世界で最初にヒト腎臓細胞から分離され、アフリカミドリザル赤血球へ結合することができ、Vero 細胞と B95a 細胞の両方において細胞融合を形成することが可能である。しかし最近の麻疹ウイルス分離株は B95a 細胞で細胞融合を示すが、Vero 細胞では細胞融合を認めない。この Edm 株と最近の分離株の細胞親和性の差に関し、細胞レセプターへの附着部位である H 蛋白の活性部位を明らかにするために、Edm 株と最近流行株から H、F 蛋白発現プラスミドを構築し発現実験を行った。

材料及び方法

1. 麻疹ウイルス株

Enders 先生から分与された野生株 Edmonston (Edm) 株と Edm 株を弱毒化したワクチン株 AIK-C を用いた⁴⁾。最近流行株として 1987 年に日本で分離された MVi/Tokyo.JPN/87-K (87-K と略す) と、同じく国際分類 D3 に属する 1999 年に日本の麻疹脳炎の患児から分離された MVi/Tokyo.JPN/99-Y (99-Y と略す) を用いた。

2. 発現プラスミドの構築と塩基配列の同定

麻疹ウイルス RNA を培養液から抽出し、F 蛋白と H 蛋白領域を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) によりそれぞれ増幅した。プライマーは F 蛋白領域には F-ATG (5'-CATGAATT-CATGGGTCTCAAGGTGAACGT) と F-TGA (5'-TTAGCGGCCGCTCAGAGCGACCTTACA-TAG)、H 蛋白領域には H-ATG (5'-GTTGAATTCA-TGTCACCA CAACGAGACCGGA) と H-TAG (5'-AATGCGGCCGCTATCTGCGATTGGTTCCA) を使用した。制限酵素 *Eco* RI と *Not* I の切断部位をアンダーラインで示した⁵⁾。F および H 蛋白の翻訳領域を *Eco* RI と *Not* I の multicloning site をもつ pBluescript II SK(BSSK) (-) ベクターの T7 promoter

の下流に挿入し、発現プラスミドを構築した。

AIK-C 株から F 及び H 蛋白発現プラスミド pAIK-F, pAIK-H を構築し、Edmonston 株由来のものは、pEdm-F、pEdm-H と命名した。87-K と 99-Y から p87K-F、p87K-H、p99Y-F、p99Y-H を構築した。構築した発現プラスミドは ABI 377 sequencer (ABI PRISM, Perkin-Elmer Corp., Tokyo) を用い、dye terminator 法によって塩基配列を調べた。

3. 麻疹ウイルス H 蛋白キメラプラスミドの構築

Edmonston 株と 87-K の H 蛋白翻訳領域を共通の切断部位を利用し、制限酵素 *Nde* I と *Ppu*MI を用い遺伝子を組み換え、キメラプラスミドを構築した。*Nde* I で塩基番号 811 位を、*Ppu*MI で塩基番号 1007 と 1682 位を切断した。更に 1007 から 1682 までの領域を細かく組み換えるため制限酵素 *Hae* III で 1295 位を組み換え、キメラプラスミドを構築した。

Edmonston 株と 99-Y も同様に *Ppu*MI を用いキメラプラスミドを構築し、更に *Eco*81 I で 1388 位を組み換え、キメラプラスミドを構築した。

4. 発現プラスミドの共発現による細胞融合分析

構築したプラスミドは B. Moss 先生から寄与して頂いた vaccinia virus T7 expression system により発現した⁶⁾。B95a 細胞の単層培養に T7 RNA polymerase を発現する recombinant vaccinia virus v-TF7-3 を multiplicity of infection (m.o.i.)=1 で感染させ、HeLa 細胞には m.o.i.=0.25 で感染させた。Vero 細胞には T7 RNA polymerase (MVAT7 pol) を発現する replication deficient vaccinia virus を m.o.i. 10 で感染させた⁷⁾。そしてそれらの細胞は 24 穴プレート上で 37°C で 1 時間培養させた。その後 Opti-MEM (GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, NY) により洗浄した。

F 蛋白発現パートナーを pEdm-F で固定し、各 H 蛋白発現プラスミドを B95a 細胞と Vero 細胞には SuperFect (QIAGEN, Germany) を用い、HeLa 細胞には DMRIE-C Reagents (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) を用い、それぞれ 1 穴あたり 0.2 μ g の発現プラスミドを transfection させた。一晚培養した後、細胞を 0.5% glutaraldehyde で固定し、ギムザ染色を行った。

5. 免疫蛍光染色による分析

Vero 細胞を Lab-Tek 8 well chamber slide (Nalge Nunc International, IL) に培養し、F と H 発現プラスミドを co-transfection させた後、それらの細胞をアセトン固定した。これをマウスで作製した抗麻疹 H 蛋白

に対するモノクローナル抗体と反応させた後、FITCでラベルした抗マウス IgG モノクローナル抗体 (SIGMA, Steinheim, Germany) を反応させ、蛍光顕微鏡下で観察した。

6. 細胞融合指数の測定

細胞融合の数値化のための指示細胞として、24穴プレートに培養した 5×10^5 の Vero 細胞に、T7RNA ポリメラーゼのコントロール下に β -galactosidase を発現するプラスミド (pGE β gal) のみを transfection させ、一晚、培養後、トリプシンでプレートから剥がし、燐酸緩衝液 (PBS) で2回洗浄後 $1 \times 10^6/0.3$ ml に調整した。F, H 発現プラスミドを co-transfection させた Vero 細胞に指示細胞を添加した。更に培養を続けることにより、指示細胞との細胞融合が出現し、 β -galactosidase が発現される。 β -galactosidase 活性は基質として 4MU- β -galactosidase を用いた蛍光 ELISA 法により測定した⁸⁾。指示細胞を添加後、4時間培養を続けた後に細胞を洗浄し 200 μ l の 0.05% NonidetP-40 を含んだ PBS で溶解した。20 μ l の細胞融解液を 0.2 mM4-methylumbelliferyl- β -galactoside (Sigma Chemicals, StLouis, MO) 80 μ l と混合させ、37°C 30分で反応させた後、酵素反応を止めるため 0.1 mM Glycine Buffer (pH9.6) を 100 ml 添加した後、蛍光 ELISA リーダーで蛍光強度を測定した。Negative control として、発現プラスミドの挿入されていない BSSK (-) を transfection 後、 β -galactosidase 指示細胞を加えた control well の細胞溶解液の蛍光強度に対する比率で細胞融合指数を示した。

7. Hemadsorption (HA) 活性

H 蛋白発現プラスミドを F 発現プラスミドと共に transfection させ、一晚培養後、燐酸緩衝液で洗浄後に 0.5% アフリカミドリザル赤血球を添加し、4°C に静置し、1時間後に洗浄し、顕微鏡で赤血球吸着を観察した。

結 果

1. ウイルス粒子および発現実験による細胞融合、Hemadsorption (HA) 活性

Edm 株と最近分離株 MVi/Tokyo. JPN/87-K、MVi/Tokyo. JPN/99-Y のウイルス粒子を Vero 細胞、B95a 細胞、HeLa 細胞に感染させ細胞融合、HA 活性を観察し、結果をまとめ Table 1 に示した。Edm 株は B95a 細胞と Vero 細胞の両方で細胞融合を呈した。一方、最近分離株の 2 種は B95a 細胞で細胞融合を認め

Table 1 Comparison of cell fusion and hemagglutination activity of Edmonston, 87-K, 99-Y strains

	細胞融合			HA 活性
	B95a	Vero	HeLa	
Edm	+	+	-	+
87-K	+	-	-	-
99-Y	+	-	-	-

たが、Vero 細胞では細胞融合を認めず、HA 活性も検出できなかった。次に、発現プラスミド pEdm-H、pEdm-F、p87K-H、p87K-F を用い、4種類の組み合わせで H 蛋白と F 蛋白を Vero 細胞に co-transfection し、細胞融合を観察した。その結果 pEdm-H を用いた組み合わせだけが Vero 細胞で細胞融合を示した。この結果から麻疹ウイルスの細胞融合能は H 蛋白に依存することが明らかとなった。

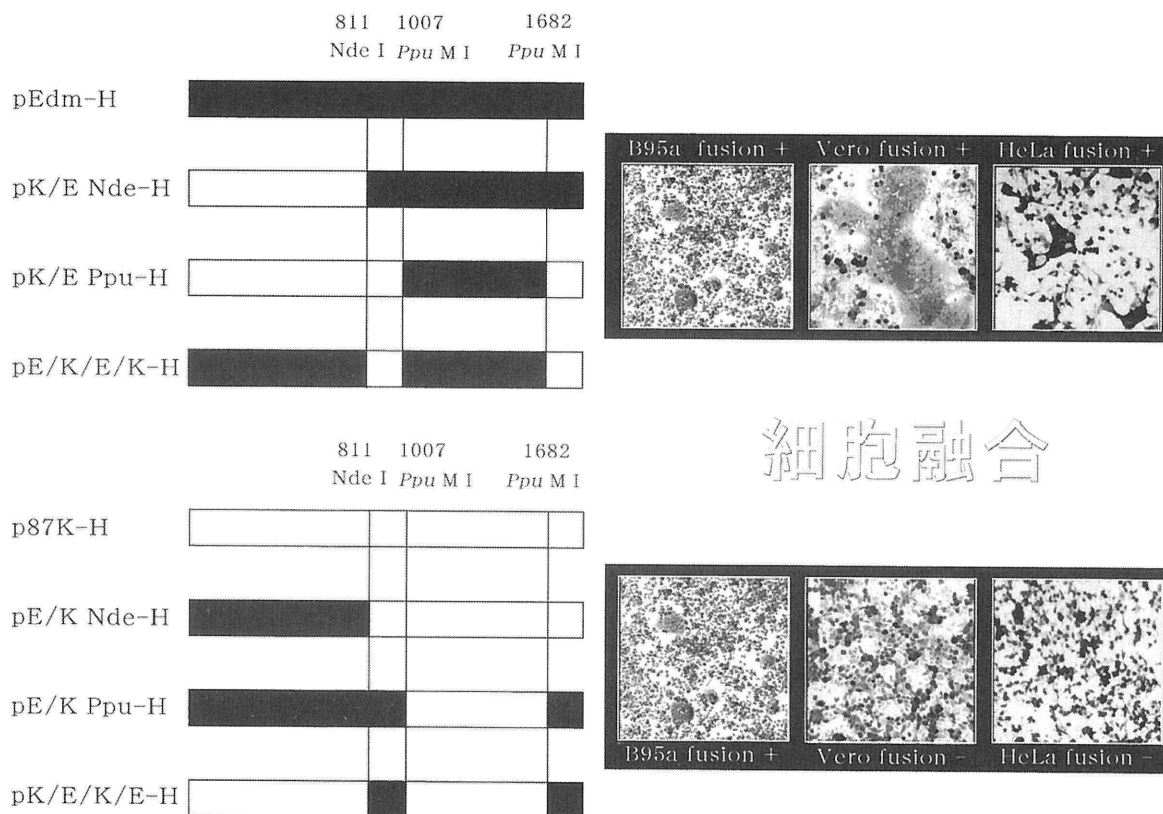
2. Edm 株と 87-K の H 蛋白キメラプラスミドによる細胞融合

pEdm-H と p87K-H を Nde I site (811 位) で組み換え、pE/K Nde-H、pK/E Nde-H を、PpuM I site (1007/1682 位) で組み換え、pE/K Ppu-H、pK/E Ppu-H を作製した。更に、pE/K Nde-H と pEdm-H を PpuM I site (1007/1682 位) で組み換え pE/K/E/K-H を、pK/E Nde-H と p87K-H を PpuM I site (1007/1682 位) で組み換え pK/E/K/E-H を作製した。pEdm-H、p87K-H と合計 6 種類のキメラプラスミドを B95a 細胞、Vero 細胞、HeLa 細胞に transfection させ、細胞融合を観察し結果を Fig. 1 に示した。

上段に B95a 細胞、Vero 細胞、HeLa 細胞で細胞融合を呈した 4 種類のプラスミドを示した。上段のプラスミドに共通する H 蛋白翻訳領域は 1007 から 1682 塩基番号までが Edm 株であることが判明した。下段には B95a 細胞でしか細胞融合を呈さないプラスミドを示した。下段のプラスミドに共通する H 蛋白翻訳領域は 1007 から 1682 塩基番号までが 87-K に関連するプラスミドであった。

3. Vero 細胞における細胞融合の細胞融合指数による定量化

1007 から 1682 塩基番号までの H 蛋白翻訳領域を Hae III site (1295 位) で更に細かく組み換え、4種類のキメラプラスミドを作製し、発現実験を行った。右側に β -galactosidase 活性を測定し細胞融合指数を示した (Fig. 2)。pEdm-H の細胞融合指数は 1.82 であ



細胞融合

Fig. 1 Fusion of chimera plasmids in B95a, Vero, and HeLa cells. The plate was stained with Giemsa solution and visualized with an Olympus microscope. All panels are at $\times 80$. Upper panels showed the plasmids which induced cell fusion in B95a, Vero, and HeLa cells. Lower panels showed the plasmids which induced cell fusion in B95a cells.

り、これに相当する細胞融合指数を呈したものは、pK/E 1295-1682-H の 1.89 であった。Edm 株の 1295 から 1682 塩基番号までの H 蛋白翻訳領域が Vero 細胞における細胞融合に関係していることが明らかとなった。また pE/K 1007-1295-H は、pEdm-H の 1007 から 1295 塩基番号の部分だけを p87K-H に置き換えたものであるが、細胞融合指数は 1.46 であった。この値は pEdm-H と p87K-H の中間の値であることから、87-K の 1007 から 1295 塩基番号までの H 蛋白翻訳領域は細胞融合を減弱させることが推定された (Fig. 2)。Fig. 2 で示した 4 種類のキメラプラスミドを B95a 細胞と Vero 細胞に pEdm-F と co-transfection させ、ギムザ染色した結果を Fig. 3 に示した。上段に Vero 細胞での細胞融合を、下段に B95a 細胞での細胞融合を示した。B95a 細胞では全てのプラスミドで細胞融合を示し、Vero 細胞では pK/E 1295-1682-H で顕著な細胞融合を示したが、pE/K 1007-1295-H の細胞融合はギムザ染色では明らかではなかった。

4. 免疫蛍光染色による麻疹 H 蛋白発現と Vero 細胞における細胞融合

各発現プラスミドを pEdm-F と co-transfection し、抗

マウス IgG モノクローナル抗体で免疫蛍光染色により H 蛋白が Vero 細胞膜上に十分に発現しているかを確認した (Fig. 4)。pEdm-H では大きな細胞融合を示し、個々の Vero 細胞に十分な H 蛋白を発現していた。一方 p87K-H は個々の Vero 細胞に H 蛋白の発現がみられたが細胞融合を認めなかった。下段の左から 4 番目に示した pK/E 1295-1682-H で pEdm-H と同等の細胞融合と、H 蛋白の発現が確認できた。また下段の左から 2 番目に示した pE/K 1007-1295-H は Fig. 3 では明らかな細胞融合を示さなかったが、数個の細胞融合を示し H 蛋白も発現していた。pE/K 1295-1682-H と pK/E 1007-1295-H は p87K-H と同様 H 蛋白は発現されているものの、細胞融合を認めなかった (Fig. 4)。

5. HA 活性の光学顕微鏡による確認

Fig. 2 に示した麻疹 H 蛋白発現プラスミドを使用し、Fig. 3 と同様に pEdm-F と Vero 細胞に co-transfection し、アフリカミドリザル赤血球にて HA 活性を観察した。いままでの実験と同様に下段の左から 3 番目の pK/E 1295-1682-H で pEdm-H と同等の細胞融合がみられ、融合細胞に HA 活性を認めた。また下段

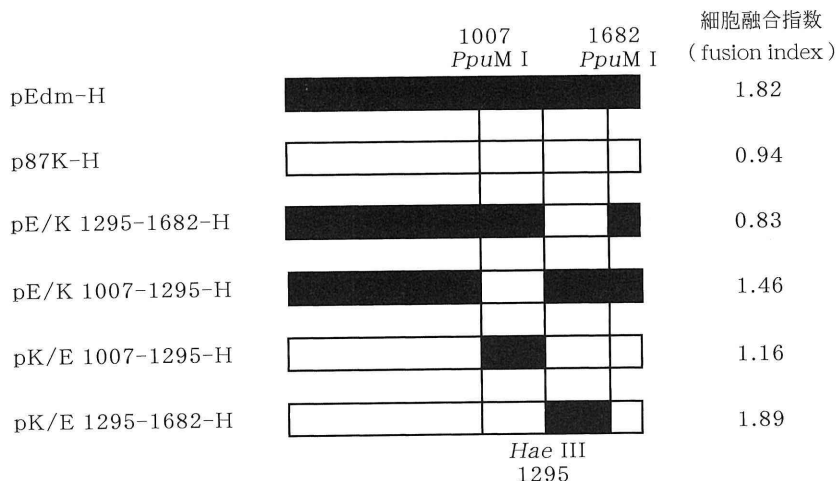


Fig. 2 The construction of the chimera plasmids and fusion index. Closed bars represent the plasmid of Edmonston strain and its regions.

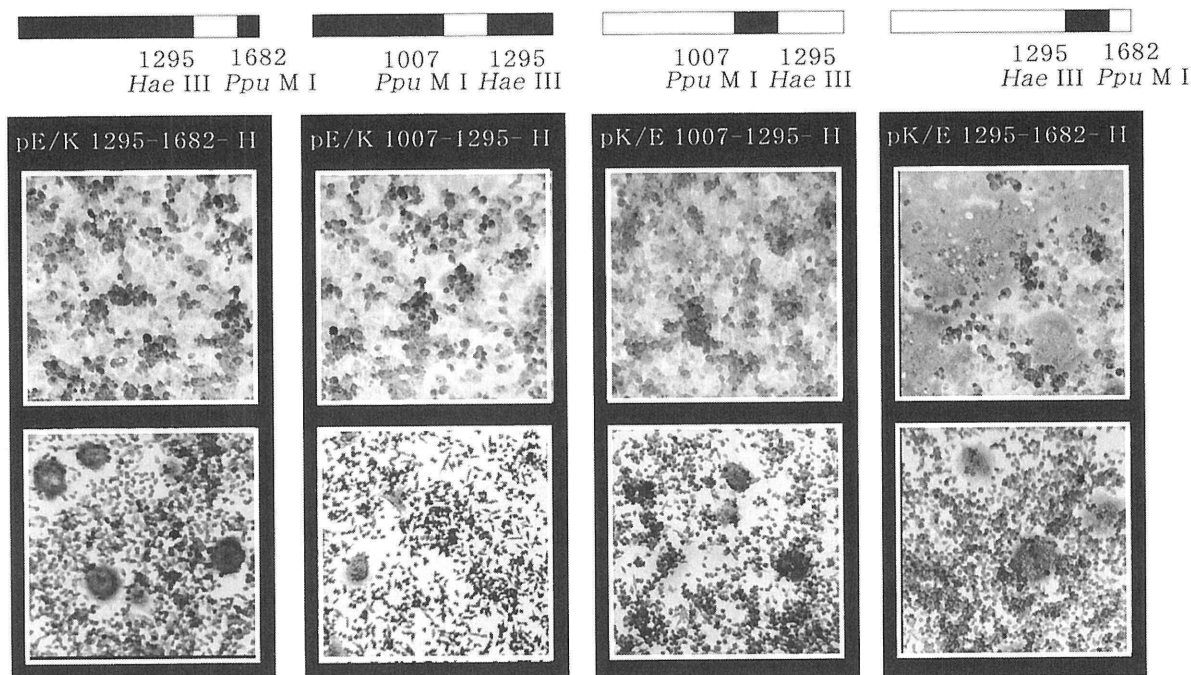


Fig. 3 Cell fusion by the different chimera plasmids. Upper panels show the results of transfection experiments in Vero cells and lower panels show those in B95a cells.

の左から 1 番目の pE/K 1007-1295-H で小さな細胞融合がみられ、融合細胞にわずかな HA 活性を認めた。HA 活性は細胞融合に相関する結果となった。p87K-H、pE/K 1295-1682-H、pK/E 1007-1295-H では細胞融合はみられず、HA 活性も認めなかった (Fig. 5)。

6. Edm 株と 99-Y の H 蛋白キメラプラスミドによる細胞融合

p87K-H と数カ所アミノ酸配列の異なる p99Y-H と pEdm-H を用い、*Ppu M I* site (1007/1682 位) で組

み換え、pE/Y *Ppu*-H、pY/E *Ppu*-H を作製した。更に、H 蛋白の 1007 から 1682 位までの領域の中で Vero 細胞における細胞融合に関与する領域を特定するため、*Eco*81 I site (1388 位) で組み換え、4 種類の H 蛋白キメラプラスミド pE/Y 1007-1388-H、pE/Y 1388-1682-H、pY/E 1007-1388-H、pY/E 1388-1682-H を作製した (Fig. 6)。Fig. 3 に示した実験と同様に、Fig. 6 に示したプラスミドを Vero 細胞に pEdm-F と co-transfection した。pY/E *Ppu*-H と pY/E 1388-1682-H が pEdm-H と同様に大きな細胞融合を呈した

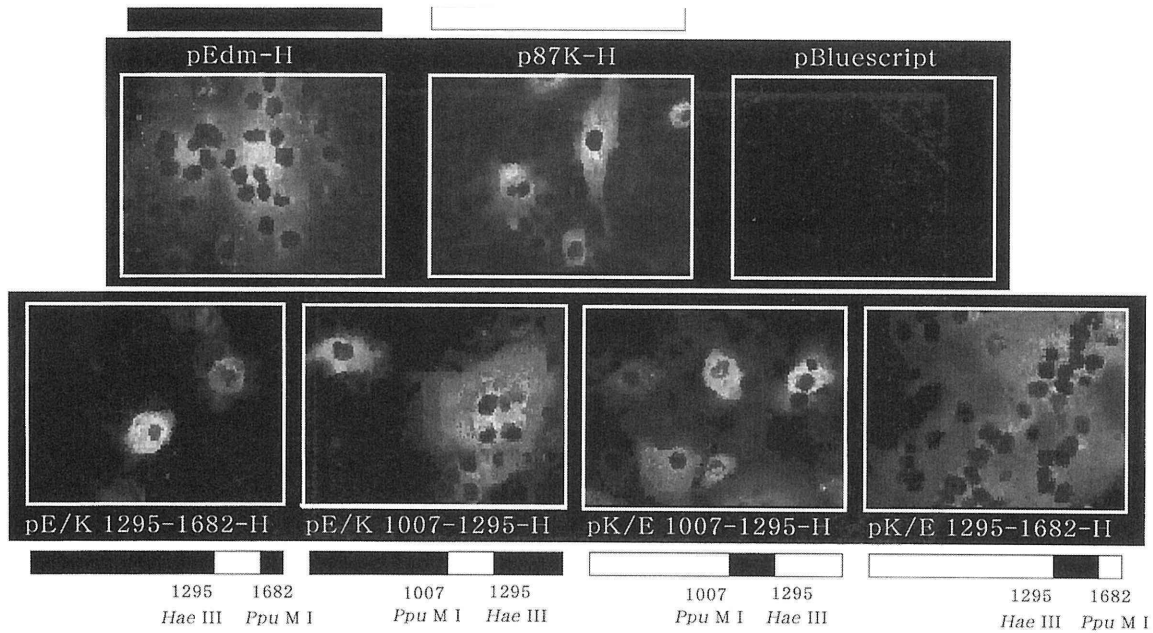


Fig. 4 Immunofluorescent assay of the expression of the H and F proteins in Vero cells. These were stained with FITC-conjugated monoclonal antibody against mouse IgG. As a negative control for mock transfection, pBluescript II SK- was transfected after Vero cells were infected with recombinant vaccinia virus. Fluorescent-labeled cells were visualized with a Zeiss Fluoro-Microscope.

HA 活性

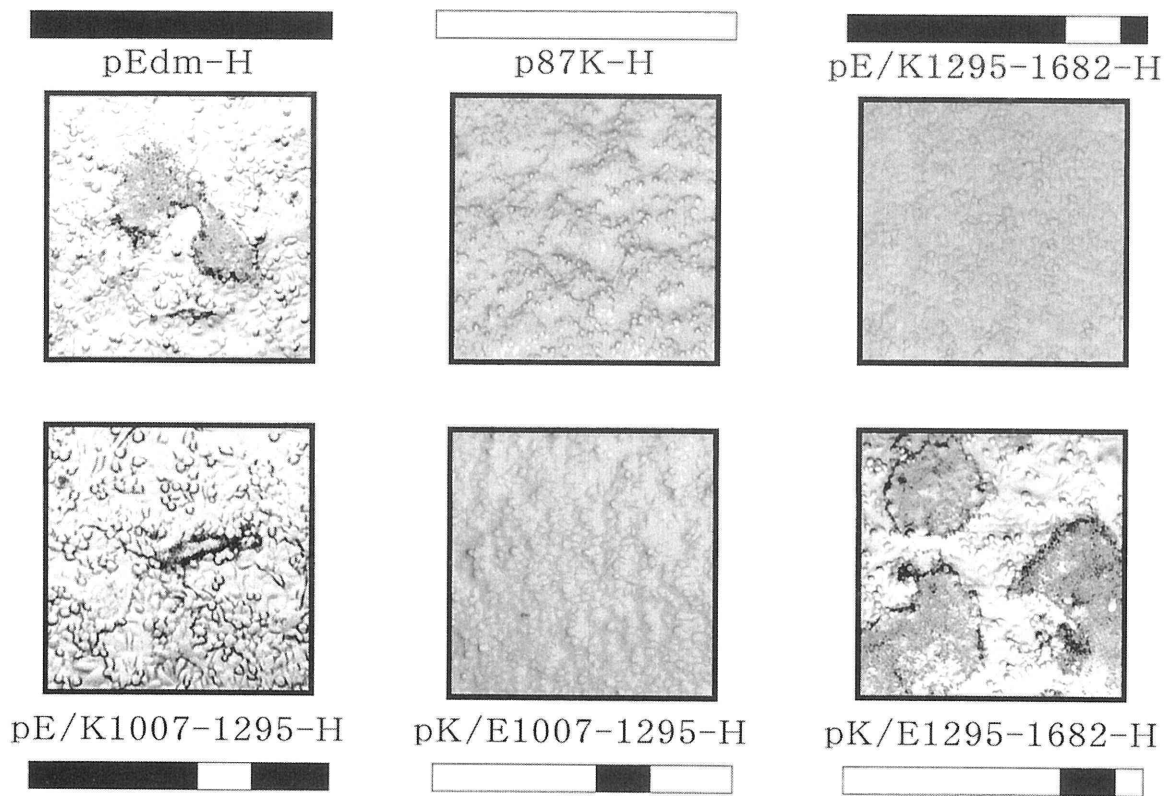


Fig. 5 Hemadsorption (HA) activity in Vero cells.

(Fig. 7)。Edm 株の 1388 から 1682 塩基番号までの H 蛋白翻訳領域が Vero 細胞における細胞融合に関係していることが判明した。下段の左から 1 番目に示した pE/Y 1007-1388-H では小さく細胞融合が観察され、99-Y の 1007 から 1388 塩基番号までの領域は細胞融

合を修飾することが明らかとなった。

7. Edm 株、87-K、99-Y の H 蛋白アミノ酸配列

各 H 蛋白アミノ酸配列をワクチン株 AIK-C のアミノ酸配列と比較し、異なる部位のアミノ酸を Fig. 8 に示した。上段に示した様に AIK-C は Edm 株由来のワクチン株であり、AIK-C と Edm 株のアミノ酸変異は H 蛋白全領域で 5 箇所しか存在しなかった。そして今回の発現実験から明らかとなった Vero 細胞における細胞融合に関する領域を黒枠で囲った。Edm 株と 87-K の組み換えキメラプラスミドによる発現実験から塩基番号 1295 から 1682 位まで (アミノ酸番号 432 から 561 位まで) の Edm 領域が Vero 細胞における細胞融合に関与する領域であることが明らかとなった。この領域には、Fig. 8 の中段に示した様に AIK-C と比較すると 3 箇所のアミノ酸変異 446 (S: セリン → T: スレオニン)、481 (Y: チロシン → N: アスパラギン)、484 (N: アスパラギン → T: スレオニン) が存在した。逆に Vero 細胞における細胞融合を減弱すると推定された領域は塩基番号 1007 から 1295 位まで (アミノ酸番号 337 から 432 位まで) の 87-K 領域であり、この領域には 4 箇所のアミノ酸変異 338 (T: ス

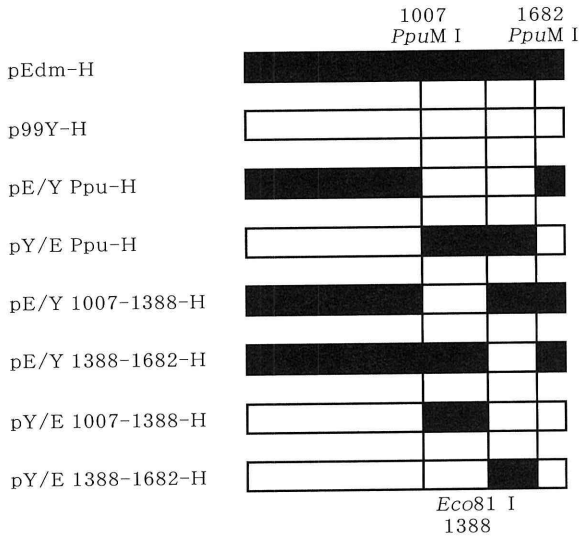


Fig. 6 The construction of the chimera plasmids from Edm strain and 99-Y. PpuM I sites and the Eco81 I site in the H gene were used.

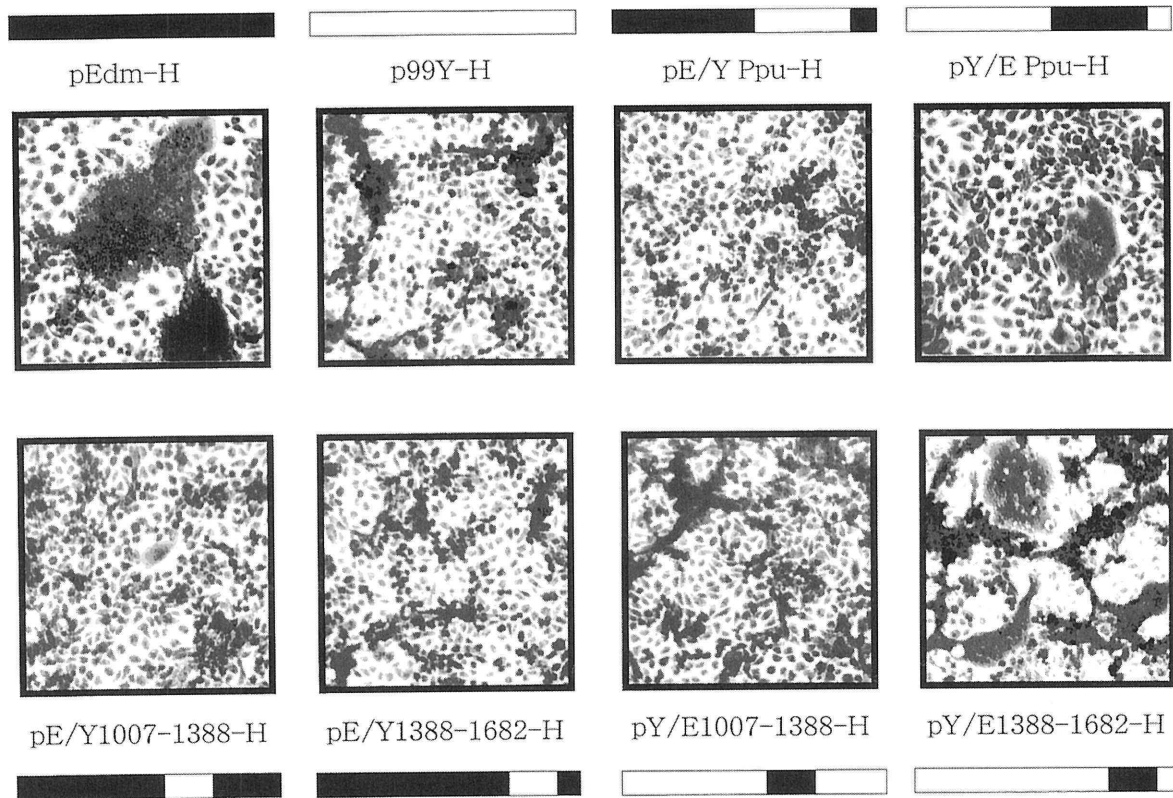


Fig. 7 Fusion inducibility of the chimera plasmids in Vero cells. The plate was stained with Giemsa solution and visualized with an Olympus microscope. All panels are at ×80.

	塩基番号	1007	1295	1388	1682
	アミノ酸番号	337	432	463	561
AIK-C		R ³⁰²	T ³³⁸ D ³⁷⁴		NE ⁴⁸⁴ NE ⁴⁹²
Edm		G	P N		TG
AIK-C		T ¹⁷⁴ T ¹⁷⁶ G ²¹¹ E ²³⁵ R ²⁴³ Y ²⁵² L ²⁷⁸ L ²⁸⁴ L ²⁹⁶	Q ³³⁴ T ³³⁸	K ³⁸⁹ I ³⁹⁰ D ⁴¹⁶ S ⁴⁴⁶	Y ⁴⁸¹ N ⁴⁸⁴
87-K		A A S G G H F F F	R P	R N N T	N T
AIK-C		T ¹⁷⁴ T ¹⁷⁶ G ²¹¹ E ²³⁵ R ²⁴³ Y ²⁵² L ²⁷⁸ L ²⁸⁴ L ²⁹⁶ I ³⁰⁶ I ³⁰⁸	T ³³⁸ F ³⁸² I ³⁹⁰ D ⁴¹⁶ S ⁴⁴⁶ N ⁴⁴⁹	S ⁴⁴⁶ N ⁴⁴⁹	Y ⁴⁸¹ N ⁴⁸⁴
99-Y		A A S G G H F F R F V V	P L N N	T D	N T

Fig. 8 Difference in the deduced amino acid of the H protein of Edm strain, 87-K and 99-Y. These were compared with those of AIK-C.

レオニン→P: プロリン)、389 (K: リシン→R: アルギニン)、390 (I: イソロイシン→N: アスパラギン)、416 (D: アスパラギン酸→N: アスパラギン) が存在した。

Edm 株と 99-Y の組み換えキメラプラスミドによる発現実験から塩基番号 1388 から 1682 位まで (アミノ酸番号 463 から 561 位まで) の領域が Vero 細胞における細胞融合に関与する領域であることが明らかとなった。この領域には、Fig. 8 の下段に示した様に AIK-C と比較すると 2 箇所のアミノ酸変異 481 (Y: チロシン→N: アスパラギン)、484 (N: アスパラギン→T: スレオニン) が存在した。逆に Vero 細胞における細胞融合を減弱すると推定された領域は塩基番号 1007 から 1388 位まで (アミノ酸番号 337 から 463 位まで) の 99-Y 領域であり、この領域には 6 箇所のアミノ酸変異 338 (T: スレオニン→P: プロリン)、382 (F: フェニルアラニン→L: ロイシン)、390 (I: イソロイシン→N: アスパラギン)、416 (D: アスパラギン酸→N: アスパラギン)、446 (S: セリン→T: スレオニン)、449 (N: アスパラギン→D: アスパラギン酸) が存在した。

考 察

麻疹ウイルスの F 蛋白と H 蛋白は共に翻訳され宿主細胞内の reticulum-Golgi network を介した後、宿主細胞膜に transport されエンベロープスパイクを形成する。F 蛋白は麻疹ウイルス感染に特徴的な cytopathic effect (CPE) である巨細胞形成 syncytium formation

と細胞から細胞への感染の拡大 cell-to-cell spread に関与する。巨細胞は細胞融合 fusion によって形成され、蛋白発現実験において H 蛋白は F 蛋白と相互作用を示し、共に細胞融合に必要であることが知られている⁹⁾。そして H 蛋白の細胞融合に対する最も明白な役割は宿主細胞レセプターへの付着 attachment である。

一方、この H 蛋白が結合する細胞の receptor として明白に認識されているものは、CD46 (membrane cofactor protein) である¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。CD46 はヒト補体制御蛋白として上皮細胞に広く分布し¹³⁾、通常は補体 (C3b/C4b) の蛋白溶解作用を不活化する働きをしている¹⁴⁾。また近年 T 細胞及び B 細胞の膜糖蛋白であるヒト SLAM (signaling lymphocyte-activation molecule; CDw150) が Edmonston 株を含めた麻疹ウイルスの新たな宿主細胞レセプターとして発見された。CD46 は Vero 細胞膜上やアフリカミドリザル赤血球上に分布、SLAM は B95a 細胞膜上に分布する⁴⁾。この細胞の major receptor の違いが、麻疹ウイルスの付着、感染、細胞融合などに影響を与えていると考えられる。

今回の実験でその細胞選択性や細胞融合能は H 蛋白に依存することが明らかとなった。H 蛋白は 617 のアミノ酸から成り、多量体を形成し、ウイルス粒子や感染した細胞の膜表面にスパイク状に存在する。H 蛋白のアミノ酸位 1 から 34 までの領域は cytoplasmic domain、35 から 58 位までが transmembrane region、59 から 181 位までが H stalk region と考えられている。

特に CD46 binding region と考えられている 468 から 487 アミノ酸位におけるアミノ酸変異は重要であり様々な報告がある¹⁵⁾。451 アミノ酸がグルタミン酸からバリンへ、481 アミノ酸がアスパラギンからチロシンへ変異すると CD46 が downregulation し、HeLa 細胞で血球吸着と fusion を認めるようになる¹⁶⁾。そして CD46 を major receptor とする細胞に最近分離株を感染させ継代していくと、481 アミノ酸位のアスパラギンがチロシンへ変異することが知られている¹⁷⁾。

H 蛋白キメラプラスミドによる発現実験から麻疹ウイルスの細胞融合に関する領域は 463 から 561 アミノ酸位までであることが判明した。Fig. 8 に示したように今回実験に使用した Vero 細胞で細胞融合を示す Edmonston 株とワクチン株 AIK-C の 481 アミノ酸位はチロシンであった。この周辺領域がウイルスのエンベロープや細胞膜上に発現した場合、外殻に位置することなどからも binding site として重要であると考えられている。484 アミノ酸位は AIK-C がアスパラギンで Edmonston 株がスレオニン、最近流行株もアスパラギンであることから、484 位のアミノ酸は Vero 細胞における細胞融合には重要でないと予測された。492 アミノ酸位は Edmonston 株と AIK-C でアミノ酸が異なるため、この部位も重要な部位ではないと考えられる。

また Fig. 2 に示した H 蛋白キメラプラスミドによる発現実験で、pE/K1007-1295-H の細胞融合指数が、pEdm-H (1.82) と pK/E1295-1682-H (1.89) に比べ 1.46 と低値であった。このプラスミドは 481 アミノ酸位がチロシンであり、Vero 細胞に顕著な細胞融合を示すはずであるが、免疫蛍光染色でも小さな細胞融合しか観察されなかった。我々の実験では、481 アミノ酸位より前半の領域である 337 から 432 アミノ酸位も細胞融合に影響を与えることを明らかにした。Fig. 8 のアミノ酸変異に注目すると、この領域で最近分離された野生株 87-K と 99-Y に共通し、Edmonston 株と AIK-C が持っていないアミノ酸は 390 と 416 位のアスパラギンであった。この 2 箇所のアミノ酸変異は binding site の立体構造に影響し、Vero 細胞での細胞融合を減弱させることが推定された。

特に 416 位のアミノ酸がアスパラギンに変異したことで新たに糖鎖付加部位が出現し、最近分離株の H 蛋白の大きさが変化し HA 活性も減弱することが報告されており¹⁸⁾、pE/K1007-1295-H と pE/Y1007-1388-H のプラスミドは 481 位のアミノ酸がチロシン

にもかかわらず、細胞融合能が低い結果となったのはこの HA 活性、すなわち CD46 結合能の減弱が原因であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えてくださった星加明徳小児科学教授ならびに実験方法をご指導いただいた北里大学北里生命科学研究所ウイルス感染制御学教室の諸兄姉に深く感謝致します。(本論文の要旨は第 41 回臨床ウイルス学会において発表した。)

文 献

- 1) riffin DE, Bellini WJ: Measles virus. In Fields Virology, 3rd Edition. Eds. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Lippincott-Raven, New York: 1267-1312, 1995
- 2) 中山哲夫: Common な小児ウイルス感染症の病態麻疹. 臨床とウイルス **30**: 9-15, 2002
- 3) Wild TF, Buckland R: Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. Measles virus. ter Meulen V, Billeter M A. Springer-Verlag, Berlin, Germany: 51-64, 1995
- 4) Makino S: Development and characteristics of live AIK-C measles vaccine. Review of Infectious Diseases **5**: 504-505, 1983
- 5) Nakayama T, Mori T, Yamaguchi S, Sonoda S, Asamura S, Yamasita R, Takeuchi Y, Urano T: Detection of measles virus genome directly from clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and genetic variability. Virus Research **35**: 1-16, 1995
- 6) Fuerst TR, Niles EG, Studier W, Moss B: Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proceeding of the national academy of science, USA **83**: 8122-8126, 1986
- 7) Sutter G, Ohlmann M, Erfle V: Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. FEBS Letter **371**: 9-12, 1995
- 8) Nussbaum O, Broder CC, Berger EA: Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. J Virol **68**: 5411-5422, 1994
- 9) Wild TF, Fayolle J, Beauverger P, Buckland R: Measles virus fusion. Role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. J Virol **68**: 7546-7548, 1994
- 10) Dorig RE, Marciel A, Chopra A, Richardson CD:

- The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**: 295-305, 1993
- 11) Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F: Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**: 6025-6032, 1993
 - 12) Nussbaum O, Broder CC, Moss B: Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. *J Virol* **69**: 3341-3349, 1995
 - 13) Blau DM, Compans RW: Entry and release of measles virus are polarized in epithelial cells. *Virology* **210**: 91-99, 1995
 - 14) Liszewski MK, Atkinson JP: Membrane cofactor protein. *Curr Top Microbiol Immunol* **178**: 7-60, 1992
 - 15) Patterson JB, Scheifinger F, Manchester M, Yilma T, Oldstone Michael BA: Structural and functional studies of the measles virus hemagglutinin: Identification of a novel site required for CD46 interaction. *Virology* **256**: 142-151, 1999
 - 16) Lecouturier V, Fayolle J, Caballero M, Carabana J, Celma ML, Fernandez-munoz R, Wild TF, Buckland R: Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type strains. *J Virol* **70**: 4200-4204, 1996
 - 17) Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthall DN, Oldstone Michael BA: Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol* **74**: 3967-3974, 2000
 - 18) Saito H, Nakagomi O, Morita M: Molecular identification of two distinct hemagglutinin types measles virus by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Mol Cell Probes* **9**: 1-8, 1995

Responsible regions for cell fusion of measles virus

Akiyoshi HOSHI¹⁾²⁾, Tetsuo NAKAYAMA²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Tokyo Medical University

²⁾Department of Virology, The Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University

Abstract

The Edmonston strain of measles virus (MV) was isolated from human kidney cells in 1954. The Edmonston strain has hemadsorption with red blood cells (RBCs) of African green monkeys (AGM), and produces cell fusion in both B95a and Vero cells. However, the recent clinical isolates of MV induce cell fusion in B95a cells, but not in Vero cells. To identify the region responsible for cell fusion in Vero cells, we used the Edmonston strain, and two wild strains, genotype D3; MVi/Tokyo.JPN/87-K(87-K), MVi/Tokyo.JPN/99-Y(99-Y). We constructed the expression plasmids of the hemagglutinin (H) and fusion (F) protein. A set of F and H plasmids was co-transfected in Vero cells or B95a cells under the control of T7 RNA polymerase. The H expression plasmids constructed from current circulating strains did not induce cell fusion in Vero cells. The H expression plasmid derived from Edmonston strain induced cell fusion in Vero cells. The expression experiment showed that cell-cell fusion of MV depends on H protein. Then, we constructed the chimera plasmids of H, using pEdm-H, p87K-H, p99Y-H, and investigated the critical H region responsible for cell fusion in Vero cells. As a result, we defined Tyr at position 481 as a critical region responsible for cell fusion in Vero cells. We suppose that Asn at positions 390 and 416 of current circulating strains reduced the extension of cell fusion in Vero cells.

〈Key words〉 Measles virus, H protein, cell fusion, Vero cells, B95a cells
