

ムンプスウイルス野生分離株の細胞融合

茂田 幸子¹⁾ 中山 哲夫²⁾¹⁾東京医科大学小児科学講座

【要旨と結論】 ムンプスの合併症として無菌性髄膜炎、難聴が知られている。ムンプスウイルスの性状を明らかとするために、合併症として難聴を認めた 93-OK、無菌性髄膜炎を併発した 80-I、耳下腺炎のみの 89-O、星野ワクチン株から fusion(F)、hemagglutinin-neuraminidase(HN) 発現プラスミドを構築し細胞融合能を検討した。93-OK から構築したプラスミドは他の株と比較して大きな細胞融合を示した。各 HN 発現プラスミドの細胞融合能には明らかな差は認められなかったが、各株の F 発現プラスミドを co-transfection させると、93-OK から作製した発現プラスミドでは大きな細胞融合誘導能が認められ、細胞融合能の差は F 蛋白に起因することが明らかとなった。93-OK 株と他の株との塩基配列を比較しキメラ F 蛋白発現プラスミドを構築し検討した結果、F 蛋白 330 位のアミノ酸が細胞融合能に重要であると想定された。

はじめに

ムンプスウイルスはパラミキソウイルスに属する negative sense の一本鎖 RNA ウイルスで 7 種類の蛋白をコードする遺伝子をもつ。ムンプスウイルスは RNA ウイルスで変異がおこりやすいものと考えられ、現在その遺伝子解析により、変異の多いと言われる SH 領域の塩基配列の差から世界的には 10 種類の genotype のウイルスが流行している¹⁾。我が国において 1976 年からのムンプスウイルス流行株を調査したところ B 群、D 群の 2 種類の genotype が流行していたが、1998 年頃からは G、H 群の流行が報告されている²⁾。

ムンプスウイルスはウイルス粒子の外殻蛋白として血球凝集素・ノイラミニダーゼ蛋白 (hemagglutinin-neuraminidase: HN) (HN と略す)、膜融合蛋白 (fusion: F) (F と略す) の糖蛋白を有している。HN 蛋白は分子量 74~80 kd の糖蛋白で、宿主細胞のレセプターと結合する蛋白である。HA 蛋白と同じ分子上に細胞膜から遊離する活性を担う neuraminidase 活性を持っている。F 蛋白は、糖蛋白で感染細胞内でその前駆体 F₀ として合成され細胞内プロテアーゼにより

F₁(58~61 kd) と F₂(10~16 kd) に開裂し、F₁ 蛋白の N 末端の疎水性領域が膜融合活性領域である。ウイルス粒子表面で多量体形成した HN 蛋白と F 蛋白が共働でウイルスの細胞膜レセプターへの結合、膜融合と感染の最初の段階に働く重要な役割を果たしている³⁾。

ムンプスウイルスは、唾液を介した飛沫により感染し、鼻咽頭の粘膜上皮で一次増殖したのち所属リンパ節で更に増殖しウイルス血症を起こし全身臓器に播種される。一般的に潜伏期間は 2~3 週と長く平均で約 18 日で、食欲不振、頭痛、倦怠感の前駆症状をもって発症し、嚥下痛を伴う両側性もしくは片側性の耳下腺炎を認める。耳下腺炎も全身症状のひとつとして発症する。耳下腺のみならず全身臓器にムンプスウイルスは感染し様々の合併症を起こすことが知られている。発熱、頭痛、嘔吐を認める典型的な髄膜炎はムンプスの約 10% に合併するといわれている。臨床症状は伴わないものの、髄液細胞増多はムンプスの 40~60% に認められ、いわゆる無菌性髄膜炎の原因ウイルスとしては、最も頻度の高いものであり、細胞数が 2,000~3,000/mm³ に達することもありムンプス髄膜炎の特徴ともいえる。その他の合併症とムンプス難聴を併発

2002 年 11 月 26 日受付、2003 年 1 月 20 日受理

キーワード: ムンプスウイルス、F 蛋白、難聴、細胞融合、Vero 細胞

(別刷請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学小児科学講座 茂田幸子)

することがある。突発性難聴の約 5-6%程度に流行性耳下腺炎が関与するといわれている。しかし、今までムンプス難聴例からウイルス分離の報告は極めて少ない。又、そのウイルス性状の詳細な報告はされていない。今回、一家 3 人が難聴を合併した症例から分離したウイルスの性状と、通常のムンプス患者から分離されたウイルス株との性状を検討したので報告する。

材料と方法

1. ウイルス株

使用したウイルスは星野ワクチン株として KO-3、野生分離株として 80-I, 89-O, 93-OK の 4 株を用いた。KO-3 はワクチンシード株で 1972 年に急性耳下腺炎から分離された野生株を鶏胎児胚細胞で 22 代継代した弱毒ワクチン株である⁴⁾。80-I は無菌性髄膜炎の症例、89-O は急性耳下腺炎の症例からそれぞれ 1980 年、1989 年に分離された株である。又、耳下腺炎に難聴を合併した症例から分離した 93-OK を使用した。Fig. 1 にその臨床背景を示した。3 人家族全員がムンプス感染により突発性難聴を来した症例から分離した株である。患児及び母親はムンプスに罹患した患児の叔父と接触があり、接触後 16 日目に母親が両側耳下腺腫脹、右側の耳鳴り、平行感覚異常が出現し、その数日後に右側の難聴を来した。母親の発症 3 日後に患児が嘔吐、座位及び歩行不能となり、音への反応が消失した。経過中患児は耳下腺腫脹は認めなかった。患児の発症 2 週間後に父親が左側の耳下腺腫脹、同側の耳鳴り、平行感覚異常が出現し、その 1 週間後に同

側の難聴を来した。患児、母親、父親のムンプス IgM EIA 抗体価は陽性で、父親の咽頭ぬぐい液からムンプスウイルスが分離され、これを 93-OK 株とし今回使用した。Vero 細胞で単層細胞にウイルス液を接種し、細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) (以下 CPE と略す) が 50%以上出現したウイルス液を採取しいずれも継代 4 代で実験に用いた³⁾。

2. 発現プラスミドの構築

これらのムンプスウイルスの培養上清 200 μ l から RNA を抽出し、同量の Lysis Buffer (4M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.5% Nonidet P-40) を加え、RNA は phenol chloroform 法で抽出し、10 μ l の再蒸留水に溶解した⁵⁾。既に報告した方法により⁶⁾ MpM+(5'-CTCCATGGAGTCCATTCAGGAAGT-3') を用いて F 領域の cDNA を合成し、HN 領域は Mp F4+(5'-ACCCATGGATTTGTAGCACTGGATG-3') を用いて合成した⁶⁾。我々は新たに合成した F-ATG(5'-TCCTGGTACCTTGATCAGTAATCATGAAGG-3), F-TAA(5'-GCCGGAGCTCTTAGTACCTAATGAGAT-3) で F 蛋白翻訳領域の DNA を増幅した。HN 領域に関しては HN-ATG(5'-CTTTGGTACCTGCTCGA AAGATGGAGCC-3), HN-TGA(5'-CCTAGAGCTCAAGTGATGGTCAATCT-3) を用いた。各プライマーの 5' 末端には下線部位の *Kpn* I、*Sac* I の制限酵素配列を付加した⁶⁾。F と HN の全翻訳領域の PCR 産物を *Kpn* I、*Sac* I で切断し pBluescript II SK (-) ベクター (STRATAGENE Cloning Sys-

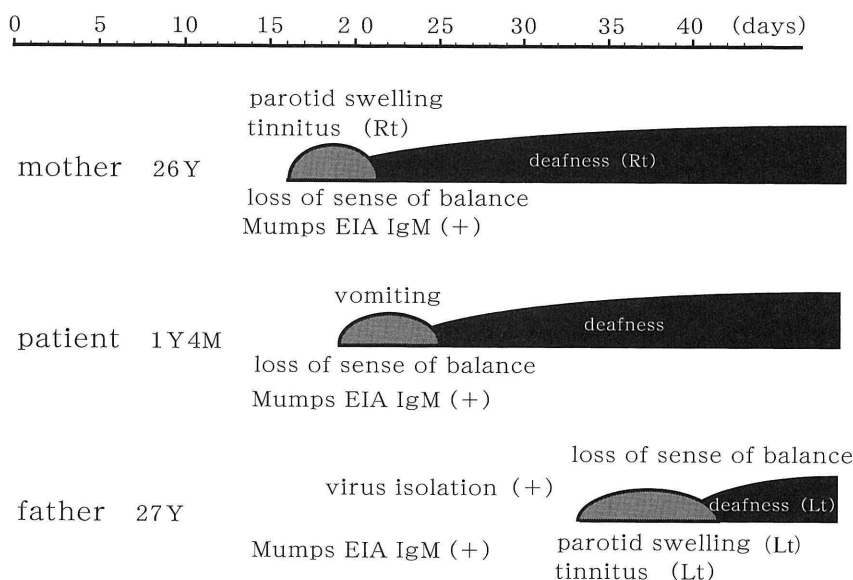


Fig. 1 Clinical background of the 93-OK strain.

tems, La Jolla, CA, USA) の T7 promoter の下流に位置する、*Kpn* I と *Sac* I の multicloning site に挿入することにより発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドの塩基配列は dye terminator 法で ABI 377A を用いて解析した⁶⁾。

3. 発現実験

recombinant vaccinia virus T7 発現システムによりプラスミドを Vero 細胞、HeLa 細胞に発現させた。HeLa 細胞を 24 穴プレートに単層培養し、T7 RNA polymerase を発現する recombinant vaccinia virus、v-TF7.3 (Dr. B. Moss より分与を受けた⁷⁾) を m.o.i.=1 で感染させ、細胞を Opti-MEM (GIBCO BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) により洗浄し F、HN 発現プラスミドを DMRIE-C (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) を用いて各 0.2 μ g を co-transfection させた。Vero 細胞に発現させるためには、T7 RNA polymerase を発現する recombinant vaccinia virus, MVAT7 pol. (Dr. G. Sutter より分与を受けた) を m.o.i.=10 で感染させ、F、HN 発現プラスミドを SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN, Germany) を用いて co-transfection させた⁸⁾。3 時間後に Opti-MEM で洗浄し、MEM5% FCS 培養液を添加した。一晚培養した後、細胞を固定しギムザ染色を行なった。

4. β -galactosidase 活性の測定

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、T7 RNA polymerase 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、PBS (–) で 2 回洗浄後 $1 \times 10^5/0.3$ ml に調整した。F、HN 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 4 時間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 -galactoside を用いた蛍光 ELISA 法により測定した⁹⁾。又、指示細胞を添加後、更に 4 時間培養を続けた後に細胞を洗浄し 200 μ l の 0.05% Nonidet P-40 を含んだ PBS (–) で溶解した。20 μ l の細胞溶解液を 0.2 mM 4-methylumbelliferyl- β -galactoside (Sigma Chemicals, St Louis, 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 (pH 9.6) を 100 μ l 同量添加した。蛍光強度は蛍光マイクロプレートリーダー (Fluoroskan II, Labsystems) により測定した¹⁰⁾。

5. 血球吸着能と neuraminidase 活性の測定

HN 発現プラスミドを Vero 細胞に単独にもしくは F 発現プラスミドと共に transfection させ、一晚培養後、PBS (–) で洗浄後に 0.5% モルモット赤血球を添加し、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。Transfection 後の細胞を細胞溶解液 (0.05% Nonidet P-40, PBS) 200 μ l に溶解し、細胞溶解液 (50 μ l) を 96 穴プレートに加え、同量の 0.1 mM 4-methylumbelliferyl N-acetylneuraminic acid (Sigma Chemicals, St Louis, MO) を基質反応液として加えた¹¹⁾¹²⁾。37°C で 2 時間反応後、0.1 mM Glycine Buffer (pH 9.6) を加え、反応を中止した。Neuraminidase 活性は蛍光マイクロプレートリーダー (Fluoroskan II, Labsystems) で蛍光強度を測定した。

結 果

1. 細胞融合能の比較

KO-3、93-OK、80-I、89-O から構築した F 発現プラスミド、pMp-KO-3-F、pMp-93-OK-F、pMp-80-I-F、pMp-89-O-F の細胞融合能を検討した。HN 発現プラスミドを KO-3 星野ワクチン株から構築した pMp-KO-3-HN として、各ウイルス株から構築した F 発現プラスミドを Vero 細胞に co-transfection し翌日にギムザ染色した結果を Fig. 2 の上段に示した。各 F 蛋白発現プラスミドは pMp-KO-3-HN と co-transfection することで細胞融合を示し、pMp-93-OK-F を F 蛋白発現プラスミドとして使用したときに大きな細胞融合を認めた。F 発現プラスミドを pMp-KO-3-F に固定して各ウイルス株から構築した HN 発現プラスミドを co-transfection した結果を Fig. 2 下段に示した。各 HN 発現プラスミドの細胞融合能には明らかな差は認められなかった。

F、HN 発現プラスミドの細胞融合能の指標として細胞内の Neuraminidase 活性を測定し、その結果を Fig. 3 に示した。Fig. 3 の上段に pMp-KO3 HN 発現プラスミドと各構築した F 発現プラスミドを co-transfection した細胞内の Neuraminidase 活性を示した。蛍光強度は pMp-KO-3-F を F 発現プラスミドとして使用した時には 371FU、pMp-93-OK-F を使用したときは 766FU、pMp-80-I-F では 431FU、pMp-89-O-F では 494FU であった。Neuraminidase 活性は pMp-93-OK-F を F 発現プラスミドとして使用した時に有意に高値を示した。一方、下段に pMp-KO3-F 発現プラスミドと各構築した HN 発現プラスミドを

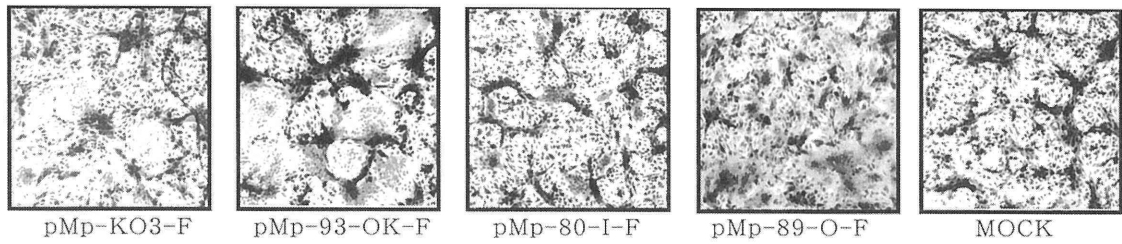


Fig. 2-A

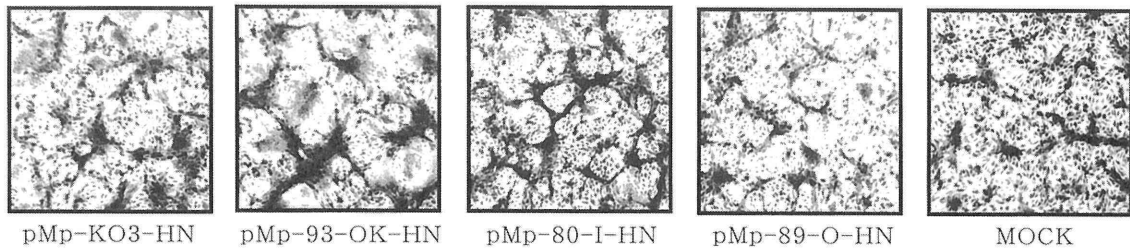


Fig. 2-B

Fig. 2 Cell fusion inducibility of F, HN protein expression plasmids in Vero cell. The plate was stained with Giemsa's solution and visualized with an Olympus microscope. All panels are at $\times 80$.
 2-A) The plasmids expressing F protein were constructed from KO-3, 93-OK, 80-I, and 89-O. Panels show the cell fusion in Vero cells co-transfected with pMp-KO-3-F, pMp-93-OK-F, pMp-80-I-F, and pMp-89-O-F, using pMp-KO-3-HN as the HN expression partner.
 2-B) The plasmids expressing HN protein were constructed from KO-3, 93-OK, 80-I, and 89-O. Panels show the cell fusion in Vero cells co-transfected with pMp-KO-3-HN, pMp-93-OK-HN, pMp-80-I-HN, and pMp-89-O-HN, using pMp-KO-3-F as the F expression partner. As a negative control, pBluescript II SK - vector was transfected after the cells were infected with recombinant vaccinia virus.

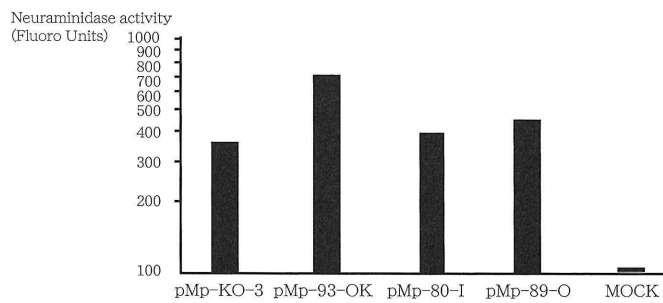


Fig. 3-A

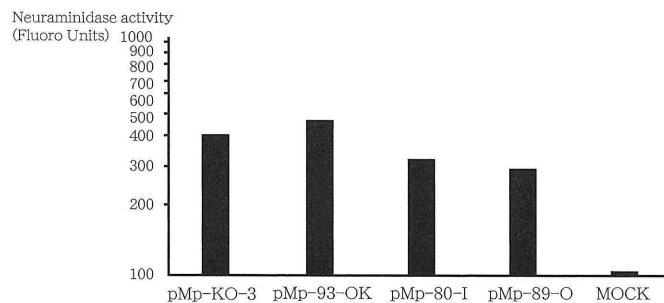


Fig. 3-B

Fig. 3 Neuraminidase activity as a quantitative assay of cell fusion of each protein expression plasmids in Vero cells.
 3-A) Neuraminidase activity was measured after co-transfection with F protein expression plasmids, using pMp-KO3-HN as an expression partner for the HN protein.
 3-B) Neuraminidase activity was measured after co-transfection with HN protein expression plasmids, using pMp-KO3-F as an expression partner for the F protein.
 As a negative control, pBluescript II SK - vector was transfected after the cells were infected with recombinant vaccinia virus.

co-transfection した細胞内の Neuraminidase 活性を示した。pMp-KO-3-HN、pMp-80-I-HN、pMp-89-O-HN を HN 発現プラスミドとして使用した時には、蛍光強度は各々、402FU、343FU、337FU で、pMp-93-OK-HN を使用した時には蛍光強度は 485FU と有意差は認めなかった。以上より細胞融合能は F 蛋白発現プラスミドに依存していることが明らかとなった。

pMp-KO-3-F 発現プラスミドと pMp-KO-3-HN 発現プラスミドを、また各構築した F 発現プラスミドと各構築した HN 発現プラスミドを co-transfection させて細胞融合を観察した結果を Fig. 4 の上段に示した。pMp-93-OK-F, HN を co-transfection させた時に大きな細胞融合を認めた。下段には上段に示した組み合わせで各発現プラスミドを 37°C、39°C で co-transfection させた時の細胞内の β -galactosidase 活性の結果を示した。pMp-KO-3-F と pMp-KO-3-HN を co-

transfection させた時は、37°C における細胞内の β -galactosidase 活性は蛍光強度 457FU、39°C において 453FU であった。pMp-80-I-F と pMp-80-I-HN を co-transfection させた時は、37°C で 317FU、39°C で 206FU、また pMp-89-O-F と pMp-89-O-HN を co-transfection させた時は、細胞内 β -galactosidase 活性は 37°C で 272FU、39°C で 165FU と 39°C の方がやや細胞融合は小さくなる傾向が認められた。pMp-93-OK-F と pMp-93-OK-HN を co-transfection させた時は、37°C における細胞内の β -galactosidase 活性は蛍光強度 778FU、39°C において 436FU と温度による細胞融合能の差を認めた。これらの結果より pMp-93-OK は 37°C において F 発現プラスミド、HN 発現プラスミドを co-transfection させた時に細胞融合能が高いことが明らかとなった。

Cell fusion

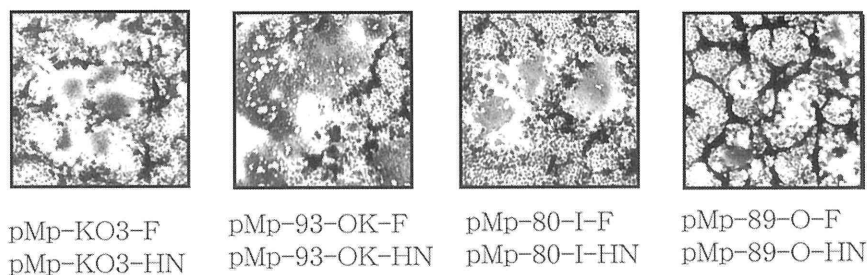


Fig. 4-A

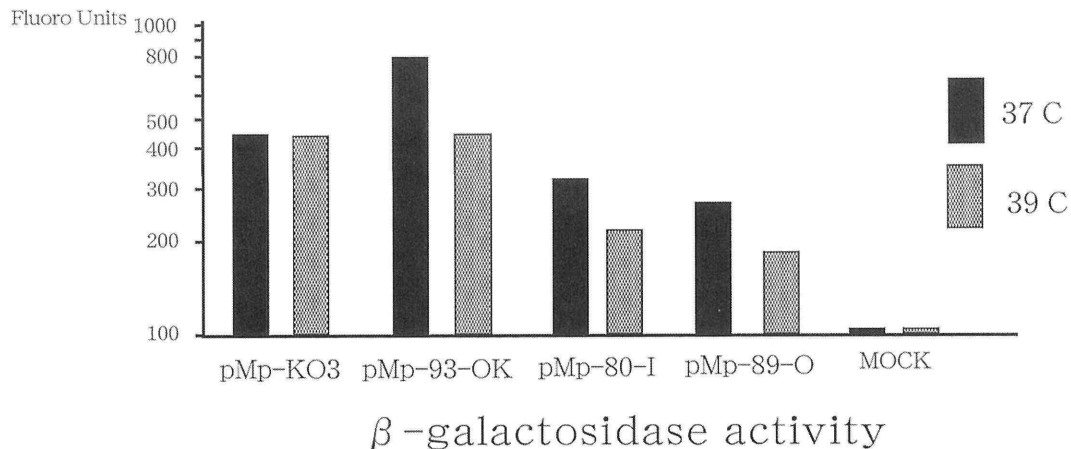


Fig. 4-B

Fig. 4 Appearance of cell fusion and β -galactosidase activity as the index of cell fusion.

4-A) Different extent of the cell fusion after co-transfection with a homologous set of the F and HN protein expression plasmids in Vero cell. All panels are at X80. A set of F and HN expression plasmids was transfected in Vero cells under the control of T7 polymerase.

4-B) β -galactosidase activity of expression of the F and HN proteins at 37°C or 39°C. Vero cells were co-transfected with a homologous set of the F and HN protein expression plasmids.

As a negative control, pBluescript II SK-vector was transfected after the cells were infected with recombinant vaccinia virus.

2. 発現プラスミドのアミノ酸の差

構築した各 HN 発現プラスミドの塩基配列から推定されるアミノ酸の違いを Fig. 5 の上段に示した。pMp-KO-3-HN と比較して、pMp-93-OK-HN は 21 番目の Val が Ilu (V-HN21-I) に変化していた。他に R-HN119-C、V-HN345-I、V-HN395-I の 4 箇所において変異を認めた。pMp-80-I-HN では V-HN21-I、I-HN46-M、Q-HN62-R、R-HN119-C の 4 箇所において変異を認めた。pMp-89-O-HN では V-HN21-I、S-HN39-T、A-HN42-S、M-HN58-L、R-HN119-C、N-HN385-S、Q-HN401-R、T-HN438-I の 8 箇所において変異を認めた。

各構築した F 発現プラスミドの塩基配列から推定されるアミノ酸の違いを Fig. 5 の下段に示した。pMp-KO-3-F と比較して、pMp-93-OK-F では G-F10-S、L-F14-F、V-F18-A、I-F49-V、L-F79-S、S-F261-A、S-F318-G、H-F330-R、Q-F383-L の 9 箇所において変異を認めた。pMp-80-I-F では Y-F8-C、L-F14-F、N-F297-H、Q-F383-L の 4 箇所において変異を認めた。pMp-89-O-F では Y-F8-C、G-F10-S、L-F14-F、S-F15-T、I-F353-V、Q-F383-L、I-F505-V の 7 箇所において変異を認めた。

3. キメラ F 蛋白発現プラスミドの構築と細胞融合能

pMp-93-OK-F で認められた大きい細胞融合は、F 蛋白に起因すると考えられた。pMp-KO-3-F との比較におけるアミノ酸の変異は 9 箇所存在した。その中

で細胞融合能の程度を規定するアミノ酸を特定するために、制限酵素を用いて各 F 蛋白発現プラスミド、pMp-93-OK-F、pMp-80-I-F、pMp89-O-F の間で組み替え、キメラプラスミドを構築し細胞融合能の程度を比較し、結果を Fig. 6 に示した。F 蛋白 698 位に存在する *Pst* I 部位で pMp-93-OK-F と pMp-80-I-F の間でキメラプラスミド pMp-OK/I *Pst* I、pMp-I/OK *Pst* I を構築した。PMp-OK/I *Pst* I は pMp-I/OK *Pst* I に比べ明らかに大きな細胞融合を認めた。その後 F 蛋白 975 位に存在する *Hinc* II 部位で pMp-OK/I *Pst* I と pMp-89-O-F の間でキメラプラスミド pMp-O/OK/I、pMp-OK/I/O を構築した。pMp-KO-3-F、HN と比べ同程度の細胞融合を示したものを+、より大きいものを++で示した。キメラプラスミドの中で pMp-OK/I *Pst* I、pMp-OK/I/O で大きな細胞融合を認めた。これらの結果より細胞融合能の大きさを規定するのは F 蛋白発現プラスミドの 330 位の R、353 位の I、505 位の I の 3 つのアミノ酸と考えられた。353 位の I、505 位の I は pMp-80-I-F、pMp-I/OK *Pst* I にも共通して含まれている。pMp-80-I-F、pMp-I/OK *Pst* I は pMp-KO-3-F と比較し細胞融合は同程度であった。以上より細胞融合能の大きさを主に規定しているのは、330 位の R であると推定された。

考 察

一般的に片側性感音性難聴はムンプスの数千例に 1 例は認められ、ムンプスによる難聴は非可逆性である

	21	39	42	46	58	62	119	345	385	395	401	438
pMp-KO3-HN	V	S	A	I	M	Q	R	V	N	V	Q	T
pMp-93-OK-HN	I						C	I	I			
pMp-80-I-HN	I	M	R				C					
pMp-89-O-HN	I	T	S	L			C	S	R	I		

Fig. 5-A

	8	10	14	15	18	49	79	261	297	318	330	353	383	505
pMp-KO3-F	Y	G	L	S	V	I	L	S	N	S	H	I	Q	I
pMp-93-OK-F	S	F	A	V	S			A	G	R		L		
pMp-80-I-F	C	F						H				L		
pMp-89-O-F	C	S	F	T					V	L		V		

Fig. 5-B

Fig. 5 Difference in the amino acids deduced from nucleotide sequence of the HN (5-A) and F. (5-B) regions in comparison with the results of the KO-3 vaccine strain.

	810 1518 49 79	261 318 330 353	505	cell fusion
pMp-93-OK-F	YSSA V S	A G R I	I	++
pMp-80-I-F	CGSV I L	S S H I	I	+
pMp-89-O-F	CSTV I L	S S H V	V	+
	698 <i>Pst</i> I			
pMp-OK/ <i>Ipst</i> I	CGSV I L	A G R I	I	++
pMp-I/OK <i>pst</i> I	YSSA V S	S S H I	I	+
pMp-O/OK/I	CGSV I L	A G	H V V	+
pMp-OK/I/O	CSTV I L	S S	R I I	++
	975 <i>Hinc</i> II			

Fig. 6 Construction of chimerical plasmids and their cell fusion inducibility. Chimerical plasmids were constructed using pMp-93-OK-F (□), pMp-80-I-F (■), and pMp-89-O-F (▨), after digestion with *Pst* I and *Hinc* II. We depicted the different amino acids among three F expression plasmids. The chimerical plasmids were co-transfected in Vero cells together with pMp-KO-3-HN as the HN expression plasmid and the degree of cell fusion extent: ++ means extensive cell fusion larger than the cell fusion observed in the wells transfected with pMp-KO-3-F and HN plasmid. + means similar to the cell fusion as observed in the wells transfected with pMp-KO-3-F and HN plasmid.

ことから耳鼻科的にも小児科的にも重要な疾患である。小児の片側性突発性難聴の原因としてムンプスが知られており、突発性難聴の約5-6%程度に流行性耳下腺炎が関与するといわれている。難聴の多くは片側性で耳下腺炎が軽快後に気づく例が多く、稀ではあるが耳下腺炎の症状を認めず、血清学的にムンプス感染が証明されるムンプス難聴もみられる。ムンプス難聴は内耳からウイルスが分離された報告もあることからウイルスの直接浸潤と考えられる¹³⁾。今まで、難聴例からのウイルス学的な検索は行われていない。その要因として難聴と診断されたときには既に急性期を過ぎておりウイルス分離が出来ないことがあげられる。3人家族全員がムンプス感染により突発性難聴を来した症例からウイルスを分離することができた。今回の症例においてもムンプス発症から難聴を呈するまでに時間の経過があり、患児からのウイルス分離は陰性であった。患児発症後に父親がムンプスに罹患し、父親も難聴をきたした。家族全員が罹患し難聴を認めたことから、ウイルス学的な検討を行った。患児、母親、父親のEIAでのムンプスIgM抗体価は陽性で、父親の咽頭ぬぐい液からムンプスウイルスが分離され、この93-OK株の性状を解析した。

ムンプスウイルスはparamyxovirusに属し、Vero細胞に特徴的なCPEを示すことが知られており、巨細

胞形成が特徴的で感染細胞の細胞融合により生じる。ムンプスウイルス粒子表面にはHN、Fの2糖類の糖蛋白が存在し、表面にスパイク状に並んでいる。HN蛋白はウイルス感染の初期に働き、細胞表面のウイルスreceptorと結合することでHN蛋白の立体構造に変化をきたし、隣接するF蛋白の構造が変化することでF1蛋白のN末端に存在する細胞融合活性部位を細胞の脂質二重膜に結合させ、ウイルスと細胞膜融合がおこる¹⁴⁾。

ウイルスの感染はこの細胞融合により拡大し、細胞融合にはHNとF蛋白の共働作用が必要となってくる¹⁴⁾。HN蛋白はその活性を発揮するには多量体形成が必要とされている^{15,16)}。又、ムンプスウイルスの合胞体形成にはHN蛋白のNeuraminidase活性も影響し、合胞体形成能を獲得した株はHN181のアミノ酸変異を伴っておりNeuraminidase活性が低い株が細胞融合能が高いと報告されている¹⁷⁾。

ムンプスウイルスの細胞融合能におけるF、HN蛋白の共働作用を調べる目的で、93-OK株を含めた野生分離株とワクチン株からF、HN蛋白発現プラスミドを構築し細胞融合能の差に関連する遺伝子領域を特定するためにT7 RNA polymeraseによる発現実験を行った。pMp-93-OKは他の蛋白発現プラスミドに比較して大きな細胞融合能を示した。各F蛋白発現プラ

スミドは pMp-KO-3-HN と co-transfection する事で細胞融合を示し、pMp-93-OK-F を F 蛋白発現プラスミドとして使用したときに大きな細胞融合を認めた。各 HN 発現プラスミドにおいては pMp-KO-3-F と co-transfection したときの細胞融合能には明らかな差は認められなかった。これらの結果より細胞融合能の差は F 蛋白に起因すると推定された。F 蛋白のどの部位が細胞融合能に影響を及ぼすかを知るために、F 蛋白発現プラスミドの塩基配列を pMp-KO-3-F と比較した。pMp-93-OK-F は他の 3 種類の F 蛋白発現プラスミドと比較してアミノ酸の変異は 6 箇所存在した。その 6 箇所の中で細胞融合能の程度を規定するアミノ酸を特定するために、制限酵素を用いてキメラプラスミドを構築した。pMp-80-I-F、pMp-89-O-F、pMp-93-OK-F の 3 種類の F 蛋白発現プラスミドを用いて構築したキメラプラスミドにおいて、細胞融合能を比較検討し、pMp-OK/I *Pst* I、pMp-OK/I/O で大きな細胞融合を認めた。これら 2 種類のキメラプラスミドに共通しているアミノ酸は、330 位の R、353 位の I、505 位の I の 3 箇所存在した。353 位の I、505 位の I は pMp-80-I-F、pMp-I/OK *Pst* I にも共通しているアミノ酸であった。pMp-80-I-F、pMp-I/OK *Pst* I は pMp-KO3-F、HN と比較し同程度の細胞融合を示したことから、330 位の R が細胞融合能を決定する重要な働きを担っていると考えられた。

ムンプスウイルスにおいて F 蛋白の機能 domain に関しての報告はないが、ムンプスウイルスと同属のパラミキソウイルスの中で最もムンプスウイルスに構造が近いとされている麻疹ウイルスにおいて、F 蛋白 337~381 位の cysteine-rich region が F、H の相互作用に関連すると報告されている¹⁸⁾。ムンプスウイルスの 330 位は cysteine-rich region の中に含まれるアミノ酸部位であり、F、HN の相互作用に関連する重要な領域と考えられる。

謝 辞

稿を終わるに臨みご指導ならびに御校閲を賜りました星加明徳教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究にあたり、終始御指導、御協力いただきまし北里生命科学研究所の方々、小児科学教室員の方々に深く感謝いたします。

本論文の要旨の一部は第 32 回日本小児感染症学会、第 104 回日本小児科学会において発表した。

文 献

- 1) Teclé T, Mickiene A, Johansson B, Lindquist L, Orvell C: Molecular characterisation of two mumps virus genotypes circulating during an epidemic in Lithuania from 1998 to 2000. *Arch Virol* **147**: 243-253, 2002
- 2) Uchida K, Shinohara M, Shimada S, Segawa Y, Hoshino Y: Characterization of mumps virus isolated in Saitama Prefecture, Japan, by sequence analysis of the SH gene. *Microbiol. Immunol* **45**: 851-855, 2001
- 3) Kathryn M, Carbone and Jerry S, Wolinsky: Mumps virus. *Virology*, Fourth Edition. Fields BN, Lippincott Williams, Wilkins, New York, 1381-1400, 2001
- 4) Sasaki K, Higashihara M, Inoue K, Makino S: Studies on the development of a live attenuated mumps virus vaccine. *The Kitasato Arch Exp Med* **49**: 43-52, 1976
- 5) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* **162**: 156-159, 1987
- 6) Kashiwagi Y, Takami T, Mori T, Nakayama T: Sequence analysis of F, SH, and HN genes among mumps virus strains in Japan. *Arch Virol* **144**: 593-599, 1999
- 7) Fuerst TR, Moss B: Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Sci USA* **83**: 8112-8126, 1986
- 8) Sutter G, Ohlmann M, Erfle V: Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *Fed Eur Biochem Societies* **371**: 9-12, 1995
- 9) 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
- 10) Nakayama T, Aizawa C, Kuno-Sakai H: A Clinical analysis of gelatin allergy and determination of its causal relationship to the previous administration of gelatin-containing acellular pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids. *J Allergy Clin Immunol* **103**: 321-325, 1999
- 11) Potier M, Mameli L, Belisle M, Dallaire L, Melancon SB: Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-Methyl-umbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic) substrate. *Analytical Biochem* **94**: 287-296, 1979
- 12) Myers RW, Lee RT, Lee YC, Thomas GH, Reynolds LW, Uchida Y: The synthesis of 4-methylumbelliferyl α -ketoside of N-acetylneuraminic acid and its use in a fluorometric assay for neur-

- aminidase. *Anal Biochem* **101**: 166-174, 1980
- 13) Westmore GA, Pickard BH, Stern H: Isolation of mumps virus from the inner ear after sudden deafness. *Br Med J* **1**: 14-15, 1979
- 14) Tanabayashi K, Takeuchi K, Okazaki K, Hishiyama M, Yamada A: Expression of mumps virus glycoproteins in mammalian cells from cloned cDNAs: Both F and HN proteins are required for cell fusion. *Virology* **187**: 801-804, 1992
- 15) Horvath C.M, Lamb R.A: Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J Virol* **66**: 2443-2455, 1992
- 16) Joshi S.B, Dutch R.E, Lamb R.A: A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* **248**: 20-34, 1998
- 17) Waxham MN, Aronowski J: Identification of amino acids involved in the sialidase activity of the mumps virus hemagglutinin-neuraminidase protein. *Virology* **183**: 226-232, 1988
- 18) 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

Different cell fusion inducibility of wild-type mumps virus strains

Yukiko SHIGETA¹⁾, Tetsuo NAKAYAMA²⁾

(Director: Prof. Akinori HOSHIKA)

¹⁾Department of Pediatrics, Tokyo Medical University

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

Abstract

Aseptic meningitis and deafness are known as serious complications in mumps virus infection. To identify the characteristics of mumps virus isolated from the patients with hearing loss after mumps infection, we constructed fusion (F) and hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein expression plasmids. We examined three wild strains: 93-OK strain was obtained from a patient with deafness, 89-O from a patient with parotitis, and 80-I from a patient with aseptic meningitis. For the control, we use KO-3 Hoshino vaccine strain. A set of F and HN protein expression plasmids was transfected in Vero cells under the control of T7 polymerase. Extensive cell fusion was observed when Vero cells were transfected with a set of protein expression plasmids constructed from pMp-93-OK. There was no significant difference in cell fusion inducibility among HN protein expression plasmids. Extensive cell fusion was observed when pMp-93-OK-F protein expression plasmid was co-transfected with pMp-KO-3-HN as an HN expression partner. We suppose the extensive cell fusion depended upon the F protein expression plasmid (pMp-93-OK-F). By comparing the sequence results of pMp-93-OK from the other strains, we constructed chimerical plasmids and investigated their fusion inducibility. It was demonstrated that Arg. at the position of 330 of the HN protein is responsible for large cell fusion inducibility of the 93-OK strain.

<Key words> Mumps virus, Fusion protein, Deafness, Cell fusion, Vero cell.
