

147. パラミクソウイルスの細胞侵入メカニズムの解明

橋口 隆生

Key words : ウイルス学, 構造生物学

九州大学 大学院医学研究院
ウイルス学分野

緒言

感染症は未だに世界全体の死因の約 25 % を占め, 近年, 世界規模で新興・再興感染症の発生が頻発しており, 人類全体の大きな脅威となっている。人に疾患を引き起こすウイルスの中で, パラミクソウイルス科に含まれるウイルスには近年, 米国での再流行が社会問題となっている麻疹 (はしか) を引き起こす麻疹ウイルスをはじめ, 流行性耳下腺炎を起こすムンプスウイルス, 小児を中心に風邪様の症状を引き起こすメタニューモウイルスや RS ウイルス, 症例は少ないが非常に高い致死率 (~50 %) を示すニパウイルス等, 空気・接触感染で急速に広がる非常に感染性の強いウイルスが含まれおり, 基礎・臨床の両面で重要性の高い分類のウイルス群となっている。本研究では, 流行性耳下腺炎 (おたふく風邪) を起こすムンプスウイルスに着目して, その病原性と組織指向性がどのような分子機構によってもたらされるのかを構造生物学的手法により解析したので報告する。

方法および結果

1. 蛋白質資料の調整

ムンプスウイルスは, パラミクソウイルス科の一本鎖 RNA ウイルスで, 粒子表面の脂質二重膜から 2 種類の糖蛋白質が突き出た構造を持つ²⁾。すなわち, 受容体結合能を持つ HN 蛋白質, 膜融合能を持つ F 蛋白質である。この 2 種類の糖蛋白質と宿主受容体であるシアル酸の相互作用によりムンプスウイルスは細胞に侵入しライフサイクルが始まる³⁾。本研究では, ムンプスウイルスの宿主細胞への侵入に着目し, ウイルスの組織指向性を明らかにすることを目的とした。そこで, まず受容体結合に必須のムンプスウイルス HN 蛋白質の構造解析のために, 蛋白質の大量発現系を構築した。著者らは, これまでに同じパラミクソウイルス科に属する麻疹ウイルスの糖蛋白質の構造解析に成功しているので^{4,5)}, 同様に蛋白質発現用の細胞としてヒト培養細胞発現系 (293 系統の細胞) を用いた。ムンプスウイルス HN 蛋白質は培養上清中に分泌発現され, タグとして His タグを融合させていたので, Ni アガロースカラムによりアフィニティー精製を行った。その後, ゲル濾過カラムによりさらに精製を行うことで構造解析用の蛋白質試料の調製を行った (図 1a)。

2. 結晶化

調製した蛋白質試料を用いて初期スクリーニングによる結晶化条件検討を行った。結晶化条件検討用のバッファーには市販のスクリーニングキット (ハンプトン社, キアゲン社, エメラルドバイオストラクチャー社) を利用した。初期スクリーニングには結晶化用のロボット (英国ダグラス社) を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法により, 蛋白質溶液 $0.2 \mu\text{l}$ と結晶化バッファー $0.2 \mu\text{l}$ を混合させた。この結果を受けて, 結晶が見られた条件をさらに最適化するため, ハンギングドロップ蒸気拡散法により, 蛋白質溶液 $1.0 \mu\text{l}$ と結晶化バッファー $1.0 \mu\text{l}$ を混合させて, 結晶化の再現性を確認した。その後, さらに結晶化条件の塩濃度や塩の種類, pH, 沈殿剤濃度の最適化もを行い, 0.2 mm 程度の大きさの結晶を得ることが出来た (図 1b)。

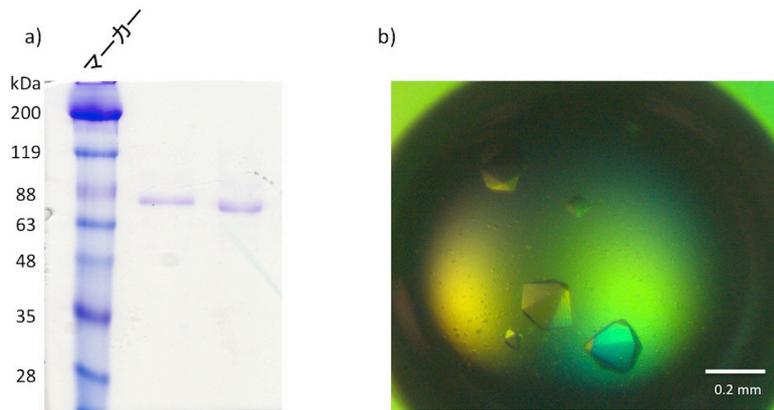


図1. ムンプスウイルス HN 蛋白質の精製と結晶化.

- a) ムンプスウイルス HN 蛋白質の SDS-PAGE. 左が還元条件下, 右が非還元条件下.
 b) ムンプスウイルス HN 蛋白質の結晶.

3. X 線回折実験

得られた結晶の X 線回折データの測定を筑波にある高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory BL-1A を利用して行った. 測定中は強力な X 線による蛋白質結晶のダメージを抑えるために, 結晶は液体窒素気流中で冷却をしながら行った. 極低温中での測定となるため, 蛋白質結晶の凍結を防ぐためにクライオ溶液条件下 (25 %グリセロール) で測定を行った. 測定は結晶を 0.5 度ずつ回転させながら, 一秒露光で 180 度分のデータを収集した. 検出器には Destrus PILATUS 2M-F を用いた. 得られた回折データは HKL2000 により処理をし, 3.3 Å 程度の分解能のデータが得られた (図2).

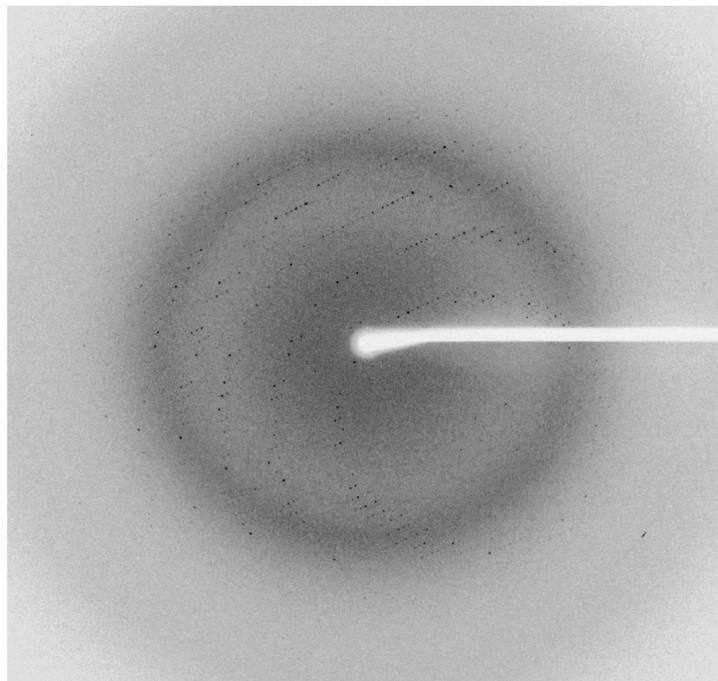


図2. ムンプスウイルス HN 蛋白質結晶の X 線回折像.

ムンプスウイルス HN 蛋白質の結晶について, Photon Factory BL-1A において X 線回折実験を行った結果を示す.

考 察

ムンプスウイルス感染症の臨床的特徴として2日以上持続する急性耳下腺腫脹が挙げられ、重篤な合併症として無菌性髄膜炎 (1-10 %) やムンプス脳炎 (0.3-0.02 %), ムンプス難聴 (0.5-0.01 %) が報告されている³⁾。従って、受容体結合に必須のムンプスウイルス HN 蛋白質の構造を決定することはムンプスウイルスの組織指向性を理解し、疾患の原因を解明することにつながると考えられる。また、ムンプスワクチン接種でも上述の無菌性髄膜炎 (0.1-0.01 %) やムンプス脳炎 (0.0004 %) が低頻度ながら副反応として報告されている³⁾。この副反応問題によりムンプスワクチンは定期接種から任意接種へと変更になった。現在、わが国のワクチン接種率は 30 % 程度であり、およそ 4 年に一度の全国規模の流行を今も繰り返している。そのため、ムンプスの撲滅に向けて安全性も免疫原性も優れたワクチン株を作製することに対しても、主要な免疫抗原である HN 蛋白質の構造決定により貢献できると期待される。今回、ムンプスウイルス HN 蛋白質の結晶化に成功し、構造決定に向けた十分な質の X 線回折データが得られたことは重要な成果となった。今後、データ解析をさらに進め、受容体との複合体構造決定に向けても更なる検討を進めて行く予定である。

共同研究者

本研究は、九州大学医学研究院の柳 雄介教授、同教室大学院生の久保田万理恵、九州大学生体防御医学研究所の神田大輔教授、高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所の清水伸隆准教授との共同研究である。本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lamb, R. A. & Parks, G. D. : Paramyxoviridae: The viruses and their replication. *In* Fields virology. 6th ed., Vol. I (eds. Knipe, D. M. et al), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 957-995, 2013.
- 2) Hviid, A., Rubin, S. & Muhlemann, K. : Mumps. *Lancet*, **371** : 932-944, 2008.
- 3) Kathryn, M. & Carbone, S. R. : Mumps virus. *In* fields virology. 6th ed., Vol. I (eds. Knipe, D. M. et al), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1024-1041, 2013.
- 4) Hashiguchi, T., Kajikawa, M., Maita, N., Takeda, M., Kuroki, K., Sasaki, K., Kohda, D., Yanagi, Y. & Maenaka, K. : Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104** : 19535-19540, 2007.
- 5) Hashiguchi, T., Ose, T., Kubota, M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Maenaka, K. & Yanagi, Y. : Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18** : 135-141, 2011.