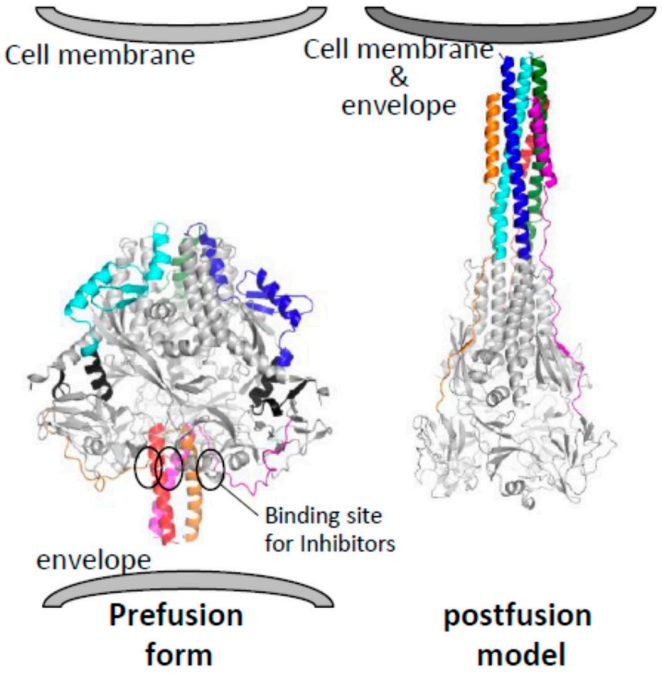
65　ウイルスによる膜融合と細胞侵入の分子基盤	柳　雄介

【目的】脂質二重膜のエンベロープで被われたウイルスは、エンベロープと細胞膜の膜融合を起こすことにより、ウイルスゲノムを標的細胞内に侵入させ、子孫ウイルスを産生する。この膜融合は、エンベロープ上のウイルス蛋白質と細胞膜上の受容体の相互作用によって起こる。本研究では、パラミクソウイルスの膜融合機構、さらにそれと関連して、麻疹ウイルスの神経細胞感染機構、麻疹ウイルスに対する融合阻害剤の作用機構、ムンプスウイルスの受容体構造を解明することを目的とした。

【方法】ヒト培養細胞を用いて麻疹ウイルス F 蛋白質、ムンプスウイルス HN 蛋白質を発現し、精製・結晶化の後、構造解析を行った。膜融合は、エンベロープ蛋白質の発現によって得られた合胞体の面積を定量することにより行った。レチノイン酸でニューロンに分化させた NT2 細胞に緑色蛍光色素発現組換え麻疹ウイルスを感染させ、感染後のウイルス伝播を蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で観察した。

【結果】膜融合に関わる麻疹ウイルス F 蛋白質の結晶構造解析から、融合阻害剤が F 蛋白質 3 量体の head 領域と stalk 領域の境界領域に結合すること、変異を起こすことにより F 蛋白質の構造不安定化と膜融合能の亢進をもたらすアミノ酸残基の多くが同じ境界領域に存在することがわかった。この領域は膜融合の調節に重要な役割を担っていると考えられた。麻疹ウイルスが神経細胞で伝播するには、膜融合能が亢進した F 蛋白質を持つことが重要であった。構造及び機能的解析から、ムンプスウイルスの受容体は末端に α2, 3 結合型シアル酸を持つ 3 糖であることがわかった。

麻疹ウイルス F 蛋白質 3 量体の膜融合前後の構造変化



（doi: 10.1073/pnas.1718957115 より引用）

65. ウイルスによる膜融合と細胞侵入の分子基盤

柳　雄介

九州大学 大学院医学研究院 ウイルス学分野

Key words：麻疹ウイルス，膜融合，F 蛋白質，ムンプスウイルス，シアル酸

緒　言

脂質二重膜のエンベロープで被われたウイルスは、エンベロープと細胞膜の膜融合を起こすことにより、ウイルスゲノムを標的細胞内に侵入させ、子孫ウイルスを産生する。この膜融合は、エンベロープ上のウイルス蛋白質と細胞膜上の受容体の相互作用によって起こる。エンベロープをもち、非分節マイナス一本鎖 RNA がゲノムであるパラミクソウイルス科のウイルスには、麻疹ウイルスやムンプスウイルスなどヒトに病気を起こす重要なウイルスが含まれる。パラミクソウイルスは、エンベロープ上に受容体結合蛋白質（麻疹ウイルスでは H 蛋白質、ムンプスウイルスでは HN 蛋白質）と融合蛋白質（fusion protein、F 蛋白質）の 2 つの糖蛋白質を持っており、これらが細胞表面での膜融合と細胞侵入に関わっている。われわれは、麻疹ウイルスが SLAM（CD150）を受容体として免疫細胞に感染すること、さらに SLAM と結合した H 蛋白質の結晶構造をこれまでに明らかにした。一方、ムンプスウイルスの HN 蛋白質はシアル酸に結合することから、シアル酸を含む糖蛋白質や糖脂質が受容体であると考えられている。しかし、受容体結合蛋白質が受容体と結合した後、受容体結合蛋白質や F 蛋白質にどのような構造変化が起こり膜融合に至るかその詳細な分子メカニズムは不明である。

麻疹ウイルスは一般には急性感染を起こすが、まれに中枢神経系に持続感染して亜急性硬化性全脳炎（SSPE）を起こすことが知られている。SSPE の主な標的である神経細胞には SLAM などの受容体は発現しておらず、どのようにしてウイルスが神経細胞に侵入して増殖するかわかっていない。われわれは、SSPE を起こす麻疹ウイルスの F 蛋白質は変異により構造が不安定化しており、膜融合能が亢進していることを明らかにしている［1］。麻疹ウイルス F 蛋白質による膜融合を阻害するペプチド［2］や小化合物［3］が報告されているが、それらの作用機構は明らかになっていない。

本研究では、パラミクソウイルスの膜融合機構、さらにそれと関連して、麻疹ウイルスの神経細胞感染機構、麻疹ウイルスに対する融合阻害剤の作用機構、ムンプスウイルスの受容体構造を解明することを目的とした。

方　法

ヒト培養細胞（293SgnTI（－）細胞）を用いて麻疹ウイルス F 蛋白質、ムンプスウイルス HN 蛋白質を発現・精製し、結晶化した。得られた結晶の解析は Photon Factory で行った。膜融合は、H 蛋白質あるいは HN 蛋白質と対応する F 蛋白質を受容体発現細胞に導入し、得られた合胞体の面積を定量することにより行った。レチノイン酸でニューロンに分化させた NT2 細胞に野生型あるいは変異 F 蛋白質をもつ green fluorescent protein（GFP）発現組換え麻疹ウイルスを感染させ、感染後のウイルス伝播を蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で観察した。

結果および考察

1. 麻疹ウイルス F 蛋白質の構造

麻疹ウイルス F 蛋白質の細胞外領域（head 領域と stalk 領域からなる）を培養細胞で大量発現させ、精製し結晶化を行った［4］。蛋白質の安定性を高め発現量を増加させるために、stalk 領域にジスルフィド結合を導入した。結晶の

X 線構造解析により、2.8Å の分解能で 3 量体構造を決定することができた（図 1A）。単量体の構造を図 1B に示す。

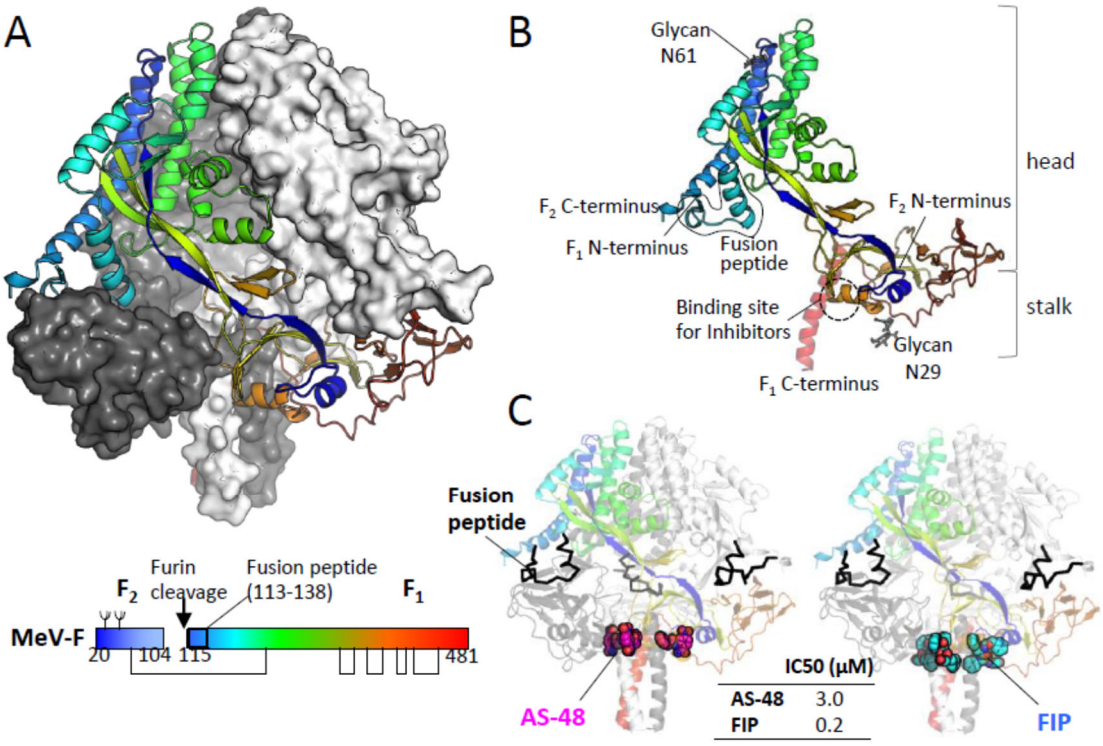


図 1. 単独あるいは阻害剤と結合した麻疹ウイルス F 蛋白質の構造［4］

（A）F 蛋白質 3 量体の X 線結晶構造と F 蛋白質の一次構造。単量体のそれぞれを虹色、黒色、灰色で示す。F 蛋白質は前駆体として合成された後、宿主プロテアーゼ furin で F1、F2 に切断される。切断の結果、F1 の N 末端に fusion peptide が形成される。一次構造の図には N 末端の糖鎖結合部位および 5 か所の S-S 結合も示す。（B）単量体構造。（C）阻害剤が結合した F 蛋白質 3 量体の構造。阻害剤の 50%阻害濃度も示す。

2. 麻疹ウイルス F 蛋白質に結合した阻害剤の構造

精製した F 蛋白質と麻疹ウイルスによる膜融合を阻害する能力をもつ fusion inhibitory peptide（FIP）［2］あるいは小化合物 AS-48［3］を混合して結晶化を行い、それぞれ 2.6Å、2.3Å の分解能で構造を決定した（図 1C）［4］。これらの 2 つの阻害剤は全く独立に開発されたものであるが、予想外にも F 蛋白質の head 領域と stalk 領域の境界の同じ領域に結合していた。ウイルスが細胞表面の受容体に結合すると、F 蛋白質は大きく構造を変化させるが、これらの阻害剤は head 領域と stalk 領域の境界領域に結合し、受容体結合後の F 蛋白質の大きな構造変化を阻害していると考えられる。

3. 構造不安定化を起こす F 蛋白質のアミノ酸

変異を起こすことにより F 蛋白質の構造不安定化と膜融合能の亢進をもたらすアミノ酸残基を F 蛋白質の構造上にマップすると Site Ⅰ～Ⅲの 3 個所に集中していることがわかった（図 2）。このうち SiteⅢは阻害剤の結合部位と一致していた。したがって、F 蛋白質のこの領域は膜融合の調節に重要な役割を担っており、その領域の変異や阻害剤の結合により膜融合能に大きな変化が起こると考えられた。融合能が亢進した M94V、S262R、T461 I 変異をもつ F 蛋白質に対しては、AS-48 と FIP は完全に融合能を阻害できたが、N462K 変異に対してはどちらの阻害剤も阻害効果を示さなかった。AS-48、FIP のいずれも N462 と直接相互作用をしていることがエスケープの原因と考えられる。多くの変異体による膜融合は、AS-48 や FIP で阻害できるので、これらのペプチドや化合物を基により阻害効果の強い阻害剤を設計して抗ウイルス薬として開発することが可能だと考えられる。

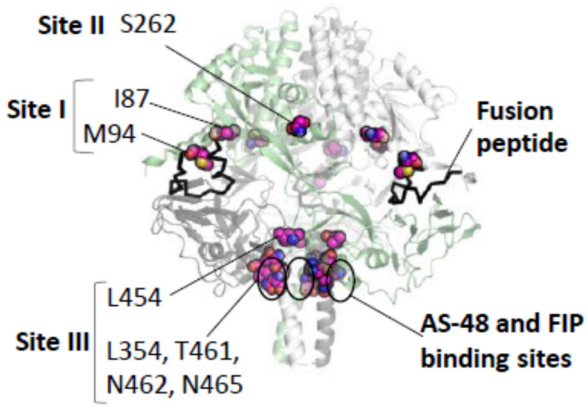


図 2. 麻疹ウイルス F 蛋白質の構造不安定化と融合能亢進を起こすアミノ酸残基［4］

F 蛋白質の構造不安定化と融合能亢進を起こすアミノ酸残を 3 量体構造の上にマップした。これらの残基は 3 個所（Site Ⅰ～Ⅲ）に集中している。Fusion peptide の位置および阻害剤の結合部位も示す。

4. 麻疹ウイルスの神経細胞感染機構

膜融合能が亢進する F 蛋白質変異（T461 I ）を導入した GFP 発現組換え麻疹ウイルスを、神経細胞に分化したヒト細胞株 NT2 に感染させたところ、感染性ウイルス粒子はほとんど産生されず、細胞融合による合胞体形成も観察されなかったが、GFP の伝播は観察できた（図 3A）。共焦点顕微鏡を用いて time-lapse 観察をしたところ、感染細胞から神経線維によって接触した他の細胞へ伝播していた。一方、野生型の F 蛋白質を持つ GFP 発現組換え麻疹ウイルスを感染させた場合は、感染した細胞から他の細胞に GFP が伝播することはなかった。さらに、GFP だけでなく、ウイルス蛋白質産生も野生型より T461 I 変異ウイルスで強く認められた（図 3B）。

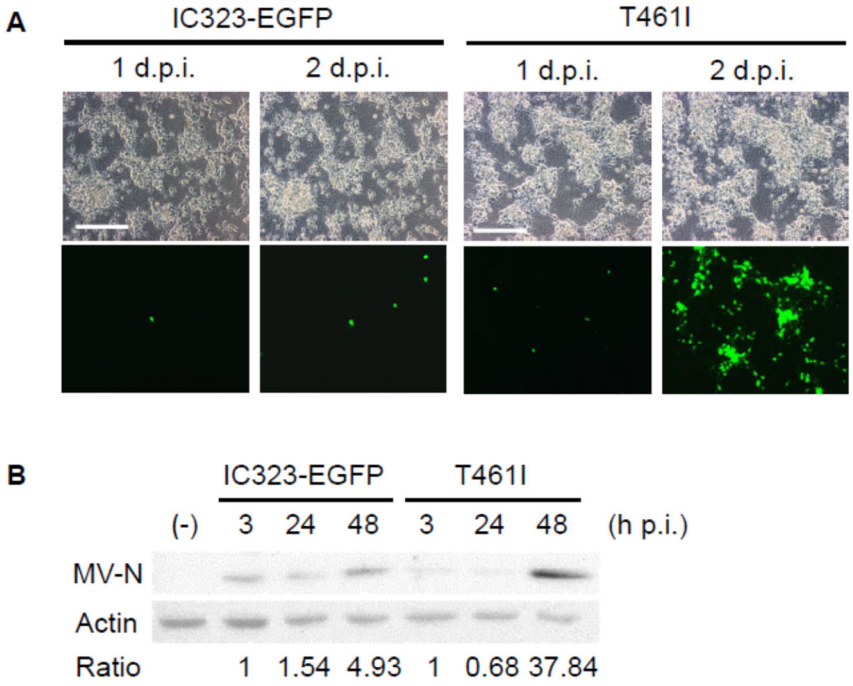


図 3. 組換え麻疹ウイルスの神経細胞伝播［1］

（A）ニューロンに分化させた NT2 細胞に GFP を発現する野生型麻疹ウイルス（IC323-EGFP）と F 蛋白質に T461 I 変異をもつウイルスを感染させた。変異ウイルスのみ感染 2 日後（2 d. p. i）に広範に周りの細胞に伝播した。スケールバーは250 μm を示す。(B)それぞれのウイルスが感染してから3、24、48時間後(h p. i.)の麻疹ウイルスN蛋白質(MV-N)の産生を Western blot で検出した。アクチン量で補正した相対値も示す。

膜融合能が亢進した麻疹ウイルスの神経細胞間の GFP 伝播は、FIP で阻害された。さらに、精製した麻疹ウイルス H 蛋白質でマウスを免疫し、単クローン抗体を作成した。SLAM を介した感染を中和できる抗 H 蛋白質単クローン抗体 4 種のうち、2 つは T461 I 変異ウイルスの NT2 細胞間伝播を阻害したが、1 つは阻害できなかった。他の一つは、SLAM を介した感染に対する中和活性は強くなかったが、NT2 細胞での伝播は効率よく阻害した。以上のことから、麻疹ウイルスは感染ヒト神経細胞に合胞体を形成することなく、感染細胞から神経線維を介して他の細胞に伝播し、それには H 蛋白質と膜融合能が亢進した F 蛋白質が不可欠であると考えられた。また、H 蛋白質と特異的に結合する未知の神経細胞受容体が存在することが示唆された［1]。

5. ムンプスウイルス受容体の構造

ムンプスウイルスとシアル酸のアナログの共結晶を作成し、X 線構造解析を行ったところ、α2, 3 結合型シアル酸を持つアナログは共結晶を作ったが、α2, 6 結合型のものは作らなかった。さらに、共結晶を詳細に検討すると、末端のシアル酸だけでなく 3 番目の糖鎖もムンプスウイルス HN 蛋白質の特定のアミノ酸残基と相互作用していることが分かった。その残基を変異させると膜融合をサポートする能力が失われた。これらの結果から、末端に α2, 3 結合型シアル酸を持つ 3 糖がムンプスウイルスの機能的受容体であると考えられた［5]。この結果は、多数の糖鎖をもつグリカンアレイを用いた結合実験でも確認された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学大学院医学研究院ウイルス学研究室の橋口隆生、福田吉成、佐藤裕真、久保田万理恵である。

文　献

1) Sato Y, Watanabe S, Fukuda Y, Hashiguchi T, Yanagi Y, Ohno S. Cell-to-Cell Measles Virus Spread between Human Neurons Is Dependent on Hemagglutinin and Hyperfusogenic Fusion Protein. J Virol. 2018 Feb 26;92(6). pii: e02166-17. doi: 10.1128/JVI.02166-17. Print 2018 Mar 15. PMID:29298883

2) Richardson CD, Scheid A, Choppin PW. Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. Virology. 1980 Aug;105(1):205-22. PMID:7414950

3) Plemper RK, Doyle J, Sun A, Prussia A, Cheng LT, Rota PA, Liotta DC, Snyder JP, Compans RW. Design of a small-molecule entry inhibitor with activity against primary measles virus strains. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Sep;49(9):3755-61. PMID:16127050

4) Hashiguchi T, Fukuda Y, Matsuoka R, Kuroda D, Kubota M, Shirogane Y, Watanabe S, Tsumoto K, Kohda D, Plemper RK, Yanagi Y. Structures of the prefusion form of measles virus fusion protein in complex with inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Mar 6;115(10):2496-2501. doi: 10.1073/pnas.1718957115. Epub 2018 Feb 20. PMID:29463726

5) 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 α2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Oct 11;113(41):11579-11584. Epub 2016 Sep 26. PMID:27671656