

日本臨牀 第45巻・第10号（昭和62年10月号）別冊

特集：ウイルス病の制圧とワクチン

ムンプスウイルス

鶴留雅人 菱山美智子 山田章雄
伊藤康彦

[II] ヒト病原ウイルスの感染防御抗原

感染防御抗原とコード遺伝子

—分子生物学的解析研究の動向と進歩—

i. ムンプスウイルス

鶴留雅人* 菱山美智子** 山田章雄**

伊藤康彦*

はじめに

ムンプスウイルスはパラミクソウイルス属に属し、耳下腺炎や髄膜炎を主徴とする全身感染症の病原体である。ウイルスの外被(エンベロープ)には2種類の糖蛋白が存在し、病原性発現に重要な働きをしている。また、生体の特異的感染防御反応は、おもにこれらの蛋白に対して向けられていると思われる。このウイルスは、比較的古くから研究の対象として扱われてきたが、他のパラミクソウイルス、たとえばセンダイウイルス等と比べると、分子生物学的な解析は遅れているのが現状である。本稿では、両糖蛋白について、今までに得られた知見を紹介し、これらの機能について考えてみたい。

I. ウイルス糖蛋白(Hemagglutinin-Neuraminidase ; HN 蛋白と Fusion ; F 蛋白)

1. 一般的性状¹⁾

HN 蛋白は分子量 74~80 K で、赤血球凝集(Hemagglutination ; HA)活性およびノイラミニダーゼ(Neuraminidase ; NA)活性を示す。F 蛋白は分子量 65~74 K で、宿主細胞由来の蛋白分解酵素によって F₁ (58~61 K) および F₂ (10~16 K) の両サブユニットに解裂し、溶血、膜融合(本稿では、エンベロープと細胞膜との融合を指す)あるいは細胞融合(細胞膜と細胞膜

との融合を指す)等の活性を示す。ウイルスは、HN 蛋白の HA 活性を介して細胞の受容体に結合することにより、感染を開始する。その後、F 蛋白の膜融合活性によりエンベロープと細胞膜との融合が起こり、ウイルス核酸が細胞質内に侵入する。HN 蛋白の NA 活性の機能については、まだ十分には明らかでないが、受容体を破壊する作用があることから、細胞からのウイルス放出およびウイルスの自己凝集の阻止に関与すると考えられている。

2. 蛋白のコード遺伝子と一次構造

ムンプスウイルスのゲノム RNA は、HN および F 蛋白を含めて少なくとも6種類の構造蛋白をコードしていると推定されるが、現在のところ、塩基配列の明らかになった領域はない。Server ら²⁾ は、F 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて F 蛋白のアフィニティー精製を行い、F₁ および F₂ サブユニットの N 末端のアミノ酸配列を決定した。図 1²⁾ に示すように、F₁ サブユニットの N 末端のアミノ酸配列を他のパラミクソウイルスのそれと比較すると、極めて類似性の高いことがわかった。センダイウイルス等でよく解析されているように、この部分は疎水性が強く、F 蛋白の溶血活性や膜融合活性の発現に重要な領域である。また、この疎水性領域は調べられたパラミクソウイルスの F 蛋白の間でよく保存されており、これらのウイ

* Masato TSURUDOME, Yasuhiko ITO : 三重大学医学部・微生物学

** Michiko HISHIYAMA, Akio YAMADA : 国立予防衛生研究所・麻疹ウイルス

	1	5	10	15	20
ムンプスウイルス	Phe-Ala-Gly-Ile-Ala-Ile-Gly-Ile-Ala-Ala-Leu-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Gln-Val-Thr-				
SV 5	— Ala — Val-Val — — Leu-Ala — — — Val — — Ala — — Val —				
NDV	— Ile — Ala-Ile — — Gly-Val — — — Val — — Ala — — Ile —				
センダイウイルス ₁	— Phe — Ala-Val — — Ile-Ile — — — Pro — —				
センダイウイルス ₂	— Phe — Ala-Val — — Thr-Ile — — — Val — — Ala — — Ile —				
センダイウイルス ₃	— Phe — Ala-Val — — Thr-Ile — — — Val — — Ser — — Ile —				

図1 ムンプスウイルスと他のパラミクソウイルスの F₁ サブユニットの N 末端のアミノ酸配列の比較(一線部はすべてのウイルスで一致している) (Server ら²⁾ による)

ルスの存続にとって必要な領域であると考えられている。

3. 蛋白の機能と病原性

センダイウイルスやニューカッスル病ウイルス(NDV)の F 蛋白は、その解裂と病原性あるいは膜融合活性とが密接に関連しているが、ムンプスウイルスの F 蛋白では、このような関連性は明らかでない。一方、Merz と Wolinsky³⁾によると、NA 活性の弱いウイルス株ほど細胞変性効果が強く、中枢神経に対する病原性も強い傾向があるという。ここで細胞変性効果というのは、細胞融合(巨細胞形成)のことで、ウイルス増殖の過程で合成された F 蛋白による、細胞膜と細胞膜との融合を意味する。彼らの用いた株は、細胞融合活性の有無に関わらず多段増殖し、また、いずれの株も F 蛋白が解裂していることがその後発表された⁴⁾。細胞融合活性のない株に感染した細胞を蛋白分解酵素(キモトリプシン)処理して、特異的に HN 蛋白をのぞいてやると、細胞融合が起こることもわかった⁵⁾。興味深いことに、この処理では、細胞からのウイルス放出量には変化が認められなかった。Waxham と Wolinsky⁶⁾は、NA の阻害剤である 2-deoxy-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminic acid (DANA)を用いて、NA 活性のない変異株を選別することに成功した。この変異株を、低温でトリ赤血球に結合させた後、温度を上げてウイルスを放出させたところ、ウ

イルス放出量は、親株に比べて格段に低下していた。この変異株は、NA 活性が強く細胞融合活性のない親株とは異なり、細胞融合活性を示した。なお、いずれの株も多段増殖をした。

以上の知見から以下のことが考えられる。

1) HN 蛋白は、HA 活性を介して細胞の受容体に結合することにより、F 蛋白による膜融合に寄与するだけではなく、NA 活性を介して F 蛋白による細胞融合を修飾(抑制)するものと思われる。

2) NA 活性がなくてもウイルスの多段増殖は十分に起こることから、膜融合は細胞融合とは異なり、NA 活性による修飾は受けないと思われる。このことは、膜融合と細胞融合の機構の相違を反映しているのかもしれない。

3) NA 活性の低いウイルス株は、一旦放出されても細胞の受容体と再結合しやすいため放出量が少なく、その結果、蓄積したウイルスにより細胞融合が起きやすくなるとも考えられる。しかし、この放出と細胞融合との関連はまだ明らかでない。また、ウイルスが細胞外から作用して細胞融合を起こす現象は、通常、濃縮した多量のウイルスが必要とされる極めて人工的なものであり、放出されたウイルスが直接細胞に作用して細胞融合を起こすことは考えにくい。今後の研究に期待されることである。

4. モノクローナル抗体(MAb)による解析

ムンプスウイルスの HN 蛋白や F 蛋白に対

表 1 HN 蛋白に対する MAb の抗体活性(Örvell⁷⁾より改変)

MAb No.	アイソタイプ	抗体価						
		ELISA	HI	NI ^a	NI ^b	HLI	中和	
1,933	1	IgM	10 ⁴	<5	<4	<4	<10	<4
2,068		IgG 2 a	10 ⁴	<5	<4	<4	<10	<4
2,015		IgG 1	10 ⁵	<5	<4	<4	<10	<4
2,170		IgG 1	10 ⁵	<5	<4	<4	<10	<4
1,992	2	IgG 2 a	10 ⁵	<5	<4	<4	1,280	16
5,374		IgG 1	10 ⁵	<5	<4	<4	1,280	16
2,041	3	IgG 1	10 ⁶	1,280	256	<4	1,280	512
5,500		IgG 2 a	10 ⁶	2,560	256	<4	2,560	1,024
2,072		IgG 1	10 ⁶	2,560	256	256	2,560	512
2,073		IgG 1	10 ⁵	1,280	128	64	640	256
2,075		IgG 1	10 ⁵	1,280	128	128	1,280	256
2,034	4	IgG 1	10 ⁵	<5	64	32	320	64
2,082		IgG 1	10 ⁵	<5	16	16	320	32
5,342		IgG 2 a	10 ⁵	<5	64	64	640	128

^a ノイラミニダーゼの基質としてフェツインを用いた。

^b ノイラミニダーゼの基質としてノイラミンラクトースを用いた。

表 2 F 蛋白に対する MAb の抗体活性(Örvell⁷⁾より改変)

MAb No.	アイソタイプ	抗体価				
		ELISA	HI	NI ^a	HLI	中和
1,103	IgG 1	10 ⁵	<5	<4	10	<4
2,049	IgG 1	10 ⁴	<5	<4	<10	<4
2,109	IgG 1	10 ⁴	<5	<4	<10	<4
2,117	IgG 2 b	10 ⁴	<5	<4	10	<4
2,155	IgG 1	10 ⁵	<5	<4	<10	<4
2,159	IgG 1	10 ⁵	<5	<4	<10	<4
5,369	IgG 1	10 ⁵	<5	<4	20	<4
5,414	IgG 2 a	10 ⁶	<5	<4	80	<4
5,418	IgG 2 a	10 ⁶	<5	<4	40	<4
5,439	IgG 2 a	10 ⁵	<5	<4	<10	<4
5,519	IgG 2 b	10 ⁵	<5	<4	<10	<4
5,525	IgG 2 a	10 ⁶	<5	<4	<10	<4

^a ノイラミニダーゼの基質としてフェツインを用いた。

する MAb に関しては、いくつかの報告があるが、Örvell⁷⁾によるものが代表的なものであろう。彼の得た MAb の、ウイルスの生物活性に対する抑制能(抗体価で表した)を、表 1⁷⁾および表 2⁷⁾に示す。なお、MAb の量は ELISA での抗体価で表してある。HN 蛋白に対する MAb は、HA 活性の抑制(HI)、NA 活性の抑制(NI)および溶血活性の抑制(HLI)、これら 3

種類の抑制能の有無で、表 1 のように 4 つのグループに分けられた。なお、(3)のグループには基質の違いにより NI を示さない MAb が含まれる。ウイルス中和能は HI を示す(3)のグループの MAb が最も強く、ウイルスの HN 蛋白と細胞の受容体との結合を阻害することが、有効な中和に結びついていると思われる。これは HA 活性を持つほかのウイルスの場合と同

様である。HIを示さずNIのみを示す(4)のグループのMAb, また, HIもNIも示さない(2)のグループのMAbも中和能を示した。これらのMAbはウイルスと細胞との結合を阻止できないと思われるが, いずれも比較的強いHLIを示すので, おそらく, 結合後に起こる膜融合(F蛋白による)に影響するために, ウイルスが細胞に侵入できないものと想像される。F蛋白に対するMAbは, 比較的弱いHLI以外にはウイルスに対する抑制能を示さなかった(表2)。

著者らの得たMAbに関しても, 以上と同様の結果が得られている⁸⁾。ところで, 前項では,

HN蛋白のNA活性が細胞融合を抑制することについて述べたが, 著者らは, MAbを用いて, HN蛋白と細胞融合に関する別の所見を得た⁸⁾。すなわち単層細胞培養において, すべての細胞が感染する濃度でウイルスを吸着させ, 6時間後に培養上清中にMAbを加えて, その後に起こる細胞融合を抑制するかどうかを調べてみた。その結果, HN蛋白に対する6つのMAbのうち, 3つが細胞融合の抑制(FI)を示した。FIの強さと, HI, NIおよび中和の強さとは関連が認められなかった。FIが際だって強いMAbはÖrvell⁷⁾の(4)のグループのMAbと似た性

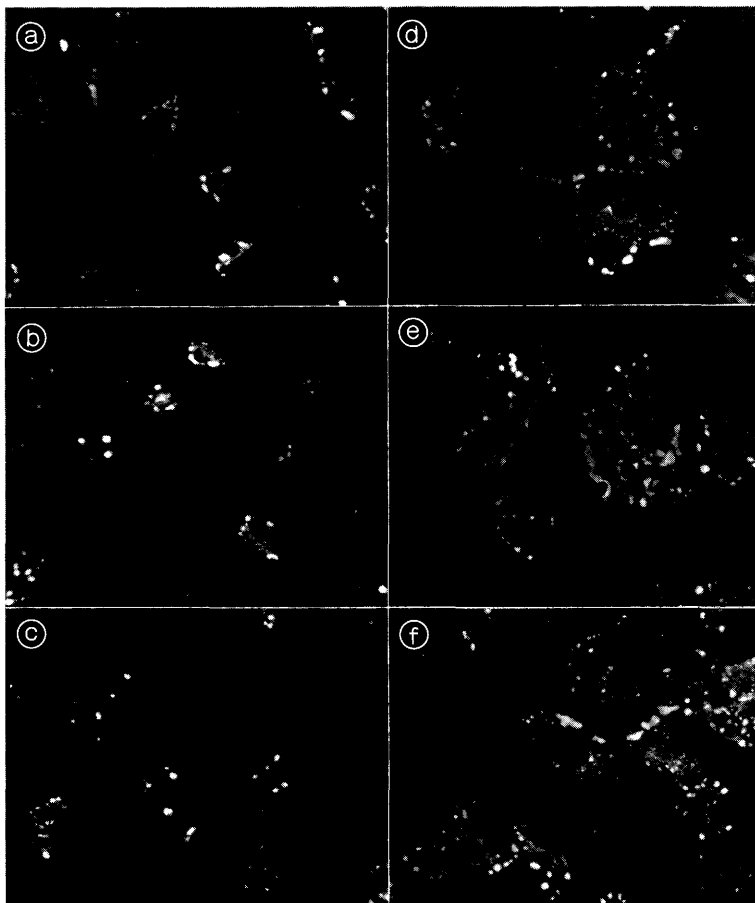


図2 HN蛋白に対するMAbによるウイルス感染拡大の抑制
(Tsurudomeら⁸⁾による)

a, b, c, : FIを示すMAb
d, e, f, : FIを示さないMAb

質を持ち、中等度の NI を示した。細胞融合が始まってからでも、この MAb を加えることで融合の進行は抑制された。なお、F 蛋白に対する 3 つの MAb を得たが、いずれも FI を示さなかった。次に、ウイルス感染の拡大に対する MAb の効果を調べてみた。実験は、細胞約 10 個当たり 1 個のウイルスが吸着する条件でおこない、ウイルス抗原の検出には直接蛍光抗体法を用いた。図 2⁸⁾ に示すように、HN 蛋白に対する MAb のうち、FI を示す 3 つの MAb を添加することにより、ウイルス抗原は、最初に感染した細胞のみに封じ込められ、近傍の細胞への感染拡大が抑えられることがわかった。

MAb を用いて得られた以上の知見からも、HN 蛋白が細胞融合という現象に積極的な役割を果たしている可能性は高いと考えられる。HN 蛋白は、細胞融合を抑制する NA 活性以外にも、細胞融合に促進的に関与する未知の機能(領域)を持っている可能性があり、特定の MAb がこの領域の近傍に結合することにより細胞融合を抑制するのかもしれない。

おわりに

以上のように、ムンプスウイルスでは、F 蛋白が担っている細胞融合活性に対して、HN 蛋白が促進的にも抑制的にも関与していると思われる。他のパラミクソウイルスでは、HN 蛋白が細胞融合を抑制するという例はない。Sendai ウイルスの HN 蛋白が膜融合や細胞融合の発現に重要な機能を果たすという報告が一部の研究グループによりなされてはいるが⁹⁾⁻¹¹⁾、一般にパラミクソウイルスでは、細胞融合における HN 蛋白の積極的な関与は考えられていない。ムンプスウイルスが例外であるのか否かは今後の重要な研究課題であると思われる。

参 考 文 献

1) Wolinsky, J.S. & Server, A.C.: Mumps virus. In: *Virology* (ed. by Fields, B.N. et al.), Raven Press, New York, p. 1255-

- 1284, 1985.
- 2) Server, A.C. et al.: Purification and amino-terminal protein sequence analysis of the mumps virus fusion protein. *Virology* **144**: 373-383, 1985.
- 3) Merz, D.C. & Wolinsky, J.S.: Biochemical features of mumps virus neuraminidases and their relationship with pathogenicity. *Virology* **114**: 218-227, 1981.
- 4) Merz, D.C. et al.: Biosynthesis of mumps virus F protein: Non-fusing strains efficiently cleave the F glycoprotein precursor. *J. Gen. Virol.* **64**: 1457-1467, 1983.
- 5) Merz, D.C. & Wolinsky, J.S.: Conversion of nonfusing mumps virus infections by selective proteolysis of the HN glycoprotein. *Virology* **131**: 328-340, 1983.
- 6) Waxham, M.N. & Wolinsky, J.S.: A fusing mumps virus variant selected from a nonfusing parent with the neuraminidase inhibitor 2-deoxy-2, 3-dehydro-N-acetylneuraminic acid. *Virology* **151**: 286-295, 1986.
- 7) Örvell, C.: The reactions of monoclonal antibodies with structural proteins of mumps virus. *J. Immunol.* **132**: 2622-2629, 1984.
- 8) Tsurudome, M. et al.: Monoclonal antibodies against the glycoproteins of mumps virus: Fusion inhibition by anti-HN monoclonal antibody. *J. Gen. Virol.* **67**: 2259-2265, 1986.
- 9) Citovsky, V. & Loyter, A.: Fusion of Sendai virions or reconstituted Sendai virus envelopes with liposomes or erythrocyte membranes lacking virus receptors. *J. Biol. Chem.* **260**: 12072-12077, 1985.
- 10) Gitman, A.G. et al.: Use of virus-attached antibodies or insulin molecules to mediate fusion between Sendai virus envelopes and neuraminidase-treated cells. *Biochemistry* **24**: 2762-2768, 1985.
- 11) Miura, N. et al.: HVJ (Sendai virus)-induced envelope fusion and cell fusion are blocked by monoclonal anti-HN protein antibody that does not inhibit hemagglutination activity of HVJ. *Exp. Cell Res.* **141**: 409-420, 1982.