

機関番号：14101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590470
 研究課題名（和文） パラミクソウイルスの膜融合における受容体結合蛋白と膜融合蛋白の相互作用の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular Mechanism of Interaction between the Receptor-binding Protein and Fusion Protein during Membrane Fusion Caused by the Paramyxoviruses
 研究代表者
 鶴留 雅人 (TSURUDOME MASATO)
 三重大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：50159042

研究成果の概要（和文）：

パラミクソウイルスは、そのウイルス膜（エンベロープ）と宿主細胞膜との膜融合を誘導することによって、細胞に侵入する。この膜融合はエンベロープ表面に存在する受容体結合蛋白と膜融合蛋白との相互作用によって引き起こされることが分かっている。本研究では、2種類のパラミクソウイルス(PIV5 と SV41)の膜融合蛋白のキメラを多数作製して解析することにより、膜融合蛋白のどの領域が受容体結合蛋白と相互作用するために必要であるのかを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The paramyxoviruses mediate membrane fusion between viral envelope and host cell membrane, which leads to entry of the virus into cells. This membrane fusion is caused by an interaction between the attachment protein and fusion protein on the viral envelope. In the study presented here, I carried out chimeric analysis of the fusion proteins of two paramyxoviruses (PIV5 and SV41) and identified the domains that are required for the fusion protein to interact with the attachment protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：パラミクソウイルス, パラインフルエンザウイルス, HN蛋白, F蛋白, 受容体, 細胞融合, 多核巨細胞, 蛋白間相互作用

1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス亜科に属するウイルスには、麻疹、流行性耳下腺炎、あるいはパラインフルエンザといった重要な小児感染症の病原ウイルスに加え、致死率の高い人獣共通感染症の原因となるニパウイルスやヘンドラウイルスが含まれる。

この亜科のウイルスはそのエンベロープに2種類の糖蛋白、すなわち受容体結合蛋白(H, HNあるいはG:ウイルス属によって名称が異なる)と膜融合蛋白(F)を持っており、細胞に感染する際には、まず受容体結合蛋白を介して細胞に結合し、次にF蛋白が構造変化をおこすことによ

ってエンベロープと細胞膜とを融合させる。この膜融合は pH 非依存性であるため、場合によっては感染細胞表面に発現した F 蛋白は隣接する非感染細胞との膜融合（細胞融合あるいは多核巨細胞形成）を誘導し、その結果、感染の拡大と同時に細胞傷害が引き起こされる。なお F 蛋白が構造変化を起こすためには、細胞由来の蛋白分解酵素により、ジスルフィド結合した 2 つのサブユニット (F1 と F2) に解裂することが前提となる。

1980 年代の末頃までは、受容体結合蛋白の役割とは受容体へ結合することだけであり、膜融合は F 蛋白単独で誘導されると考えられていた。しかしその後、私の研究グループ (Virology 206, 1117-1125, 1995; J. Virol. 71, 9855-9858, 1997) および国内外の複数の研究グループにより、膜融合の誘導には「受容体結合蛋白と F 蛋白とのウイルス特異的な相互作用」が必要であることが立証された。これは、1 種類のエンベロープ蛋白が受容体結合能と膜融合誘導能を具有している他の大部分のエンベロープウイルスとは対照をなす、パラミクソウイルスに特徴的な膜融合誘導機構である。すでに 12 年前、私たちはヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) とシミアンウイルス 41 (SV41) の受容体結合蛋白 (HN) のキメラ解析を行い、これらの HN 蛋白のストーク(茎)領域が F 蛋白との相互作用に関与することを見出している (Virology 213, 190-203, 1995)。時を同じくして米国の 2 つの研究グループが、HPIV3、センダイウイルス (SeV) およびニューカッスル病ウイルス (NDV) の HN 蛋白についても同様の結果を報告しており、爾来 HN 蛋白のストーク領域が F 蛋白との相互作用に関わることを支持する報告が相次いでいる。さらに近年では、麻疹ウイルスの受容体結合蛋白 (H) についても、そのストーク領域の関与が指摘されている。一方、X 線結晶構造解析により、パラインフルエンザ 5 型ウイルス (PIV5)、NDV および HPIV3 の HN 蛋白の頭部領域の立体構造が解明され、受容体結合部の位置も同定されたが、ストーク領域の立体構造はいずれの HN 蛋白でも不明であり、この領域がどのような様式で F 蛋白と相互作用するのかは依然として謎である。他のエンベロープウイルスと同様、パラミクソウイルスによる膜融合についての研究も近年急速に進展しており、最も有力な仮説によれば、まずエンベロー

プあるいは感染細胞の表面に形成された「受容体結合蛋白と F 蛋白の複合体」が標的膜表面の受容体に結合する。次にこの結合が引き金となって F 蛋白が「HN-F 複合体」から離脱して構造変化を起こすことにより、膜融合を誘導するとされている。しかし、この仮説を検証するためには、多くの解決すべき課題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、(1) F 蛋白のどの領域が受容体結合蛋白との相互作用に関わっているのか？ (2) 受容体結合蛋白と F 蛋白の相互作用によって F 蛋白に何がおこるのか？ という最も重要と見なされる 2 つの課題を追究することを計画した。すでに私たちは HPIV2 と SV41 の F 蛋白のキメラ解析により、HPIV2 の F 蛋白の F1 中央領域が HPIV2 の HN 蛋白との相互作用に関わっていることを報告しているが (J. Gen. Virol. 79, 279-289, 1998)、この F1 中央領域は F 蛋白の 27% を占める長い領域であり、さらに絞り込む必要があった。しかし、HPIV2 の HN 蛋白は SV41 の F 蛋白との共発現でも弱い細胞融合を誘導したこと、また、一次構造に基づいて (細胞融合誘導能を持つ) 複雑なキメラを作製することが難航したことから、この絞り込みは頓挫した。ただし現在に至るまで、パラミクソウイルスの F 蛋白のキメラ解析の研究報告はどこからもなされていない。このような状況下で、昨年米国の研究グループにより、PIV5 の F 蛋白の立体構造が解明されたことから (Yin et al., Nature 439, 38-44, 2006)、本研究ではこの立体構造に基づいてキメラ解析を再開することにより、まず前述の課題 (1) を追究することを計画した。一方、興味深いことに、PIV5 (W3A 株) の F 蛋白は HN 蛋白と相互作用しなくても単独で細胞融合を誘導できることが知られていた (Paterson et al. PNAS 82, 7520-7524, 1985)。しかし私たちは、別の株 (WR) の F 蛋白による細胞融合誘導には PIV5 の HN 蛋白が必要であること、ただし WR 株の F 蛋白の Leu-22 を W3A 株の F 蛋白と同じアミノ酸 (Pro) で置換した変異 F 蛋白 (L22P) は単独で細胞融合を誘導できることを見出した (J. Virol. 71, 9855-9858, 1997)。さらに、WR 株の F 蛋白と L22P の立体構造が解裂の前後で相互に異なることから、PIV5 の F 蛋白が少なくとも 4 種類の立体構造をとりうることを明らかにした (Virology 347, 11-27, 2006)。な

お、解裂前のWR株のF蛋白および解裂後のL22Pの構造は、近年米国の研究グループにより解明された構造変化開始前および構造変化終了後のF蛋白のX線結晶構造(Yin et al., PNAS 102, 9288-9263, 2005; Yin et al., Nature 439, 38-44, 2006)にそれぞれ相当する。以上のことから、前述の課題(2)を追究するためには、これらの研究結果と情報に基づいてPIV5のHN蛋白とF蛋白を対象とした解析を行うことが最適であると考えられる。

3. 研究の方法

1. PIV5とSV41のF蛋白のキメラ解析を行うことにより、F蛋白のどの領域が受容体結合蛋白との相互作用に関わっているのかを明らかにする。具体的にはまずPIV5のF蛋白の立体構造における「F1中央領域」の位置を明らかにし、その中央領域内でF蛋白(3量体)の表面に露出している部分を同定する。次にこの露出部分を複数の小さなドメインに区分けして、これらを単独にあるいは組み合わせてSV41のF蛋白の相同なドメインに置き換える。そして、その結果作製されたキメラF蛋白とSV41のHN蛋白をHeLa細胞に共発現させて細胞融合を誘導するかどうかを調べることで、HN-F相互作用に関わるF蛋白上のドメイン(群)を同定する。

2. PIV5のF蛋白やキメラF蛋白の解裂配列をSeVの解裂配列(トリプシン解裂型)で置換した変異F蛋白を用いて、HN蛋白とF蛋白の相互作用の分子機構およびその結果誘導されるF蛋白の構造変化の分子動態を明らかにする。HN-F複合体における蛋白間の結合様式は不明であるが、複合体が形成されてからF蛋白が離脱するまでの過程で、その結合の強さが変動することが予想される。すなわち免疫共沈法において、界面活性剤の種類や濃度に依存してHN-F複合体の可溶化効率が異なることが予想される。そこで、この種の実験に通常用いられるラウリルマルチドを含めた種々の界面活性剤を用いて発現細胞を可溶化し、免疫共沈法を行うことにより、細胞融合誘導過程でF蛋白が離脱するまでの各段階におけるHN-F複合体の結合性を比較する。

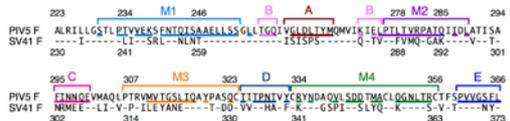
3. F蛋白の構造変化とF蛋白の分子内ジスルフィド結合の再編成との関連性を調べる。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のEnvの構造変化すなわち膜融合誘導に

は、これらの膜融合蛋白の分子内ジスルフィド結合が再編成されることが必要であるといわれている。また、この再編成は宿主細胞表面に存在するジスルフィドイソメラーゼファミリーの酵素により媒介されることもわかっている。そこで、これらの酵素の活性をDTNBなどの阻害剤で抑制することにより、F蛋白の構造変化のどの段階で分子内ジスルフィド結合の再編成が起こるのかを明らかにする。

4. 以上の結果を総合して考察し、2種類のエンベロップ蛋白によるパラミクソウイルスの膜融合の分子機構に関する既存の仮説を検証する。

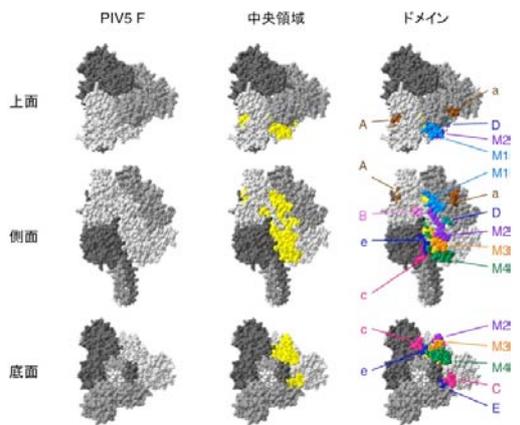
4. 研究成果

1. HPIV2とPIV5のF蛋白のアミノ酸配列のアラインメントを行い、PIV5のF蛋白の一次構造におけるF1中央領域(aa.223-366)を同定した(図1)。



(図1)

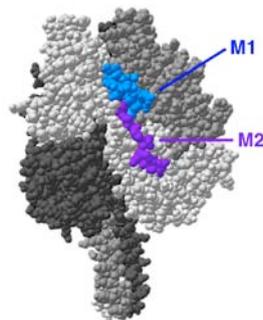
2. 次に分子モデルを作成してPIV5のF蛋白3量体の立体構造におけるF1中央領域の位置を視覚化し、この領域のうち3量体表面に露出しているアミノ酸群の位置を明らかにした。さらに、3量体表面に露出しているF1中央領域のアミノ酸群を9個のドメイン(M1-M4, A-E)に区分けした。この区分けに際しては、各ドメインが少なくとも10個の露出したアミノ酸から構成されていること、ドメイン両端のアミノ酸群がPIV5とSV41のF蛋白間で保存されていることを条件とした(図2)。



(図2)

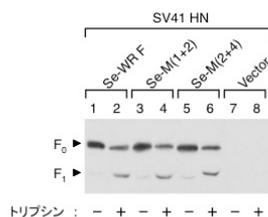
3. 前項(2)で区分けした PIV5 の F 蛋白上のドメインを単独に、あるいは組み合わせて SV41 の F 蛋白の相同ドメインで置き換えたキメラ F 蛋白群を作製した。これらのキメラ F 蛋白と SV41 の HN 蛋白を HeLa 細胞に共発現させたところ、2つのドメイン(M1とM2)を SV41 の F 蛋白のものに置き換えたキメラ F 蛋白, M(1+2), が細胞融合を誘導することが判明した。また、3つのドメイン(M1, M2 および M4)を SV41 の F 蛋白のものに置き換えたキメラ F 蛋白も SV41 の HN 蛋白との共発現で細胞融合を誘導したが、微弱ながら HN 非依存性の細胞融合誘導能を示すことが判明した。なお、これら2つのキメラ F 蛋白は PIV5 の HN との共発現でも細胞融合を誘導する能力を維持していた。

以上の結果から、F 蛋白上の M1 ドメイン(aa.234-246)と M2 ドメイン(aa.278-285)が HN 蛋白との相互作用に関わっていることが示唆された(図3)。



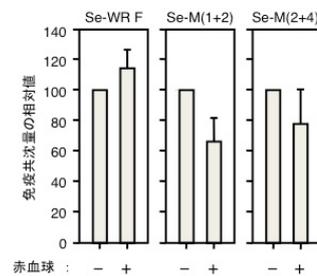
(図3)

4. M(1+2)のトリプシン解裂型である Se-M(1+2)を作製し、免疫共沈法により SV41 の HN 蛋白との結合性を調べたところ、Se-M(1+2)と SV41 の HN 蛋白との結合性は、解裂の前後に関わらず、トリプシン解裂型の PIV5 の F 蛋白(Se-WRF)と SV41 の HN 蛋白との結合性と同程度であることが明らかになった(図4)。



(図4)

次に、細胞表面に HN 蛋白の受容体を持つモルモット赤血球を発現細胞に重層して解析した結果、受容体結合後に Se-M(1+2)が SV41 の HN 蛋白から離脱することが明らかとなった(図5)。



(図5)

5. 上記の実験系では、マイルドな界面活性剤であるラウリルマルトシドを用いて発現細胞を可溶化し、SV41 の HN 蛋白に対する抗体を用いた免疫共沈法を行なっている。この沈降物をドデシル硫酸ナトリウムで処理して F 蛋白と HN 蛋白の結合の強さを調べたところ、解裂後の Se-M(1+2)と Se-WRF の SV41 の HN 蛋白に対する結合性は解裂前に比べて明らかに弱かったが、両者に明らかな相違点は認められなかった。

以上の結果から、F 蛋白は HN 蛋白と結合するだけでは細胞融合を誘導できないことが明らかになった。従って、細胞融合誘導に関わる F 蛋白の構造変化は HN 蛋白から離脱する際に HN 蛋白によって引き起こされること、またそのためには F 蛋白の2つのドメイン(M1とM2)が重要な役割を果たすことが示唆された。

6. 宿主細胞表面に存在するジスルフィドイソメラーゼファミリーの酵素による分子内ジスルフィド結合の再編成が F 蛋白の構造変化すなわち膜融合誘導に必要なかを調べるために、HPIV5 の HN 蛋白と F 蛋白を HeLa 細胞に発現させ、これらの酵素の活性を DTNB やバシトラスンで阻害したところ、膜融合に対する抑制は認められなかった。従って、F 蛋白の構造変化は HIV の Env などとは異なり、分子内ジスルフィド結合の再編成を必要としないことが明らかになった。

7. PIV5 の F 蛋白の5つのドメイン(M1, M2, M3, M4およびB)を SV41 の F 蛋白の相同ドメインで置換したキメラ F 蛋白は、SV41 の HN 蛋白と共発現させると膜融合

を誘導できるが、PIV5のHN蛋白との共発現では膜融合を誘導できなくなっていた。すなわち、これらのドメインがHN蛋白との特異的な機能的相互作用を規定していることが明らかになった。

本研究により、HN蛋白とF蛋白の機能的相互作用においてF蛋白のHN蛋白特異性を規定するドメインが同定されたことから、膜融合の分子機構の研究領域にパラダイムシフトがもたらされるものと考えられる。一方、HN蛋白とF蛋白の物理的な相互作用を解析するためには、免疫共沈法などの従来の手法には限界があり、より繊細な手法（フォトクロスリンク法など）を用いて行なう必要があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- 1) Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nakahashi M, Kawano M, Komada H, Nosaka T, and Ito Y. Identification of domains on the fusion (F) protein trimer that influence the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the F protein in mediating cell-cell fusion. *J. Virol.* 85: 3153-3161. (2011) 査読有.
- 2) Nishio M., Tsurudome M, Garcin D, Kimada H, Ito M., Lemercier P, Nosaka T, and Kolakovsky D. Human parainfluenza virus type 2 L protein regions required for interaction with other viral proteins and mRNA capping. *J. Virol.* 85: 725-732. (2011) 査読有.
- 3) Komada H, Kawano M, Uefuji A, Ito M, Tsurudome M, Hatakeyama E, Nakanishi M, Sakue S, Joh S, Suzumura E, Tamaki T, Tomioka T, Nishio M, Tsumura H, Uematsu J, Yamamoto H, O'Brien M, Bando H, and Ito Y. Completion of the full-length genome sequence of human parainfluenza virus types 4 A and 4B: sequence analyses of the large protein genes, and gene start, intergenic and end sequences. *Arch. Virol.* 156: 161-166. (2011) 査読有.
- 4) Yamamoto H, Ura Y, Tanemura M, Koyama A, Takano S, Uematsu J, Kawano M, Tsurudome M, O'Brien M, and Komada H. Inhibitory effect of bovine lactoferrin on human parainfluenza virus type 2 infection. *J. Health Sci.* 56: 613-617. (2010) 査読有.
- 5) Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Ito Y, and Tsurudome M. Effects of multiple amino acids of the parainfluenza virus 5 fusion protein on its haemagglutinin-neuraminidase-independent fusion activity. *J. Gen. Virol.* 90: 405-413. (2009) 査読有.
- 6) Ito M, Yamakawa I, Nishio M, Tsurudome M, Kawano M, Komada H, and Ito Y. A quantitative method for analyzing establishing-efficiency of persistent viral infection. *Microbiol. Immunol.* 53: 259-265. (2009) 査読有.
- 7) Tsurudome M, Nishio M, Ito M, Tanahashi S, Kawano M, Komada H, and Ito Y. Effects of hemagglutinin-neuraminidase protein mutations on cell-cell fusion mediated by human parainfluenza type 2 virus. *J. Virol.* 82: 8283-8295. (2008) 査読有.
- 8) Nishio M, Ohtsuka J, Tsurudome M, Nosaka T, and Kolakovsky D. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits genome replication by binding to the L protein: possible role in promoting viral fitness. *J. Virol.* 82: 6130-6138. (2008) 査読有.
- 9) Taoda N, Shinji E, Nishii K, Nishioka S, Yonezawa Y, Uematsu J, Hattori E, Yamamoto H, Kawano M, Tsurudome M, O'Brien M, Yamashita T, and Komada H. Fucoidan inhibits parainfluenza virus type 2 infection to LLCMK2 cells. *Biomed. Res.* 29: 331-334. (2008) 査読有.

[学会発表] (計10件)

- 1) 鶴留 雅人, 西尾 真智子, 伊藤 守弘, 河野 光雄, 野阪 哲哉, 駒田 洋, 伊藤 康彦. パラインフルエンザウイルスの膜融合誘導における受容体結合蛋白と膜融合蛋白の相互作用, 第58回日本ウイルス学会学術集会, 平成22年11月8日, 徳島.
- 2) 西尾 真智子, 鶴留 雅人, 野阪 哲哉. ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) L蛋白の転写能に必須であるアミノ酸の同定, 第58回日本ウイルス学会学術集会, 平成22年11月8日, 徳島.
- 3) 木下 聖次郎, 伊藤 守弘, 庵原 俊昭, 寺脇 貴久, 鶴留 雅人, 伊藤 康彦. ムンプスウイルスの臓器・組織親和性を規定する因子の同定, 第58回日本ウイルス学会学術集会, 平成22年11月8日, 徳島.
- 4) Tsurudome M, Ito M, Nishio M, and Ito Y. Identification of domains on the trimer surface of the fusion (F) protein that influence the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the F protein in inducing cell-cell fusion. XIV International Conference on Negative Strand Viruses, 2010年6月22日, Bruges (Belgium).

- 5) Nishio M, Tsurudome M, Ito M, Ito M, and Kolakofsky D. Human parainfluenza virus type 1 L protein regions required for interaction with other viral proteins and polymerase activity. XIV International Conference on Negative Strand Viruses, 2010年6月22日, Bruges (Belgium).
- 6) 西尾 真智子, 大塚 順平, 鶴留 雅人, 野阪 哲哉. ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)P蛋白上の核移行シグナル(NLS)と核外移行シグナル (NES) の同定, 第57回日本ウイルス学会学術集会, 平成21年10月27日, 東京.
- 7) 鶴留 雅人, 西尾 真智子, 伊藤 守弘, 河野 光雄, 駒田 洋, 伊藤 康彦. パラミクソウイルスの膜融合蛋白の解析: 受容体結合蛋白との結合能と融合誘導能との関連性, 第57回日本ウイルス学会学術集会, 平成21年10月25日, 岡山.
- 8) 駒田 洋, 河野 光雄, 鶴留雅人, 西尾 真智子, 伊藤 守弘, 伊藤 康彦. パラインフルエンザ 4 型ウイルスの全遺伝子解析, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 平成20年10月27日, 岡山.
- 9) 鶴留 雅人, 西尾 真智子, 伊藤 守弘, 河野 光雄, 駒田 洋, 伊藤 康彦. パラミクソウイルスの受容体結合蛋白(HN)による細胞融合(および細胞傷害)の制御機構, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 平成20年10月26日, 岡山.
- 10) 西尾真智子, 駒田 洋, 鶴留雅人. ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス(hPIV2)L蛋白上のウイルス蛋白結合部位の同定とL蛋白の機能に必須である新たな領域の同定, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 平成20年10月26日, 岡山.

[図書] (計 2 件)

- 1) Tsurudome M : Parainfluenza virus entry.
In “ Negative Strand RNA Virus ” Luo M (Ed.), p.35-61, World Scientific, New Jersey. (2011)
- 2) Tsurudome M and Ito Y: Rubulaviruses.
In “ The Springer Index of Viruses. 2nd edition ” Tidna CA, Darai G (Eds.), p.1143-1148, Springer, New York. (2011)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴留 雅人 (TSURUDOME MASATO)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50159042