

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460552

研究課題名(和文)パラミクソウイルスの膜融合における機能的および物理的HN-F相互作用の解析

研究課題名(英文)Analysis of functional and physical HN-F interaction in the course of membrane fusion by paramyxoviruses

研究代表者

鶴留 雅人 (Tsurudome, Masato)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50159042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：パラインフルエンザウイルスのエンベロップ蛋白HNの頭部領域は細胞膜上の受容体に結合すると構造変化を起こし、それまで隠されていたストーク領域がウイルス特異的にエンベロップ蛋白Fの頭部領域と相互作用して活性化することで、Fが膜融合の誘導そして細胞へのウイルス侵入を媒介する。このHN-F相互作用における特異性は異なるウイルス間でのHNストーク領域とF頭部領域の一時構造の相同性によって一義的に決まるものとされてきた。しかし本研究により、HN頭部領域およびFストーク領域がそれぞれHNストーク領域およびF頭部領域の立体構造に影響をおよぼすことでHN-F相互作用の特異性を修飾していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It is widely appreciated that during the course of membrane fusion by parainfluenza viruses, the head domain of the viral envelope protein HN (hemagglutinin-neuraminidase) undergoes a structural transition after its binding to the receptors on the cell surface, that exposes otherwise hidden stalk domain of the HN. The exposed HN stalk domain then interacts with the head domain of another viral envelope protein F (fusion) in a virus-specific manner, which enables the F to undergo a series of structural changes that lead to merger of viral and cellular membranes. Such specificity is believed to be defined by the similarity in the primary structures of the HN stalk domain and the F head domain between different viruses. However, our present study revealed that the HN head domain and F stalk domain can modulate the specificity by affecting tertiary and/or quaternary structures of the HN stalk domain and the F head domain, respectively.

研究分野：ウイルス学・分子生物学

キーワード：パラインフルエンザウイルス HN蛋白 F蛋白 分子間相互作用 膜融合 細胞融合

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、致命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。これら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(HN, H, あるいはG: ウイルスの属によって名称が異なる)と膜融合蛋白(F)を持っている。いずれの蛋白にも頭部領域とストーク領域があり、細胞に侵入する際には、まず受容体結合蛋白(四量体)の頭部領域を介して細胞に結合し、次にF蛋白(三量体)全体が構造変化を起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に依存しないため、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)を誘導することがあり、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。

従来、受容体結合蛋白の役割とは受容体への結合のみであり、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、私たち(*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「**受容体結合蛋白と膜融合蛋白のウイルス特異的相互作用**」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。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、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が(*Virology* 213,190-203,1995), 相前後して米国の2つの研究グループが、HPIV3, センダイウイルスおよびニューカッスル病ウイルス(NDV)のHN蛋白について同様の結果を報告した。近年のX線構造解析の結果から、H蛋白が受容体に結合すると、その頭部領域が構造変化を起こすことによって「隠れていた」ストーク領域が露出し、F蛋白との物理的相互作用が可能になることが示唆されている。なお、BHK細胞などの単層培養細胞にHN蛋白

のストーク領域とF蛋白を共発現させると細胞融合が誘導されることから、ストーク領域のみでF蛋白を活性化できること、また、すでに接着している細胞同士を融合させるためにはHN蛋白頭部領域の受容体結合能は不要であることが判明している。近年では、麻疹ウイルスのH蛋白やニパウイルスのG蛋白についてもそのストーク領域がF蛋白の活性化に関与することが示唆されている。一方F蛋白については、パラインフルエンザ5型ウイルス(PIV5)とSV41のF蛋白のキメラ解析により、その頭部領域の三つのドメイン(M1, M2 および M3)がHN蛋白との相互作用に関わっており、この領域内の21個のアミノ酸を置換するだけでHN蛋白特異性を改変できることを私たちは見出している(*J. Virol.* 85, 3153-3161, 2011; *J. Virol.* 87, 8342- 8350, 2013)。

2. 研究の目的

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関する研究も近年急速に進展しているが、その特徴である「**受容体結合蛋白と膜融合蛋白の相互作用の分子機構**」については、解明すべき重要課題が少なくとも2つ残されている。すなわち、(1)受容体結合蛋白のストーク領域との機能的作用に関わる領域を膜融合蛋白(F蛋白)上に同定すること、および、(2)生理的条件下において、受容体結合蛋白と膜融合蛋白の結合(複合体)を検出すること、である。

課題(1): 本研究では、F蛋白のキメラ解析をさらに進展させることにより、受容体結合蛋白(HN)のストーク領域と機能的に相互作用するF蛋白上の領域を同定することを目的とする。

課題(2): 蛋白同士の物理的結合を検出するために頻用されてきた免疫共沈(Coimmunoprecipitation: Co-IP)法では、非イオン性界面活性剤で細胞を処理して蛋白を可溶化する必要があるが、この可溶化によってF蛋白の立体構造が著しく変化することを、私たちは見出している(*J. Virol.* 75,8999-9009, 2001; *Virology* 347,11-27, 2006)。すなわち、たとえCo-IP法を用いてHN-F複合体を検出できたとしても、それは生理的条件下で形成されたHN蛋白とF蛋白の物理的結合を反映していない可能性が高い。従って本研究では、HN-F複合体の検出方法として「Co-IP法以外の3種類の方法」を採用して

この課題を追究する。

3. 研究の方法

(1)既に報告したとおり、PIV5のFの頭部領域の中央部(Middle region)に存在する21アミノ酸をSV41のFの対応アミノ酸に置換したキメラF蛋白(No. 36)はPIV5のHNとではなく、SV41のHNと相互作用して細胞融合を誘導する(*J. Virol.* **87**, 8342- 8350, 2013)。本研究では、PIV5とSV41のHNの頭部領域を置換したキメラHN蛋白、あるいは頭部領域を欠損させた短縮型のHN蛋白を各種キメラF蛋白と共発現させて細胞融合誘導の有無を解析することによって、HNのストーク領域と機能的に相互作用するF上の領域を同定する。

(2)Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)法, Residue-specific photo-crosslink (RSPC)法, Split ubiquitinを用いた(酵母細胞内)Two-Hybrid法を用いて、HN-F相互作用の分子機構を明らかにする。

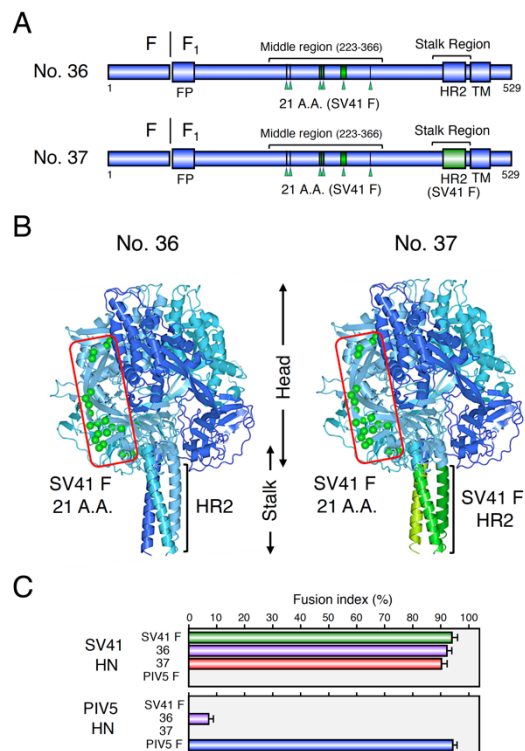
4. 研究成果

(1) PIV5のHN(PIV5 HN)とSV41のHN(SV41 HN)の頭部領域を互いに交換したキメラHN(CH5-41およびCH41-5)を作製した。CH5-41のストーク領域はPIV5 HNに、頭部領域はSV41 HNに由来するが、発現開始後12時間でPIV5のF(PIV5 F)と特異的に相互作用して公汎な細胞融合を誘導することを見出した。一方CH41-5の場合には、誘導された細胞融合は極めて小規模であり、またFの特異性も不明瞭であった。

(2)先述したようにキメラF蛋白(No. 36)はSV41 HNと特異的に相互作用して細胞融合を誘導するが、本研究において発現開始後24時間まで観察したところ、No. 36が弱いながらもPIV5 HNとも相互作用し、微弱ながらも明瞭な細胞融合を誘導することが判明した(図1C)。そこでこの現象についてさらに追究したところ、No. 36のストーク領域をSV41 Fの当該領域で置換したキメラF蛋白、No. 37(図1A, B)、はNo. 36と同程度にSV41 HNと相互作用するが、PIV5 HNとは相互作用しないことが判明した(図1C)。

以上の結果から、Fのストーク領域の構造の相違が(Fの頭部領域とHNとの相互作用における)FのHN特異性に甚大な影響を与えることが明らかとなった。

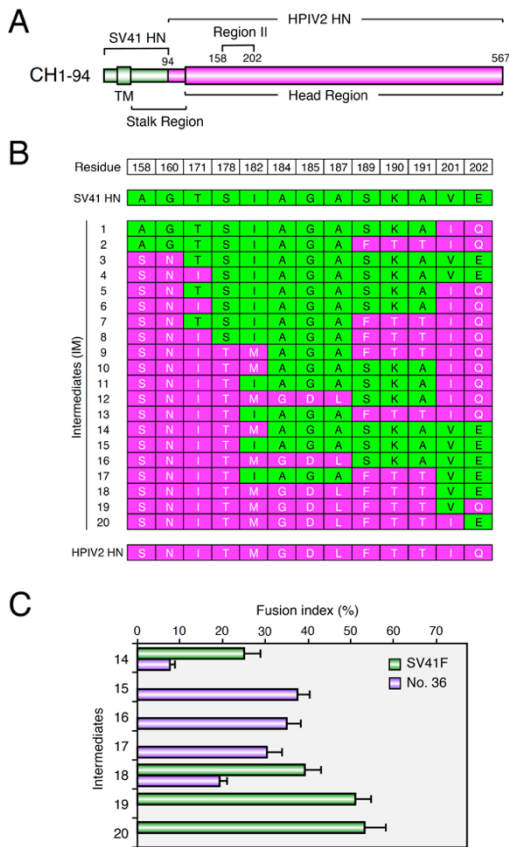
(3)頭部領域を欠いたPIV5 HNにFLAGタグを付加した短縮型HN(PIV5 HN HL-FLAG)はPIV5 Fとの同時発現で細胞融合を誘導し、SV41 FやNo. 36との機能的相互作用は認



(図1)

められなかった。しかし FLAG タグを除くと、No. 36とも機能的に相互作用するようになった。一方、SV41 HN HL-FLAGはそのストーク領域の末端にGCN4配列を付加することによってようやく機能を発揮し、SV41 Fとの特異的な相互作用能を示したが、PIV5 FやNo. 36との相互作用は認められなかった。また、HPIV2 HN-FLAGはGCN4配列を付加してもHPIV2 Fとの相互作用は認められず、(予想に反して)No. 36との相互作用が認められた。(4)HPIV2 HNのStalk領域をSV41 HNの当該領域で置き換えたキメラHN(CH1-94: 図2A)がHPIV2 FとではなくSV41 Fと特異的に機能的相互作用をする(細胞融合を誘導する)ことをすでに報告した。一方、No. 36はSV41 Fと特異的に機能的相互作用をすることから、これらのキメラ同士の機能的相互作用能を調べたところ、予想に反して細胞融合は全く誘導されなかった(図2C)。

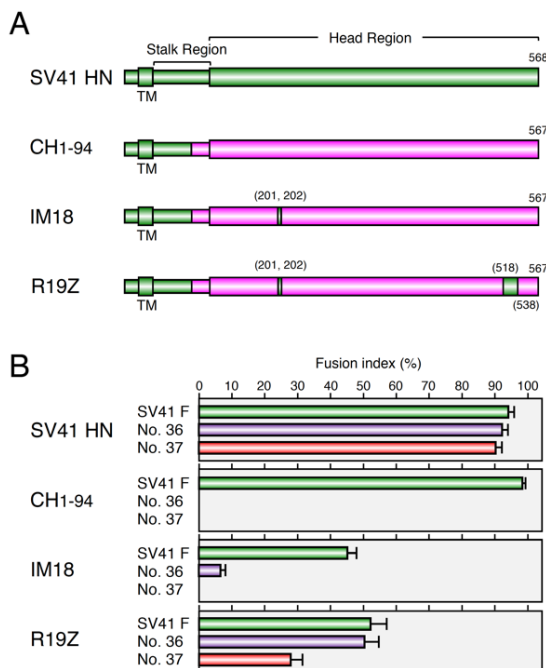
(5)上記の予想外の現象をさらに追究した結果、CH1-94の頭部領域(HPIV2 HN由来)の二量体境界部近傍に位置する13個のアミノ酸をSV41 HNの対応アミノ酸で順次置換することにより作製した20種のキメラHN(intermediate:IM)が様々なF特異性を示すこと、さらにそのうち2つ(IM14とIM18)がSV41HNと同様のF特異性を示すことを見出した(図2B, C)(*J. Virol.* **89**: 12374-12387, 2015)。なお、Native PAGE解析の結果、これら



(図 2)

20 種のキメラ HN の安定性は同程度であったが、いずれも CH1-94 より低いことが判明した。すなわち HN の安定性と F 特異性との関連性は認められなかった (*J. Virol.* 89,12374-12387, 2015)。

(6) ムンプスウイルスの HN 蛋白は HPIV2 F



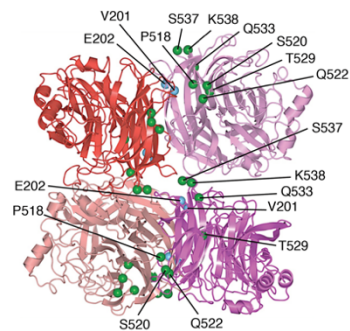
(図 3)

や PIV5 F とも機能的相互作用できるが、HPIV2 HN や PIV5 HN は MuV F とは機能的相互作用をしない。そこでこれらのストーク領域のアミノ酸配列の比較解析を行ったところ、このような HN の互換性の有無を説明できるようなアミノ酸は存在しないことが判明した (*J. Virol.* 89,12374-12387, 2015)。

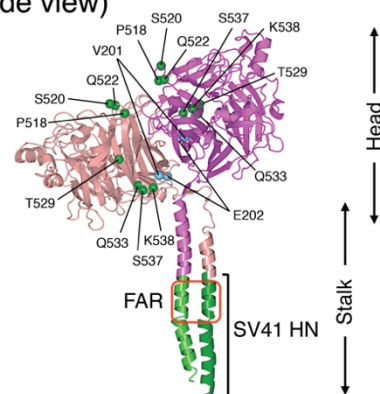
(7) 前述のとおり、CH1-94 の頭部領域に位置する特定のアミノ酸群 (201 位と 202 位) を SV41 HN の対応アミノ酸群で置換したキメラ HN (IM18) は No. 36 と相互作用するが、その能力は SV41 F との相互作用に比べるとかなり弱く、また、No. 37 との相互作用は検出できなかった。しかし、さらなるキメラ解析により、IM18 の頭部領域に位置する 7 箇所のアミノ酸 (518 位, 520 位, 522 位, 529 位, 533 位, 537 位, 538 位) を SV41 HN の対応アミノ酸群に置換したキメラ HN (R-19Z) は SV41 HN と同様に SV41 F, No. 36 および No. 37 と相互作用できることが明らかとなった (図 3)。

(8) 分子モデル解析により R-19Z の頭部領域に存在する SV41 HN 由来のアミノ酸は、いずれも二量体境界部及びその近傍に位置していることが判明した (図 4)。以上の結果から、HN の頭部領域と F のストーク領域構造の相違が (HN のストーク領域と F の頭部領域を介

RZ19 (Top view)



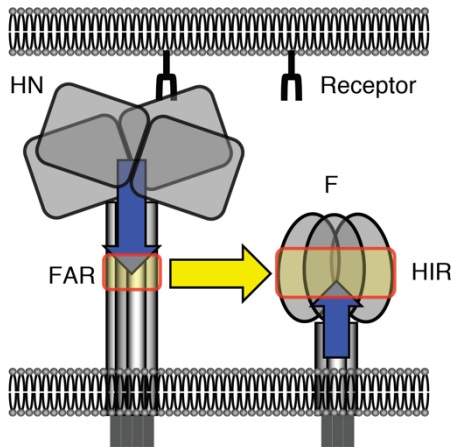
RZ19 (Side view)



(図 4)

した)HN-F 相互作用における (interacting partner に対する) 特異性に劇的な変化を及ぼすことが明らかとなった。

(9) HN はその頭部領域を介して細胞表面の受容体 (Receptor) に結合すると頭部領域の大規模な構造変化を起こす。その結果, それまで頭部領域に隠されていたストーク領域上部に存在する F-activating region (FAR) が露出して F の頭部領域に存在する HN-interacting region



(図 5)

(HIR) との相互作用を起こし, その結果, F が活性化して膜融合を誘導するものと考えられている (図 5)。ただし, FAR の位置に関するコンセンサスは得られていたが, HIR の位置については諸説存在した。しかし本研究の成果により, HIR の位置は確定したものと考えている (図 1B 参照)。

一方, この HN-F 相互作用はウイルス特異的であるが, 一部の異なるウイルス間で HN と F の相互作用が認められている。このような現象は FAR と HIR のアミノ酸配列の相同性の高低によって一義的に決まるものとされてきたが, 本研究により HN の頭部領域および F のストーク領域におけるアミノ酸置換がそれぞれ FAR および HIR の特異性に著しい影響をおよぼすことが明らかになったことから, 当該現象は FAR と HIR のアミノ酸配列のみでなくそれらの立体構造の相同性に規定されることが示唆された。また, FAR の立体構造は HN に FLAG などのタグを付加することによっても強い影響を受けることを明らかにしており (*J. Virol.* 89, 12374-12387, 2015), HN と F の物理的結合の検出には (Venus 断片を両蛋白に付加する) BiFC 法や (Split ubiquitin を両蛋白に付加する) Two-Hybrid 法は不適格であること

が判明した。一方, 現在のところ RSPC 法によっても HN-F 物理的結合の検出には成功しておらず, この結合が両蛋白とも Minor population において極めて Transient に起こり, かつその Avidity も微弱であることが窺われる。したがって, 他の検出法の検索も含め, さらなる追究が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Goto H, Ihira H, Morishita K, Tsuchiya M, Ohta K, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Enhanced growth of influenza A virus by coinfection with human parainfluenza virus type 2. *Med. Microbiol. Immunol.* 205: 209-218. (2016) 査読有。
- 2) Ohta K, Goto H, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Graf1 controls the growth of human parainfluenza virus type 2 through inactivation of RhoA signaling. *J. Virol.* 90: 9394-9405. (2016) 査読有。
- 3) Tsurudome M, Ito M, Ohtsuka J, Hara K, Komada H, Nishio M, Nosaka T. The Fusion protein specificity of the parainfluenza virus hemagglutinin-neuraminidase protein is not solely defined by the primary structure of its stalk domain. *J. Virol.* 89: 12374-12387. (2015) 査読有。
- 4) Kihira S, Uematsu J, Ishitana Y, Chindoh M, Baba A, Kuzuta R, Hasegawa T, Fujimoto K, Funauchi A, Yamamoto H, Kawano M, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H. Calcium ionophore A23187 inhibits human parainfluenza virus type 2 growth and monoclonal antibody against CD98 heavy chain recovers the inhibition. *Int. J. Sci.* 3: 14-20. (2014) 査読有。
- 5) Ohtsuka J, Fukumura M, Tsurudome M, Hara K, Nishio M, Kawano M, Nosaka T. Vero/BC-F: an efficient packaging cell line stably expressing F protein to generate single round-infectious human parainfluenza virus type 2 vector. *Gene Ther.* 21: 775-784. (2014) 査読有。
- 6) Kihira S, Uematsu J, Kawano M, Itoh A, Ookohchi A, Satoh S, Maeda Y, Sakai K, Yamamoto H, Tsurudome M, O'Brien M, Komada H. Ribavirin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication in vitro. *Microbiol. Immunol.* 58: 628-635. (2014) 査読有。

[学会発表] (計 16 件)

- 1) 植松 淳, 酒井香江, 山本秀孝, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋. フィトヘムアグルチ

- ニンによるヒトパラインフルエンザウイルス 2 型増殖への影響. 日本薬学会第137年会, 平成29年3月24日～3月27日, 仙台国際センター, 仙台, 宮城.
- 2) Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T. The F protein specificity of the parainfluenza virus HN protein can be modified by substituting specified amino acids in the HN head domain. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 平成28年10月23日～10月25日, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 北海道.
 - 3) Ohta K, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Rab27a involves the growth of human parainfluenza virus type 2. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 平成28年10月23日～10月25日, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 北海道.
 - 4) 植松 淳, 酒井香江, 山本秀孝, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋. ミコフェノール酸によるヒトパラインフルエンザウイルス 2 型増殖阻害. 日本薬学会第136年会, 平成28年3月26日～3月29日, パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川.
 - 5) Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Komada H, Nosaka T. Factors that define the F protein specificity of the parainfluenza virus HN protein. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 平成27年11月22日～11月24日, 福岡国際会議場, 博多, 福岡.
 - 6) Ohta K, Goto H, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Graf1/ARHGAP-26 negatively regulates the growth of human parainfluenza virus type 2 through the RhoA inactivation. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 平成27年11月22日～11月24日, 福岡国際会議場, 博多, 福岡.
 - 7) Ito M, Yoshikawa H, Shigetomi R, Sato Y, Takeuchi T, Ihara T, Tsurudome M, Hayashi S, Ito Y. Analysis of fusion- inducing ability of mumps virus clinical isolates. 第63回日本ウイルス学会学術集会, 平成27年11月22日～11月24日, 福岡国際会議場, 博多, 福岡.
 - 8) 駒田 洋, 酒井香江, 植松 淳, 山本秀孝, 河野光雄, 鶴留雅人. ミコフェノール酸のパラインフルエンザ 2 型への抗ウイルス作用. 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部 合同学術大会, 2015, 平成27年11月1日, 金城学院大学, 名古屋, 愛知.
 - 9) Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T. The F specificity of the parainfluenza virus HN is not solely defined by the primary structure of the HN stalk domain. XVI International Conference on Negative Strand Viruses, 平成27年6月14日～6月19日, Siena (Italy).
 - 10) Ohta K, Goto H, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Involvement of Graf1/ARHGAP26 and Rho family GTPases in the growth of human parainfluenza virus type 2. XVI International Conference on Negative Strand Viruses, 平成27年6月14日～6月19日, Siena (Italy).
 - 11) 植松 淳, 酒井香江, 鈴木沙織, 吉美由美子, 山本秀孝, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋. リカスポーゼ阻害剤Z-VAD-FMK酸のパラインフルエンザウイルス 2 型増殖への作用. 日本薬学会第135年会, 平成27年3月25日～3月28日, デザイン・クリエイティブセンター神戸, 神戸, 兵庫.
 - 12) 酒井香江, 植松 淳, 山本秀孝, 河野光雄, 鶴留雅人, 駒田 洋. フラボノイドのパラインフルエンザウイルス 2 型増殖への作用. 日本薬学会第135年会, 平成27年3月25日～3月28日, デザイン・クリエイティブセンター神戸, 神戸, 兵庫.
 - 13) 鶴留雅人, 伊藤守弘, 大塚順平, 駒田 洋, 西尾真智子, 野阪哲哉. パラインフルエンザウイルスのHNとFの機能的相互作用の分子機構. Fとの相互作用におけるHNのHead領域の役割. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 平成26年11月10日～11月12日, パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川.
 - 14) 太田圭介, 後藤秀男, 松本祐介, 湯峯奈都子, 鶴留雅人, 西尾真智子. 抗ウイルス因子Tetherinがパラミクソウイルスの増殖に与える影響. 平成26年11月10日～11月12日, パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川.
 - 15) 伊藤守弘, 吉川大貴, 久保田弘通, 迫田兼人, 竹内 環, 庵原俊昭, 鶴留雅人, 伊藤康彦. ムンプスウイルスの臨床分離株の細胞融合誘導能の解析. 平成26年11月10日～11月12日, パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川.
 - 16) 久保田弘通, 伊藤守弘, 吉川大貴, 迫田兼人, 竹内 環, 鶴留雅人, 駒田 洋, 西尾真智子, 伊藤康彦. パラミクソウイルスの細胞融合誘導におけるCD98の関与. 平成26年11月10日～11月12日, パシフィコ横浜, 横浜, 神奈川.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
鶴留 雅人 (TSURUDOME MASATO)
 三重大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：50159042