

学 位 論 文 題 名

Structural and functional analysis
of human parainfluenza virus type 1
hemagglutinin-neuraminidase protein

（ヒトパラインフルエンザウイルス1型 HN 蛋白の構造と機能の解析）

学位論文内容の要旨

パラインフルエンザウイルス1型（PIV-1）はパラミクソウイルス科に属する一本鎖のRNAウイルスで、小児に急性呼吸器感染症を起こす病原体の一つである。本科にはニューカッスル病ウイルス、牛痘ウイルス、麻疹ウイルス等、人畜に重要な病原ウイルスが含まれる。パラミクソウイルスのエンベロープにはHNとFの2種のスパイク糖蛋白が存在する。HN蛋白は宿主細胞レセプターへの吸着及びノイラミニダーゼ活性を有し、F蛋白は膜融合を媒介する。最近、F蛋白による膜融合にHN蛋白が関与することが示されたが、その詳細は明らかでない。本論文はパラミクソウイルスの感染に必須なHN蛋白の構造と機能について得られた新しい知見を述べたものである。

1. HN蛋白の膜融合への関与

HN蛋白の膜融合に果たす役割を調べるため、PIV-1及びマウス由来のセンダイウイルス（SV）のHNおよびF遺伝子をそれぞれクローニングし、HeLa T4⁺細胞に発現させた。これらのウイルスのF蛋白を単独で発現させても細胞融合は起こらなかったが、同じウイルスのHN蛋白とともに発現させると細胞融合を引き起こした。次に、異なるウイルス由来のHNとFを発現させた。SVのHNとPIV-1のFを発現させた場合、細胞融合は起こらなかったが、

P I V-1 のHNとS VのFでは多数の細胞が融合した。膜融合に果たすHNの機能をさらに詳しく調べるため、変異HNを作製した。膜結合ドメイン内のシステイン（第55アミノ酸）をトリプトファンに置換した変異HN蛋白は、もとのHNと同様に吸着およびノイラミニダーゼ活性を示したが、F蛋白とともに発現させても膜融合を起こさなかった。システインをグリシンに置換した変異HN蛋白の吸着、ノイラミニダーゼおよび膜融合活性はもとのHN蛋白と同様であった。この成績は膜融合活性に重要なのはシステイン残基そのものでなく、この領域の構造であることを示唆している。また、P I V-1とS VのキメラHN蛋白をP I V-1あるいはS VのFとともに発現させた結果、HN分子の中央部62%の領域も膜融合活性に関与することが明らかとなった。

以上のように、P I V-1のF蛋白による膜融合にHN蛋白の関与が必須であることならびにHN蛋白分子の膜結合ドメインおよび中央部がその活性発現に重要であることを明らかにした。

2. P I V-1 HN蛋白の熱安定性

P I V-1の培養細胞における増殖は34℃で最大であり、高温（38℃）ではその100分の1以下しか増殖しない。S Vは両温度ではほぼ同等に増殖する。P I V-1のHN蛋白を細胞に発現させ、熱安定性をパルスーチェイス試験で調べた結果、34℃では6時間後も安定であったが、38℃では、3時間以降、蛋白の分解が認められた。一方、P I V-1のF蛋白は何れの温度でも安定であった。また、S V HNは両温度で安定であった。そこで、P I V-1 HN蛋白のモノクローナル抗体との反応性を34℃と38℃で比較した。3つの抗体のうち1つの抗体は低温で強く反応し、高温では弱い反応しか示さなかった。この所見はHNの構造が温度によって変化することを示唆している。次に、P I V-1の変異HNについて熱安定性を調べた結果、第461及び462アミノ酸をS Vと同じアミノ酸に変異させたHNは38℃でも34℃と同様な安定性を示した。

以上のように、PMV-1のHN蛋白分子上で第461および462アミノ酸がHNの熱安定性に関与することを明らかにした。

3. HN蛋白の分離精製と結晶化

PMV-1 HN蛋白の三次構造を解析するために、この蛋白を分離精製し、結晶化を試みた。まず、結晶化の妨げとなる膜結合領域の疎水性アミノ酸配列を除くため、精製ウイルスをプロテアーゼで処理し、ショ糖密度勾配遠心で二量体を精製した。精製HN蛋白が5 X 5 nm分子の二量体であることを電子顕微鏡により確認した。得られたHNのアミノ酸配列を解析した結果、精製HN蛋白は第136または137アミノ酸で開裂をうけた、全438あるいは439アミノ酸で構成されていることがわかった。精製HN蛋白は赤血球凝集およびノイラミニダーゼ活性と抗原性を保持していた。20%ポリエチレングリコールを用いてこのHN蛋白の結晶化を試みた。その結果、方形および針状の二種類の結晶が得られた。方形の結晶をX線解析に供したが、約10 Åの解像が限度で、三次構造を明らかにするには至らなかった。針状の結晶を電子顕微鏡で解析した結果、HN分子が三重らせんを形成していることが明らかになった。このような三重らせん構造結晶はこれまでに報告がなく、HN蛋白の特性を示しているものと考えられる。

以上のように、PMV-1 HN蛋白が単独で結晶化し得ることが明らかとなった。三次構造の解明のためにはウイルス株及び精製方法をさらに検討して、安定なHN蛋白の結晶標品を得ることが必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 悠紀臣
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 助教授 喜 田 宏
副 査 助教授 高 島 郁 夫

学 位 論 文 題 名

Structural and functional analysis of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin-neuraminidase protein

(ヒトパラインフルエンザウイルス1型HN蛋白の構造と機能の解析)

本論文はパラミクソウイルス科の一員であるパラインフルエンザウイルス1型のHN蛋白の構造と機能について検討を加え、次のような新しい知見を得たことを述べたものである。

1. HN蛋白がF蛋白の膜融合に関与することが既に報告されているが、申請者はHNとFを細胞で発現させ、F蛋白による膜融合にHN蛋白が必須であることを確認すると共に変異HNおよびキメラHNを作製し、機能部位を特定した。その結果、HN蛋白の膜結合領域と中央部が重要であることを明らかにした。

2. パラインフルエンザウイルス1型のヒト由来ウイルスとマウス由来センダイウイルスのHNとF蛋白を細胞に発現させ、パルスチエイズ試験で熱安定性を調べた。ヒト由来ウイルスのHN蛋白は38℃では不安定であったが、F蛋白は安定であった。センダイウイルスのHNは38℃でも安定であった。変異HNウイルスを用いて熱安定性に関与する部位を検討し、第461番周辺のアミノ酸であることを明らかにした。

3. HN蛋白の二量体を分離精製し、構造と機能を調べた。精製HNは438または439個のアミノ酸から成り、赤血球凝集およびノイラミニダーゼ活性を保持していた。20%のポリエチレングリコールによって方形と針状の2種類の結晶を得た。方形結晶はX線解析を行ったにもかかわらず、三次構造を明らかにすることができなかったが、針状結晶はらせん構造であることを明らかにすることができた。

以上、本論文は、パラインフルエンザウイルス1型の感染に必須なHN蛋白について、膜融合への関与、熱安定性、結晶化について検討を行い、感染機構の解明上重要な

知見を提出した。よって申請者は博士（獣医学）の学位を授与される資格があると認めた。