

センダイウイルス V 蛋白に高度に保存されたアミノ酸 のウイルス病原性と RNA editing における重要性

福 原 徳 子

広島大学医学部細菌学講座 (主任: 吉田哲也教授)

受付 平成 13 年 11 月 21 日

受理 平成 13 年 12 月 20 日

センダイウイルス (以下 SeV と略す) の V 蛋白は培養細胞でのウイルス増殖には必要ないが、マウス個体での増殖には不可欠であり、V 蛋白はマウスでのウイルス増殖を促進する機能をもつと考えられている。V 蛋白特異的 (Vu) 領域にはパラミクソウイルス亜科に共通して保存された15個のアミノ酸残基が3つの領域に固まって存在する。RNA editing 部位の直後からの連続した4個 (領域 I), Vu 領域のほぼ中央部に5個 (領域 II), さらに, C 端側の zinc-finger-like region には6個のアミノ酸 (領域 III) が保存されている。本研究ではこれらの保存されたアミノ酸の V 蛋白の機能における意義を検討するために, これらのアミノ酸に変異を導入して, 9 個の変異ウイルスを作製した。全ての変異ウイルスは培養細胞で野生型ウイルスと同様に増殖したが, いずれの変異ウイルスもマウスの肺内での増殖と病原性は低下した。変異ウイルスのうちの1つの SeV-H₃₁₈N は RNA editing 効率の著しい低下を示し, 318番目のヒスチジンは RNA editing のために保存されていることが示された。領域 I と領域 II の変異は Vu 蛋白の亜鉛結合能を阻害しなかったが, 領域 III に変異を導入した Vu 蛋白では亜鉛結合能に著しい低下が観察された。これらの結果から領域 III の保存されたアミノ酸は亜鉛と結合する構造をとることによって, 領域 I と領域 II の保存されたアミノ酸は亜鉛結合とは関係なく一定の蛋白構造を与えることによって, V 蛋白の機能に重要な役割をもつことが示された。また, RNA editing 効率の実験結果から editing 部位のすぐ下流のヒスチジンがコードされる塩基配列が効率の良い RNA editing のために必要であることが明らかとなった。

Key words: センダイウイルス, V 蛋白, 亜鉛結合, 病原性, 保存アミノ酸残基

パラミクソウイルス科センダイウイルス (SeV) はマウス等の齧歯類に感染して肺炎を起こすエンベロープウイルスであり, 約 15.4 kb の 1 本鎖マイナス RNA をゲノムとして持つ。SeV ゲノムは N (nucleocapsid), P (phosphoprotein), M (matrix), F (fusion), HN (hemagglutinin-neuraminidase), L (large) の 6 つの構造蛋白をコードする 6 つの遺伝子で構成されている。これらの 6 つの遺伝子のうち, P 遺伝子は複数の蛋白をコードしている点で特徴的である (Fig. 1)。P 遺伝子の転写により合成された mRNA からは, P 蛋白に加え非構成蛋白の C, C', Y1, Y2 蛋白も合成される。即ち, 後者 4 つの蛋白はそれぞれ異なる翻訳開始コドンから P 蛋白フレームに対して +1 シフトしたフレームから合成される。さらに, P 遺伝子からは, RNA editing (mRNA 合成時に, 遺伝子の塩基情報と

異なる塩基への置換, 塩基の挿入・欠失が起こること) によって鋳型にはない G 塩基が挿入されて非構成蛋白の V 蛋白をコードする mRNA が合成される。その結果, P と V 蛋白の N 端側 317 アミノ酸残基は同じ配列であるが, V 蛋白 C 端側は 67 残基の P 蛋白と異なる V 特異的 (V unique (Vu)) 配列を有する^{15,26,28)}。

RNA editing をノックアウトした変異 SeV (SeV V (-)) のマウス病原性は著明に減少する。このウイルスは親株の SeV (SeV wild-type (WT)) と同様に培養細胞内で効率よく増殖し, ウイルス mRNA の転写や, ゲノム複製, 蛋白合成に大きな差はない。しかし, マウス個体においては SeV WT と比較してマウス肺から早期に排除される⁹⁾。マウス個体での SeV の増殖や病原性における V 蛋白の機能ははまだ明らかではないが, V 蛋白はマウスでの効率的なウイルス増殖やウイ

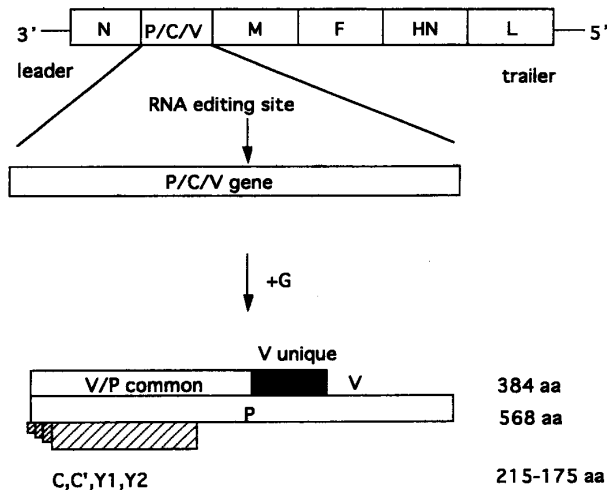


Fig. 1. Schematic representation of the extraordinary diversity of SeV P gene expression. RNA editing with the addition of one G nucleotide at the editing site produces an mRNA that encodes the V protein. The SeV P mRNA encodes not only the P protein but the C protein in a shifted frame independent of editing status. There are four C-related proteins, designated C, C', Y1 and Y2, with alternative translational start codons.

ルス病原性発現には必須であると考えられている。さらに、この機能には Vu 領域が重要であることが示された^{2,7,10}。

この Vu 領域にはパラミクソウイルス亜科に属する全てのウイルスに高度に保存された15個のアミノ酸が存在する (Fig. 2)。これらの分布は領域 I, II, IIIに分けることができる。領域 I には RNA editing 部位の下流直下から連続する4つのアミノ酸、領域 II には連続した6つのアミノ酸のうち5つのアミノ酸が完全に保存されている。領域 II の保存されたアミノ酸のうち2つのシステイン残基は zinc-finger-like motif の一部分を形成する。領域 III では5つのシステイン残基と1つのプロリン残基が完全に保存されており、この部分は zinc-finger-like motif の主要部分を形成している。これらの高度に保存されたアミノ酸の存在は、V 蛋白の構造や機能にとって、これらのアミノ酸残基が重要であることを示唆している。しかし、zinc-finger-like motif 以外のこれらの領域の重要性はいまだ検討されていない。本研究はこの点を明らかにするために、これらの高度に保存されたアミノ酸残基に変異を導入し、V 蛋白の亜鉛結合能を測定した。さらに変異を導入したウイルスをリバーシジェネティクスシステムにより作製してこれらの変異ウイルスのマウス病原性について検討を行った。

材料と方法

1) 細胞, ウイルス, 抗体

LLC-MK₂ 細胞は10%ウシ胎児血清加 Eagle's minimal essential medium (MEM) で培養した。Z 株 cDNA から作製した SeV WT とその変異ウイルスはニワトリ受精卵尿膜腔で増やした。感染価は蛍光抗体法でウイルス感染細胞数を数えることにより、ウイルス感染価を測定する immunofluorescent infectious focus assay を用い、cell infectious units (CIU)/ml で表した⁸⁾。T7 RNA ポリメラーゼを発現するワクチニアウイルス vTF 7.3⁹⁾は Bernard Moss 博士 (National Institute of Health, USA) より分与を受け、CV1 細胞で増やした。抗 SeV 抗体は精製 SeV 粒子でウサギを免疫して得た。抗 V 蛋白抗体及び抗 C 蛋白抗体は加藤篤博士 (国立感染症研究所) より分与された。

2) V 蛋白変異 SeV の回収

遺伝子操作は基本的には Current protocols in molecular biology に準じて行った¹⁾。使用した pSeV (+) は SeV Z 株の完全長 cDNA ゲノムの両端にそれぞれ改変した T7 プロモーターとデルタ肝炎ウイルスリボザイムを有する¹¹⁾。pSeV (+) を *E. coli* JM110 (*dam, dcm*) に導入した後、メチル化感受性制限酵素 *Cla* I で切断した。pSeV (+) からの *Cla* I 断片は SeV antigenomic cDNA の2090から5335位のヌクレオチドに対応する。これを pHSG396 にサブクローニングして、このプラスミド上で QuickChange mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) を使用して部位特異的変異導入を行った。全ての変異 DNA は 310 genetic analyzer (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用して塩基配列を決定してスクリーニングし、さらにこの変異 *Cla* I 断片を pSeV (+) に再び戻した。

SeV は、作製した pSeV (+) から加藤らの方法¹¹⁾により回収した。即ち、vTF-7.3 感染 LLC-MK₂ 細胞に変異 pSeV (+) とともに pGEM-N (マルチクローニングベクターに N 遺伝子を導入したプラスミド)、pGEM-P (P 遺伝子導入プラスミド)、pGEM-L (L 遺伝子導入プラスミド) をトランスフェクトし、3日後に感染細胞を发育鶏卵に接種、32°C で3日間培養した。

3) GST-Vu 融合蛋白の発現と亜鉛結合能の測定

318から384までの Vu ペプチドを GST の C 末端に融合させ、glutathione-S-transferase (GST)-Vu 融合ポリペプチドを作製し、以前発表した方法に多少改良を加えて亜鉛結合能測定を行った⁷⁾。変異を導入した

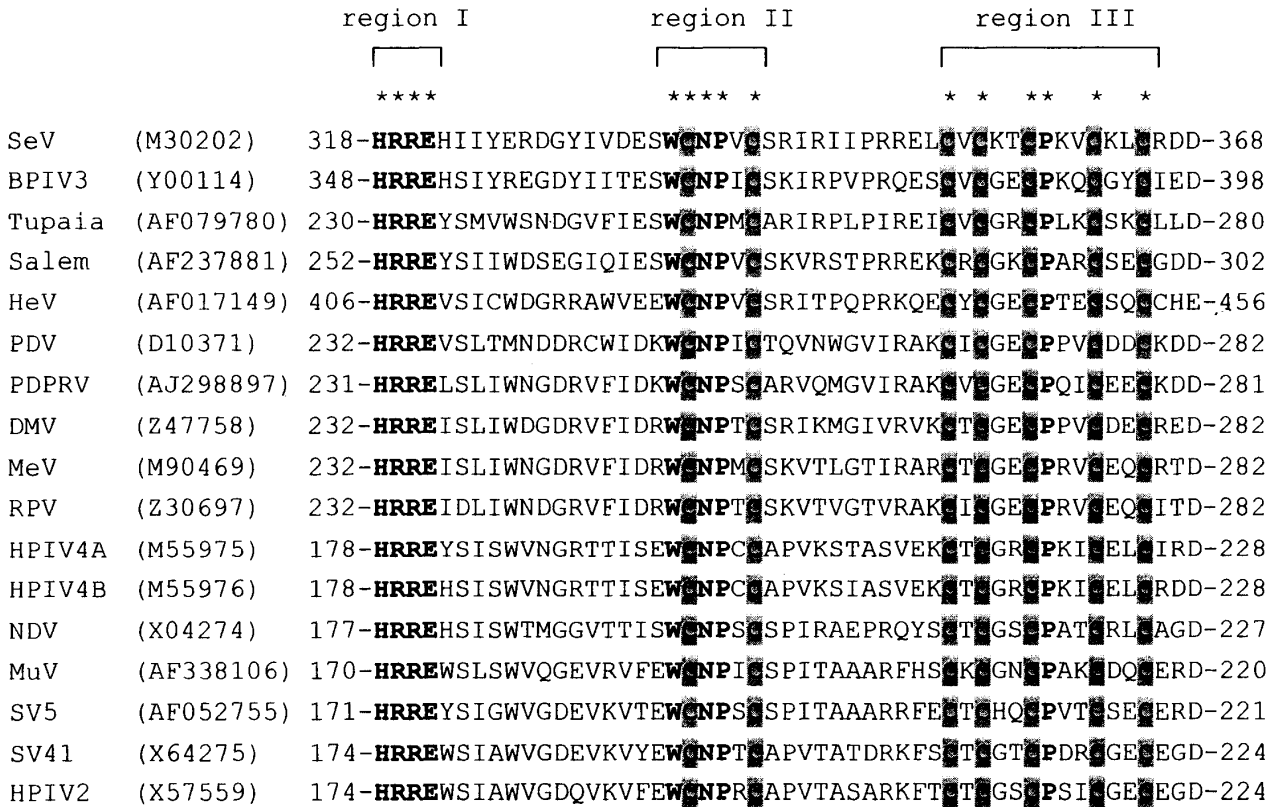


Fig. 2. Multiple amino acid sequence alignment of the V unique regions of the *Paramyxovirinae* subfamily viruses. The Vu regions of selected members of the *Paramyxovirinae* subfamily were aligned using the CLUSTALW program (DNA Data Bank of Japan). The sequence of SeV is at the top, and sequences closer to that of SeV were aligned from top to bottom. Conserved amino acid residues are in boldface and marked by asterisks, and cysteine residues in the conserved residues are further shaded. DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers are shown in parentheses. SeV, Sendai virus; BPIV3, bovine parainfluenza virus type 3; TPMV, *Tupaia* paramyxovirus; SLMV, Salem virus; HeV, Hendra virus; PDV, phocine distemper virus; PPRV, Peste-des-petits-ruminants virus; DMV, dolphin morbillivirus; CDV, canine distemper virus; MeV, measles virus; RPV, rinderpest virus; HPIV4A, human parainfluenza virus type 4A; HPIV4B, human parainfluenza virus type 4B; NDV, Newcastle disease virus; SV5, simian virus 5; SV41, simian virus 41; MuV, mumps virus.

Vu 遺伝子を変異 pSeV (+) から PCR で増幅して GST fusion 蛋白発現ベクター (pGEX-4T-1, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) の *Bam*HI と *Xho*I サイトの間に組み込んだ。塩基配列を確認した組み換えプラスミドを BL21-CodonPlus RIL 細胞 (Stratagene) に導入し、組み換え蛋白の発現を誘導した後、細胞を遠心により集めた。この細胞を BugBuster lysis buffer と Benzonase nuclease (Novagen, Madison, WI, USA) で溶解し、グルタチオンセファロース 4B アフィニティカラムに吸着させ、さらにグルタチオンで溶出した。蛋白は Bradford protein assay を使用して測定した。

亜鉛結合能測定のために、溶出蛋白を10%ゲルを使って SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜にプロットし、100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50 mM NaCl, 10 mM

dithiothreitol (DTT) で処理した。この膜を窒素ガスで飽和した 100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50 mM NaCl, 370 kBq/ml ⁶⁵ZnCl₂ (NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) とインキュベートした後、100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50 mM NaCl, 100 mM DTT で洗浄し、BAS 2000 イメージアナライザー (Fuji Film, Tokyo) を使用してラジオオートグラフィーを行った。さらにその膜をアミドブラックで染色して蛋白を可視化し、定量した。

4) ラジオアイソトープによるウイルス蛋白の標識と免疫沈降

35 mm ディッシュ上の LLC-MK₂ 細胞に SeV を multiplicity of infection (m.o.i.) 20 で接種した。感染 7 時間後、メチオニン、システイン欠損 Dulbecco's modified MEM (DMEM) に [³⁵S] システイン-メチオ

ニン ($[^{35}\text{S}]$ Pro-mix; 3.7 MBq/ml; Amersham Pharmacia Biotech) を加え30分間細胞を標識した。標識感染細胞を radio immunoprecipitation assay buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl) で溶解して、遠心上清中のウイルス蛋白を抗 SeV, 抗 V, 抗 C 血清のいずれかで免疫沈降し, さらに SDS-PAGE を行った²⁴⁾。ゲルを乾燥し, BAS 2000 イメージアナライザーで解析した。

5) 感染細胞内 V mRNA の limited primer extension

基本的には Hausmann らの方法に準じて行った⁵⁾。35 mm ディッシュ上の LLC-MK₂ 細胞に SeV を m.o.i. 10 で接種した。感染24時間後, ISOGEN reagent (Nippon Gene, Tokyo) を使用して感染細胞から全 RNA を抽出し, VedR primer (5'-TTGAGCAGTTGTTT GTTCTC-3') を使用して Superscript II 逆転写酵素 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により42°C, 30分間逆転写した。PCR は VedR primer, VedN primer (5'-CAATAGGGACCCGCTCTGTC-3'), Taq DNA ポリメラーゼを含む 50 μ l の反応液中で行った。この PCR 産物 (316 bp) を Sephadex-G 50 スピнкаラムで精製して, primer extension の鋳型として使用した。

Limited primer extension は 15 μ l の反応液中で 37°C, 2分間行った。この反応液中には 1 μ g アルカリ変性処理 PCR 産物, 1 pmol assay primer (5'-GGTC-TAGAGACCGACTCAAC-3'), 27 mM Tris-HCl (pH 7.5), 14 mM MgCl₂, 33 mM NaCl, 7 mM DTT, 10 μ M dATP, 10 μ M dCTP, 2 μ M ddTTP, 18.5 kBq/ μ l [α -³²P] dGTP (Amersham Pharmacia Biotech), 3 U modified T7 DNAポリメラーゼが含まれている。使用した

assay primer は RNA editing 部位の 3'-TTTTTCCC-5' 配列のすぐ上流にアニールするようにデザインした。反応後, 75 nmol の dNTP を加えてさらに37°C, 2分間のチェイスを行った。反応停止液 (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 18 μ l を加えた後, 検体 (3 μ l) を 8% のシークエンスゲルで分離し, 放射活性をイメージアナライザーで解析した。

6) 培養細胞における変異 SeV ウイルス増殖

LLC-MK₂ 細胞に m.o.i. 0.01 で SeV を感染させ, 10 μ g/ml のトリプシン含有 DMEM で培養した²³⁾。培養液の一部を毎日採取し, ウイルス感染価を測定した。

7) マウスへの SeV 感染

3週齢の雄の specific-pathogen-free ICR/Crj (CD-1) マウス (日本チャールズリバー, 厚木) を使用した。軽いエーテル麻酔下でマウスに 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ CIU の SeV を経鼻感染し, 2週間, 毎日それらの体重と臨床的症状を観察した。またウイルスの肺内増殖は感染マウスを一定の間隔をおいて屠殺し, 肺を 1 ml の MEM 中でホモジネートしてその遠心上清中のウイルス感染価を測定した。マウスは広島大学医学部動物実験施設感染実験区において飼育した。

成 績

1) SeV V 蛋白特異領域への変異の導入

CLUSTALW プログラム²⁷⁾を使用して Vu 領域のアミノ酸配列を比較すると, パラミクソウイルス亜科のウイルス間には高度に保存された15個のアミノ酸残基が存在することが示された (Fig. 2)。これらの保存

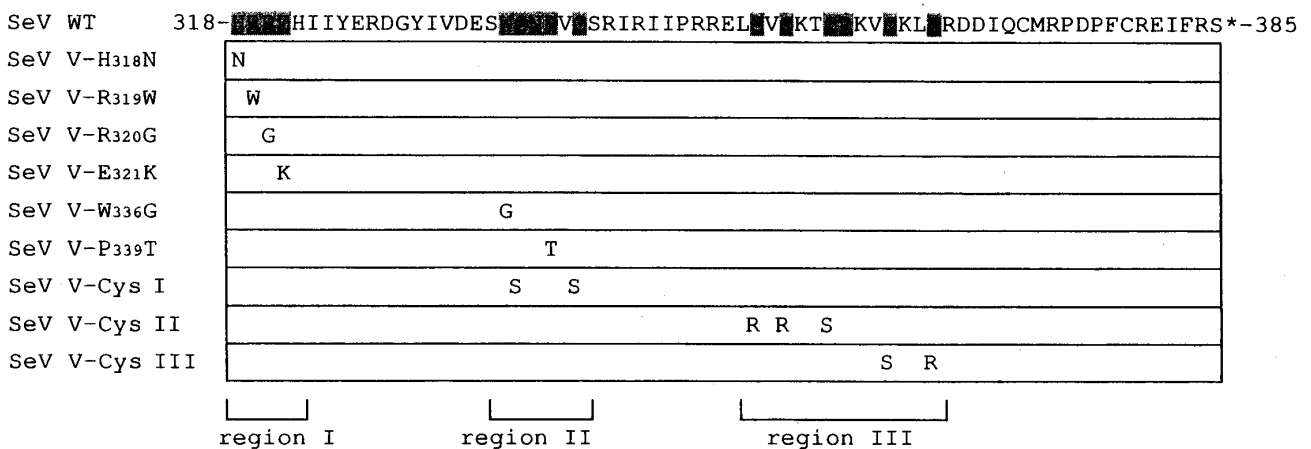


Fig. 3. Schematic representation of mutations of the SeV V protein. Mutations were introduced into the conserved amino acids in the V unique region (shadowed) so as not to change any amino acids of the overlapping P-coding frame.

されたアミノ酸残基の意義を検討するために Fig. 3 に示すような変異を導入した。領域 I の保存された 4 つのアミノ酸をそれぞれ他のアミノ酸に変換して V-H₃₁₈N, V-R₃₁₉W, V-R₃₂₀G 及び V-E₃₂₁K を作製した。これらの変異は、蛋白の読み枠がオーバーラップしている P 蛋白のアミノ酸を変化させないようにデザインし、より性質の似通ったアミノ酸を選択した。zinc-finger-like motif の一部と考えられている領域 II の中の 2 つのシステイン残基は同時にセリンに変換し、V-(C₃₃₇S+C₃₄₁S) を作製、V-CysI と名付けた。領域 II の他の保存残基にもそれぞれ変異を導入し、V-W₃₃₆G, V-P₃₃₉T を作製した。さらに領域 III の 5 つのシステイン残基のうち 3 つを同時に変換した V-(C₃₅₃R+C₃₅₅R+C₃₅₈S) (V-CysII) と、他の 2 つのシステインを変換した V-(C₃₆₂S+C₃₆₅R) (V-CysIII) を作製した (Fig. 3)。これら領域 II, III の変異も領域 I と同様に P 蛋白のアミノ酸を変化させず、かつより性質の似通ったアミノ酸を選択し、作製した。

2) 変異 Vu 蛋白の亜鉛結合能

麻疹ウイルス, Simian Virus 5 (SV5), ニューカッスル病ウイルス (NDV) 等のパラミクソウイルスの Vu 蛋白は、保存された 7 つのシステイン残基から成る zinc-finger-like motif により亜鉛を結合することが示されている^{18,22,25}。さらに、我々は以前 Vu 領域の 7 つの保存されたシステイン残基をそれぞれ置換した変異 SeV ウイルスを作製し、V 蛋白の亜鉛結合能がウイルスの病原性に影響を与えることを示した⁷。このことから V 蛋白の構造が亜鉛結合に依存して、病原性と関連がある宿主の機能に影響を与えているということが推測された。したがって、亜鉛結合能は V 蛋白の構造の指標となると考えられる。

そこで、著者は今回作製した変異 Vu 蛋白の亜鉛結合能を検討した。GST 融合変異 Vu ポリペプチドを *E. coli* 内で発現、精製して、さらに PVDF 膜上にブロットした。膜上で ⁶⁵Zn 結合を測定した後、アミドブラック 10 B で蛋白を染色した (Fig. 4A)。全長 GST-Vu 蛋白に加えて GST の位置や GST と GST-Vu の間に複数の濃いバンドが観察された。これらは *E. coli* における unmatched codon usage による翻訳の中途停止によるものと考えられ、測定から除外した。実際、効率のよい亜鉛結合は全長の GST-Vu 蛋白のみに認められた (Fig. 4A)。

亜鉛結合実験は 3 回行い、亜鉛結合能の平均値を蛋白量で補正した。Fig. 4B に示したように、領域 I と領域 II の変異 GST-Vu (R₃₁₉W, E₃₂₁K, P₃₃₉T) の亜鉛結合は GST-Vu WT の 75% 以上あり、若干減少するも

の亜鉛結合能は比較的保たれていた。領域 II の保存されたシステインの変異 GST-Vu (CysI, C₃₃₇S+C₃₄₁S) もまた亜鉛結合能を比較的保っていた。一方、GST-Vu-Cys III (C₃₆₂S+C₃₆₅R) は 40% 以下の結合能を

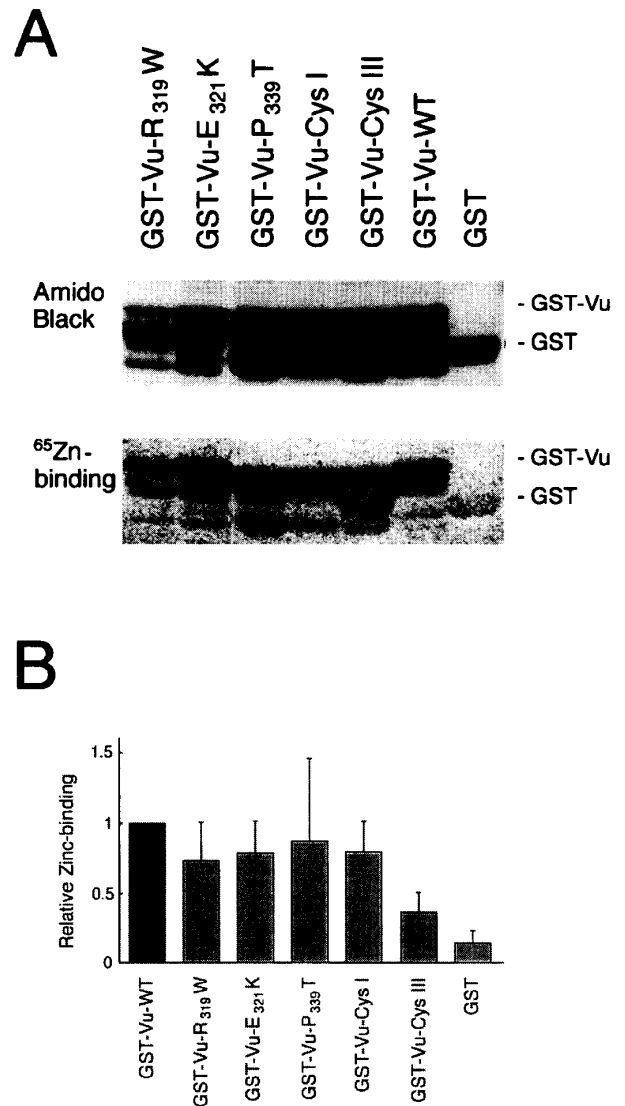


Fig. 4. Western blotting of the mutant GST-Vu proteins and their zinc-binding capacities. (A) Mutant GST-Vu proteins as well as GST were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a membrane. The blot was probed with ⁶⁵ZnCl₂ in a reducing condition to detect zinc binding and processed for autoradiography (⁶⁵Zn-binding). The membrane was then stained by amido black 10B to detect blotted proteins (Amido Black). (B) The relative ratio of zinc binding of the GST-Vu mutants to that of the wild-type GST-Vu was calculated using data obtained from three independent experiments. Bars indicate standard deviation.

示した。これらの結果は領域Iと領域IIの変異は亜鉛結合能を軽度減弱させること、領域IIIのC₃₆₂S+C₃₆₅Rの変異は著しく減弱させることを示している。GST-Vu-Cys II (C₃₅₃R+C₃₅₅R+C₃₅₈S)は*E. coli*で発現、精製ができなかったため、この解析から除外した。

3) 変異V蛋白を有するSeVのcDNAからの回収

各々の変異V蛋白を有する感染性SeVをcDNAからのウイルス回収系を利用して作製した。変異ウイルスの回収効率は対照の野生型SeVとほとんど同等であった。発育鶏卵で32°C、3日間培養して得た変異ウイルスの感染価は10⁹から10¹⁰ CIU/mlであり、野生型SeVの増殖に匹敵するものだった。

4) 培養細胞内におけるV変異SeVの蛋白合成

V変異SeVの蛋白合成を解析するために、LLC-MK₂細胞に変異ウイルスをm.o.i. 20で感染し、[³⁵S]システイン-メチオニンで蛋白を30分標識後、抗V、抗SeV、抗C血清でそれぞれ免疫沈降した(Fig. 5A)。V蛋白のN端側はP蛋白と共通であるため、抗V血清はV蛋白とP蛋白どちらも沈降させた。V蛋白とP蛋白の量を定量して同じレーンのP蛋白量に対するV蛋白量の比を求め、独立して行った3回の実験の平均値をFig. 5Bに示した。その結果、SeV V-H₃₁₈NのV蛋白はSeV WTと比較して約50%減少していたが、他の変異ウイルスとSeV WTには差が見られなかった。SeV構成蛋白の合成は各ウイルスはほぼ同等であった(Fig. 5A, αSeV)。C蛋白の合成についても差はみられなかった(Fig. 5A, αC)。

5) 変異ウイルスのV mRNA産生とRNA editing効率

変異SeV V-H₃₁₈Nの感染細胞内における蛋白合成の解析の結果はV蛋白の合成量が明らかに低いことを示した。このウイルスはゲノムのediting部位(3'-UUUUUCCCC-5')のすぐ下流のGをUに置換した変異を有している。この置換はRNA editing効率を変化させるかもしれない。そこで、editing部位UUUUUのすぐ上流にアニールするassay primerを使用するlimited primer extension法により、editingされたRNAの解析を行った。感染LLC-MK₂細胞から全RNAを抽出してRT-PCRの鋳型としてmRNAのRNA editing部位近傍を含むDNA断片を増幅した。このDNA断片を鋳型としてassay primer, dATP, dCTP, [^{α-32}P]dGTP, ddTTP存在下でprimer extensionを行った(Fig. 6A)。この測定では、鋳型からのcolinear転写産物とGが挿入された(editingされた)転写産物はそれぞれ+0Gと+1Gのバンドとして検出

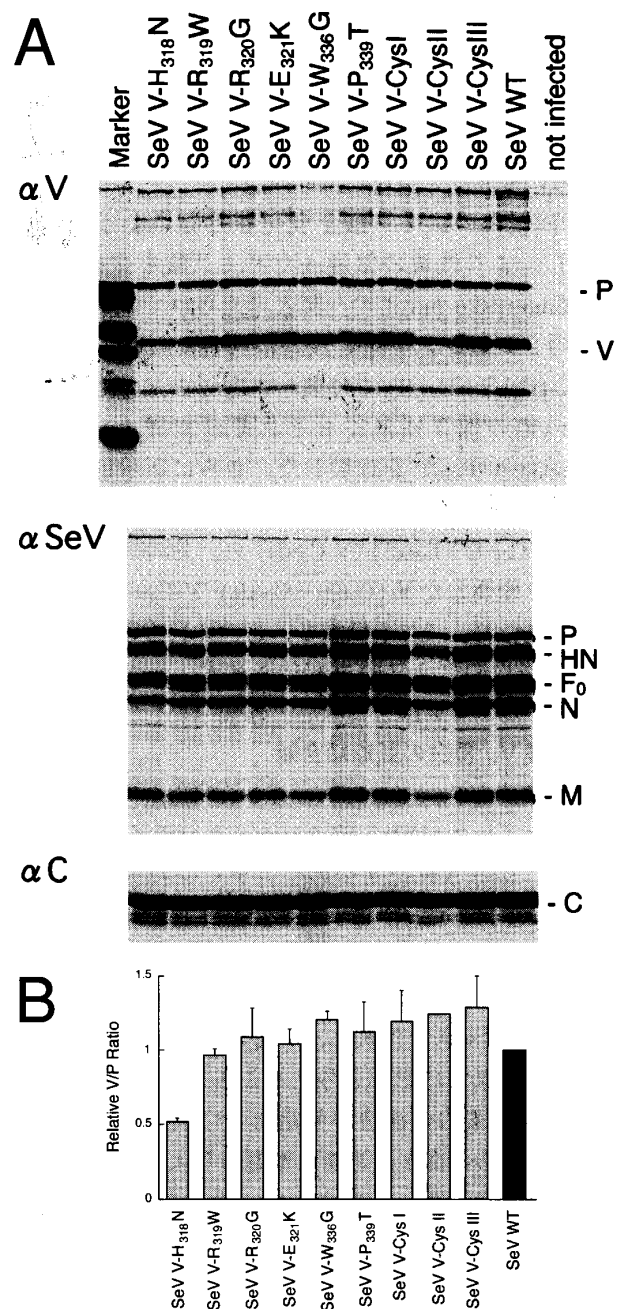


Fig. 5. (A) Protein synthesis of SeV V mutants in cultured cells. LLC-MK₂ cells were infected with SeV V mutants as well as SeV WT at an m.o.i. of 20. Proteins were labeled with [³⁵S] cysteine-methionine for 30 min at 7h post-infection and immunoprecipitated with either anti-V serum (α V), anti-SeV serum (α SeV), or anti-C serum (α C). Proteins were analyzed by SDS-PAGE and processed for autoradiography. (B) Quantification of the V protein. Radioactivity of the V protein was standardized with that of the P protein in the same lane and compared with that of SeV WT, which was set at 1.0. The mean and standard deviation from three experiments are shown in the graph.

される (Fig. 6)。

各バンドの放射活性を G 残基の数で補正後, +1 G バンドの相対比, 即ち $\% [(+1 G)/(+0 G)+(+1 G)]$ を算定した (Fig. 6B)。SeV WT 感染細胞内では +1 G バンドは 34% であり, この値はこれまでの報告とほぼ一致した²⁸⁾。また, SeV V-H₃₁₈N 以外の変異ウイルスの相対比もほぼ同様の値であったが (28% から

36%), SeV V-H₃₁₈N の +1 G バンドの相対比は 10% しかなかった。これは H₃₁₈N 変異によって RNA editing の効率が低下したことを示している。一方, SeV V (-) 感染細胞内では +1 G バンドが認められず, この測定系が正確であることを示している (Fig. 6B)。

6) 培養細胞における V 変異 SeV の増殖

導入した変異が培養細胞におけるウイルス増殖に対してどのように影響するかを検討するために, LLC-MK₂ 細胞にこれらの変異ウイルスを m.o.i. 0.01 で感染させた。全ての変異ウイルスは感染後 2 日目では SeV WT よりやや速く増殖したが, 3 日目にはほぼ同様の感染価となった (Fig. 7)。これらの結果は V 変異 SeV が培養細胞内で親株の SeV WT と同様に増殖することを示しており, V 蛋白のこれらの変異は培養細胞でのウイルス増殖を障害しないと考えられた。

7) マウス肺における V 変異 SeV の増殖

次に特定の V 変異 SeV についてマウス肺におけるウイルス増殖を検討した。3 週の ICR マウスに 10⁷ CIU の V 変異 SeV を感染させ, マウス肺内のウイルス増殖の時間経過を検討した (Fig. 8)。SeV V-R₃₁₉W は感染後 1 日目は SeV WT と同様な増殖を示したが, その後一時的なピークを 5 日目に示したものの, 明らかに WT より急速にマウスの肺内から排除された。SeV V-E₃₂₁K は SeV V-R₃₁₉W と SeV WT の中間の増殖性を示した。SeV V-P₃₃₉T は感染後 3 日目まで SeV WT にほぼ匹敵する増殖性を示したが 5 日目のピーク値は WT の 1/10 以下でより速く排除された。領域 I と領域 II の一塩基の各変異ウイルスはそれぞれ異なった肺内ウイルス増殖態度と減弱傾向を示した。一方, 変異ウイルス SeV Cys I, SeV Cys II, SeV Cys III の 1 ~ 3 日目の増殖はやや低いものの WT にあまり違わないが, 5 日目以降 WT に比べ急速に減少した (Fig. 8)。システイン変異 SeV もマウス肺において効率的なウイルス増殖が出来ないと考えられた。

8) V 変異 SeV のマウス病原性

一群 5 匹の ICR マウスに変異 SeV の各希釈を接種して, 接種後 2 週間観察の後, 各変異ウイルスの 50% のマウスを死亡させる量 (50% mouse lethal dose (MLD₅₀)) を決定した。病原性は MLD₅₀ の逆数で表した。SeV V-H₃₁₈N, SeV V-R₃₁₉W, SeV V-R₃₂₀G, SeV V-W₃₃₆G と SeV V-P₃₃₉T の病原性は, それぞれ SeV WT の病原性に対して 4%, 4%, 1%, 10%, 1%, 64% であった。これらのウイルスの病原性とマウス肺内でのウイルス増殖性とはほぼ相関した (Fig. 8)。領域 I と領域 II の 1 つのアミノ酸を置換した V 変異 SeV は SeV V-P₃₃₉T を除き全て著しく弱毒化してい

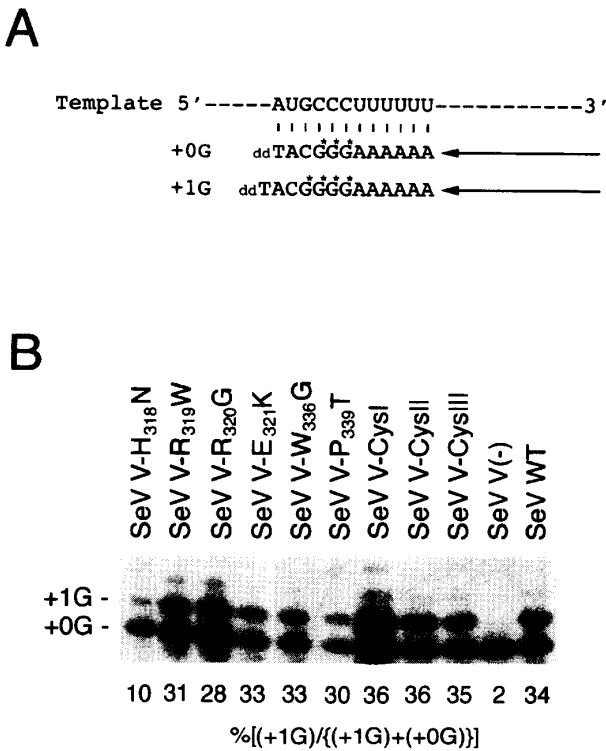


Fig. 6. Limited primer extension. Total RNA was extracted from SeV-infected cells, and DNA fragments spanning the RNA editing site were amplified by RT-PCR to prepare a template for primer extension. (A) Oligonucleotides were primed by an assay primer (arrow), synthesized by incorporation of dextyadenosine (A), deoxycytidine (C), and ³²P-labeled deoxyguanosine (G*), and terminated by incorporation of dideoxythymidine (ddT). +0G is an oligonucleotide synthesized from the non-edited colinear transcript, and +1G is that from the edited, one-nucleotide-inserted transcript. (B) Oligonucleotides synthesized were analyzed using an 8% sequencing gel and radioautography. The SeV V mutants employed include SeV V (-), in which the editing site is destroyed by two-base substitutions and no RNA editing occurs¹⁰⁾. Percent ratio of radioactivity of +1G against the sum of +0G plus +1G is shown below the lane.

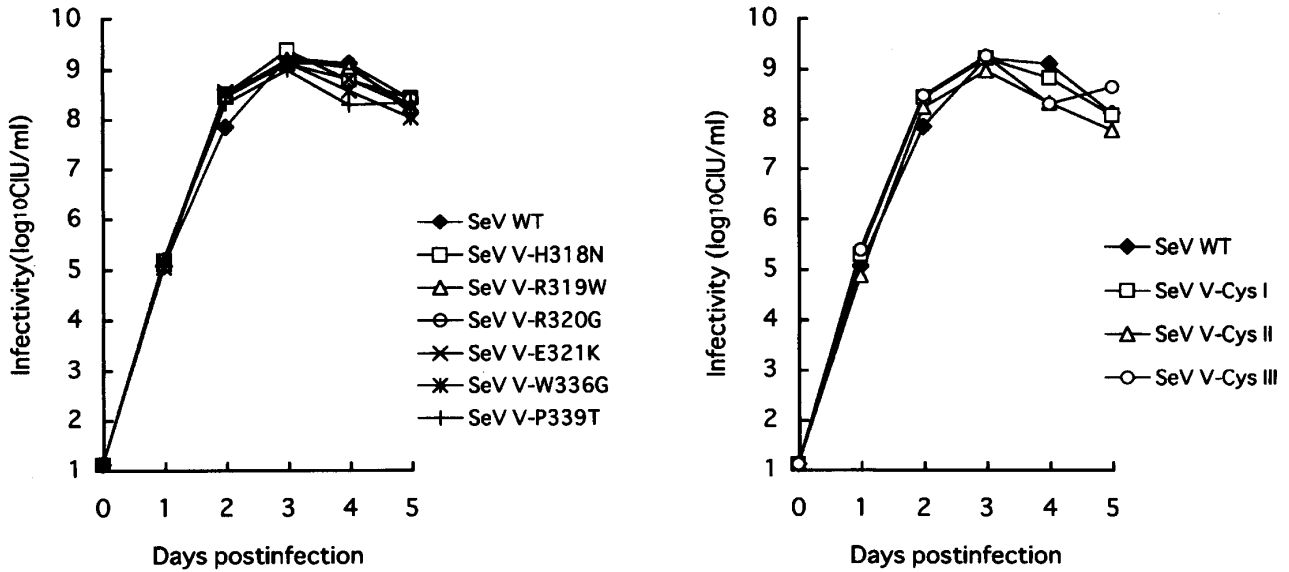


Fig. 7. Replication of SeV V mutants in cultured cells. LLC-MK₂ cells were infected with each of the SeV V mutants at an m.o.i. of 0.01 and incubated in Dulbecco's modified MEM in the presence of 10 μ g/ml trypsin. A part of the culture medium was sampled daily and infectivity was measured.

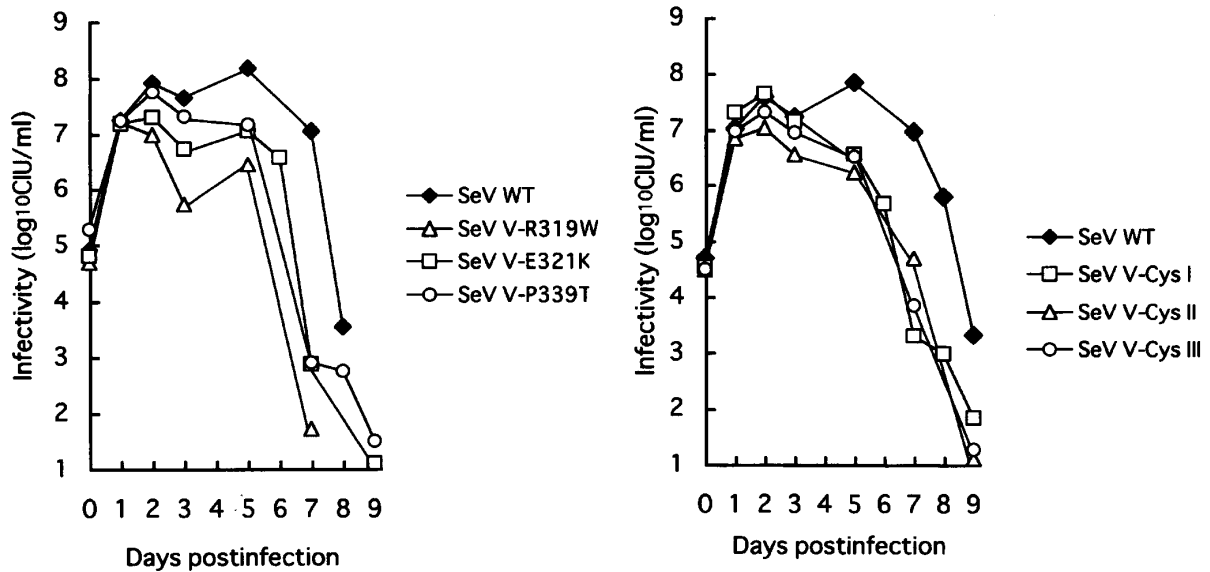


Fig. 8. Replication of SeV V mutants in the mouse lung. Mice were infected with 10^7 CIU/mouse of each of the SeV V mutants as well as SeV WT, and two or three mice infected with each of the viruses were sacrificed on days 0, 1, 2, 3, 5, 7, and 9. The lungs were removed from each mouse and homogenized in 1ml of MEM, and then infectivity was measured. Each point represents the mean infectivity in the mice. The lungs of mice that died on day 8 were removed on that day.

た。SeV Cys I, SeV Cys II, SeV Cys III の病原性も WT ウイルスの2%から4%であり (Table 1), これらの変異ウイルスも WT と比べて弱毒化していた。

考 察

V 特異的領域の保存されたアミノ酸の変異は SeV

がマウス肺内で効率良く増殖出来ないような状態を招き, その結果ウイルスのマウスに対する病原性が低下した。したがって, これらの保存されたアミノ酸はマウス肺でのウイルス増殖やウイルス病原性を促進するという V 蛋白の機能に重要と考えられる。立体構造の破壊は V 蛋白の機能不全をもたらすので, これら

Table 1. MLD₅₀ of SeV V mutants^a

Virus	MLD ₅₀ (relative pathogenicity)	
	Expt.1	Expt.2
SeV WT	7.9×10 ⁵ (1.00)	3.2×10 ⁵ (1.00)
SeV V-H ₃₁₈ N	2.0×10 ⁷ (0.04)	ND
SeV V-R ₃₁₉ W	2.0×10 ⁷ (0.04)	ND
SeV V-R ₃₂₀ G	1.3×10 ⁷ (0.01)	ND
SeV V-E ₃₂₁ K	7.9×10 ⁶ (0.10)	ND
SeV V-W ₃₃₆ G	1.3×10 ⁷ (0.01)	ND
SeV V-P ₃₃₉ T	ND	5.0×10 ⁵ (0.64)
SeV V-Cys I	ND	7.9×10 ⁶ (0.04)
SeV V-Cys II	ND	1.3×10 ⁷ (0.02)
SeV V-Cys III	ND	7.9×10 ⁶ (0.04)

^aValues are MLD₅₀ values of SeV V mutants (CIU/mouse) in two experiments. Relative pathogenicity (reciprocal relative ratios of MLD₅₀ values) compared with SeV WT, which is set at 1.0, is shown in parentheses. ND, not done. Cys I: C₃₃₇S+C₃₄₁S, Cys II: C₃₅₃R+C₃₅₅R+C₃₅₈S, Cys III: C₃₆₂S+C₃₆₅R.

のアミノ酸残基は V 蛋白の構造維持に関与している可能性がある。

SeV と同じパラミクソウイルス亜科に属する SV 5 の V 蛋白は 1 分子あたり 2 個の亜鉛イオンを結合することが示された²²⁾。同じウイルス亜科の麻疹ウイルスや NDV の GST 融合蛋白も亜鉛と結合する^{18,25)}。さらに我々の研究室の Huang ら⁷⁾は、SeV の GST-Vu 蛋白も亜鉛を結合することを示した。C₃₃₇S 又は C₃₄₁S、あるいは両方のシステインに変異をもつ領域 II の変異 GST-Vu 蛋白の亜鉛結合はそれぞれ WT の 50%、70% であったが、領域 III の GST- 変異 Vu 蛋白、C₃₅₃R、C₃₅₅R、C₃₅₈S または C₃₆₅R の亜鉛結合は 40% かそれ以下であった⁷⁾。今回、システイン残基を同時に複数変換させたのは、Huang ら⁷⁾の報告ではシステイン残基の変換は 1 カ所のみであったため、複数の残基を変換した場合はさらに大きな影響が現れることを予想したためである。しかし、今回の結果は前回のそれと一致し、単独のシステイン残基を変換した場合とほとんど変わらなかった。即ち、領域 II の C₃₃₇S と C₃₄₁S 変異を有する GST-Vu 蛋白 (V-Cys I) は約 80% の結合を示したが、領域 III の C₃₆₂S と C₃₆₅R の GST-Vu 蛋白 (V-Cys III) の結合能は約 40% であった。したがって、V 蛋白の亜鉛結合能は主に領域 III のシステイン残基によって起こり、この領域の一つのシステイン残基の変換は複数の残基の変換と同等の構造的変化を V 蛋白にもたらすと考えられる。zinc-finger-like motif と考えられているシステインの内、領域 II の 2 つのシステイ

ン残基は実際の亜鉛結合にはあまり関与していないと思われる。

Cys I, Cys II, Cys III のいずれの変異 V を有する SeV もマウスに対して高度に弱毒化していた。この結果は C₃₄₁S (領域 II) 又は C₃₆₅R (領域 III) のような 1 つのシステイン残基の置換がウイルス病原性を低下させるという以前の結果と合致する。前回の報告では、我々は亜鉛結合能は V 蛋白の構造と機能に関与していると結論した⁷⁾。さらに今回の詳細な研究から、保存された全てのシステイン残基はウイルス病原性に重要であるが、領域 II のシステインは亜鉛結合能と関係なく V 蛋白の機能に関与していると考えられた。

Editing 部位 3'-UUUUUCCCC-5' のすぐ下流の G を U に置換した SeV V-H₃₁₈N の RNA editing 効率は半分以下に減少していた。したがって、SeV V-H₃₁₈N の弱毒性は、変異によって生じた V 蛋白の機能不全の可能性に加えて、editing の減少による V 蛋白の発現減少による可能性がある。Hausmann ら^{5,6)}は、editing 効率と挿入されるヌクレオチドの数を調節する P 遺伝子中の cis-acting signal を検討した結果、3'-UUUUUCCCC-5' 配列のすぐ上流のヌクレオチドが G 挿入の調節に重要であることを報告した。彼らはプリン塩基配列上でのテンプレート-ポリメラーゼ複合体の安定性が editing に重要であると推定した。しかし、彼らは editing 部位下流の塩基について解析を行っていない。今回の実験結果はすぐ下流のヌクレオチドもまた editing 効率を調節していることを示している。この場合、テンプレートは RNA editing 部位の下流を含んで何らかの構造を形成している可能性がある。

パラミクソウイルスの V 蛋白はいろいろな機能を有する。V 蛋白欠損 NDV は培養細胞や発育鶏卵内でも増殖が悪い¹⁹⁾。これに対して SeV の V 蛋白は *in vivo* においてのみ必須である⁹⁾。SV 5 の V 蛋白は STAT 1 の分解を起こすことによってインターフェロンの作用を抑える^{3,14)}。ヒトパラインフルエンザ 2 型 (HPIV 2) は STAT 2 を不安定化することによって抗インターフェロン作用を示す^{12,20,21)}。この抗インターフェロン作用は P/V の共通領域のアミノ酸の関与も示されたが²⁹⁾、主に V 特異的領域に依存して起こると考えられている。これらの V 蛋白の機能の違いは、V 特異的領域で完全に保存されている 15 アミノ酸残基では説明できない。したがって、この機能的多様性は V 特異的領域内の非保存アミノ酸によると考えられる。これに対して、保存されたアミノ酸は V 蛋白の基本構造を規定しているのであろう。

SeV V 蛋白による *in vivo* でのウイルス増殖の促進

メカニズムは不明である。SV5 V 蛋白は damaged DNA-binding protein に結合して、細胞周期を調節する^{16,17)}。その場合、1 個の保存されたシステイン残基の変異によりこの相互作用がなくなることから、V 蛋白の構造と機能はシステイン残基に依存していると考えられる。本研究は、V 蛋白の機能と関連したウイルス病原性もまた、システイン残基や他のアミノ酸に依存していることを示した。SeV V 蛋白は保存されたアミノ酸残基によって形成された蛋白構造を介して宿主因子と結合し、マウスでのウイルス増殖を促進すると思われる。今後、SeV V 蛋白と相互作用する宿主因子を決定する研究が必要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、後指導、御校閲を賜りました広島大学医学部細菌学講座吉田哲也教授に深甚なる謝意を捧げます。また、直接ご指導賜りました同講座坂口剛正助教授、動物感染実験のご指導をいただきました清谷克寛講師に厚く御礼申し上げます。さらに、cDNA からの SeV 回収系システムの材料を分与いただきました加藤篤先生と永井美之先生（国立感染症研究所）に謝意を表します。広島大学医学部の医療分子探索施設及び遺伝子治療開発システム施設の使用にあずかりましてその管理者の方々にも深謝いたします。

参 考 文 献

1. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (eds.). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc.
2. Delenda, C., Hausmann, S., Garcin, D. and Kolakofsky, D. 1997. Normal cellular replication of Sendai virus without the trans-frame, nonstructural V protein. *Virology* 228 : 55-62.
3. Didcock, L., Young, D. F., Goodbourn, S. and Randall, R. E. 1999. Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis. *J. Virol.* 73 : 3125-3133.
4. Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. and Moss, B. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesized T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 8122-8126.
5. Hausmann, S., Garcin, D., Delenda, C. and Kolakofsky, D. 1999. The versatility of paramyxovirus RNA polymerase stuttering. *J. Virol.* 73 : 5568-5576.
6. Hausmann, S., Garcin, D., Morel, A. S. and Kolakofsky, D. 1999. Two nucleotides immediately upstream of the essential A6G3 slippery sequence modulate the pattern of G insertions during Sendai virus mRNA editing. *J. Virol.* 73 : 343-351.
7. Huang, C., Kiyotani, K., Fujii, Y., Fukuhara, N., Kato, A., Nagai, Y., Yoshida, T. and Sakaguchi, T. 2000. Involvement of the zinc-binding capacity of Sendai virus V protein in viral pathogenesis. *J. Virol.* 74 : 7834-7841.
8. Kashiwazaki, H., Homma, M. and Ishida, N. 1965. Assay of Sendai virus by immunofluorescence and hemadsorbed cell-counting procedures. *Proc. Soc. Exp. Med.* 120 : 134-138.
9. Kato, A., Kiyotani, K., Sakai, Y., Yoshida, T. and Nagai, Y. 1997. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J.* 16 : 578-587.
10. Kato, A., Kiyotani, K., Sakai, Y., Yoshida, T., Shinoda, T. and Nagai, Y. 1997. Importance of the cysteine-rich carboxyl-terminal half of V protein for Sendai virus pathogenesis. *J. Virol.* 71 : 7266-7272.
11. Kato, A., Sakai, Y., Shinoda, T., Kondo, T., Nakanishi, M. and Nagai, Y. 1996. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells* 1 : 569-579.
12. Kawano, M., Kaito, M., Kozuka, Y., Komada, H., Noda, N., Nanba, K., Tsurudome, M., Ito, M., Nishio, M. and Ito, Y. 2001. Recovery of infectious human parainfluenza type 2 virus from cDNA clones and properties of the defective virus without V-specific cysteine-rich domain. *Virology* 284 : 99-112.
13. Kiyotani, K., Takao, S., Sakaguchi, T. and Yoshida, T. 1990. Immediate protection of mice from lethal wild-type Sendai virus (HVJ) infections by a temperature-sensitive mutant, HVJpi, possessing homologous interfering capacity. *Virology* 177 : 65-74.
14. Komatsu, T., Takeuchi, K., Yokoo, J., Tanaka, Y. and Gotoh, B. 2000. Sendai virus blocks alpha interferon signaling to signal transducers and activators of transcription. *J. Virol.* 74 : 2477-2480.
15. Lamb, R. A. and Kolakofsky, D. 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication, p. 1305-1340. In D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields Virology (Fourth Edition)*, Vol. 1, 2 vols. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
16. Lin, G. Y. and Lamb, R. A. 2000. The paramyxovirus simianvirus 5 V protein slows progression of the cell cycle. *J. Virol.* 74 : 9152-9166.
17. Lin, G. Y., Paterson, R. G., Richardson, C. D.

- and Lamb, R. A.** 1998. The V protein of the paramyxovirus SV5 interacts with damage-specific DNA binding protein. *Virology* **249** : 189–200.
18. **Litson, P. and Briedis, D. J.** 1994. Measles virus V protein binds zinc. *Virology* **198** : 399–404.
19. **Mebatsion, T., Verstegen, S., De Vaan, L. T., Romer-Oberdorfer, A. and Sehriar, C. C.** 2001. A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J. Virol.* **75** : 420–428.
20. **Nishio, M., Tsurudome, M., Ito, M., Kawano, M., Komada, H. and Ito, Y.** 2001. High resistance of human parainfluenza type 2 virus protein-expressing cells to the antiviral and anti-cell proliferative activities of alpha/beta interferons: cysteine-rich v-specific domain is required for high resistance to the interferons. *J. Virol.* **75** : 9165–9176.
21. **Parisien, J. P., Lau, J. F., Rodriguez, J. J., Sullivan, B. M., Moscona, A., Parks, G. D., Lamb, R. A. and Horvath, C. M.** 2001. The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2. *Virology* **283** : 230–239.
22. **Paterson, R. G., Leser, G. P., Shaughnessy, M. A. and Lamb, R. A.** 1995. The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* **208** : 121–131.
23. **Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Kato, A., Asakawa, M., Fujii, Y., Nagai, Y. and Yoshida, T.** 1997. Phosphorylation of the Sendai virus M protein is not essential for virus replication either in vitro or in vivo. *Virology* **235** : 360–366.
24. **Sakaguchi, T., Leser, G. P. and Lamb, R. A.** 1996. The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **133** : 733–747.
25. **Steward, M., Samson, A. C., Errington, W. and Emmerson, P. T.** 1995. The Newcastle disease virus V protein binds zinc. *Arch. Virol.* **140** : 1321–1328.
26. **Thomas, S. M., Lamb, R. A. and Paterson, R. G.** 1988. Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5. *Cell* **54** : 891–902.
27. **Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22** : 4673–4680.
28. **Vidal, S., Curran, J. and Kolakofsky, D.** 1990. Editing of Sendai virus P/C mRNA by G insertion occurs during mRNA synthesis via a virus-encoded activity. *J. Virol.* **64** : 239–246.
29. **Young, D. F., Chatziandreou, N., He, B., Goodbourn, S., Lamb, R. A. and Randall, R. E.** 2001. Single amino acid substitution in the V protein of simian virus 5 differentiates its ability to block interferon signaling in human and murine cells. *J. Virol.* **75** : 3363–3370.

Mutational Analysis of the Sendai virus V Protein: Importance of the conserved residues for virus pathogenesis and efficient RNA editing

Noriko FUKUHARA

Department of Bacteriology, Hiroshima University school of Medicine

(Director: Prof. Tetsuya YOSHIDA)

The V protein of Sendai virus (SeV) is nonessential for virus replication in cell culture but indispensable for viral pathogenicity in mice. In the unique region of the V protein, the amino acid residues conserved among the members of the *Paramyxovirinae* subfamily are clustered in three regions: region I, just downstream of the RNA editing site; region II, the middle of the V unique region; and region III, the cysteine-rich zinc-finger-like region. In the present study, we introduced mutations into the conserved amino acids and generated nine mutant viruses. All of the viruses had impaired virus replication in mouse lungs and attenuated virulence in mice. One mutant, SeV V-H₃₁₈N, had inefficient RNA editing, showing that histidine at position 318 is conserved for the RNA editing machinery. Mutations in regions I and II did not inhibit zinc-binding capacity of the V unique polypeptides, while those in region III severely inhibited the zinc-binding capacity. These results demonstrate that the conserved amino acids in regions I and II are important for both V protein function, probably via protein conformation independent of zinc binding. The results also show that the histidine in region I is necessary for efficient RNA editing.