HVJ (センドイウイルス) のいわゆる宿主依存性 修飾現象について

本 間 守 男*

HOST-INDUCED MODIFICATION OF HEMAGGLUTININATING VIRUS OF JAPAN (HVJ, SENDAI VIRUS)

Morio HOMMA

Department of Bacteriology, Yamagata University
School of Medicine, Yamagata

[受付: 3月6日, 1975年]

はじめに

ミクソウイルスやパラミクソウイルスなどのように、エンヴェロップをもったウイルスが感染細胞から出芽(Budding)機構で成熟する際に、宿主の成分をエンヴェロップにとり込み、その結果ウイルスに宿主の性状が反映されるということが現在ではよく知られている。このように、宿主の種類に応じて変化するウイルスの性状としてもつとも明瞭な形でとらえられたものの中に、宿主域が変化するという現象がある。これは、表面的にはバクテリオファージで観察されている現象と非常によく似ており、それにならつて宿主依存性修飾(Host-induced modification)と呼ばれてきた。しかし、動物ウイルスの場合にはバクテリオファージのような詳しい内容の検討は行なわれておらず、ここに紹介する著者の研究からも明らかにされるように、むしろそれとはまったく異なつた機構をもつと理解すべきである。本論文においては、機構のまだよく研究されていない動物ウイルスの現象を総論的にとり上げることを避け、著者がこれまで研究してきたHVJのいわゆる宿主依存性修飾現象について解説し、この現象のもつ意義について若干の考察を加えたい。

HVJ にみられる宿主依存性修飾現象

HVJ はふ化鶏卵の漿尿膜細胞でよく増殖し、そこで産生されるウイルスは漿尿液中に放出されかつ蓄積される。以下このウイルスをEgg HVJと略称する。Egg HVJは表1に示すように、生物活性として赤血球凝集

表 1 Egg HVJ と L HVJ の性状

性 状	Egg HVJ	L HVJ
A. 生物学的性状		
赤血球凝集	+	+
ノイラミニダーゼ	+	+
溶 血	+	—
細胞融合	+	—
培養細胞に対する感染	+	—a
卵に対する感染	+	±b
B. 物理学的性状		
密 度	1.174	1.207

a. 細胞に対する変性効果を指標としては検出できないが、蛍光抗体法では、Egg HVJ の $1/10,000$ の感染価を示す。表3参照

b. Egg HVJ の $1/100$ の感染価を示す。表3参照

能(HA)、ノイラミニダーゼ、溶血能、細胞融合能などのほか、ふ化鶏卵はもちろん、L、HeLa、猿腎細胞など種類の培養細胞に対する感染性をもっている。Egg HVJはL細胞に感染し定型的な細胞変性を起こすが、そこで一段増殖後に産生されたウイルス(以下L HVJと略称する)は、Egg HVJと同程度のHA、ノイラミニダーゼ活性を示すにもかかわらず、溶血能、細胞融合能および培養細胞に対する感染性を欠いている^{1,2,3,4,5)}。またこれらの生物活性の変化に伴つてウイルスの密度の増加が認められる³⁾。このようにEgg HVJとL HVJとの間には生物学的性状のみならず物理的性状においても

* 山形大学医学部細菌学教室

明らかな相違が見られる。しかし、L HVJ を卵に接種した場合には、低い効率ながら感染性を示すことができ、しかもそこで産生されたウイルスはまったく元の Egg HVJ と同じ性質を持つている。このように L HVJ で観察された性状の変化は非遺伝的なもので、宿主域の変化という面では、先に述べたバクテリオファージにおける非適応性の宿主依存性修飾現象とよく似ている。著者と同じような生物活性の修飾については、名大癌研の松本、前野らによっても報告がなされている⁹⁾。ここで得られた結果は次のように整理し直すことができる。

A. 生物学的性状から見た修飾現象

1) HA およびノイラミニダーゼ活性

表1に示したように、この2つの活性はHAを基準として測定した場合にEgg HVJ とL HVJ の間では有意の差を認めることはできず、宿主による修飾現象とはまったく無関係に機能している。

2) 溶血能、細胞融合能および培養細胞に対する感染性

これら3つの活性は宿主の種類に応じて大きく変動し、しかも常に同じような挙動を示す。ここで示したL HVJ の培養細胞に対する感染性は、常法にしたがつて細胞変性効果を指標として10倍階段希釈法で測定した結果であるが、感染細胞を蛍光抗体法を用いて検出⁷⁾した場合には、低いながらも感染性を検出することができる。その場合の感染効率はEgg HVJ の約 $1/10,000$ 程度である。

3) ふ化鶏卵に対する感染性

これもやはり宿主の影響をうける。L HVJ は卵に対する感染性を持つてはいるが、その効率はEgg HVJ の約 $1/100$ 程度である。しかし、この感染効率は培養細胞に対するそれと比較した場合には100倍程度高い値となる。この性状は結果的には2)と同じカテゴリーに含まれるべきものであるが、後でとり上げるように、L HVJ の感染価が卵の中ではなぜ培養細胞で測定した場合よりも高く表現されるか、という問題を考えるうえに重要な情報を提供することになるので、便宜上独立した性状として取り扱うことにする。

B. 物理的性状から見た修飾現象

上述の生物活性の変化に伴ってウイルスの密度も変化する。すなわち、すべての生物活性を持つ Egg HVJ は1.174の低い値を示すのに対して、溶血能、細胞融合能および培養細胞に対する感染性などを欠くL HVJ は1.207という高い値を示す。このウイルスの密度は宿主細胞の種類に応じていろいろな値をとりうるもので、明らかに宿主依存性の修飾をうけている。

L HVJ が、その増殖の母体となつたL細胞に対する感染性を欠いているのは、インフルエンザウイルスをHeLa細胞に感染させた際に見られるような不完全粒子の産生⁸⁾によるのではない。またL HVJ は赤血球のみならず、L細胞に対する吸着も低温においてはEgg HVJ と同じ程度に進行する。しかし吸着したウイルスは36°Cの条件では容易に細胞から遊離する。このことはHVJの吸着には、明らかに区別しうる2つの過程が存在し、ウイルスに対する細胞側のレセプターの有無が一元的に感染成立の可否を決定するという、Hollandがエンテロウイルスで唱えたドグマはこのウイルスでは通用しないことを示している。L HVJ では低温における可逆的吸着だけが進行し、それ以後の高温における非可逆的吸着状態への進行は阻害された状態にあると考えることができる。またL HVJ が同時に溶血能や細胞融合能を欠くということは、これらの生物活性がウイルスの細胞内への侵入と密接な関係をもつ機構によつていのではないかと、その可能性を強く示唆している。さてそれならば上述の生物活性の修飾に常に随伴する密度の変化はいかに説明されうのだろうか。以下にこのことについて少し詳しく解説したい。

L HVJ が溶血能や細胞融合能を欠くことについて理論的には2つの可能性が考えられる。1つはもともとそのような活性を欠く場合であり、ほかはそのような活性がなんらかの機構によつて抑制されている場合とである。前者の立場に立つならば、溶血能や細胞融合能を担う物質は、卵という宿主からは供給されるが、L細胞からは供給されないということで、これらの機能は宿主のコンタミネラントとして理解することになる。事実これまでの多くの研究は、間接的にこの考え方を支持してきた。宿主のリピド成分がウイルスのエンヴェロップにとり込まれる、というインフルエンザウイルス⁹⁾におけるのと同じことがHVJでも報告されている¹⁰⁾。しかし、宿主のリピド成分がそのままエンヴェロップに持ち込まれるのではなく、ある程度の選択的な再配分が行なわれることはあるらしい^{11,12)}。一般的にパラミクソウイルスのエンヴェロップには、Phosphatidylethanolamineの含量が高く、Phosphatidylcholineの含量が低いという傾向があり^{11,12,13)}、このリピド構成がエンヴェロップに溶血活性を賦与するのに効果があるとの考え方もある¹⁴⁾。しかし細胞膜のリピド組成は培地の組成や細胞の生理的条件によつて容易に変動しうる^{10,12,15)}ので、結果の解釈に当たつては慎重を期すべきであろう。Simpsonら¹⁵⁾は、HVJによく似たニューカッスル病ウイルス(NDV)のPhospholipase Cに対する感受性が、宿主細胞の種類によつて異なり、また感染細胞の培養液中にSphingo-

myeline を添加しておく、そこから産生されたウイルスの同酵素に対する抵抗性が増大するというを観察している。これらの報告は、細部に関してはともかく、一般的にはパラミクソウイルスのエンヴェロープに宿主のリピド成分が反映するということを示している。またウイルスの密度が、宿主細胞の種類に応じてそれぞれ固有の値をもつ^{8,16,17,18)}ということも、宿主の細胞膜の性状を反映したウイルスエンヴェロープのリピド含量に差があるためと考えてさしつかえないであろう。一方、著者らが観察した、HVJ の溶血能や細胞融合能は培養細胞で産生したウイルスでは見られない、という現象は、パラミクソウイルスに普遍的なものとして理解されるようになり、この現象を手がかりにして、これらの活性の本体を探ろうという一連の研究が当然の流れとして行なわれるようになった。しかし、それらの研究はすべて、培養細胞を通過したウイルスが活性を示さないのは、そのウイルスが活性を担う物質を脱落しているとの偏見に基づいて進められたために、その帰結するところでもまた、活性の本体は宿主細胞から供給されとの結論にならざるをえなかつた。たとえば、Neurath^{19,20)}は著者らの実験結果を見て、溶血能の本体は卵の漿尿膜細胞から供給されと考え、漿尿膜細胞から溶血物質を分離することを試み、その本体はある種のエステラーゼであるとの結論を下している。HVJ のエンヴェロープが Phospholipid として Lysolecithin を持つことが知られており^{11,13,21)}、またこれこそが溶血能の本体であろうとの考え²²⁾も出されていたが、最近 Brodano ら²³⁾は Lysolecithinase (Phospholipase B) が HVJ の溶血能および細胞融合能を選択的に不活化することを報告して、上記の Lysolecithin の説を強く支持している。しかも彼らの仕事には、Lysolecithinase が溶血能、細胞融合能を不活化する条件下でも感染性は影響を受けないというおまけがついており、溶血能および細胞融合能は、ウイルスにとつてもつとも本質的な感染性とは無関係の、単なる宿主に由来するコンタミナントであるかのごとき強い印象を与えている。しかし、一見明解な結論を導いた彼らの実験内容は非常に貧弱であり、これらの活性の定量性もはなはだ幼稚で、まったく信じよう性に乏しい。彼らの実験の方法や結論は、それまでの研究の流れから見た場合に、その時代に迎合した非常に受け入れやすいものであつたがゆえに、そのもたらした罪は決して軽いものではなからう。細胞融合活性について Young & Ash ら¹⁸⁾は、卵で増殖した NDV は密度が低くかつ細胞融合能を持つのに対して、培養細胞から産生された NDV は密度が高くかつ細胞融合能を欠いているとの結果を得、このことから NDV の密度を左右している宿

主由来のリピドが細胞融合活性の本体であろうとの推察を下した。以上のように、これまでの宿主依存性修飾現象に関する仕事からは、ウイルスのエンヴェロープが宿主細胞によつて物理的および化学的に修飾をうける結果として、生物学的な修飾現象が存在するという結論しか与えられていない。

トリプシンによる HVJ の活性化現象

著者自身も HVJ の溶血能は宿主に由来する活性ではないかと考え、それを証明するためのいくつかの実験を計画したが、その努力はすべて徒労に終わった。しかしある目的に沿つた実験を行なつている間に、驚くべき事実遭遇した。それは、HVJ に感染した L 細胞をトリプシン処理によつて分散し非感染 L 細胞上に接種したところ、その感染細胞を中心としてウイルス抗原の合成が隣接細胞に波及するという事実である。この抗原を合成している場所は、蛍光抗体法および Hemadsorption 法によつて Microfoci として容易に定量的に検出することができ(図 1、図 2)、そのために以下に述べる実験解析が可能となつた。

1) Focus は、感染細胞をトリプシンの代わりにピペットで機械的に分散したり、または EDTA で分散した場合には決して出現しない。

2) トリプシンで分散した感染細胞を接種する際に、ウイルスに対する抗体を培地中に含ませると Focus 形成は阻止される。

3) Focus の大きさおよび数が培養時間の経過に伴つて増加することはない。このようなことから、感染細胞

図 1 HVJ 感染 L 細胞をトリプシン処理後、L 細胞の単層培養上に接種して生じた蛍光陽性 Focus。

図 2 HVJ 感染 L 細胞をトリプシン処理後、L 細胞の単層培養上に接種して生じた Hemadsorption foci.

に対するトリプシンの効果はその酵素作用による非常に特異的なものであり、その作用の標的となっているのは細胞膜上にある成熟粒子そのものではないかと考えられるに至った。

超遠心によつて精製濃縮した LHVJ を磷酸緩衝食塩水に浮遊し、種々の濃度のトリプシン溶液で 36°C 、6 分間の処理を行なつた後、ただちに氷冷し、Soybean trypsin inhibitor を加えて反応を停止してから溶血能、細胞融合能および感染価を測定した。得られた結果は図 3 に示してあるが、L HVJ を直接トリプシンで処理することによつて、上記の活性のすべてが同時に復活することが明らかとなつた。さらにこの実験は、これらの活性を最大限に復活させるに必要なトリプシンの至適濃度は、すべての活性について同じであることを示している。これに対して、対照として用いた Egg HVJ においては、トリプシンによる活性の上昇はほとんど観察されない。この実験のもつ意義について少し詳しく考察を加えたい。

まず、トリプシン処理によつて活性が復活したという事実は、L HVJ がこれらの活性を担う本体を欠いているという従来の考え方を払拭し、L HVJ ではこれらの活性の発現を抑制するなんらかの機構が存在するという別の考え方を支持している。他方、Egg HVJ にあつてはその抑制機構がすでに解除された状態にあることを示唆する。さらに、ウイルスの活性化は、トリプシンの特異的な酵素作用に基づくことが明らかにされ、この系を利用することによつて生物活性の宿主依存性修飾現象を、はじめて物質的基盤に立つて解析しうる手段を得たことになる。著者はこの活性化現象を発見したとき、L

図 3 L HVJ の感染性、溶血能および細胞融合能に及ぼすトリプシンの影響

感染価は蛍光抗体法⁷⁾で測定した。細胞融合能は、Ehrlich 浮遊細胞と Vero 単層培養を用いて測定した⁸⁾。

HVJ は成熟の際に上記の活性の発現を抑制する物質を L 細胞から獲得し、それがトリプシン処理によつて除かれ活性化されるという機構を作業仮説として設定し、さらに説明を容易にするために、そのような抑制物質に対して Masking substance なる名称を冠した⁹⁾。この仮説は、著者にとつては、これまで HVJ に観察されたいろいろな生物学的現象を矛盾なく説明しえてはなはだ便利であつたが、後に述べる実験成績は、この仮説の誤りであつたことを示す結果となつている。

つぎに溶血能および細胞融合能の意義に関して、ここに得られた実験成績は非常に重要な事実を示している。これまでも溶血能と細胞融合能との異同に関しては多くの研究者によつて論じられてきた。しかしその議論に当たつて注意すべきことは、溶血能は赤血球から遊離されたヘモグロビンの量で、細胞融合能は複数の細胞が合細胞を形成する度合いで、というようにまったく異なつた方法で定量されているということである。これらの生物現象は、ウイルスの粒子の大きさや、エンヴェロープの損傷の度合いおよび細胞の生理的状态などで容易に左右さ

れるものであり、結果の現象から活性の本体の異同を論ずるに当たっては厳に慎重でなければならない。この点に関し、著者の実験系では、完全な Virion の集団のみが取り扱われており、また実験に用いたトリプシン処理の条件ではエンヴェロープの破壊が起きていないという特徴をもっている。したがって、これら2つの活性を最大に復活させるトリプシンの至適濃度が同じであるというここで得られた結果は、両現象が反応の開始時点で共通の機構をもつということを強く示唆している。しかも、その共通の機構は、感染を成立させるうえに非常に重要な役割を果たしていると考えられる。このことを、すでに述べた、L HVJ では吸着以後の侵入過程が進行しない、という事実と対比させた場合に、溶血とか細胞融合現象の基礎にあるウイルスと細胞との Interaction は、このウイルスの持つ侵入開始機構そのものであると考えることができる。したがって溶血能および細胞融合能は、HVJ の侵入機構を特徴づけ、さらに感染の成立を左右しているウイルスの存続に不可欠な機能として理解しなければならない。ウイルスにとってこのように重要な機能は、宿主細胞から供給されるコンタミネントなどではありえなかつたわけで、ウイルス遺伝子によってプログラムされた機能として粒子内に組み込まれていた方がはるかに好都合であろう。Morgan らは、エンヴェロープを持ったウイルスの侵入機構を電子顕微鏡的に観察し、これらのウイルスでは、エンヴェロープと細胞膜との融合によつて核たん白質を含んだ内部構造が細胞内に侵入するといういわゆる Envelope fusion の考えを提出した^{28,24)}。Envelope fusion は、やはりエンヴェロープを持ったラブドウイルスに属する Vesicular stomatitis virus についても確かめられている²⁵⁾。また、HVJ の溶血現象や細胞融合現象を形態的側面から解析した結果、これら両現象の根底には Envelope fusion が共通の機構として存在すると考えられるに至つた^{26,27)}。著者らも、HVJ の電子顕微鏡による観察からこの考えを支持する結果を得ている。しかし、Morgan らは Envelope fusion を HVJ のみならず、溶血能や細胞融合能を持たないインフルエンザウイルスでも観察しており²⁸⁾、Envelope fusion を、エンヴェロープを持ったウイルスに共通の侵入機構として理解しようとしていることには少なからぬ抵抗を感じる。著者は、HVJ の溶血能や細胞融合能を Envelope fusion に基づいた侵入の機能そのものであり、そのような活性を欠損しているインフルエンザでは、まったく別の侵入機構が存在するだろうと考えている。Morgan の考えの根本的な誤りは、Envelope fusion の引き金となるべきウイルスによる細胞膜の融解反応に、ノイラミニダーゼが関与す

図4 HVJ の密度に対するトリプシンの影響
Egg HVJ (○····○) と L HVJ (●——●) のトリプシン処理前(上)と処理後(下)の密度を、酒石酸カリ密度勾配(60~30%, w/v) 遠心法により測定した²⁹⁾。

ると考えていることにある²⁴⁾。この考えは、溶血能も細胞融合能も発現していない L HVJ においても HA およびノイラミニダーゼは機能しており、またトリプシン処理はその活性に影響を与えない²⁸⁾、という著者の実験結果とは明らかに相いれない。Envelope fusion にノイラミニダーゼが関与するとの Morgan の考えは、その後 Neurath らによつても否定されている²⁹⁾。L HVJ のトリプシンによる活性化現象に関連して興味のあるもう1つの現象は、このトリプシン処理によつても L HVJ の密度は変わらないということである(図4)。この事実はすでに述べたように、HVJ の密度を左右しているリピッドが細胞融合の本体であるという Young らの考え¹⁹⁾の誤りを指摘しているとともに、HVJ のエンヴェロープの化学的および物理的な宿主依存性修飾と生物学的な性状の変化とは、まったく異なつた独立の現象であることを明確にしている。

HVJ の活性化に伴うウイルス糖たん白の変化

L HVJ の溶血能や細胞融合能がトリプシン処理によつて活性化されるという現象は、それまで手がかりのつかめなかつた、いわゆる生物学的な宿主依存性修飾現象

図5 Egg HVJ ポリペプチドの SDS ポリアクリルアミド電気泳動法による解析
各分画は Coomassie blue 染色後の吸光度を示す⁸⁰⁾. VP 3 は Nucleoprotein, VP 2 と VP 4 は糖たん白質. a はトリプシン処理前, b はトリプシン処理後.

を物質的に追求しようと同時に、この実験系を通して細胞融合能および溶血能の本体をも追求しようとの見通しを与えている。この目的に沿って行なわれた実験⁸⁰⁾をつぎに紹介する。

ウイルスの活性化とそれに伴うポリペプチドの変化とを対応させるために、未処理の活性を持たない L HVJ と、トリプシン処理によって活性化された後の L HVJ とを比較した。この実験の対照としては、元来活性化された状態のみ産生され、その活性がトリプシン処理によっても影響を受けない Egg HVJ を用いた。以下の実験では、溶血能のみを活性化の指標としているが、活性型ウイルスとは溶血能、細胞融合能をともに発現しているウイルスを、非活性型ウイルスとは両機能が発現されない状態にあるウイルスを指している。

図5に示すように、Egg HVJ においては、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で、たん白質染色によ

図6 L HVJ ポリペプチド構成⁸⁰⁾
a はトリプシン処理前, b はトリプシン処理後。
トリプシン処理によって VP 2 と VP 4 の関係が変わる。

って6つのポリペプチド (VP 1 ~ VP 6) を識別することができ、そのうち、VP 2 と VP 4 は糖たん白質である。Egg HVJ は、トリプシン処理によって、活性のみならずゲル電気泳動上のパターンも変化を受けない。これに対して、非活性型の L HVJ では、VP 2 領域に、Egg HVJ の VP 2 に対応する VP 2a のほかに、これに接近してもう1つの糖たん白 VP 2b が存在し、これと対照的に VP 4 の量が顕著に少なくなっている。ところが、これをトリプシンで活性化した後では、VP 2b が消失し VP 4 が著明に増加している(図6)。この関係を、放射性アミノ酸とグルコサミンで標識したウイルスでもう少し詳細に検討したのが図7であるが、この図では、トリプシン処理によって GP 2 (=VP 2b) の消失と GP 3 (=VP 4) の増加のほかに、分子量の小さい糖たん白質 GP 4 の出現するのが見られる。L HVJ と同様の結果は、それよりももつと活性度の低い、HeLa 細胞で増殖したウイルス (HeLa HVJ) でも見られるが、

図 7 放射性アミノ酸とグルコサミンで標識した L HVJ のポリペプチド構成⁸⁰⁾

a はトリプシン処理前, b は処理後. トリプシン処理によって GP 2 が消失, GP 3 が増加し, 新しく GP 4 が出現する. NP は Nucleoprotein.

この場合には GP 2 と GP 3 の量的な開きはさらに顕著になっている. そしてこれをトリプシン処理した場合にも, やはり L HVJ のときと同じ結果が得られる. 以上の結果は次のように説明される.

1) 本来活性型である Egg HVJ では, トリプシン処理による活性の変化もポリペプチドパターンの変化も見られない.

2) 非活性型のウイルスのポリペプチドパターンは, GP 2 の存在と GP 3 の減少により特徴づけられており, かつこの特徴は非活性度の強いウイルスほど顕著である. トリプシン処理によりウイルスを活性化した場合には, GP 2 は消失し, それと同時に GP 3 の量的増加および GP 4 の出現が見られる. そしてこのパターンは, 結果的には Egg HVJ のそれと非常に似たものとなる.

HVJ のポリペプチドと機能との関係については, 最近の研究によってしだいに明らかにされてきた. この中で, GP 1 が HA とノイラミニダーゼの両方の活性を担っていることは, 戸沢ら⁸¹⁾をはじめほかの研究者によっても報告され^{82, 83)}, 同様の結果は, NDV⁸⁴⁾や SV 5⁸⁵⁾でも得られている. この事実は, 両活性が別々の糖たん白

質で担われているインフルエンザウイルス⁸⁶⁾とはまったく異なつた, パラミクソウイルスに共通の特徴であると考えられよう. 著者の実験も, L HVJ の HA とノイラミニダーゼ活性は溶血能や細胞融合能と異なり, トリプシン処理とは無関係に常に機能し, さらに GP 1 はトリプシン処理による構造上の変化を受けないことを示しており, 上の記述とよく符合している. トリプシン処理による活性化現象に, GP 3 の増加と GP 4 の出現が伴うということは, これらの 2 つの糖たん白質が溶血や細胞融合などの活性の出現と密接な関係を持つと考えられる. このことは活性型の Egg HVJ が, トリプシンで活性化された後の L HVJ や HeLa HVJ とよく似たペプチドパターンを示していることによつても支持される. GP 3 と GP 4 は, おそらくトリプシンの作用を受けた GP 2 の解裂によつて生ずるものと思われる. その根拠としては, Egg HVJ でも放射能標識ウイルスでは GP 4 の存在が確認されたこと, 分子量の計算から, GP 3 (51,000) と GP 4 (15,000) の和が GP 2 (67,000) の値とほぼ同じであること, および GP 3 と GP 4 は, HA とノイラミニダーゼ活性を担っているスパイクと区別しうるもう 1 つの別のスパイクを構成していること⁸³⁾などが挙げられる. 糖たん白質の解裂による溶血能および細胞融合能の出現に関しては, Scheid & Choppin⁸²⁾も著者と同じ見解に達している. 以上に述べたポリペプチドの解析の結果は, はじめに著者が考えたように, L HVJ の生物活性が宿主細胞に由来する Masking substance によつて抑制された状態にあるとの考えの誤りであることを示唆しているが, 放射能標識ウイルスをトリプシンで活性化した場合に, 常に数パーセントの放射活性が Virion から遊離するとの事実があるために, この仮説を完全に否定するまでには至らなかった. しかし, トリプシン処理で遊離する物質を解析することは, ウイルスの精製の基準をどこに設けるかという技術的な保証が得られないかぎり無用の混乱をひき起こすことが容易に予想される. そこで糖たん白質の解裂と活性化現象とをより直接的に対応させるための実験を企て, この方面からのアプローチによつて上の仮説を否定しようと試みた.

再構成エンヴェロープに対するトリプシンの影響

Detergent で可溶化された NDV 標品から透析によつて Detergent を除き, ウイルスエンヴェロープを再構成させる手法が飯沼ら⁸⁷⁾によつて紹介されてから, HVJ の再構成についても詳細な研究がなされた^{88, 89)}. 活性型の Egg HVJ から再構成されたエンヴェロープは, Virion のエンヴェロープが担っている HA, ノイ

ラミニダーゼ、溶血能および細胞融合能などのすべての生物活性を備えており、かつそのポリペプチドは2つの糖たん白質(GP1とGP3)のみから構成されている³⁰⁾。この手法を著者の系にも応用して、これまで Virion で得られたトリプシンによる活性化の機構を、糖たん白質GP2の解裂反応によつてのみ説明しようとして現在実験を進めているが、これまでに得られた成績の大略を紹介したい。実験内容は、次の4つの主要な部分から成っている。

1) 非活性型ウイルスを可溶化し、その遠心上清から再構成されたエンヴェロープの活性はどうか、またその糖たん白質構成はどうかになっているか。

2) 非活性型ウイルスをトリプシンで活性化した後で、上と同様の処理を行なつて得た再構成エンヴェロープ粒子の糖たん白質構成はどうか。

3) 上記1)の実験で、もし再構成粒子が非活性型である場合には、それをトリプシン処理によつて活性化できるかどうか。またこの処理によつて糖たん白質構成がどう変わるか。

4) 可溶化状態にある非活性型ウイルスに直接トリプシン処理を行ない、そのあとで再構成させた場合の活性と構成たん白質との関係はどのようになるか。

この実験では、継代培養された猿腎細胞(LLCMK2)で増殖したHVJ(MK HVJ)が用いられているが、このウイルスは非常に収量がよいばかりでなく、これまで得られたウイルスの中でもつとも非活性度が強いという特徴を持っているので、本実験を行なうのにはたいへん都合がよい。

表2に示したように、非活性型MK HVJから再構成された粒子は、やはり活性を示さないが、トリプシン処理は、Virion、可溶化状態にあるエンヴェロープおよび再構成粒子のいずれに対しても有効に働き、活性型の再構成粒子を生ずる。また、再構成粒子の構成糖たん白質は、非活性型再構成粒子のみがGP2を示し、活性型再構成粒子は、トリプシン処理を行なつた時期には関係なく、すべてGP2を欠き、GP3とGP4とから成ることが明らかである。GP1は活性のいかんにかかわらず、すべての再構成粒子に共通に存在する。この結果から、トリプシンが、Virion、可溶化状態のエンヴェロープおよび再構成粒子など、いずれの状態のGP2に対しても非常に特異的な作用部位をもつことが明らかであり、GP2の解裂がウイルスを活性化させると結論してさしつかえなからう。

HVJ はなぜ卵に感染しうるか

これまでの実験から、HVJの活性化にはGP2の解

表2 HVJ 再構成実験におけるトリプシンの影響*

トリプシンの 作用時期	再 構 成 粒 子	
	活 性	糖たん白質構成
非 処 理	—	GP1, GP2
可 溶 化 前 Virion	+	GP1, GP3, GP4
可溶化エンヴェロープ	+	GP1, GP3, GP4
再 構 成 後	+	GP1, GP3, GP4

* 非活性型 MK HVJ を用い、再構成の各段階でトリプシン処理を行ない、得られた粒子の生物活性(溶血能)と糖たん白質構成を調べた。

表3 L HVJ の感染性に対するトリプシンの影響

トリプシン処理	感 染 価	
	L 細胞 ^a	発育鶏卵 ^b
非 処 理	10 ^{4.2}	10 ^{6.5}
0.0004%, 36度, 6分	10 ^{7.9}	10 ^{8.1}

a. L細胞単層培養に対する感染性。蛍光抗体法⁷⁾による。

b. 50%感染価(EID₅₀)。

裂が必須であることが明らかにされたが、それならばなぜ Egg HVJ はそれ自体で活性化された状態にあるのだろうか。卵以外の培養細胞で増殖したL HVJ, HeLa HVJ および MK HVJ などは、培養細胞に対する感染性はきわめて低いにもかかわらず、卵に接種した場合には約100倍程度感染効率が增加する(表3)。しかしその場合でも、あらかじめトリプシン処理することより、さらに10~100倍程度感染効率が上がり、結果的には Egg HVJ の感染効率达到匹敵するレベルにまで到達する(表3)。これらの事実を矛盾なく統一的に解釈するため、著者は卵の中にトリプシン処理と同じ効果を持つ活性化機構の存在を想定した。もつとも簡単に考えるならば、漿尿液中にトリプシン様の作用を持った活性化物質(Activator)が都合よい程度に含まれていないかということである。この可能性を検討するため、L HVJ を正常な漿尿液と36°C で in vitro で混合し、継時的にウイルスを取り出してその感染価と溶血価とを測定した。その結果は図8に示したように、時間の経過に伴つて、ウイルスの溶血能と感染性が同時に活性化される。しかもその活性化は Soybean trypsin inhibitor の存在によつて完全に阻止される。またウイルスの活性化に伴つて、すでに述べたようなGP2の解裂の起こることが明瞭に示されている(図9)。このことは漿尿液中にトリプシン様の作用を持った Activator の存在することを示唆しているが、その力価には個々の卵ごとの変動があ

図 8 漿尿液による L HVJ の活性化
L HVJ を正常漿尿液と36°C で混合し、経時的に溶血能 (●—●) と L 細胞に対する感染価⁷⁾ (■—■) とを測定した。対照としてトリプシンインヒビターを入れたと溶血能 (○……○) も感染性 (□……□) も復活しない。

図 9 MK HVJ の糖たん白質構成に対する漿尿液の影響
a は処理前、b は処理後。

図 10 HVJ の増殖と Activator 産生との関係

り、これが卵の中における唯一の活性化機構かどうかは不明である。これまでの成績は、むしろ、漿尿液中にはトリプシン以外のプロテアーゼが活性化物質として存在する可能性を示している。Activator(s) の本体やその存在部位に関しては、現在研究が進行中であるが、将来、Activator(s) が HVJ の株間の性状の差を区別するマーカーとして使用されることが考えられる。

あとがき

ここに紹介した著者の実験成績から、これまでパラミクソウイルスで観察されてきたいわゆる宿主依存性修飾現象の解釈は、根本的に修正される必要がある。ウイルスエンヴェロープのリビドの性状や含量は直接宿主の性状を反映した真の意味での宿主依存性修飾現象と考えられるが、溶血能、細胞融合能および感染性などの宿主の種類に応じた表面的な生物学的性状の変化は、これから独立したまったく違った次元の現象であり、しかも実際には宿主の修飾を受ける事実もない。HVJ の発見当初、先達が卵という、このウイルスの活性化にはもつともよい条件を備えた宿主を偶然に選択したために、そこで産生された活性化状態にあるウイルスを、そのまま標準的なウイルスと考えてしまったようである。そして、多くの研究者はこのウイルスを基準にして非活性型のウイルスをながめてきたために、HVJ の生物活性は宿主に依存して修飾されるとの考えに短絡してしまったと思われる。著者の成績を基にして本来の HVJ の姿を描くならば、それは HA とノイラミニダーゼのみを常時機能し、感染の成立を左右する直接の機能(溶血能、細胞融合能)は秘めていると思われる。したがってこのウイルスを活性化する要因は、当然宿主側から提供されなければならない。このような活性化の要因は、おそらく細胞膜の表面に存在する、または細胞外に遊離されるトリプシン様の作用を持った Activator であろうと考えられる。こ

の関係を模式的に示したのが図10である。L HVJ, HeLa HVJ および MK HVJ のように感染性をあらわさない非活性型のウイルスが、ふ化鶏卵に代表されるような Activator producing system に到達すると、そこで活性化されて細胞内に侵入し、増殖の過程を経て成熟ウイルスが細胞外に遊離する。このとき産生されるウイルスは本質的には非活性型であるが、Budding の過程で、細胞膜表面または細胞外環境に存在するであろう Activator によつて活性化されるために、表面的には活性型のウイルスのみが産生されることになる。一方、非活性型ウイルスが Activator non-producing system に到達した場合には、非活性状態にとどまり吸着以後の過程に進むことはできない。しかしそのようなウイルスは、ノイラミニダーゼの作用によつて細胞から離れて別の Activator producing system に到達することも可能である。これに対して活性型ウイルスの場合には、Activator の産生、非産生に関係なく感染が成立し、成熟ウイルスを産生するが、Activator non-producing system においては、一段増殖によつてもつぱら非活性型ウイルスのみを産生する。

HVJ のこのような増殖様式は生体感染においてどのような意義を持ちうるだろうか。HVJ が生体に感染してから標的器官に達するまでの経路のいたるところに Inhibitor は存在しうるであろうが、ウイルスの活性型のいかにかわらずノイラミニダーゼが常に機能していることは、ウイルスをインヒビターから遊離させて標的細胞に近づけるのに役立つのかもしれない。またもし標的器官を Activator producing system と割り切つて考えるならば、これが HVJ の Organ tropism を規定すると考えることも可能である。また Activator の産生の度合は、臓器や細胞の種類のみならず、動物の Aging の程度によつてもかなり異なることは容易に予想される。マウスが HVJ の Natural reservoir であることは疑い余地のない事実であるが、ブタから分離された報告もあり^{40,41)}、それが唯一の Host と考える根拠はない。HVJ にはかつてヒトの新生児肺炎から分離されたという歴史があるが⁴²⁾、その分離に当たつてマウスが用いられたという事実のために、ついにその因果関係を立証することは不可能であつた。しかし著者がこの実験を通して、今、ひそかに感じていることは、もしやあの新生児肺炎は新生児なるがゆえに起こりえた HVJ の感染症ではなかつたかということである。HVJ の Tropism の問題は、少なくとも Holland がエンテロウイルスで提唱したようなレセプターレベルのできごととして単純化することはできない。Activator の産生と

いう観点から、どこまでこの問題に近づきうるかは今後の著者の研究課題である。

謝 辞

本研究の開始時からご教示を賜つた石田名香雄教授、途中から共同研究者として本研究に参画した大内正信博士および貴重な助言と激励をいただいた篠原兵庫教授に感謝します。また、トリプシンによる HVJ 活性化現象に関し、直接その実験の動機を提供してくれた小林ヒロ子、福田孝子ならびに実験の遂行に当たり、優秀な技術援助を惜しまなかつた多田孝太郎の諸兄姉の協力に厚く謝意を表します。さらに個々の実験成績についてたえず討議いただいた戸沢秀樹教授、清水一史博士および村松道子博士に深謝します。

本研究は、文部省科学研究費補助金の助成によつて行なわれた。

文 献

- 1) Ishida, N. and Homma, M. (1960) : A variant Sendai virus, infectious to egg embryos but not to L cells. *Tohoku J. Exp. Biol. Med.* **73**, 56-69.
- 2) Ishida, N. and Homma, M. (1961) : Host-controlled variation observed with Sendai virus grown in mouse fibroblast (L) cells. *Virology* **14**, 486-488.
- 3) Homma, M. (1971) : Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. I. Restoration of the infectivity for L cells by direct action of trypsin on L cell-borne Sendai virus. *J. Virol.* **8**, 619-629.
- 4) Homma, M. (1972) : Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. II. Restoration of the hemolytic activity of L cell-borne Sendai virus by trypsin. *J. Virol.* **9**, 829-835.
- 5) Homma, M. and Tamagawa, S. (1973) : Restoration of the fusion activity of L cell-borne Sendai virus by trypsin. *J. gen. Virol.* **9**, 423-426.
- 6) Matsumoto, T. and Maeno, K. (1962) : A host-induced modification of hemagglutinating virus of Japan (HVJ, Sendai virus) in its hemolytic and cytopathic activity. *Virology* **17**, 563-570.
- 7) Kashiwazaki, H., Homma, M. and Ishida, N. (1965) : Assay of Sendai virus by immunofluorescence and hemadsorbed cell-counting procedures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **120**, 134-138.
- 8) Henle, G., Girardi, A. and Henle, W. (1955) : A non-transmissible cytopathic effect of influenza virus in tissue culture accompanied

- by formation of non-infectious hemagglutinins. *J. Exp. Med.* **101**, 25-41.
- 9) Wecker, E. (1957) : Die Verteilung von ^{32}P im Virus der klassischen Geflügelpest bei verschiedenen Markierungsverfahren. *Z. Naturforsch.* **12b**, 208-210.
- 10) Klenk, H. -D. and Choppin, P. W. (1969) : Lipids of plasma membrane of monkey and human kidney cells and of parainfluenza virus grown in these cells. *Virology* **38**, 255-268.
- 11) Blough, H. A. and Lawson, D. E. M. (1968) : The lipids of paramyxoviruses: A comparative study of Sendai virus and Newcastle disease viruses. *Virology* **36**, 286-292.
- 12) Klenk, H. -D. and Choppin, P. W. (1970) : Plasma membrane lipids and parainfluenza assembly. *Virology* **40**, 939-947.
- 13) Shibuta, H., Yamaura, K., Yamamoto, T. and Matumoto, M. (1969) : Incorporation of ^{32}P into phospholipids of influenza A and parainfluenza 1 viruses. *Jap. J. Microbiol.* **13**, 212-214.
- 14) Hosaka, Y. and Shimizu, Y. K. (1972) : Artificial assembly of envelope particles of HVJ (Sendai virus). II. Lipid components for formation of the active hemolysin. *Virology* **49**, 640-646.
- 15) Simpson, R. W. and Hauser, R. E. (1966) : Influence of lipids on the viral phenotype. I. Interaction of myxoviruses and their lipid constituents with phospholipases. *Virology* **30**, 684-697.
- 16) Stenback, W. A. and Durand, D. P. (1963) : Host influence on the density of Newcastle disease virus (NDV). *Virology* **20**, 545-551.
- 17) Evans, M. J., and Kingsbury, D. W. (1969) : Separation of Newcastle disease virus proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Virology* **37**, 597-604.
- 18) Young, N. P. and Ash, R. J. (1970) : Polykaryocyte induction by Newcastle disease virus propagated on different hosts. *J. gen. Virol.* **7**, 81-82.
- 19) Neurath, A. R. (1964) : Separation of a hemolysin from myxoviruses and its possible relationship to normal chorioallantoic membrane cells. *Acta Virol.* **8**, 154-162.
- 20) Neurath, A. R. (1965) : A component splitting diisopropylfluorophosphate in preparation of Sendai and Newcastle disease viruses and in a fraction from normal chorioallantoic membrane cells: Its possible identity with hemolysin. *Arch. ges. Virusforsch.* **15**, 531-538.
- 21) Rebel, G., Fontages, R. and Colobert, L. (1962) : Nature lipidique des substances responsables de l'activité hémolytique de myxovirus parainfluenzae 1 (virus Sendai). *Ann. Inst. Pasteur* **102**, 137-152.
- 22) Barbanti-Brodano, G., Possati, L. and La Placa, M. (1971) : Inactivation of polykaryocytogenic and hemolytic activities of Sendai virus by phospholipase B (lysolecithinase). *J. Virol.* **8**, 796-800.
- 23) Morgan, C. and Rose, H. M. (1968) : Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. VIII. Entry of influenza virus. *J. Virol.* **2**, 925-936.
- 24) Morgan, C. and Howe, C. (1968) : Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. IX. Entry of parainfluenza 1 Sendai virus. *J. Virol.* **2**, 1122-1132.
- 25) Heine, J. W. and Schnaitman, C. A. (1969) : Fusion of vesicular stomatitis virus with the cytoplasmic membrane of L cells. *J. Virol.* **3**, 619-622.
- 26) Howe, C. and Morgan, C. (1969) : Interactions between Sendai virus and human erythrocytes. *J. Virol.* **3**, 70-81.
- 27) Apostolov, K. and Almeida, J. D. (1972) : Interaction of Sendai (HVJ) virus with human erythrocytes: a morphological study of haemolysis cell fusion. *J. gen. Virol.* **15**, 227-234.
- 28) Homma, M. (1974) : Host-induced modification of Sendai virus. Negative strand viruses (ed. Mahy and Barry) Acad. Press.
- 29) Neurath, A. R., Vernon, S. K., Hartzell, R. W. and Rubin, B. A. (1972) : Haemolysis by Sendai virus: lack of requirement for neuraminidase. *J. gen. Virol.* **16**, 245-249.
- 30) Homma, M. and Ohuchi, M. (1973) : Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells III. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *J. Virol.* **12**, 1457-1465.
- 31) Tozawa, H., Watanabe, M. and Ishida, N. (1973) : Structural components of Sendai virus. Serological and physicochemical characterization of hemagglutinin subunit associated with neuraminidase activity. *Virology* **55**, 242-253.
- 32) Scheid, A. and Choppin, P. W. (1974) : Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* **57**, 475-490.
- 33) Shimizu, K., Shimizu, Y. K., Kohama, T. and Ishida, N. (1974) : Isolation and characterization of two distinct types of HVJ (Sendai virus) spikes. *Virology* **62**, 90-101.

- 34) Scheid, A. and Choppin, P. W. (1973) : Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.* **11**, 263-271.
- 35) Scheid, A., Caligiuri, L. A., Compans, R. W., and Choppin, P. W. (1972) : Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with the large SV5 glycoprotein. *Virology* **50**, 640-652.
- 36) Kilbourne, E. D., Choppin, P. W., Schulze, I. T., Scholtissek, C. and Bucher, D. L. (1972) : Influenza virus polypeptides and antigens—Summary of influenza workshop I. *J. Infect. Dis.* **125**, 447-455.
- 37) Inuma, M., Yoshida, T., Nagai, Y., Maeno, K. and Matsumoto, T. (1971) : Hemagglutinin and neuraminidase subunits of Newcastle disease virus. *Virology* **46**, 663-677.
- 38) Shimizu, K., Hosaka, Y. and Shimizu, Y. K. (1972) : Solubilization of envelopes of HVJ (Sendai virus) with alkali-Emasol treatment and reassembly of envelope particles with removal of the detergent. *J. Virol.* **9**, 842-850.
- 39) Hosaka, Y. and Shimizu, Y. K. (1972) : Artificial assembly of envelope particles of HVJ (Sendai virus). I. Assembly of hemolytic and fusion factors from envelopes solubilized by Nonidet P 40. *Virology* **49**, 627-639.
- 40) 笹原二郎, 林 重美, 熊谷哲夫, 山本芳弘, 平沢澄, 宗形光蔵, 岡庭 梓, 加藤和好 (1954) : 最近発見された豚の肺病変を主徴とする一病毒性疾患について (I) 病毒の分離と豚継代について (II) 2, 3 の性状について. *ウイルス*, **4**, 131-139.
- 41) 笹原二郎, 林 重美, 熊谷哲夫, 平沢 澄, 宗形光蔵, 岡庭 梓, 加藤和好 (1954) : 最近発見された豚の肺病変を主徴とする一病毒性疾患について (III) 仔豚に対する感染実験. *ウイルス*, **4**, 297-301.
- 42) Kuroya, M., Ishida, N. and Shiratori, T. (1953) : Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. Report : The isolation of a new virus possessing hemagglutinin activity. *Yokohama Med. Bull.* **4**, 217-233.