エンベロープウイルスの細胞内侵入機構

大西俊一, 吉村昭彦

京都大学理学部生物物理学教室¹⁾

(昭和59年2月20日 受付)

1. 総 論

エンベロープを持つウイルスが、そのゲノムを宿主細胞に移すためにはエンベロープを脱がねばならない(uncoating). HVJ (hemagglutinating virus of Japan) などのパラミクソウイルスの場合には、エンベロープと細胞膜との直接の融合によりこの uncoating が行なわれることが知られている¹⁾(図1A). しかしながら、他のエンベロープウイルスの場合には、エンベロープが細胞膜と直接融合した電顕像が観察されることはまれであり^{*}, ウイルス粒子はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが観察されていた²⁾(図1B). 古く1948年に、Fazekas de S. Groth はこの取り込みがコロイド色素の取り込みに似ているとして、viropexis と名付けた³⁾. エンドサイトーシスによって取り込まれると、ゲノムはウイルスのエンベロープと食胞(endocytic vesicle)膜で二重に囲まれることになる(図1B). この二重の囲いからどのようにしてゲノムが抜け出るか、食胞はやがてリソゾームと融合し、そこで強力な加水分解を受けるが、ゲノムのみが消化をまぬがれて二次リソゾーム膜を通過するのはどのようにして可能であるか、これらの難問に対しては、やや神秘的とも言える図式が提出されるのみであって^{2,5)}, 明答はなかった. したがって、viropexis によって細胞内に取り込まれるウイルスについては、どのようにしてゲノムを細胞質に移すかという感染の第一段階が不明のままであった.

1979年に Väänänen らは、トガウイルス科のセムリキ森林ウイルス(SFV)と Sindbis virus で、中性では認められない溶血活性が、弱酸性条件(pH<6)では顕著に起こることを発見した⁶⁾. 続いて、Helenius らは

1980年、培養細胞を用いて SFV の侵入機構を研究し⁷⁾, (1)ウイルスは viropexis により取り込まれ、coated vesicle に入り、ついで細胞内空胞や二次リソゾームに運ばれる. 直接細胞膜と融合している電顕像は観察されない, (2)ウイルスの膜融合(相手はリン脂質コレステロールのリポソーム)が pH≤6.0 で起こる, (3)クロロキンのようなリソゾームの pH (ふつうの値は4.8~5.0)を上げる試薬がウイルスの増殖を阻害する. しかも感染のごく初期(5分以内)の段階を阻害することから、SFV は viropexis の後リソゾームまたは他の内部が酸性の空胞において膜融合を起こし、ゲノムを細胞質に放出するという新機構(図1Bb)を提出した. 同じ年に、前田と大西は、インフルエンザウイルス(IFV)が酸性(pH~5)で強い溶血活性および膜融合活性を持つことを発見した⁸⁾. その後、電顕観察や、クロロキン、NH₄Cl のリソゾーム指向性試薬の増殖阻害作用の研究から、IFV がリソゾーム経由でゲノムを放出する機構を提出した⁹⁾. この研究では、リソゾームの pH を測定し、クロロキンなどによりリソゾーム pH が6.0以上になると増殖阻害が起こることを観察しており、増殖阻害のリソゾーム pH 依存性と膜融合の pH 依存性がよく一致することを確かめている. この後、ウシ口内炎ウイルス(VSV)に対しても同様の細胞内侵入機構が提出され^{10,11)}, この機構の普遍性が示された. これらのウイルスは、生理的な中性環境では膜融合できないかあるいはきわめて弱い活性をもつにすぎないので、細胞膜との直接の融合によりゲノムを放出できない. 細胞内の酸性環境に運ばれたときに始めて膜融合を起こしてゲノムを放出すると考えられる. 酸性での膜融合活性が明らかにされたので、細胞内でのゲノム放出過程が無理なく説明できるようになったのである.

したがって、エンベロープウイルスの uncoating の場所を決めるものは、ウイルスの膜融合活性の pH 依存性

Infectious cell entry mechanism of enveloped viruses by Shun-ichi OHNISHI and Akihiko YOSHIMURA (Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan).

1) 〒606 京都市左京区北白川追分町

* Morgan と Rose はインフルエンザウイルス⁴⁾について、Heine と Schnaitman はウシ口内炎ウイルス⁸⁾について観察したと報告している.

図1 エンベロープウイルスの細胞内侵入の二様式。(A)細胞膜との直接の融合によるゲノム放出。(B)エンドサイトーシスの後、(a)エンドゾームにて、あるいは(b)リソゾームと融合の後二次リソゾームにて、それらの内部が酸性であるため膜融合を起こしてゲノムを放出。

ということになる。図2に数種類のウイルスについてそのpH依存性を比較してあるが、その相異および相似は一目瞭然であろう。HVJのみが中性および酸性で活性をもち、他のウイルスはすべて酸性でのみ強い活性を示す。それらのpH依存性はお互いに大体似ている。HVJは中性でも酸性でも膜融合できるので、viropexisによって細胞内に入り酸性環境のオルガネラに運ばれても融合してゲノムを放出できる。どちらでのuncoatingが感染により重要であるかは、一つには膜融合とエンドサイトーシスの速さの大小によるであろう。HVJの膜融合の速さは 0.84min^{-1} と求められている。エンドサイトーシス(BHK細胞)の速さの正確な見積もりはないが、 0.05min^{-1} くらいであるので、膜融合の方が速い。

細胞内の酸性のオルガネラはリソゾームであり、したがってそれがSFVやIFVなどのuncoatingの場所であると考えられていたが、最近、リソゾームに到達するまでにエンドゾーム内が既に酸性(pH~5)であることが明らかにされて、そこでのuncoatingの可能性が強くなった(図1B a)。低密度リボタンパク質やアシアロ糖タンパク質などのリガンドは、細胞膜上のcoated pitに存在するそれぞれの受容体に結合し、ついでcoated vesicleとして細胞内に陥入し、coat(クラスリン重合体)がはずれvesicleの融合が起こる(エンドゾーム)^{12,13}。このcoated vesicle内が急速に酸性になることが明らかにされたのである^{14,15}。これはvesicle膜に結合するH⁺-ATPアーゼの働きによるものである⁶⁵。リソゾーム内部の酸性化も、リソゾーム膜のH⁺-ATPアーゼの

働きによる。

エンベロープウイルスも受容体に結合し、coated pitを経由してcoated vesicle内に取り込まれるので、エンドゾームで膜融合を起こしてゲノムを細胞質に放出すると思われる。実際に、最近、HeleniusらはSFVについて、われわれはIFVについてエンドゾームでのuncoatingを示す証拠を得ている^{16,17}。その方法は、37°C 10分あるいは20°C 1時間という処理でuncoatingが起こり、ウイルスの再生産が起こることを観察したものである。このような条件では、ウイルスは未だエンドゾーム内にあり、リソゾームには到達していないことを別の実験で確かめている。上に述べたクロロキンなどのウイルス増殖阻害作用は、エンドゾームでのuncoatingと矛盾はしていない。何故ならば、これらの“リソゾーム”指向性試薬はエンドゾームのpHをも同様に上昇させる。

エンベロープウイルスの融合活性をになうものは、そのエンベロープに存在するスパイクタンパク質——HVJのF₁、IFVのヘマグルチニンHA、SFVのE₁、VSVのGなどである。HVJの場合には受容体との結合を司るタンパク質HNが別に存在していて、吸着と融合が分業されているが、その他のウイルスの場合は一つのタンパク質が兼業していると思われる。ウイルスの膜融合活性のpH依存性を決めるものは、結局これらのスパイクタンパク質であって、そのpHに対する挙動の相違によるものであろう。

これらの融合活性タンパク質はどのようにして自分の膜と相手の膜を融合させるのだろうか。Gethingらは

図1 ウイルス膜融合活性(○), 溶血活性(●), および細胞融合活性(△)のpH依性. (a) HVJと赤血球の膜融合をスピラベル法で測定. (b) IFVとMDCK細胞の膜融合(スピラベル法による測定), およびMDCK細胞の融合. (c) SFVとBHK-21細胞の膜融合(RNAの放出をリボヌクレアーゼによる分解により測定⁷⁹⁾). BHK細胞の融合⁸⁰⁾. (d) VSVとMDCK細胞の膜融合(リボヌクレアーゼによる測定¹⁰⁾). 溶血活性はセミアルカリプロテアーゼ処理した赤血球について測定⁸¹⁾. MDCK細胞の融合は文献⁵⁰⁾による. すべてのデータは最大値を1にして規格化してある.

1978年に²¹⁾, HVJのF₁およびIFVのHA₂のN末端部分に約20コの疎水性アミノ酸領域があることに注目し, この部分が融合活性をもつと考えた(図3A, B). この部分のアミノ酸配列は株間でよく保存されている. とくにIFVで抗原性のシフトが起こっても保存されている(図3B). 疎水性アミノ酸残基が約20コ連続するポリペプチドは, 膜の脂質二分子層内に入ることが可能である*. 生体膜の内在性タンパク質が脂質二分子層を

貫通している部分も, 約20コの疎水性残基の連続したポリペプチド部分である. 信号ペプチドも約20コの疎水性アミノ酸残基が連続しており, この部分がミクロソーム膜の脂質層に直接入ってくることは可能である. もっとも, この場合には膜内で別のタンパク質がつくる孔があって, 信号ペプチドはその孔を通るという考え方もあるが.

F₁のN末端はすべて疎水性アミノ酸残基であるが, HA₂はその中に2ないし3コの酸性アミノ酸残基が混じっており, その場所も株間でよく保存されている. この相違がIFVが酸性で融合活性をもつ一因ではないかと筆者は考えている. これらの酸性残基は中性では解離型であり負の電荷を帯びている. 電荷をもつグループを脂質二分子層内部に入れるには非常に大きい仕事を必要とするが, 酸性になってプロトン化すると電荷がなくなり容易になる*. 大腸菌のλ受容体の信号ペプチドは, 野生型のは約20コの疎水性アミノ酸残基のみよりなるが, 突然変異株ではそのうちの1コが酸性残基に置き換っている. この突然変異株では, λ受容体は内膜を通過できずに細胞質にたまる結果となる. これは酸性残基のために脂質二分子層に入り難くなるのが一因と思われる.

IFVをプロメラインで処理すると, HAのエンベロープに埋もっている部分の近くが切れて水に溶けるようになる. このプロメライン断片の単結晶が作成され, X線回折によりその構造が明らかにされた³⁰⁾. HAは三量体として存在しており, 図4にそのうちの一分子を示した. 受容体結合部位や抗原性決定部位は表面近くに存在するが, 融合活性部位であるHA₂のN末端部分は奥深いところであり, むしろ自分の膜の近くにある. 酸性(pH<6.0)になると, ヒスチジン残基やアスパラギン酸・グルタミン酸残基がプロトン化され, HAの構造が大きく変わり, HA₂のN末端部分が相手の膜に接近してその脂質層と相互作用できるようになるのではなからうか.

この他, トガウイルスのE₁, レトロウイルスのp15Eにも疎水性アミノ酸残基が連続した部分がある. しかしその内部には酸性アミノ酸残基は見当らない(図3C, D). VSVも酸性で膜融合活性をもつウイルスであるが, そのスパイクタンパク質Gには, 疎水性残基が20コも連続した部分は見当らず, 融合活性中心は現在のところ不明である.

* 水中にあるときに比べて, 自由エネルギーにして30kcal/モル前後安定化する.

* 例えばIFVのHA₂の場合, プロトン化すると18kcal/モル安定化するが, 電荷を帯びている場合は5.7kcal/モルの安定化にしかない(H3(図3B)のN末端20コのアミノ酸について計算).

図3 膜融合活性をになうエンペロープタンパク質の疎水性領域. A) パラミクソウイルス F₁ の N末端部. B) インフルエンザウイルス HA₂ の N末端部 (アンダーラインは酸性アミノ酸). C) トガウイルス E₁ (80から96まで). D) レトロウイルス p15E N末端部.

A. Paramyxovirus F₁

HVJ²¹⁾ N-Phe-Gly-Ala-Val-Ile-Gly-Thr-Ile-Ala-Leu-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Gln-Ile-Thr²⁰
 SV5²²⁾ N-Phe-Ala-Gly-Val-Val-Ile-Gly-Leu-Ala-Ala-Leu-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Gln-Val-Thr
 NDV²³⁾ N-Phe-Ile-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Gly-Val-Ala-Leu-Gly-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Gln-Ile-Thr

B. Influenza virus HA₂

A/PR/8/34(H1)⁴⁴⁾ N-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile-Glu-Gly-Gly-Trp-Thr-Gly-Met-Ile-Asp-Gly-Trp-Tyr-Gly-Tyr¹⁵
 A/Japan/305/57(H2)⁴⁵⁾ N-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile-Glu-Gly-Gly-Trp-Gln-Gly-Met-Val-Asp-Gly-Trp-Tyr-Gly-Tyr²⁰
 A/Aichi/2/68(H3)⁴⁶⁾ N-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile-Glu-Asn-Gly-Trp-Glu-Gly-Met-Ile-Asp-Gly-Trp-Tyr-Gly-Phe
 A/FPV/Rostock/34(H7)⁴⁷⁾ N-Gly-Leu-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile-Glu-Asn-Gly-Trp-Glu-Gly-Leu-Val-Asp-Gly-Trp-Tyr-Gly-Phe

C. Togavirus E₁

SFV⁷³⁾ ...Asp-Tyr-Gln-Cys-Lys-Val-Tyr-Thr-Gly-Val-Tyr-Pro-Phe-Met-Trp-Gly-Gly-Ala-Tyr-Cys-Phe-Cys-Asp-Ser-Glu-Asn^{75 80 85 90 95 100}
 Sindbis⁷⁴⁾ ...Asp-Tyr-Thr-Cys-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-Val-Tyr-Pro-Phe-Met-Trp-Gly-Gly-Ala-Tyr-Cys-Phe-Cys-Asp-Ser-Glu-Asn

D. Retrovirus p15E

MoMLV⁹¹⁾ N-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Thr-Leu-Ala-Leu-Leu-Leu-Gly-Gly-Leu-Thr-Met-Gly-Gly-Ile-Ala-Ala-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Thr-Thr-Ala-Leu^{1 5 10 15 20 25 30}
 AKV⁹²⁾ N-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Thr-Leu-Ala-Leu-Leu-Leu-Gly-Gly-Leu-Thr-Met-Gly-Gly-Ile-Ala-Ala-Gly-Val-Gly-Thr-Gly-Thr-Thr-Ala-Leu
 F-MuLV⁹³⁾ N-Glu-Pro-Val-Ser-Leu-Thr-Leu-Ala-Leu-Leu-Leu-Gly-Gly-Leu-Thr-Met-Gly-Gly-Ile-Ala-Ala-Gly-Val-Gly-Thr-Gly-Thr-Thr-Ala-Leu

図4 IFV ヘマグルチニンの立体構造。三量体のうちの一分子を示す³⁰⁾。ブロメリン処理したヘマグルチニンの単結晶の解析から得られたもの。分子はウイルスエンベロープ膜から約135Å突出しており、その表面に受容体結合部位(→)と抗原性決定部位(*)がある。

以上で総論を終え、以下各種ウイルスについて各論的に述べる。ウイルス uncoating の場を決めるためには、膜融合の性質とくに pH 依存性を調べる必要があると思われる。クロロキンの増殖阻害の研究も有用であるが、少なくともその作用が感染の初期であることを確かめる必要がある。

2. パラミクソウイルス

2.1 膜融合活性

HVJ, Newcastle Disease Virus (NDV), SV5 などのパラミクソウイルスは、エンベロープにスパイクタンパク質として HN と F を持つ。HN は細胞表面のシアル酸を認識し細胞への吸着をつかさどる。HN は同時

にシアリダーゼ活性をもつが、この活性はウイルスの成熟過程などに関与しているらしい¹⁸⁾。F は膜融合活性を担うタンパク質で、前駆体 F_0 から宿主プロテアーゼによる限定分解によって $F_1 \cdot F_2$ に解裂する。宿主によっては非解裂型の F_0 のみを有するウイルスが生産されるが、このウイルスは膜融合活性がなく感染性ももたない。しかし、トリプシンなどのプロテアーゼでこのウイルスを処理すると、 F_0 の解裂に伴い膜融合活性と感染性が出現してくる^{19,20)}。このことは、F が膜融合活性を担っていることに加え、膜融合がウイルス感染に必須の過程であることを示している。

F_1 の N 末端には、パラミクソウイルス間で一次構造が非常によく似た疎水性領域があり(図3A)^{21,22)}、この部分の配列を真似たオリゴペプチドは、膜融合を阻害しウイルスの感染性を低下させる²²⁾。このことからこの疎水性領域は膜融合の“活性中心”と考えられ、 F_0 の解裂に伴って表面に露出し相手の膜と直接相互作用すると考えられている^{23,24)}。

HVJ は、中性で膜融合、溶血、および細胞融合活性を示す。酸性 (pH~5) でも、中性より程度はやや低いが膜融合および溶血活性を示す(図2a)。また、これらの活性は、アルカリ (pH~9) 前処理によって上昇する^{25,26)}。

HVJ の膜融合の速度論的解析がスピラベルリン脂質を用いてなされている。これは、予めウイルスとスピラベルリン脂質(ふつうスピラベルホスファチジルコリン PC* が用いられる)をインキュベーションして、エンベロープに PC* を10~12%程度含ませたものを調製しておき、このウイルスが細胞膜と融合したときに ESR スペクトルのピークの高さが増大する(約6~7倍)ことを利用する方法である。融合が起こると、PC* が細胞膜脂質と速かに混じり合うので、ESR ピークの高さが増大する。図5に HVJ と赤血球(ゴースト)の場合の結果を示す¹⁰⁴⁾。ESR ピークの高さは速かに増大して5分後には4.5倍になり、その後も増大するがその速さは遅いことがわかる。なお、同図には細胞当りの吸着ウイルス量をいろいろ変えたときのデータも示されている。これらのデータは融合反応が一次反応に従うとして解析できる。図中の実線は、

$$h/h_0 = f - (f-1) \{ \alpha e^{-k_1 t} + (1-\alpha) e^{-k_2 t} \}$$

の式に、 α , k_1 , k_2 をパラメーターとしてフィットさせた理論曲線である。 h , h_0 は時間 t , 0 のときのピークの高さ、 f はウイルスが融合したときのピークの高さの増大率(この場合は6.6)、 k_1 , k_2 は融合速度定数、 α は k_1 で融合するウイルスの割合である。 k_1 , k_2 の値は吸着ウイルス数が変わっても一定で、 $k_1 = 0.84 \text{ min}^{-1}$, k_2

図5 HVJ-赤血球(ゴースト)の膜融合反応¹⁰⁴⁾, スピンドラベルリン脂質による測定で, 縦軸(左)は ESR ピークの高さの増大を目盛ってある, 37°C. 縦軸(右)にはピークの高さから求められた融合したウイルスの割合を目盛ってある. ウイルスと赤血球の混合比(個/細胞): a) 4.8 (約2), b) 9.6 (4.2), c) 19.2 (7.6), d) 38.4 (13.7), e) 76.8 (25). かっこ内は吸着ウイルス数の推定値.

$=0.011\text{min}^{-1}$ と求められた. α の値はウイルス量の増加とともに減少した. これらの結果は, 吸着したウイルスはすべてが同じ速さで融合するのではなく, 少なくとも二種類のポピュレーションがあること, 速く融合するウイルスは一分間でその84%が融合すること, 速く融合するウイルスの割合は吸着ウイルス量とともに減少することを示している.

HVJ はグリコホリンやガングリオシドをふくむリポソームと効率よく融合する^{27,28)}. リポソームのリン脂質組成にはあまり依存しない. コレステロール依存性については異なった報告がある^{28,29)}.

ウイルスより界面活性剤を用いて単離したスパイクタンパク質は, ロゼット状のミセル構造をとる. 界面活性剤存在下で, ロゼットにウイルスの全脂質や, リン脂質およびコレステロールを加えて再構成した小胞は, 溶血および若干の細胞融合を起こす^{31~33)}. ロゼットよりFのみを単離して再構成すると, 赤血球に吸着しないため溶血は起こらないが, レクチンを用いて再構成小胞と赤血球を結合させると溶血が起こる. したがって膜融合に HN は必要ないと思われるが, 必要とする報告もある^{35,36)}.

2.2 細胞内侵入機構

生理的な中性条件で膜融合活性を持つパラミクソウイ

ルスの uncoating は, 図1 Aのようなエンベロープと細胞膜との直接の融合による形式をとると考えてよい. しかし, 同時にエンドサイトーシスによっても取り込まれるので³⁷⁾, 細胞内小胞での融合の可能性もある. 問題は融合とエンドサイトーシスの相対速度であろう. Millerらはクロロキンが HVJ の感染を阻害することから, HVJ の細胞内侵入にリソゾームが関与していると主張しているが³⁸⁾, 我々や永井, 万年らの実験ではクロロキンの感染阻害効果は認められない^{39~41)}. しかし, HVJ はもともと中性でも酸性でも膜融合を起こすので, クロロキンを用いる方法論自身が誤りである.

3. オルソミクソウイルス

3.1 膜融合活性

IFV のスパイクタンパク質は HA と NA の二種類であり, その存在比は約5:1である. HA は細胞への吸着をつかさどり, NA はシアリダーゼ活性をもつ. HA は, パラミクソウイルスのと同様に, 前駆体 HA_0 がトリプシン様のプロテアーゼで切断をうけ, $\text{HA}_1 + \text{HA}_2$ に分かれたものである. HA_0 のみを持つウイルスは感染性が低い, トリプシンにより HA_0 を切断すると感染性が上昇する^{42,43)}. HA_2 の N 末端には疎水性領域があり, その一次構造は株間でよく保存されている^{44~47)}.

図6 酸性におけるIFVと赤血球の膜融合。IFVスパイクタンパク質に対するフェリチン抗体を用いた電顕による観察。ウイルスを赤血球に4℃中性で吸着させた後、(a)中性(pH 7.0)あるいは(b)酸性(pH 5.2)にして37℃10分間インキュベーションしたもの。Bar=500nm. 北里大学山科教授の御好意による。

F₁の疎水性領域とよく似ているが、2～3コの酸性アミノ酸残基が介在する点が異なっている(図3B)。

IFVは中性では膜融合活性をもたないが、pH 6.0以下で活性が現われpHの低下とともに増大する(図2B)。このpH依存性は株間で若干の相違がある^{39,50,51)}。酸性での膜融合は速く、pH 5.0では約2分以内にほぼ完了

する(37℃)。図6にはフェリチン抗体法によるIFVと赤血球の融合の電顕像を示す。酸性条件では吸着ウイルス粒子をほとんど認めることができず、ウイルスの表面抗原(HA, NA)が赤血球膜上に拡散しており、膜融合とそれに続くスパイクタンパク質の膜上での拡散が明確に示されている。これに反し、中性ではウイルス粒子は

図7 IFV の MDCK 細胞への侵入. 単層培養した MDCK 細胞に, 低温で IFV (MOI 約100) を吸着させ, 37°C で(a) 0 分, (b) 4 分, (c) 10 分, (d) 0.1mM クロロキン存在下で 30 分インキュベーションした⁹⁾. (b) 細い矢印は coated pit を, 太い矢印および小枠内は coated vesicle を示す. (c) 細い矢印はエンドゾームを, 太い矢印は二次リソゾームを示す. (d) 矢印は, 空胞内のウイルスを示す. Bar=500nm

細胞表面に吸着したままである. IFV の酸性での膜融合活性には, HA_0 から HA_1+HA_2 への解裂が必須である⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

IFV は受容体(シアル酸をもつ糖タンパク質あるいは糖脂質)を含むリポソームに吸着し融合する^{48,52)}. その pH 依存性は細胞膜との融合の場合と同じである. IFV はまた受容体を含まない単なるリン脂質のみよりなるリポソームとも融合する. これらの膜融合は, リポソームの脂質組成やコレステロールの存否にあまり依存しない⁴⁸⁾. また, Ca^{2+} , Mg^{2+} などの二価イオンは必要でない⁵²⁾.

IFV の膜融合活性に NA は必要でないと考えられる. たとえば, NA を 56°C の加熱や還元剤の処理で失活させ

ても, 酸性での溶血活性に影響はなく^{53,54)}, NA 活性を失った変異株でも, 溶血活性は存在する⁵⁵⁾. また HA 遺伝子をクローニングして SV 40 に組込んだものを感受性細胞に transfect させると, 細胞表面に HA が発現してくるが, この細胞を酸性処理すると細胞融合が起こる⁵⁶⁾. しかし, Huang らは HA のみの再構成小胞と細胞膜との融合(彼らは中性で融合が起こるとしているが)には, NA 活性を外から加える必要があるとしている⁵⁷⁾.

IFV を Triton X-100 などの界面活性剤で可溶化し密度勾配遠心を行うと, HA や NA がミセル状に会合したロゼットができるが, このロゼット自身に酸性での溶血活性がある. しかし細胞融合は起こさない⁵⁸⁾. このロゼットをホスファチジルコリンとコレステロールのリ

図8 NH_4Cl あるいはクロロキンのリソゾーム pH (●) に及ぼす影響, および IFV 感染に及ぼす影響 (○), MDCK 細胞. リソゾーム pH は, FITC-デキストランを用いて大熊らの方法⁶⁴⁾により測定した. ウイルス感染は, インキュベーション 7 時間後の赤血球吸着法により測定した.

ポソームに再構成した小胞は, 酸性での溶血活性のみならず, 膜融合活性および細胞融合活性を再現する⁵⁹⁾.

HA には抗原性の異なる 12 のサブタイプが同定されており⁶⁰⁾, サブタイプ内でも毎年抗原性が少しずつ異っている. しかし, HA の膜融合の活性中心と考えられる HA_2 の疎水性領域は, 株間でほとんど変動がない (図 3 B). この部分に対する抗体は, おそらくサブタイプに関係なく中和活性を有するに違いない. 実際, この部分の合成ポリペプチドに対する抗体は, H1, H2 の両サブタイプの IFV, および B 型インフルエンザの感染を抑制するという⁶¹⁾. また HA に対するモノクローナル抗体のうち, HA 活性は抑えないが, 溶血活性は抑えるものが取られており⁶²⁾, このようなモノクローナル抗体の中には, HA のサブタイプに関係なく中和活性を有するものがあると期待される.

3.2 細胞内侵入機構

IFV は中性で膜融合活性をもたないので, 直接細胞膜との融合でゲノムを放出することは困難である. 電子顕微鏡による観察では, coated pit に吸着して取り込まれたものや coated vesicle 内のウイルス粒子がみられる (37°C 5 分後, 図 7 b). 時間が経過すると, smooth-surfaced vacuole や二次リソゾーム内のウイルス粒子が観察されるようになる (10 分後, 図 7 c). 前者は, coated vesicle から coat がはずれお互いに融合したもの, すなわちエンドゾーム (あるいは receptosome) と考えられる. 37°C 15 分以後になると, 細胞内でウイルス粒子を同定することはほとんど不可能になる. これは, ウイルスがリソゾームに達しリソゾーム酵素により消化されたためと考えられる.

IFV は酸性で膜融合活性をもつので, 細胞内での膜融合の場合としてまず第一にリソゾームが考えられた⁹⁾. 実際, 宿主細胞としてよく用いられる MDCK 細胞のリソゾーム pH を測定すると 4.9 であり³⁹⁾, この pH 付近で IFV はきわめて高い膜融合活性をもつ (図 2 b). アンモニアやクロロキンなどのいわゆるリソゾーム指向性アミンは, リソゾーム内に蓄積されリソゾーム pH を上昇させる働きがある⁶⁴⁾. たとえば MDCK 細胞では, クロロキン 0.1 mM でリソゾーム pH は 6.3 に, NH_4Cl 10 mM で 6.4 に上昇する (図 8 参照)^{9, 39)}. これらの pH では IFV は膜融合を起こすことができないので, ゲノム放出はなく, ウイルスの増殖もないはずである. 実際, ウイルスの生産は対照の 1/100 以下に抑えられることが明らかにされた. さらに, NH_4Cl やクロロキンの濃度 (あるいは外液の pH) を変えてリソゾームの pH をいろいろな値に調節し, それぞれの条件下で IFV の増殖を測ったところ, リソゾーム pH が 6.0 以上になると増殖が顕著に抑えられることが明らかにされた. この増殖阻害のリソゾーム pH 依存性 (図 8) は, IFV の膜融合活性の pH 依存性 (図 2 b) によく一致しており, 間接的ではあるが, ウイルス侵入のリソゾーム経路を強く支持している. もちろん, これらのアミンは, IFV のエンドサイトーシスおよび酸性での膜融合活性には影響を及ぼさないことは確かめられている. なお, アミンの存在下ではリソゾーム pH の上昇とともに, リソゾーム内の消化酵素の活性が低下するので, 感染開始より 30 分後でも, 空胞内にウイルス粒子を認めうる (図 7 d).

ところが, 最近受容体を仲介するエンドサイトーシスの研究が進み, リガンドがリソゾームに到達するまでに,

図9 蛍光色素 FITC でラベルした IFV を細胞に吸着させインキュベーションしたときの蛍光強度の時間変化¹⁷⁾. カバーガラス上の MDCK 細胞に, FITC ラベルしたウイルスを 4°C 1 時間吸着させ, よく洗った後に, 37°C (●) あるいは 20°C (○) でインキュベーションし, 495nm の光で励起し 520nm の蛍光強度を経時的に測定した. 矢印のところで 20mM NH_4Cl を加えた.

すなわちエンドゾームの段階ですでに酸性の環境にあることが明らかにされた. Benjamin と Maxfield はマウス繊維芽細胞で^{14, 66)}, Renswoude らは K562 細胞で¹⁵⁾ エンドゾームの pH を測定し, およそ 5.0~5.5 の値を得ている. この pH では IFV の膜融合が可能である.

エンドゾームでの IFV の uncoating を研究するために, まず FITC ニリン酸エステル*でラベルされたウイルスの蛍光強度の時間変化が測定された¹⁷⁾. FITC ニリン酸エステルの蛍光は非常に弱い, リソゾームで脱リン酸化されると著しく (約 20 倍) 強まる. MDCK 細胞に吸着させてインキュベーションすると, 37°C では 10 分以後に, 20°C では 1 時間以後に蛍光強度が増大した. 次にウイルスを FITC でラベルし, MDCK 細胞に吸着させてインキュベーションすると, その蛍光強度は 30°C 10 分で, 20°C では 1 時間で半減した (図 9). FITC のフルオレッセインの蛍光強度は, 酸性条件下で著しく弱くなるので**, この結果は, ウイルス周辺の pH がリソゾームに至るまでのエンドゾームの段階で酸性になることを示している. その pH の値を計算すると 5.2 になる.

* FITC: フルオレッセインイソチシアナート

** とくに励起波長 495nm で蛍光測定 520nm のとき. フルオレッセインを使って pH を測定するときには, 励起波長 450nm のときと 495nm のときの蛍光強度 (520nm) の比から計算する.

このウイルス環境の pH は, 20mM NH_4Cl を加えると急速に上昇する (図 9 矢印). その pH の値は 6.7 であった. 一方, 100PFU/cell のウイルスを吸着させ, 37°C 10 分間あるいは 20°C 1 時間インキュベーションし, その後 20mM NH_4Cl 存在下で 37°C で総計 12 時間インキュベーションすると, 対照 (NH_4Cl 非存在下で 12 時間インキュベーションしたもの) とほとんど同程度のウイルスを生産した. これらの結果は, エンドゾームで膜融合を起こしてゲノムを細胞質に放出し, 感染が成立したことを示している¹⁷⁾.

図 8 はウイルス生産とリソゾーム pH の関係を示したものであるが, クロロキンや NH_4Cl のリソゾーム指向性の塩基は, リソゾーム pH のみならずエンドゾームの pH をも同程度に上昇させるので, 同図の横軸はエンドゾーム pH と読み替えることができる⁶⁶⁾. したがって, エンドゾームでの uncoating と矛盾はしていない.

IFV は 1 PFU あたりの粒子数が 100 程度とかなり多いため, 真に感染を起こすウイルス粒子がどこで uncoating するかを決定することは容易ではない. エンドゾームでもリソゾームでも可能であるが, 時間的な関係からみてもエンドゾームでの uncoating の方が可能性が高いといえる.

以上の結果はヒト A 型 IFV について得られたものであるが, Matlin らはトリ A 型ウイルスについて同様の

結果を得ている⁶³⁾。柴田らはB型IFVについて、酸性での膜融合活性とアミンによる増殖阻害効果など、やはり同様の観察を行なっている⁶⁷⁾。C型IFVはシアリダーゼを欠き、エンベロープにはgp88のみをもつが、その溶血活性は酸性で現われる(しかしA型ウイルスよりも少しアルカリ側に偏っている)^{68,105)}。この活性にはgp88の解裂が必要である。したがって、A型B型と同様の侵入機構が考えられるが、まだ確定されていない。

4. トガウイルス

4.1 膜融合活性

SFV, Sindbis virus, Rubella virusなどのトガウイルスも、酸性(pH<6.5)で溶血活性を有する^{6,69)}。これらのウイルスは、酸性側で赤血球凝集活性も上昇し、細胞への吸着量も増加する⁷⁰⁾。SFVの膜融合活性は、トリチウムラベルRNAをもつウイルスを用いて研究された。細胞(BHK-21)に吸着させ、いろいろなpHで37°C30秒間インキュベーションし、4°CでプロティネースKで処理してまだ吸着しているウイルスを除いた後、トリチウムの放射活性を測定する。得られた結果は図2cに示すように、pH<6.5で膜融合活性をもつようになる。IFVに比べるとやや中性側に寄っている。膜融合速度は大きく、pH 5.5では37°C30秒の間に吸着ウイルスの84%が融合した。融合効率吸着ウイルス量に依存し、上記の値は細胞当たり430コのウイルス量のときである。吸着ウイルス量が増加すると効率は減少する(たとえば細胞当たり58,000コのときは45%)。その他、西部ウマ脳炎ウイルスは酸性で細胞傷害(⁵¹Crの細胞外への放出)をひき起こす⁷¹⁾。日本脳炎ウイルスは、中性でも溶血活性および細胞融合活性をもつが、酸性ではこれらの活性が増大する⁷²⁾。

SFVは受容体をふくまないリポソームにも吸着し酸性(pH≤6.0)で融合する⁷⁾。この反応はきわめて速く(37°Cで1分以内)、かつ0°Cでも、吸着ウイルスの25%は融合する⁷⁵⁾。リポソームのリン脂質組成にはあまり依存しないが、コレステロールが必須であること、さらにCa²⁺、Mg²⁺両イオンを必要とする点でIFVと異なる⁷⁵⁾。

SFVのスパイクタンパク質のロゼットは、IFVのロゼットの場合と異り、酸性での溶血活性を持たない。ロゼットにウイルスの全脂質やリン脂質を加えて得られる再構成小胞は溶血活性を有する⁷⁶⁾。ホスファチジルコリンのみを加えて再構成した場合でも溶血活性をもつので、再構成小胞の膜融合活性にはコレステロールは必要でない。

4.2 細胞内侵入機構

SFVは細胞(BHK-21)表面に吸着し、速かにcoated

pitに集まり、エンドサイトーシスによりcoated vesicleに包まれて細胞内に取り込まれ、細胞内の空胞(恐らくエンドゾーム)さらに二次リソゾームへ輸送される。細胞膜との直接の融合によるゲノムの放出は観察されない。SFVのエンドサイトーシスは非常に効率よく、37°C10分で吸着ウイルスの60%が細胞内に取り込まれている⁷⁷⁾。

SFVの増殖は、クロロキンやアンモニアなどのリソゾーム指向性アミンにより阻害される^{7,78)}。これらのアミンは感染開始より5分以内に加えなければ阻害効果はあらわれない⁷⁾。また、ウイルス吸着後、短時間(90秒)外液を酸性(pH 5.5)にするとアミンの増殖阻害効果はなくなる⁷⁹⁾。これらの結果からSFVの膜融合が細胞内の酸性環境(リソゾーム and/or エンドゾーム)で起こり、ゲノムが細胞質に放出されて感染が成立するという機構が提出された。SFVの増殖(³H-ウリジンのとりこみ)を50%阻害するのに必要なNH₄Clの濃度は5mMであり⁷⁸⁾、IFVの場合の1.5mM(図8)に比べてやや高目である。このことは、SFVの膜融合がIFVの場合よりやや高いpH(6.0~6.5)でも起こることを反映しているものと思われる。

最近、HelenisらはSFVの膜融合の場がリソゾームではなくエンドゾームであることを示す報告を出した¹⁶⁾。彼等は³H-ウリジンでラベルしたウイルスを用いてuncoatingを研究した。すなわち、このウイルスをBHK-21細胞に吸着させ、37°Cでいろいろな時間インキュベーションした後ホモジナイズし、リボスクレアーゼで分解された³Hの放射活性を測定した。その結果uncoatingは5~7分後に起こっていることが明らかにされた。一方、³⁵S-メチオニンでラベルされたウイルスの加水分解により、ウイルスが二次リソゾームに到達する時間を測定すると、37°Cで15~20分を必要とした。20°Cでは2時間たっても二次リソゾームに到達しないにもかかわらず、uncoatingが起こり感染が成立した。これらの結果から、SFVはエンドサイトーシスの後エンドゾームで膜融合を起こし、ゲノムを細胞質に放出し感染が始まることを結論している。

Sindbis virusの細胞内侵入についてもSFVと同様の機構が提出されている⁸⁰⁾。

5. ラブドウイルス

5.1 膜融合活性

VSVや狂犬病ウイルス(Rabies virus)は、ガチョウ赤血球やセミアルカリプロテアーゼ処理をしたヒト赤血球を凝集し、酸性(pH<6.5)で溶血を引き起こす^{50,81)}。また酸性で細胞融合を起こす。VSVは、IFVの場合よりもやや高いpH(~6.5)でも溶血活性、細胞融合活性

を示すが, 中性 (pH 7) でもわずかながら溶血活性を示す (図 2d). 従来, まれに VSV 感染細胞が通常の中性条件でも融合 (fusion from within) を起こし, 多核細胞を形成することが知られていた⁸²⁾. また, VSV のエンベロープと細胞膜とが直接融合した電顕像も提出されていたが⁸³⁾, これらの観察は, VSV が中性付近でも若干の膜融合活性を持つことによるものと思われる.

VSV や狂犬病ウイルスのスパイクタンパク質は, G タンパク質一種のみで, その一次構造も決定されている^{84,85)}. その一次構造には, HVJ の F₁, IFV の HA₂, SFV の E₁ にみられるような疎水性領域は見当たらない. また SFV と Sindbis virus にみられるような長い共通領域もみられない⁸⁶⁾.

VSV の細胞への吸着量は, 細胞をトリプシンやシアリダーゼで処理することで上昇する⁸⁷⁾. また, VSV はプロテアーゼ処理をしたヒト赤血球をよく凝集する⁸¹⁾. これらの事実から, VSV の受容体は, 細胞表面のタンパク質にかくされており, 糖脂質かリン脂質ではないかと推測される. 最近, ホスファチジルセリン (PS) のリポリームが, VSV の細胞への吸着を阻害することが報告されている⁸⁸⁾. 山田らは, VSV とリポソームの酸性での相互作用 (膜融合とリポソームのリシス) をスピンドラベル法により調べ, PS をふくむリポソームと最も効率よく相互作用することを見出している⁸⁹⁾. しかし, 実際の細胞では PS は主に脂質二分子層の細胞質側に存在するので⁹⁰⁾, PS が真の受容体であるか否かはなお検討を要するであろう.

5.2 細胞内侵入機構

VSV も受容体を仲介するエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる¹⁰⁾. VSV の感染はリソゾーム指向性アミンにより阻害される^{10,11,38)}. この増殖阻害は感染開始20分後にアミンを加えたときには起こらない¹¹⁾. またウイルス吸着後短時間外液を酸性にすることで打ち消される⁴¹⁾. これらの結果と上記の膜融合の性質から, VSV の uncoating は細胞内酸性の環境であるエンドゾームまたはリソゾームで起こり, 感染が成立するものと考えられる. VSV は中性でも若干の膜融合活性をもつが, 上述のアミンの効果は, 細胞膜との直接の融合による uncoating が感染にとって重要でないことを示している.

6. その他のウイルス

レトロウイルスのエンベロープタンパク質は一種類であり, 多くの場合プロテアーゼで一個所切断をうけている. 切断後に生じる N 末端部には疎水性アミノ酸領域があり (図 3 D)⁹¹⁻⁹³⁾, 膜融合の活性中心である可能性が

高い. しかし膜融合活性についてはほとんど研究されていない. レトロウイルスが viropexis で細胞内に取り込まれること⁹⁴⁾, リソゾーム指向性のクロロキンがマウスのレトロウイルスの感染を抑制すること⁹⁵⁾などから, 細胞内酸性環境での uncoating の可能性はあるが, その確認のためには膜融合活性の pH 依存性などの研究が必要であろう.

ヘルペスウイルス (HSV) も viropexis されることが知られており⁹⁶⁾, またクロロキンやアンモニアで増殖が阻害される⁹⁷⁾. しかし, エンベロープと細胞膜の直接の融合像も報告されている⁹⁸⁾. ポックスウイルスについても viropexis が報告されており⁹⁹⁾, 感染細胞が fusion from within で多核細胞を形成する¹⁰⁰⁾. ワクチニアウイルスの感染性は PS の添加により上昇することが知られている¹⁰¹⁾. コロナウイルスについては, 感染細胞の多核細胞形成が報告されている¹⁰⁰⁾. これらのウイルスの uncoating の場所を決めるためには, 膜融合活性の pH 依存性などの研究が必要であろう.

7. ま と め

エンベロープウイルスには, その uncoating の場が細胞内のエンドゾーム (あるいは二次リソゾーム) であるものが多く, これが一つの普遍的なルートであることが強く示唆される. 細胞膜との直接の融合により uncoating するウイルスは, 中性でかなり強い膜融合活性をもつことが必要であろう. 一つのモデル系ではあるが, SV40 の DNA やポリオウイルスの RNA を包み込んだリポゾームも, その uncoating の場は細胞膜というよりもむしろ細胞内リソゾームであることを示すデータがある¹⁰²⁾. このような細胞内経路による uncoating のメカニズムは何だろうか. IFV¹⁰³⁾ やレトロウイルスは, 感染のためにゲノムを核に運び込む必要があるが, エンドサイトーシス-エンドゾーム-(リソゾーム) という経路は, このゲノムの輸送に有利であるかも知れない. SFV, VSV, IFV は, 細胞膜に吸着させた後短時間外液を酸性にして膜融合を起こさせても感染が起こる. しかし, SFV や VSV に比べて IFV の感染効率が著しく悪いのは, このことを示唆しているのかもしれない. これは興味ある問題として残されている.

文 献

- 1) Howe, C. and Morgan, C. (1969): J. Virol., **3**, 70-81.
- 2) Dales, S. (1973): Bact. Rev., **37**, 103-135.
- 3) Fazekas de St. Groth, S. (1948): Nature, **162**, 294-295.
- 4) Morgan, C. and Rose, H.M. (1968): J. Virol.,

- 2, 925-936.
- 5) Dourmashkin, R.R. and Tyrrell, D.A.J. (1974): *J. Gen. Virol.*, **24**, 129-141.
- 6) Väänänen, P. and Kääriäinen, L. (1979): *J. Gen. Virol.*, **43**, 593-601.
- 7) Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. and Fries, E. (1980): *J. Cell Biol.*, **84**, 404-420.
- 8) Maeda, T. and Ohnishi, S. (1980): *FEBS Lett.*, **122**, 283-287.
- 9) Yoshimura, A., Kuroda, K., Kawasaki, K., Yamashina, S., Maeda, T. and Ohnishi, S. (1982): *J. Virol.*, **43**, 284-293.
- 10) Matlin, K., Reggio, H., Simons, K. and Helenius, A. (1982): *J. Mol. Biol.*, **156**, 609-631.
- 11) 大内正信, 万年和明, 三舟求真 (1981): 第29回日本ウイルス学会総会抄録, 1066.
- 12) Brown, S. M., Anderson, R. G. W. and Goldstein, J.L. (1983): *Cell*, **32**, 663-667.
- 13) Geuze, J. H., Slot, J. W., Strous, G. J. A. M., Lodish, H.F. and Schwartz, A.L. (1983): *Cell*, **32**, 277-287.
- 14) Benjamin, T. and Maxfield, F. R. (1982): *Cell*, **28**, 643-651.
- 15) Renswoude, J., Bridges, K. R., Harford, J. B. and Klausner, R. D. (1982): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6168-6190.
- 16) Marsh, M., Bolzau, E. and Helenius, A. (1983): *Cell*, **32**, 931-940.
- 17) Yoshimura, A. and Ohnishi, S. (1984): *J. Virol.*, (投稿中).
- 18) Klenk, H.D., Compans, R.W. and Choppin, P. W. (1970): *Virology*, **42**, 1158-1162.
- 19) Homma, M. and Ohuchi, M. (1973): *J. Virol.*, **12**, 1457-1465.
- 20) Scheid, A. and Choppin, P. W. (1974): *Virology*, **57**, 470-490.
- 21) Gething, M. J., White, J. M. and Waterfield, M. D. (1978): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2737-2740.
- 22) Richardson, C. A., Scheid, A. and Choppin, P.W. (1980): *Virology*, **105**, 205-222.
- 23) Hsu, M. C., Scheid, A. and Choppin, P. W. (1981): *J. Biol. Chem.*, **256**, 3557-3565.
- 24) Asano, K., Murachi, T. and Asano, A. (1983): *J. Biochem.*, **93**, 733-741.
- 25) Hsu, M. C., Scheid, A. and Choppin, P. W. (1982): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5862-5866.
- 26) Haywood, A. M. and Boyer, B. P. (1982): *Biochem.*, **21**, 6041-6046.
- 27) Landsberger, F., Greenberg, N. and Altstiel, L. (1981): *The Replication of Negative Stranded Viruses* (ed. D. Bisnop and R. Compans) Elsevier, North Holland, 617-622.
- 28) Oku, N., Njima, N. and Inoue, K. (1982): *Virology*, **116**, 419-427.
- 29) Kundrot, C. E., Spangler, E. A., Kendall, D. E., MacDonald, R. C. and MacDonald, R. I. (1983): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1608-1612.
- 30) Wiley, D. C., Wilson, I. and Skehel, J. J. (1981): *Nature*, **289**, 373-378.
- 31) Hosaka, Y., Senba, T. and Fukai, K. (1974): *J. Gen. Virol.*, **25**, 391-404.
- 32) Volsky, D. I. and Loyter, L. (1978): *FEBS Lett.*, **92**, 190-194.
- 33) Uchida, T., Kim, J., Yamaizumi, M., Miyake, Y. and Okada, Y. (1979): *J. Cell Biol.*, **80**, 10-20.
- 34) Hsu, H. C., Scheid, A. and Choppin, P. W. (1979): *Virology*, **95**, 476-491.
- 35) Ozawa, M., Asano, A. and Okada, Y. (1979): *Virology*, **99**, 197-202.
- 36) Miura, N., Uchida, T. and Okada, Y. (1982): *Exp. Cell Res.*, **141**, 409-420.
- 37) Hosaka, Y. and Koshi, Y. (1968): *Virology*, **34**, 419-434.
- 38) Miller, D. K. and Lenard, J. (1981): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3605-3609.
- 39) 吉村昭彦, 黒田和道, 大西俊一 (1982): 第30回日本ウイルス学会総会抄録, 1024.
- 40) 永井美之, 浜口道成, 吉田哲也 (1982): 第30回日本ウイルス学会抄録, 1025.
- 41) 万年和明, 石川和正, 三舟求真 (1982): 第30回日本ウイルス学会総会抄録, 1021.
- 42) Klenk, H.D., Rott, R., Orlich, M. and Blödo-rin, J. (1975): *Virology*, **68**, 426-439.
- 43) Lazarowitz, S. G. and Choppin, P. W. (1975): *Virology*, **68**, 440-454.
- 44) Winter, G., Fields, S. and Brownlee, G. G. (1981): *Nature*, **292**, 72-75.
- 45) Gething, M. J., Bye, J., Skehel, J. and Waterfield, M. (1980): *Nature*, **297**, 301-306.
- 46) Verhoeve, M., Fang, R., Jou, W. H., Devos, R., Huylebroeck, D., Saman, E. and Fiers, W. (1980): *Natures*, **286**, 771-776.
- 47) Porter, A. G., Barber, C., Carey, N. H., Hallwell, Threlfall, G. and Emtage, J. S. (1979): *Nature*, **276**, 298-301.
- 48) Maeda, T., Kawasaki, K. and Ohnishi, S. (1982): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4133-4137.
- 49) Huang, R. T. C., Rott, R. and Klenk, H. D. (1981): *Virology*, **110**, 243-247.
- 50) White, J. K., Matlin, K. and Helenius, A. (1981): *J. Cell Biol.*, **89**, 674-679.
- 51) Lenard, J., Bailey, C. and Miller, D. (1982): *J. Gen. Virol.*, **62**, 353-355.
- 52) White, J., Helenius, A. and Kartenbeck, T. (1982): *EMBO J.*, **1**, 217-222.
- 53) Hosaka, Y., Seriburi, O., Moran, M. G., Yoshida, Y. and Fukai, K. (1982): *Biken J.*, **25**, 51-56.
- 54) 吉村昭彦, 黒田和道, 大西俊一 (1981): 第29回日

- 本ウイルス学会総会抄録, 1061.
- 55) 清水一史, 中山堯之, 宮本 勉 (1981): 第29回日本ウイルス学会総会抄録, 1063.
 - 56) White, J., Helenius, A. and Gething, M. J. (1982): *Nature*, **300**, 658-659.
 - 57) Huang, R. T. C., Rott, R., Klent, K. D. and Kohama, T. (1980): *Virology*, **107**, 313-319.
 - 58) Sato, S. B., Kawasaki, K. and Ohnishi, S. (1983): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3153-3157.
 - 59) Kawasaki, K., Sato, S. B. and Ohnishi, S. (1983): *Biochim. Biophys. Acta*, **733**, 286-290.
 - 60) WHO Memorandum (1980): *Bulletin of the World Health Organization*, **58** (4), 585-591.
 - 61) Sutcliffe, J.G., Shinnick, T.M., Green, N. and Lerner, R.A. (1983): *Science*, **219**, 660-666.
 - 62) 喜田 宏, Webster, R.G., Brown, L.E., 梁川 良 (1982): 第30回日本ウイルス学会総会抄録 (シンポジウム 4).
 - 63) Matlin, K. S., Reggion, H., Helenius, A. and Simons, K. (1981): *J. Cell Biol.*, **91**, 601-613.
 - 64) Ohkuma, S. and Poole, B. (1978): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3327-3331.
 - 65) Galloway, C.J., Dean, G.E., Marsh, M., Rudnick, G. and Mellman, I. (1983): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3334-3338.
 - 66) Maxfield, F. R. (1982): *J. Cell Biol.*, **95**, 676-681.
 - 67) Shibata, M., Maeno, K., Tsurumi, T., Aoki, H., Nishiyama, Y., Isomura, S. and Suzuki, S. (1982): *J. gen. Virol.*, **59**, 183-186.
 - 68) Ohuchi, M., Ohuchi, R. and Mifune, K. (1982): *J. Virol.*, **42**, 1076-1079.
 - 69) Väänänen, P. and Kääriäinen, L. (1980): *J. Gen. Virol.*, **46**, 467-475.
 - 70) Halonen, P.E., Ryan, J.M. and Stewart, J. A. (1967): *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **125**, 162-167.
 - 71) 本本紀一, 橋本雄之, 清水文七 (1981): 第29回日本ウイルス学会総会抄録, 3058.
 - 72) 保井孝太郎, 木村純子 (1982): 第30回日本ウイルス学会総会抄録, 1031.
 - 73) Garoff, H., Frischauf, A.M., Simons, K., Leh-rach, H. and Delius, H. (1980): *Nature*, **288**, 236-241.
 - 74) Rich, C. M. and Straus, J. H. (1981): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2062-2066.
 - 75) White, J. and Helenius, A. (1980): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3273-3277.
 - 76) Marsh, M., Bolzau, E., White, T. and Helenius, A. (1983): *J. Cell Biol.*, **96**, 455-461.
 - 77) Marsh, M. and Helenius, A. (1980): *J. Mol. Biol.*, **142**, 439-454.
 - 78) Helenius, A., Marsh, M. and White, J. (1982): *J. Gen. Virol.*, **58**, 47-61.
 - 79) White, J., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (1980): *J. Cell Biol.*, **87**, 264-272.
 - 80) Talbot, P.J. and Vance, D.E. (1980): *Can. J. Biochem.*, **58**, 1131-1137.
 - 81) Mifune, K., Ohuchi, M. and Mannen, K. (1982): *FEBS Lett.*, **137**, 293-297.
 - 82) 竹原 学, 横山順子, 宮本啓子, 黒田久寅, 角田保 (1980): 第28回日本ウイルス学会総会抄録, 2044.
 - 83) Heine, J.W. and Schnaitman, C.A. (1971): *J. Virol.*, **8**, 786-795.
 - 84) Rose, J. K. and Gallione, C. J. (1981): *J. Virol.*, **39**, 519-528.
 - 85) Anilionis, A., Wunner, W. H. and Curtis, P. J. (1981): *Nature*, **294**, 275-278.
 - 86) Rose, J. K., Doolittle, R. F., Anilionis, A. A., Curtis, P. J. and Wunner, W. H. (1982): *J. Virol.*, **43**, 361-364.
 - 87) Schloemer, R. and Wagner, R. (1975): *J. Virol.*, **15**, 882-893.
 - 88) Schlegel, R., Tralka, T. S., Willingham, M. C. and Pastan, I. (1983): *Cell*, **32**, 639-646.
 - 89) 山田 訓, 大西俊一 (1983): 第32回日本ウイルス学会総会抄録, 3034.
 - 90) Opden Kamp, J. A. F. (1979): *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 47-71.
 - 91) Shinnick, T.M., Lerner, R.A. and Sutolitte, J. A. (1981): *Nature*, **293**, 543-548.
 - 92) Lenz, J., Crowther, R., Straceski, A. and Haseltine, W. (1982): *J. Virol.*, **42**, 519-529.
 - 93) Koch, W., Hunsmann, G. and Friedrich, R. (1983): *J. Virol.*, **45**, 1-9.
 - 94) Dales, S. and Hanafusa, H. (1972): *Virology*, **50**, 440-458.
 - 95) Pazmino, N.H., Yuhua, J.M. and Tennant, R. W. (1974): *Int. J. Cancer*, **14**, 379-385.
 - 96) Dales, S. and Silverberg, H. (1969): *Virology*, **37**, 375-380.
 - 97) 小山一, 内田孝宏 (1981): 第29回日本ウイルス学会総会抄録, 1051.
 - 98) Miyamoto, K. and Morgan, C. (1971): *J. Virol.*, **8**, 910-918.
 - 99) Dales, S. (1963): *J. Cell Biol.*, **18**, 51-72.
 - 100) Poste, G. (1972): *Int. Rev. Cytol.*, **33**, 157-252.
 - 101) Ichihashi, Y. and Oie, M. (1983): *Virology*, **130**, 306-317.
 - 102) Pagano, R. E. and Weinstein, J. N. (1978): *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**, 435-465.
 - 103) Herz, C., Stavnenzer, E., Krug, R. M. and Gurney, Jr., T. (1981): *Cell*, **26**, 391-400.
 - 104) Kuroda, S., and Ohnishi, S. (1984): 投稿準備中.
 - 105) Kitamae, F., Sugawara, K., Ohwada, K. and Homma, M. (1982): *Virology*, **73**, 357-361.