Respiratory Syncytial ウイルスのゲノムの構造

佐竹正延

京都大学ウイルス研究所癌ウイルス部門

(受付: 昭和60年7月29日)

I. はじめに

(1) RS ウイルス研究の状況

Respiratory Syncytial ウイルス (RS ウイルス) は、幼児の呼吸器感染症の主要な病原体として知られている¹⁾。年長の小児・成人の場合は、感染が上気道に局限し、症状も軽度ですむか、もしくは全く無症状の不顕性感染であるが、生後6カ月未満の幼児に感染すると、時に感染が下気道(気管支・細気管支)に波及し、重篤な症状を引き起こす。このように、小児科臨床の面からみて、重要な病原ウイルスであるにもかかわらず、これまでその生化学的解析が充分に行なわれたとは、言い難いように思われる。その原因として、組織培養でのウイルス収量が低いこと、従って十分量のウイルス粒子を精製することが難かしいこと、ウイルス粒子が極めて脆弱で容易に感染性を失なうことなどが挙げられる。また遺伝学的な面からの解析も遅れており、ts-mutant の相補性試験から、7ないし8個の遺伝子の存在が推定されていたに過ぎない²⁾。ところが近年、RS ウイルスもまた、DNA 組み換え技術を適用して研究されるようになり、その遺伝子・ゲノムの構造がかなりの程度まで明らかにされるといった、展開がみられた。その結果、従来の方法では予測できなかった知見が、数多く得られた。例えば、遺伝子の数・ゲノム上での各遺伝子の配列・新種の蛋白又は遺伝子の存在・各蛋白のユニークなアミノ酸配列といった事柄である。これらの知見は、RS ウイルス各蛋白の生物学的機能、またウイルスの転写・複製の機構を理解する上での、基礎的な情報を提供するものである。一方、近縁のウイルスであるセンダイウイルス (H

VJ)・麻疹ウイルスのゲノム構造の解析も、ほぼ時期を同じくして行なわれ、HVJ・麻疹・RS ウイルスの遺伝子構造を比較することが可能になり、興味深い共通点もしくは相違点が指摘されている。そこで以下に、RS ウイルスの遺伝子・ゲノム構造の研究の状況を述べるが、随時、近縁ウイルスと対比しつつ見ていくことにする。HVJ のゲノム構造については、本誌上に塩田・浜田による詳しい紹介があり³⁾、是非参照して頂きたい。なお、RS ウイルスの遺伝子構造の研究は、筆者の属していた米国 N.I.H. の Chanock 博士の研究室、ノースカロライナ大学の Wertz 一派の2つのグループによって行なわれ、ここでは両グループの研究結果を総合して紹介する。

(2) RS ウイルスの構成成分

RS ウイルスは、Paramyxovirus 科に属しているが、この科は3つの群、Paramyxovirus・Morbillivirus・Pneumovirus に分類される(表1)。3者とも細胞融合活性(F)を有する点で共通しているが、赤血球凝集活性(HA)、neuraminidase 活性(NA)の有無で区別される。即ち、HVJ は HA・NA 活性ともに有し、麻疹ウイルスは HA 活性のみを示す。しかし RS ウイルスには HA・NA 活性とも検出されない。またヌクレオカプシドの構造については、RS ウイルスの場合(14 nm)、他の2群よりも(18 nm)、その直径がいく分小さい。

RS ウイルスのゲノムは、約 5×10^6 ダルトンの長さの、分節のない1本鎖 RNA である。そして、ウイルス粒子から抽出した RNA は、感染細胞より抽出したウイルス特異的な poly(A)-RNA とハイブリダイズすることから、ウイルスゲノム RNA は、negative の極性を持つ⁴⁾。従ってその増殖の機構は、VSV (rhabdovirus)・HVJ などと、基本的には同様と推測される。増殖の場合は細胞質で、脱核した細胞でも増殖が可能である。

精製したウイルス粒子には、SDS-PAGE 上、8つの蛋白が同定されていて、大きい方から、L(180 k)・G(90

Structural aspect of the respiratory syncytial virus genome, by Masanob SATAKE. Division of Tumor virus, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606, Japan.

〒606 京都市左京区聖護院川原町

表 1 Paramyxovirus Family

Genus	Paramyxovirus	Morbillivirus	Pneumovirus
Virus (host)	Parainfluenza 1,2,3,4 (human) Mumps (human) Sendai or HVJ (murine) NDV (avian) SV5 (simian)	Measles (human) Distemper (canine) Rinderpest (bovine)	Respiratory syncytial (human) Mouse pneumonia (murine)
F (fusion)	+	+	+
HA (hemagglutinin)	+	+	-
NA (neuraminidase)	+	-	-

k)・F₁(48 k)・NC(42 k)・P(34 k)・M(28 k)・24 k 蛋白・F₂(21 k) と名付けられている^{5,6,7)}。この中で G・F₁・F₂ は、放射性グルコサミンでラベルされるので、糖蛋白である。F 蛋白は還元条件下では、F₁ と F₂ とに分離されるが、非還元条件下では、単一の 68k 蛋白として泳動されるので、F₁ と F₂ とはジスルフィド結合により結合していると考えられる。また、ウイルス粒子をトリプシン処理すると、G と F とが遊離されるので、G・F はエンベロープに位置する蛋白であることがわかる。次に、F に対する抗体は、感染細胞が融合して多核巨大細胞を形成するのを阻害することから、F は細胞融合能を担う蛋白である^{8,9)}。一方 G 蛋白は、Paramyxovirus の HN 蛋白に相当すると考えられるが、RS ウイルスには HA・NA 活性とも検出されない。しかし抗 G 血清・G に対するモノクローナル抗体には、ウイルスの中和抗体活性が存在するし^{8,10)}、精製した G(¹²⁵I でラベルしてある)は細胞膜に結合するので¹⁰⁾、G 蛋白は、ウイルスの細胞膜への吸着結合に役割を果たしているのであろう。

エンベロープとコアをつなぐ蛋白は、M 蛋白である。ウイルス粒子を低塩 (0.15 M. NaCl) 濃度下で、2% Triton X 処理して可溶化されてくるのが、上記の G・F の他、28 k 蛋白で、これが membrane・matrix 蛋白と定義される¹¹⁾。塩濃度を更に上げて (0.4 M) Triton X 処理すると、全ての蛋白が可溶化されて、ヌクレオカプシド構造だけが残る¹¹⁾。ヌクレオカプシドの成分は、ゲノム RNA と NC 蛋白で、他に量は少ないが P と L とがある。P はリン酸化蛋白、L はポリメラーゼで、RNA の転写・複製時には、P と L とは酵素複合体として機能

するものと思われる。

以上に挙げたウイルス粒子の構成蛋白は、ウイルス感染細胞内でも同定されている^{12,13)}。また、ウイルス感染細胞中に特異的に検出されるが、ウイルス粒子中にはとり込まれない、ウイルスゲノムによって code される蛋白 (non-structural 蛋白・NS 蛋白) が、2 ないし 3 種類存在する。

(3) RS ウイルス遺伝子のクローニング^{14,15,16)}

RS ウイルス粒子からのゲノム RNA の収量はそう多くないので、かわりに、感染細胞から抽出した poly(A)-RNA を、クローニングの為の出発材料とした。Hep 2 細胞に RS ウイルス A₂ 株を、アクチノマイシン D 存在下で感染させた。これは宿主の RNA 合成を抑制する為で、RS ウイルスの増殖は、インフルエンザウイルスと異なり、アクチノマイシン D により阻害されない。CPE 出現後細胞を可溶化して、細胞質 RNA を回収、更に poly(A)RNA を精製した。次いで、oligo(dT) をプライマーとし、poly(A)RNA 鋳型から 1 次鎖 cDNA を合成、2 本鎖 DNA とした後、G:C tailing 法により、pBR322 の Pst I 部位に挿入した。recombinant は大腸菌 HB 101 株にトランスフェクトし、テトラサイクリン耐性のコロニーを拾い、ライブラリーを作製した。

ライブラリーからのウイルス遺伝子クローンのスクリーニング・同定について、上述したと同様にして、ウイルス感染細胞から poly(A) RNA を得、³²P で強くラベルした cDNA を作って、これをプローブとしてライブラリー全体にあてた。強い陽性を示すクローンを約 200 個選び、ウイルス特異的なサブライブラリーとした。

表 2 Characterization of RS Viral Transcripts

Viral genes	Size of transcripts in nucleotides ex- cluding the 3' poly (A) tail	Molecular Weight (dal) of and the number of aminoacids (AA) in proteins encoded by the transcripts	
		dal	AA
Nonstructural protein 1 (NS ₁) (1c)	528	15,568	139
Nonstructural protein 2 (NS ₂) (1b)	499	14,703	124
Nucleocapsid protein (NC)	1,197	43,456	391
Phosphoprotein (P)	907	27,150	241
Matrix protein (M)	952	28,717	256
7.5 kdal protein (1a)	405	7,536	64
33 kdal protein (G)	918	32,588	298
Fusion Protein (F)	1,899	63,371	574
22 kdal protein	957	22,156	194
Polymerase (L)	-	-	-

各クローンは次に、感染細胞 poly(A)RNA に対して Northern プロットを行なうことにより、それに対応する mRNA のサイズ毎に分類した。最終的には、各クローン DNA により、感染細胞 poly(A)RNA を hybrid-select し、選択された RNA を *in vitro* で翻訳して、SDS-PAGE で蛋白を検出することにより、各クローンがどのウイルス遺伝子を保有しているかを同定した。なお Huang & Wertz は、感染細胞 poly(A)RNA をゲルで分画し、精製した各 RNA 画分を、*in vitro* で翻訳することによって、直接に各 mRNA の遺伝子同定を行なっている¹⁷⁾。ウイルス諸蛋白のうち、NC・P・M・24k・NS₁・NS₂ の各蛋白は、*in vivo* 即ち、ウイルス粒子もしくは感染細胞から精製したものと、*in vitro* で翻訳したものと、そのペプチドマップが一致する。しかし G・F 蛋白は、*in vivo* では翻訳後に修飾を受けるので(糖鎖の付加)、*in vitro* での翻訳蛋白とは、必ずしもペプチドマップが一致しない。それで、G・F 遺伝子のクローンの同定は、後述のように別の方法によった。

次に、各遺伝子のクローンの中から、対応する mRNA のサイズと照らし合わせて、full length と思われるク

ローンを選び、Maxam・Gilbert 法により、その塩基配列を決定した。更に、primer extension で dideoxy 法を併用して、mRNA の 5' 末端の塩基配列も、決定することが可能である。こうして mRNA(cDNA) の全長に渡って、塩基配列を決定したら、3つの異なる読み取り枠で翻訳し、open reading frame(ORF) の存在を検出して、最も確実らしい ORF から、code される蛋白のアミノ酸配列を推定した。以上の結果をまとめたのが表 2 で、各々の転写産物(mRNA)の長さ、code される蛋白のアミノ酸数・分子量を示してある。

II. RS ウイルスの遺伝子

(1) NC 遺伝子^{18,19,20)}

発表された NC 遺伝子の塩基配列には¹⁸⁾、実は誤謬のあることが、後日判明した^{19,20)}。きっかけは、筆者が G 蛋白を code していると思われる遺伝子クローンを sequence していた際、そのクローンの 3' 末端側 283 塩基の配列が、発表された NC 遺伝子塩基配列の 3' 末端側 283 塩基(C 末端側 92 個のアミノ酸配列に相当する)の配列と、全く同一であることに気づいたことに始まる。共通塩基配列の部分からプライマーを作り、感染細胞

poly(A)RNA とハイブリダイズさせて、dideoxy 法で伸長させると、その塩基配列は、発表されたNC塩基配列ではなく、G遺伝子塩基配列の中に続いていくことがわかった。即ち、発表されたNCの塩基配列は、NCユニークな5'側1136塩基と、G遺伝子由来の3'側283塩基とが、偶々 in frame で結合したものである。ゲノム複製時のエラーで生じたD I型のゲノムから転写された、poly(A)RNA の cDNA クローンを拾ったものと考えられる。

その後、NC遺伝子クローンを sequence し直し、訂正された結果は^{19,20)}、発表された塩基配列の¹⁸⁾1137番目(アミノ酸376番目)から、発表されたのとは異なるNC本来の塩基配列が57個(アミノ酸16個)続き、poly(A)鎖で終わる。従って、転写産物は1197塩基長、codeされる蛋白は、アミノ酸数391個、分子量43kである。推定分子量の値は、*in vivo* のNC蛋白のSDS-PAGE上の値とよく一致する。蛋白は全体としてやや塩基性であるが、塩基性アミノ酸が特に密集している領域は認められず、全体に一樣に分布している。また、cysteine 含量が低い(3個, 0.8%)。

RSウイルスのヌクレオカプシド構造が、HVJ・麻疹ウイルスのそれと異なることは、上述した通りであるが、各々のNC蛋白のアミノ酸配列^{21,22)}を比較すると興味深い。NC蛋白のアミノ酸数・分子量は、各々、391個・43k(RS)、524個・57k(HVJ)、523個・58k(麻疹)である。また、塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸の比は、57個:46個(RS)、66個:68個(HVJ)、66個:61個(麻疹)で、RSのNC蛋白が、最も塩基性が強い。こうしたNC蛋白のサイズ・等電点の違いが、ヌクレオカプシド構造にどのように反映しているか、またその結果、転写・複製の際の機能にどのような影響を与えているのか、今後の研究が待たれる。なお cysteine 含量は、3ウイルスとも低い(RS 3個, HVJ 2個, 麻疹 3個)。アミノ酸配列そのものについては、3ウイルス間に相同性は認められない。ただし、同じ Morbillivirus に属する麻疹・Distemperウイルスの蛋白は、血清学的に強い交叉反応を示すことが知られていたが、両者のNC蛋白のアミノ酸配列は、特に蛋白の中央部分において、強い相同性を示す²²⁾。

HVJのNC蛋白は、*in vivo* では修飾を受け、開始Metが除去され、2番目のAlaがアセチル化されることが報告されている²³⁾。

(2) P遺伝子²⁴⁾

P遺伝子の転写産物は907塩基長で、その中にORFは、唯一つ存在する。そのcodeする蛋白は、241個のアミノ酸からなり、分子量は27kダルトンである²⁴⁾。そ

のうち酸性アミノ酸の含量は51個(21%)、塩基性アミノ酸は32個(13%)で、全体として強い酸性の蛋白である。アミノ酸配列の中央部とC末端側に、酸性アミノ酸の密集する領域があり、その部位は強く負に荷電していると思われる。P蛋白のSDS-PAGE上の見かけの分子量は34kで、アミノ酸配列からの推定値より大きい。負に荷電している領域への、SDSの結合が弱いと解釈される。VSVのNS蛋白にも、同様の強い負の荷電領域が、蛋白のN末端側約3分の1の所に存在し、SDS-PAGEでは、真正の分子量(25k)よりも、遅く(40~50k)泳動される²⁵⁾。こうした負の荷電領域は、塩基性のM・NC蛋白と相互作用する部位かもしれない。

P蛋白はヌクレオカプシドの構成成分の1つであるが、リン酸化の程度が転写に及ぼす影響については、VSVのNS蛋白で調べられている。ヌクレオカプシドをアルカリ・ホスファターゼで脱リン酸化すると、*in vitro* の転写反応は阻害される²⁶⁾。また、NS蛋白が弱くリン酸化されている場合より(NS1)、強くリン酸化されている場合の方が(NS2)、転写活性は促進される^{27,28)}。RSウイルスの場合は、残念ながらまだ信頼できる、*in vitro* の転写系が確立されていないので、P蛋白のリン酸化の及ぼす効果については、不明である。

RSウイルスのP遺伝子が、P蛋白をのみcodeしていることは、他のパラミクソウイルスのP遺伝子の構造とは、際立った対比を示している。HVJの場合には、①P蛋白(79k)をcodeするmRNAと、non-structuralなC蛋白(22k)をcodeするmRNAとが、スクロース密度勾配遠心で同じ分画に沈降すること²⁹⁾、②ゲノムRNAより作製したcDNAライブラリーで、P・C蛋白のmRNAをhybrid-selectする遺伝子座を分離できないことから³⁰⁾、PとCとが同一遺伝子内にcodeされていることが示唆されたが、P遺伝子の塩基配列の決定により^{21,31)}、P遺伝子がP蛋白(568アミノ酸・62k)とC蛋白(204アミノ酸・24k)との両方をcodeしうることが明らかになった。1本のmRNAが2つの蛋白をcodeしていることは(bicistronic mRNA)、更にS₁マッピング・primer extension・hybrid-arrest translationによっても、確認された³¹⁾。P遺伝子上で、P蛋白の開始コドンは104番目の塩基、C蛋白のそれは114番に、終止コドンは、P蛋白—1808番、C蛋白—726番目の塩基に位置していて、2つの蛋白のcode領域は、frameをずらして完全に重複している。従って、P・C蛋白のアミノ酸配列は異なるはずであり、実際に両者のペプチドマップが異なることは、以前に報告されていた³²⁾。

麻疹ウイルスのP遺伝子の塩基配列も決定され^{33,34)}、HVJの場合と全く同様に、異なるframeを利用し重複

しつつ、P・C 両蛋白を code している。HVJ・麻疹ウイルスのC蛋白はともに塩基性の蛋白であるが、その生理機能は不明である。ただし麻疹のC蛋白は、細胞質のみならず核内にも存在すると報告されている³⁴⁾。一方 Simian virus 5 (SV 5) の場合は、状況が少しく異なり、そのP蛋白(44k)と non-structural なV蛋白(24k)との mRNA を分離できないことから、P遺伝子がP・V蛋白の両方を code していると思われるが、しかし、V蛋白のペプチドマップはPのペプチドマップの一部と一致する³⁵⁾。従って、P・V蛋白ともに同一の mRNA から翻訳され、かつ同一の frame を利用しているが、Vの開始コドンがPのそれよりも下流にあたるのだろうと推定されている。HVJ・麻疹・SV 5 いずれの場合であれ、上記のようなP遺伝子の構造は、1本の mRNA からの開始コドンの選択の機構・それと翻訳効率ひいては発現量の調節という興味ある問題点を提起している。

さて RS ウイルスのP蛋白のサイズは(27k), HVJ・麻疹ウイルスのP蛋白(各々、62k・54k)と比べていかにも小さい。HVJ のヌクレオカプシドをV8プロテアーゼ処理すると、Pは分解されるが、40kのフラグメントがヌクレオカプシドに残っている、この時、*in vitro* の転写反応は正常に進行する³⁶⁾。また、Pに対するモノクローナル抗体の存在下では、ヌクレオカプシドの転写反応は阻害されるが、これらの抗体の認識部位は、Pの40kフラグメント部分にマップされる³⁷⁾。このように40k部分は、Pの機能に必要な core と考えられる。そしてこの core は、cysteine を含むことから、P蛋白のC末端側約半分、即ち、P遺伝子のうちC蛋白とは重複しない部分に相当するらしい。RS ウイルスのP蛋白のサイズは小さいが、これは、上記の HVJ・P蛋白の core に該当する、最小限の機能単位ということかもしれない。その意味では、VSV の NS 蛋白も 25k と小さい点に、注意される。ただし、VSV の NS 蛋白、RS・HVJ・麻疹の各々のP蛋白の間には、アミノ酸配列の相同性はみられない。

(3) M遺伝子³⁸⁾

M遺伝子は、952塩基長で、長いORFのcodeする蛋白は、256個のアミノ酸からなり、分子量28kダルトンである³⁹⁾。この分子量の値は、*in vivo* のM蛋白のSDS-PAGE上の値とよく一致する。以下にM蛋白の様相を述べる。

①塩基性アミノ酸32個(12%)、酸性アミノ酸25個(10%)を含み、やや塩基性の蛋白である。しかし塩基性アミノ酸の密集領域は、特に認められない。HVJのM遺伝子の塩基配列も決定されたが^{39,40)}、M蛋白は、348個のアミノ酸からなり、分子量38.5kで、強い塩基性の蛋白である。VSVのM蛋白もまた、塩基性アミノ酸に富み、N末端近くに塩基性アミノ酸の密集領域が存在する⁴¹⁾。さて、VSVのts-変異株で、非許容温度で転写反応が促進するものが分離されているが、変異はM遺伝子に存在する⁴²⁾。また、VSVの精製した蛋白Mを、ヌクレオカプシドに添加すると、ヌクレオカプシドは、伸展した構造から、凝縮した構造に変化するが、同時に転写反応が抑制される⁴³⁾。こうしたM蛋白のヌクレオカプシドとの相互作用は、M蛋白の塩基性によるものとされている。

②RSウイルスのM蛋白は、疎水性アミノ酸に富み、特にC末端側3分の1部分に、疎水性アミノ酸の密集領域が存在する。HVJのM蛋白にもそのC末端近くに、疎水性領域がある。VSVのM蛋白は、全体として疎水性の蛋白であるが、特に著明な疎水性領域は、分子内に認められない。こうしたM蛋白の疎水性の性質は、膜との相互作用に重要な役割を担っている。細胞膜もしくはエンベロープ直下に並び、ヌクレオカプシドとエンベロープ糖蛋白との間に介在して、ウイルスの成熟を助け、かつウイルス粒子の構造を、保持していると考えられる^{44,45)}。

③②で述べたように、M蛋白は膜と相互作用する蛋白

図1 M遺伝子(上段)と22k蛋白遺伝子(下段)のORF

であるが、アミノ酸配列のN末端に、いわゆる signal peptide 配列⁴⁶⁾は見当らない。これは RS・HVJ・VSV に共通している。signal 配列の欠如は、M蛋白が細胞質内遊離のリボソーム上で合成されることと^{47,48)}、一致する。なお、HVJ のM蛋白は、*in vivo* で修飾を受け、開始 Met が除去され、2 番目の Ala がN-アセチル化される⁴⁹⁾。

④①②③のように、RS・HVJ・VSV のM蛋白は、類似の性質を持つにもかかわらず、1 次アミノ酸配列には相同性がみられない。M蛋白の機能を解析する為には、高次構造の比較が必要と思われる。

次に、RS のM遺伝子には、上記のM蛋白の他、75個のアミノ酸からなるポリペプチドを code する、小さな ORF が、M蛋白のC末端と一部重複して、ただし異なる frame で、存在する (図1)。この小さな ORF が、生物学的に意義のあるものかどうか、現在是不明である (後述)。HVJ のM遺伝子の場合にも、M蛋白の終止コドンのすぐ次のコドン (Met) から、同じ frame で、27 個のアミノ酸を code する、小さな ORF が存在する (trailer peptide)。一方、A型インフルエンザウイルスのM遺伝子 (第7分節) からは、M₁-RNA と、スプライシングにより M₂-RNA とが作られる。M₁-RNA は、M蛋白 (252 アミノ酸) を code する。M₂-RNA から作られる M₂蛋白 (97 アミノ酸) の存在は、*in vivo* で確認されていたが⁴⁹⁾、その機能はしばらく不明であった。最近、M₂蛋白は、感染細胞表面に突出している膜挿入蛋白であり、cytotoxic T 細胞の標的分子であることが、明らかにされた⁵⁰⁾。

(4) 22 k 蛋白遺伝子^{51,52)}

この遺伝子は、他のパラミクソウイルスには、それに相当する遺伝子・蛋白が見当らない。RS にユニークな遺伝子として同定された¹⁵⁾。以前から、感染細胞・ウイルス粒子内に、24 k の蛋白が、ウイルス特異的なものとして見つかったが^{5,7,12)}、M蛋白 (28 k) の分解産物といった可能性も含め、その位置づけは不明であった。しかし、22 k 蛋白遺伝子が、他の RS 遺伝子とは重複しない、独立の単位として確認され¹⁵⁾、新しい RS 独特の蛋白・遺伝子として、位置づけられることになった。22 k 蛋白遺伝子は、957 の塩基長を持ち、長い ORF は、分子量 22 k、194 個のアミノ酸からなる蛋白を code している^{51,52)}。塩基性アミノ酸 36 個、酸性アミノ酸 23 個を含み、強い塩基性の蛋白である。*in vivo* でも 24 k 蛋白は、RS 蛋白群の中で、最も塩基性の強いことが、2 次元 PAGE で観察されている¹³⁾。

in vivo では、24 k 蛋白は、糖でも Pi でもラベルされず、また開裂も受けず、翻訳後の修飾は受けない^{7,11)}。

24 k 蛋白は、ウイルス粒子の構成成分の 1 つであるが、その位置については、ウイルス粒子を 0.4 M 食塩の存在下で、2% Triton X 処理すると、エンベロープ糖蛋白の他、M と 24 k 蛋白とが溶出されること、また、ヌクレオカプシド標品中には 24 k は、存在しないことなどから、24 k 蛋白は、M蛋白と類似の、エンベロープに associate した蛋白と考えられる⁵³⁾。アミノ酸配列の中央部に、疎水性領域が存在するので、この部位が、エンベロープ膜と相互作用する部位かもしれない。N末端には、signal 配列は見当らない。22 k 蛋白の更に詳しい生理的機能については、まだわかっていない。

22 k 蛋白遺伝子には、更に、90 個のアミノ酸からなるポリペプチドを code する小さな ORF が、22 k 蛋白のC末端と 1 部重複し、frame をずらして存在する (図1)。この遺伝子構造は、上述のM遺伝子の構造と似ている。M・22 k 蛋白遺伝子に存在する 3' 近傍の小さな ORF が、実際に使用され、その情報を含むポリペプチドが作られているかどうかは、不明である。仮に利用されたとしたら、以下の可能性が考えられる。

①スプライシング。しかし RS ウイルスは、核の関与なしに、細胞質内で増殖する。Northern プロットでも、M・22 k 蛋白の poly(A)-RNA よりも小さな RNA 種は、検出されていない。②翻訳の終止と再開始。リボソームが 5' 近傍の長い ORF を翻訳し、終止コドンで一たん停止した後、近くの開始コドンで再び翻訳を開始するというもの。M遺伝子の場合、終止コドンの下流には、ATG は存在しない。22 k 蛋白遺伝子の場合には、終止コドンの 55 塩基分下流に、ATG が存在し、そこから次の終止コドンまで、61 個のアミノ酸からなるポリペプチドを作ることが、理論上可能である。③翻訳のフレーム・シフト。リボソームが 5' 近傍の ORF を読んできて、その終止コドンの近くに到達したら、frame を変えて読み始め、3' 近傍にある ORF を読んでいくというもの。この場合には、より大きい蛋白が合成されることになる。以上①②③とも、可能性だけで、実験的裏付けはない。

(5) NS₁ と NS₂ 遺伝子⁵²⁾もしくは 1c と 1b 遺伝子⁵⁴⁾

これら 2 つの遺伝子は、ウイルス粒子中には取り込まれないが、感染細胞中に出現する、non-structural (NS) 蛋白を code している。NIH グループの NS₁・NS₂ が、各々、Wertz グループの 1c・1b 遺伝子に該当する。感染細胞の poly(A)RNA を、各々のクローン DNA で選択し、*in vitro* 翻訳すると、NS₁ は 14 k 蛋白を、NS₂ は 11 k 蛋白を選択合成する^{16,52)}。*in vitro* で合成されたこれらの 14 k・11 k 蛋白は、感染細胞より精製したそれらと、ペプチドマップが一致する¹⁶⁾。また感染細胞より精製した 14 k・11 k 蛋白のキモトリプシン分解産物

の, HPLC による分離パターンは, 他の RS 蛋白とは異なる⁵³⁾. 最終的には, 遺伝子の塩基配列が決定されて^{52,54)}, 2つの独立した NS 遺伝子の存在が, 明確になった. RS ウイルスの, 他のパラミクソウイルス (HVJ・麻疹) との, 大きな相違の1つは, RS の P 遺伝子が NS 蛋白を重複して code することなく, NS 蛋白の遺伝子が, 独立に, しかも2つ存在することである.

NS₁ 遺伝子は, 528 塩基長で, 139 個のアミノ酸からなる分子量15.5 k の蛋白を code する. 全体として, 中性であり疎水性である. NS₂ 遺伝子は, 499 塩基長で, 124個のアミノ酸からなる分子量14.7 k の蛋白を code している. NS₂ 蛋白は, 親水性で塩基性である.

これら NS₁・NS₂ 蛋白の機能は, 現在全く不明であるが, おそらく, ウイルス RNA の転写・複製に重要な役割を果たしているであろう.

(6) 1a 遺伝子⁵⁵⁾

Wertz グループが, その存在を明らかにした遺伝子で¹⁶⁾, 405 塩基の長さを持ち, 64 個のアミノ酸からなる, 分子量 7.5 k の蛋白を code する⁵⁵⁾. SDS-PAGE 上 9.5 k と計測された蛋白が¹⁶⁾, これに該当する. 蛋白は疎水性アミノ酸に富み, 配列の中央部に疎水性領域が存在する. 当初 9.5 k 蛋白は, 感染細胞中の中のみその存在が確認され, NS 蛋白の1つとされたが¹⁶⁾, 最近, ウイルス粒子中にも極く微量に存在することが判明した⁵³⁾. 機能

図 3

はわかっていない。

(7) L 遺伝子

Wertz のグループが、ポリメラーゼ (L) 遺伝子のそれと思われるクローンを拾っている¹⁵⁾。

(8) F 遺伝子^{56,57)}

決定された F 遺伝子^{56,57)}は、1899 塩基長で、574 個のアミノ酸からなる分子量 63 k の F 蛋白 (図 2) を code する。蛋白の全体の様相を知る為に、hydropathicity プロファイルを描くと⁵⁸⁾、3 つの特徴的な疎水性領域が存在することがわかる (図 3)。A が signal peptide 配列、B は開裂部位で F₁ サブユニットの N 末端、C は membrane anchorage 部位である。以下、順に述べていく。

N 末端の開始 Met からアミノ酸番号 20 までの A 領域は、膜蛋白に共通にみられる signal peptide 配列で⁴⁶⁾、ER 結合型リボソーム上での蛋白合成の際、新生ポリペプチド鎖を ER 膜内に引き込む役割をしている。一般の膜蛋白では引き続き、signal 配列は signal peptidase により除去されることが多いが^{59,60)}、RS の F 蛋白では、その F₂ サブユニットの N 末端アミノ酸配列がまだ決定されていないので、正確にどの部位で signal peptide が除去されるのかはわからない。なお、HVJ の F₂ サブユニット N 末端はブロックされているが⁶¹⁾、RS でも同様の可能性がある。

パラミクソウイルスの F 蛋白が、その活性、即ち細胞融合能を発現する為には、前駆体 F₀ が F₁・F₂ の 2 つのサブユニットに開裂されることが、必須の条件である⁶²⁾。RS ウイルス F₀ 蛋白の開裂部位については、F 蛋白に対するモノクローナル抗体で免疫沈降して精製した F₁ サブユニットの、アミノ酸配列を部分的に決定することにより、F₁ N 末端をアミノ酸番号 137 の Phe と同定した⁵⁶⁾。この 137 番から 155 番までの 19 アミノ酸の部分が、第 2 の疎水性領域 B (図 3) で、F₁ サブユニットの N 末端に相当する。開裂部位の同定から、RS の F 蛋白は、N

末端—F₂—F₁—C 端の構造をとっており、この順序は HVJ の F 蛋白のそれと同一である⁶¹⁾。仮に 20 個の signal peptide が除去されるとして、F₂ は 116 アミノ酸、F₁ は 438 アミノ酸からなる。

F 蛋白の第 3 の疎水性領域 C (図 3) は、F の C 末端近くアミノ酸番号 526 から 549 にかけて存在する。最も疎水性の強い領域で、membrane anchorage 領域として機能するものと思われる。550 番から C 末端までの部分はやや親水性で、細胞質内に存在するとすれば、蛋白の N 端側約 90% が細胞膜外に突出していることになる。

F 蛋白の糖鎖について、RS ウイルス感染細胞を tunicamycin で処理すると、F 蛋白の glycosylation は完全に阻害されることから⁶³⁾、糖鎖は N 結合型であると考えられる。N 型糖鎖の結合部位である Asn-X-Ser/Thr のアミノ酸配列は、F₂ サブユニット中に 4 カ所、F₁ サブユニット中に 1 カ所存在する。Tunicamycin 処理細胞の F₀ (55/60 k) は、非処理細胞の F₀ (68 k) に比べ、約 10/15 k 分子量が小さいが⁶³⁾、この分子量の差異は、殆んど糖結合可能部位が、実際に利用されていることを推測させる。また *in vivo* の F₂ サブユニットは F₁ に比べて、モル比で言って、より糖含量が高いことも、F₂・F₁ 内の糖結合可能部位の数とよく一致する。なお全ての部位は、membrane anchorage 領域よりも N 端側に、かつ疎水性領域 A・B を避けて存在する。*in vivo* の F 蛋白の N 結合型糖鎖は、複合型である⁶³⁾。

ジスルフィド結合について、*in vivo* で開裂して生ずる F₁・F₂ サブユニットは、ジスルフィド結合で結合している。結合部位となりうる Cys は、F₁ 中に 3 カ所、F₂ 中に 13 カ所存在する。

F 蛋白がその機能・細胞融合能を発現する為には、F₀ が F₁ と F₂ サブユニットに開裂することが必須であるので、種々のパラミクソウイルスの開裂部位近傍のアミノ酸配列を比較することは、興味のある点である (表 3)。SV

表 3

Comparison of the Cleavage - Activation Sites

Fusion protein		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
RS	Ser <u>Lys Lys Arg Lys Arg Arg</u>	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Val	Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Ala	Val
SV5	Thr <u>Arg Arg Arg Arg Arg</u>	Phe	Ala	Gly	Val	Val	Ile	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Gln
Sendai	Gly Val Pro Gln Ser <u>Arg</u>	Phe	Phe	Gly	Ala	Val	Ile	Gly	Thr	Ile	Ala	Leu	Gly	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Gln
NDV		Phe	Ile	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	Gly	Val	Ala	Leu	Gly	Val	Ala	Thr	Ala	Ala	Gln
Influenza HA protein																			
A (Jap/305/57)		Glu	Ser	<u>Arg</u>	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Glu
B (Lee)		Lys	Glu	<u>Arg</u>	Gly	Phe	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Gly	Trp	Glu
C		Lys	Ser	<u>Arg</u>	Ile	Phe	Gly	Ile	Asp	Asp	Leu	Ile	Ile	Gly	Leu	Leu	Phe	Val	Ala
Avian (A/FPV)	Ser <u>Lys Lys Arg Glu Lys Arg</u>	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu			

5・HVJ・Newcastle disease virvs (NDV) の F₁ サブユニットの、N末端付近のアミノ酸配列は既に知られていたが⁶¹⁾、最近 SV5⁶⁴⁾、HVJ^{39,65)} については、F 遺伝子の塩基配列も決定され、F 蛋白のアミノ酸配列が推定された。既に指摘されていた様に、SV5・HVJ・NDV の F₁ サブユニットの、N末端18個のアミノ酸配列は、互いに極めて高い相同性を示す。18個のうち、2・4・5・8・9番を除き、他の13個は、3者間で全く共通である。それで、この相同性の高いアミノ酸配列自体が、融合活性に必要なのであろうと推測された⁶¹⁾。実際、この部位のアミノ酸配列に似せた合成オリゴペプチドの存在下では、F 蛋白の融合活性が阻害される^{66,67)}。しかしながら、RS の F₁ サブユニットN末端は、SV5・HVJ・NDV のそれと相同性を示さない、わずかに1・3・9番のアミノ酸が同一である。従がって、アミノ酸配列それ自体というよりは、その高次構造のあり方が、機能発現の為に重要なかもしれない。全てに共通しているのは、F₁ N末端が疎水性であることで、細胞膜との相互作用を想像させる。

インフルエンザウイルスの HA 蛋白にも、似たような状況がある。HA 蛋白も開裂を受け、前駆体 HA₀上の並びは、N 端—HA₁—HA₂—C 端で、HA₂ がパラミクソウイルスの F₁ に該当する。表 3 にみられるように A 型⁶⁸⁾・B 型⁶⁹⁾ インフルエンザウイルスの HA₂N 端は極めて高い相同性を示すが、C 型^{70,71)} のそれは異なっている。しかしこの場合もまた、A・B・C 型ともにその HA₂N 端は疎水性であることが共通である。パラミクソウイルスの F・インフルエンザウイルスの HA 蛋白は、開裂後に融合活性を示すが、至適 pH が異なり、F はやや塩基

性側⁷²⁾、HA のそれは酸性側⁷³⁾である。F₁・HA₂ の N 端それぞれのとる高次構造は、微妙に異なるのかもしれない。

F 蛋白が2つのサブユニットに開裂を受けるのは、宿主細胞由来のトリプシン様酵素によってである。即ち、Arg 残基の C 端側で開裂される。特徴的なことは、RS・SV5 の Arg 残基の N 端側には、さらに塩基性アミノ酸が5～6個続いていることである。それに対し HVJ の場合は、認識部位の Arg 1 個だけである。これらの相違は各々のウイルス F 蛋白の、開裂されやすさの程度と相関していると考えられる。RS・SV5 は、組織培養細胞で外からのトリプシンの添加なしに、多段階増殖が可能であるが、HVJ を培養哺乳動物細胞に感染させた場合には、F 蛋白は開裂を受けず、一段増殖に止まる。インフルエンザウイルスの場合には、A・B・C 型とも、開裂部位には Arg が1個だけ存在する。なお HVJ・インフルエンザウイルスとも、鶴卵中では多段階増殖が可能である。面白いのはトリ・インフルエンザウイルスの例である。トリの H 7 型には、病原性と非病原性との2種類の株があり、前者の HA 蛋白は容易に開裂を受けやすいのに対して、後者のそれは開裂されにくい型である。図 3 に示してあるのは病原性 H 7 株のアミノ酸配列で、開裂部位の N 端側に塩基性アミノ酸が続いている⁷⁴⁾。それに対して、非病原性の H 7 株の HA は、その開裂部位に、おそらく1個の Arg のみ含むらしい⁷⁵⁾。また病原性 H 7 株の場合には、開裂後さらに、carboxypeptidase B 様の酵素の作用で、開裂部位の塩基性アミノ酸残基も除去される⁷⁶⁾。

(9) G 遺伝子^{77,78)}

CAAAATGCAAAAC

ATG	TCC	AAA	AAC	AAG	GAC	CAA	CGC	ACC	GCT	10	AAG	ACA	TTA	GAA	AGG	ACC	TGG	GAC	ACT	20
MET	SER	LYS	ASN	LYS	ASP	GLN	ARG	THR	ALA	LYS	THR	LEU	GLU	ARG	THR	TRP	ASP	THR	CTC	
										30										
AAT	CAT	TTA	TTA	TTC	ATA	TCA	TCG	TGC	TTA	TAT	AAG	TTA	AAT	CTT	AAA	TCT	GTA	GCA	CAA	
ASN	HIS	LEU	LEU	PHE	ILE	SER	SER	CYS	LEU	TYR	LYS	LEU	ASN	LEU	LYS	SER	VAL	ALA	GLN	
										50										
ATC	ACA	TTA	TCC	ATT	CTG	GCA	ATG	ATA	ATC	TCA	ACT	TCA	CTT	ATA	ATT	GCA	GCC	ATC	60	
ILE	THR	LEU	SER	ILE	LEU	ALA	MET	ILE	ILE	SER	THR	SER	LEU	ILE	ILE	ALA	ALA	ILE	ILE	
										70										
TTC	ATA	GCC	TCG	GCA	AAC	CAC	AAA	GTC	ACA	CCA	ACA	ACT	GCA	ATC	ATA	CAA	GAT	GCA	80	
PHE	ILE	ALA	SER	ALA	ASN	HIS	LYS	VAL	THR	PRO	THR	THR	ALA	ILE	ILE	GLN	ASP	ALA	THR	
										90										
AGC	CAG	ATC	AAG	AAC	ACA	ACC	CCA	ACA	TAC	CTC	ACC	CAG	AAT	CCT	CAG	CTT	GGA	ATC	100	
SER	GLN	ILE	LYS	ASN	THR	THR	PRO	THR	TYR	LEU	THR	GLN	ASN	PRO	GLN	LEU	GLY	ILE	SER	
										110										
CCC	TCT	AAT	CCG	TCT	GAA	ATT	ACA	TCA	CAA	ATC	ACC	ACC	ATA	CTA	GCT	TCA	ACA	ACA	120	
PRO	SER	ASN	PRO	SER	GLU	ILE	THR	SER	GLN	ILE	THR	THR	ILE	LEU	ALA	SER	THR	THR	PRO	
										130										
GGA	GTC	AAG	TCA	ACC	CTG	CAA	TCC	ACA	ACA	GTC	AAG	ACC	AAA	AAC	ACA	ACA	ACA	ACT	140	
GLY	VAL	LYS	SER	THR	LEU	GLN	SER	THR	THR	VAL	LYS	THR	LYS	ASN	THR	THR	THR	THR	GLN	
										150										
ACA	CAA	CCC	AGC	AAG	CCC	ACC	ACA	AAA	CAA	CGC	CAA	AAC	AAA	GCA	CCA	AGC	AAA	CCC	160	
THR	GLN	PRO	SER	LYS	PRO	THR	THR	LYS	GLN	ARG	GLN	ASN	LYS	PRO	PRO	SER	LYS	PRO	ASN	
										170										
AAT	GAT	TTT	CAC	TTT	GAA	GTG	TTC	AAC	TTT	GTA	CCC	TGC	AGC	ATA	TGC	AGC	AAC	AAT	180	
ASN	ASP	PHE	HIS	PHE	GLU	VAL	PHE	ASN	PHE	VAL	PRO	CYS	SER	ILE	CYS	SER	ASN	ASN	CCA	
										190										
ACC	TGC	TGG	GCT	ATC	TGC	AAA	AGA	ATA	CCA	AAC	AAA	AAA	CCA	GGA	AAG	AAA	ACC	ACT	200	
THR	CYS	TRP	ALA	ILE	CYS	LYS	ARG	ILE	PRO	ASN	LYS	LYS	PRO	GLY	LYS	LYS	THR	THR	THR	
										210										
AAG	CCC	ACA	AAA	AAA	CCA	ACC	CTC	AAG	ACA	ACC	AAA	AAA	GAT	CCC	AAA	CCT	CAA	ACC	220	
LYS	PRO	THR	LYS	LYS	PRO	THR	LEU	LYS	THR	THR	LYS	LYS	ASP	PRO	LYS	PRO	GLN	THR	THR	
										230										
AAA	TCA	AAG	GAA	GTA	CCC	ACC	ACC	AAG	CCC	ACA	GAA	GAG	CCA	ACC	ATC	AAC	ACC	ACC	240	
LYS	SER	LYS	GLU	VAL	PRO	THR	THR	LYS	PRO	THR	GLU	GLU	PRO	THR	ILE	ASN	THR	THR	LYS	
										250										
ACA	AAC	ATC	ATA	ACT	ACA	CTA	CTC	ACC	TCC	AAC	ACC	ACA	GGA	AAT	CCA	GAA	CTC	ACA	260	
THR	ASN	ILE	ILE	THR	LEU	LEU	THR	SER	SER	ASN	THR	THR	GLY	ASN	PRO	GLU	LEU	THR	SER	
										270										
CAA	ATG	GAA	ACC	TTC	CAC	TCA	ACT	TCC	TCC	GAA	GGC	AAT	CCA	AGC	CCT	TCT	CAA	GTC	280	
GLN	MET	GLU	THR	PHE	HIS	SER	THR	SER	SER	GLU	GLY	ASN	PRO	SER	PRO	SER	GLN	VAL	SER	
										290										
ACA	ACA	TCC	GAG	TAC	CCA	TCA	CAA	CCT	TCA	TCT	CCA	CCC	AAC	ACA	CCA	CGC	CAG	TAG	300	
THR	THR	SER	GLU	TYR	PRO	SER	GLN	PRO	SER	SER	PRO	PRO	ASN	THR	PRO	ARG	GLN	END		

TTACTTAAAAA

MOLECULAR WEIGHT = 32588

図4 G遺伝子の塩基配列と、G蛋白の推定アミノ酸配列

図5

表4 G蛋白の推定アミノ酸組成

11	(3.7)	ALA
5	(1.7)	ARG
21	(7.0)	ASN
5	(1.7)	ASP
5	(1.7)	CYS
17	(5.7)	GLN
10	(3.3)	GLU
5	(1.7)	GLY
4	(1.3)	HIS
23	(7.7)	ILE
18	(6.0)	LEU
30	(10.0)	LYS
3	(1.0)	MET
7	(2.3)	PHE
30	(10.0)	PRO
33	(11.0)	SER
58	(19.4)	THR
2	(0.7)	TRP
3	(1.0)	TYR
8	(2.7)	VAL

G遺伝子の転写産物は、918塩基長で、長いORFのcodeする蛋白の、アミノ酸数は298個、分子量は33kダルトンである(図4)^{77,78)}。クローンDNAによりhybrid-selectされた感染細胞mRNAを、in vitro翻訳すると、36kの蛋白が検出される。3kの分子量の差異は、多量のPro(30個, 10%)による高次構造への影響と思われる(表4)。この遺伝子が実際にG蛋白をcodeしていることは、精製したG蛋白の部分的アミノ酸配列決定によって証明された⁷⁷⁾。

G蛋白のhydropathyプロファイルを描くと(図5)、全体としてやや親水性である。G蛋白はエンベロープに位置する膜蛋白であるが、膜との相互作用を推測させる強い疎水性領域は、唯1カ所、23番アミノ酸から63番目までのA領域(図5)に存在する。即ち、通常の膜蛋白にみられるような、N末端の開始Metに引き続くsignal peptide配列、C末端近傍のmembrane anchorage領域は、見当らない。それでG蛋白の場合には、A領域がsignalとして機能し、新生ポリペプチド鎖がER膜に引き込まれるのを助ける、そしてA領域はそのまま膜にanchorとして止まり、A領域よりC端側は、引き続き膜中を横断して、最終的に膜外に突出すると予想される。G蛋白のN末端、アミノ酸1番から20番までは、親水性であり、細胞質側に残るのである。

さて、G蛋白のようにN端が膜へ向くという方向性は、

一般のウイルス膜蛋白にはみられない構造であるが、唯一の例外というわけではない。同じパラミクソウイルスのSV5・HVJのHN蛋白もまた、同様の方向性を持つであろうことは、最近決定された塩基(アミノ酸)配列から示唆されている^{79,80)}。またNDVのHN蛋白は、合成されたHN₀から、C端側の小さなfragmentが開裂を受けて除かれ、活性型のHNに転換する。この時、HN₀・HNともにそのN末端はブロックされているが、各々のC末端のアミノ酸配列は異なることから、NDVのHN蛋白も、そのN端側が膜への挿入部位と考えられている⁸¹⁾。更に、インフルエンザウイルスのNAの場合も、同様な膜に対する方向性を有することは、その塩基(アミノ酸)配列からも示唆されたし⁸²⁾、直接的には、完全なNA分子・NAをプロナーゼ処理して得られるhead部分の各々のN・C末端アミノ酸配列の決定によっても、証明されている⁸³⁾。RSウイルスのG蛋白は、パラミクソウイルスのHN・インフルエンザウイルスのNAに対応する蛋白であり、これら3者間には、膜への方向性の点で共通項があるわけである。しかしながら、アミノ酸配列そのものについては、3者の間に相同性を認めることはできない。

G蛋白の推定アミノ酸配列から計算された分子量は、33kであるが、感染細胞・ウイルス粒子のG蛋白は、84/90kもの分子量を示す。この差約50kは何に起因するのだろうか? 最近、Gruber and Levineが、G蛋白の糖鎖について興味ある報告をしている⁸³⁾。感染細胞をtunicamycin処理すると、Gは約80kに分子量が下がるので、10/15kの分は、N結合型糖鎖によるものである。一方、Golgi機能を損傷するイオノフォアであるmonensinで感染細胞を処理すると、Gの分子量は約45kに下がる。monensinは、N結合型糖鎖の付加を損なうことなく、O結合型糖鎖の合成を選択的に阻害する。従って45kの分は、O結合型糖鎖によるものである。次に感染細胞をパルス・ラベルすると、45kの前駆体が検出され、この前駆体は、endo H glycosylaseの処理により、35kに転換する。以上から、G蛋白への糖鎖の付加を模式化すると、新生ポリペプチド鎖(35k)→RERでのN結合型糖鎖10kの付加(45k)→Golgi上でのO結合型糖鎖45kの付加(90k)、という順になる。

ここで再び図4のアミノ酸配列に戻ると、N結合型糖鎖の結合部位となりうるAsn—X—Ser/Thr配列は、計7カ所ある。しかしそのうち3つは、中央のXがProであり、実際に糖鎖が付加することは稀である^{84,85)}。従って残り4カ所が、仮に全部利用されるとすれば、1本の糖鎖を4kとして、N型糖鎖は計15kとなり、前のtunicamycinの実験結果とよく符合する。また、O結合

型糖鎖の受容体となる Ser・Thr の含量が著しく高いことも (91個, 30%) (表4), 45 k もの O 結合型糖鎖の存在と符節が合う。なお, Asn—X—Ser/Thr 配列は全て, 図5の A 領域より C 端側に位置し, また Ser・Thr 残基も, A 領域より C 端側に特に多数存在する。前述のように, A 領域より C 端側は, 細胞膜外へ突出している部分と想像されるので, 糖結合可能部位の位置は, 合理的に配置されているわけである。G 蛋白は, 強い塩基性であることを, 付け加えておく。

現在までに, ウイルス糖蛋白で O 結合型糖鎖を有する例は, 少数しか報告されていない。例えば, N 型・O 型の両方を持つ例は, HSV 1 型の gB・gC・gD・gE 蛋白^{86,87)}, ワクシニアウイルスの HA 蛋白⁸⁸⁾, O 型のみを持つ例は, コロナウイルスの E I 蛋白⁸⁹⁾, などである。パラミクソウイルスでは, RS の G 蛋白が初めての例である。ここで O 結合型糖鎖について, 簡単にまとめている。

O 結合型糖鎖は, ポリペプチド鎖の Ser 又は Thr に, N-アセチルガラクトサミンを介して結合する。その構成糖には, N-アセチルガラクトサミン・ガラクトース・N-アセチルグルコサミン・フコース・シアル酸などがある。糖鎖の付加は, Golgi 装置で行なわれ, 蛋白のプロセッシングとしては, 後期の段階で起こるわけである。O 結合型糖鎖の存在を証明する方法は, ①NaOH・NaBH₄ 処理による糖鎖の遊離, ② α -D-N-acetylgalactosamine oligosaccharidase による糖鎖の遊離, ③monensin 処理により, 糖鎖の付加が阻害されることなどである。

ウイルス糖蛋白における O 結合型糖鎖の機能は, RS ウイルスの G 蛋白も含め, よくわかっていない。RS の G 蛋白は, パラミクソウイルスの HN 蛋白に相当する蛋白であるが, 細胞膜への吸着に関与することは指摘されていても, HA・NA 活性は検出されない。上記のような G 蛋白のユニークな構造・糖鎖の存在などが, その機能とどのように関連しているか, 今後の研究が待たれるゆえである。

(4) 開始コドンについて

Kozak によれば⁹⁰⁾, 大部分の真核細胞 mRNA について, その規定しているポリペプチドの開始コドンは, ① mRNA 塩基配列で 1 番最初に (5' 側に) 現われる AUG である。②開始コドンを取りまく塩基配列に, PuXXAUGPu という共通配列が見出される。そこで RS ウイルスの転写産物の塩基配列と, その ORF の開始コドンについてみていくと (表5), G を除く他の全ての mRNA で, その開始コドンは, 1 番最初に現われる AUG である。しかも, 5' 側の non-coding 域が, 9~17 塩基と極めて短かい。5' 側 non-coding 域がやや長いのは, NS₁

表5

Nucleotide Sequence Around the Initiating Methionine

	-3	+1+2+3+4
NS ₁	G A G	A T G G
NS ₂	A C C	A T G G
NC	A A G	A T G G
P	A T C	A T G G
M	A A T	A T G G
Ia	C C A	A T G G
G	C A A A T G C A A A C	A T G T
F	A C A	A T G G
22k	A A T	A T G T

(54塩基), NS₂ (32 塩基), Ia (84塩基) の場合だけである。また開始コドンを取りまく塩基配列については, NS₂・NC・P・M・F は, AXXAUGG の構造をとり, 真核細胞 mRNA に最も頻繁にみられる配列である。その他の mRNA も, -3・+4 のどちらか一方は必ず, Pu であり, -3・+4 とともに Py である例はない。G の ORF の開始コドンは, 5' 側で 2 番目に出現する AUG であるが, 最初の AUG は, CXXAUGC と, -3・+4 とともに Py であり, in vivo ではおそらく利用されることはないと思われる。なお, G の最初に現われる AUG からは, その frame でいくと, 直ちに終止コドンに行きあたる。従って, G の mRNA の場合には, 2 番目に出現する, ORF の開始コドンが, 実際の蛋白合成の開始点であろう。

III RS ウイルスのゲノムの構造・転写・複製

(1) ゲノムの構造

前章までに, RS ウイルスの各々の遺伝子の構造と, その code する蛋白について述べてきたが, 次に, 各遺伝子がどのようにして発現されるか (転写), またウイルスの増殖サイクルがどのようにして完結するか (複製) を理解する為には, ウイルスゲノム全体の構造を知らねばならない。

①mRNA の共通構造について^{87,91)}, 非分節の ⊖ 鎖 RNA ウイルスの原型である VSV・HVJ は, そのゲノムの構造が塩基レベルで, 全てもしくは殆んど明らかにされており, その全ての遺伝子の両端に, 共通な塩基配列の存在することが知られている^{92,93)}。RS ウイルスの解析は, その mRNA の cDNA クローンから出発したので, 全ての遺伝子の転写産物に共通する構造について,

表 6

5'-END AND 3'-END SEQUENCES OF RS VIRAL TRANSCRIPTS

Transcripts encoding	5'-end sequence	3'-end sequence
NS ₁ protein	5'NGGGCAAATAAGAATTTGAT	5' ----CTAACACCATTAGTTAATAT (A) 12
NS ₂ protein	5'GGGGCAAATAAATCAATTCA	5' ----CCTGAAAATTATAGTAATTT (A) 13
NC protein	5'NGGGCAAATACAAAGATGGC	5' ----ATGTAGAGCTTTGAGTTAAT (A) 5
P protein	5'NGGGCAAATAAATCATCATG	5' ----AAATCTATAATATAGTTAC (A) 13
M protein	5'NGGGCAAATATGGAAACATA	5' ----TAGTACTCAAATAAGTTAAT (A) 6
22 kdal protein	5'NGGGCAAATATGTCACGAAG	5' ----TATCTAACCGATAGTTATTT (A) 14
33 kdal protein (G)	5'NGGGCAAATGCAAACATGTC	5' ----CACCACGCCAGTAGTTACTT (A) 13
F protein	5'NGGGCAAATAACAATGGAGT	

*The codon for initiating methionine of the respective protein(s) is underlined.

*A conserved tetranucleotide sequence AGTTA is present around the 3'- end of all but the NS₂ transcript.

表 7

Comparison of the Sequences Around the Intergenic Region

	Initiation Sequence	Termination Sequence	Intercistronic Sequence
VSV	3'UUGUCNNUAG	3' ---AUAC(U) ₇ -5'	NA
Sendai	3'UCCC ^{AU} _{AA} U ^{UG} _{UG A}	3' ---AUUC(U) ₅ -5'	GAA
Measles	3'UCCUUGGU	3' ---AAUA(U) ₆ -5'	GAA
RS	3'CCCCGUUUA ^U _C	3' ---UCAAT(N) ₁₋₄ (U) _N -5'	-

まず調べられた(表6)⁵⁷⁾⁹¹⁾. 列挙すると, (i)5'末端に cap 構造を有するであろうこと. この点はまだ直接には証明されていない. しかし, mRNA を鋳型としての, primer extension 法で, 真の5'末端から1塩基分余計に伸長される傾向から, cap の存在が予想される. (ii)5'末端に9塩基からなる共通配列, GGGGCAAU が存在すること. (iii)3'末端の poly(A) 鎖の上流に, 非特定の数塩基をはさんで, AGUUA という5塩基からなる共通配列が存在する(私達 NIH グループは当初この配列を見過

ごしていたが, Collins らによって指摘された). (iv)3'末端に poly(A) 鎖が存在する. (ii)(iii)の点は, VSV・HVJ との類推から, ゲノム上の各遺伝子の両端に存在する, 全遺伝子に共通な, 転写開始信号・終止信号のコピーと考えられる. この mRNA の共通塩基配列を, ゲノムセンスに直したのが表7である.

②遺伝子間塩基配列について. 繰り返しになるが, RS の解析は, mRNA の cDNA クローンから出発した. こういう場合に遺伝子間塩基配列を決定する方法として

Comparison of the Transcriptional Map

RS	3'- NS ₁ - NS ₂ - NC - P - M - la - G - F - 22k - L - 5' (1c) (1b)
Sendai	3' - NC - P - M - F - HN - L - 5'
VSV	3' - N - NS- M - G - L - 5'

図 6

は, (i) 鋳型 mRNA 上での primer extension の際, RNA 標品中に相当量の read through 転写産物が含まれていれば, ある遺伝子の mRNA 5'末端から隣接遺伝子 mRNA 3'末端へと続く塩基配列を読むことができる. (ii) read through の cDNA クローンを拾って, 塩基配列を決定する. (i)(ii)で得た情報を, 既知の遺伝子塩基配列と対照させることにより, read through 上での各遺伝子の隣接部分は, (mRNA 3'末端の共通塩基配列) — (数個のA) — (遺伝子間塩基配列) — (mRNA 5'末端の共通塩基配列) という構造であることがわかった. この構造は全体として, VSV・HVJ のそれと全く同様である (表7). ここでU塩基の並びは, poly (A) 鎖の付加信号, intergenic sequence は, monocistronic な mRNA には転写されない, 遺伝子間の塩基配列である.

③ゲノムと転写産物との関係. 表7のRSの欄には, read throughも含めた転写産物の塩基配列から推定して, ゲノムセンスで記してあるが, 実際にゲノム上にそのような塩基配列が存在することの, 直接的な証明にはならない. しかし, HVJ の read through 転写産物の塩基配列は, 遺伝子間領域も含めて, ゲノムの忠実なコピーであるとの報告もあり⁹⁴⁾, 以下は, 転写産物から推定された, RSウイルス・ゲノムの塩基配列を, 正しいものと仮定する.

④ゲノム上の各遺伝子の配列^{15,16,95)}. Collins らは, RSウイルス各遺伝子のクローンをプローブとして, 感染細胞 poly (A) RNA に対して Northern プロットを行なった際, 当該の monocistronic な mRNA の他に, より高分子量の read through 転写産物をも, 検出することができた. 1つの read through は, その含む2つの隣接遺伝子に対応する2つのクローンによって, 同一泳動位置に検出される. 従がって, 全ての遺伝子のクローンについて, その検出する read through を次々と重

ね合わせることで, ゲノム上での各遺伝子の相対的位置を推定することが可能である. Collins らにより提唱されたマップ^{15,16)} が, 図6に示してある. さらに Wertz グループは, UV (紫外線) 不活化法により, 上記の遺伝子マップを, ゲノム上の3'側・5'側に方向づけた⁹⁵⁾.

⑤RSウイルスと他のパラミクソウイルスとの比較.

RSウイルスゲノム上の各遺伝子の3'末端・5'末端に, 各々9個・5個の共通塩基配列が存在するという構造は, 全体として, VSV⁹²⁾・HVJ⁹³⁾・麻疹⁹⁶⁾ のゲノム構造と酷似している (表7). 従がって類推から, RSの場合も, 3'末端配列が転写の開始信号, 5'末端配列が終止信号と考えられる. 3'末端配列については, RS・HVJ・麻疹との間に, 若干の相同性がみられる. しかし5'末端配列についてはRSの場合, 共通塩基配列と poly(A) 付加信号との間に, 数個の非特定の塩基が介在するという, VSV・HVJ・麻疹にはみられない様相を示す. 次に poly (A) 付加信号は, U塩基の並びがそれに相当する点は, VSV・HVJ と同様であるが, U塩基の数が, VSV・HVJ の様に一定でなく, RS の場合, 各遺伝子により多少異なるようである (表8, F・NS₁ では U₄, M では U₆).

遺伝子間塩基配列については (表8), RS のそれはまだ1部しか判明していないが, VSV・HVJ のそれとは大きく異なる. 即ち, VSV・HVJ の場合は, 遺伝子間には各々2・3個の塩基だけで, しかも各遺伝子間で共通な配列であるのに対し, RS のそれは, NS₁—NS₂ 間が19個^{52,54)}, M—la 間が9個⁵⁵⁾, F—22k 間が46個⁵¹⁾と, かなり長くかつ長さもまちまちである. しかも今の所, 共通な塩基配列が見出されない. 以上のように, RS の転写終止点・遺伝子間塩基配列は, やや複雑で, かつ少々厳密性を欠く点が特徴と言える.

表 8

Intergenic Sequences of RS Virus

NS ₁	----- (A) ₄ C T T A A C A G A A G A C A A A A A T <u>G G G G</u> ----- NS ₂
M	----- (A) ₆ T A T A C A C N N <u>G G G G</u> ----- 1a
F	----- (A) ₄ C A C A A T T G A A T G C C A G A T T A A C T T A C C A T C T G T A A A A A T G A A A A C T <u>G G G G</u> ----- 22K

RSウイルス・ゲノム上の各遺伝子の配列は、VSV・HVJ のそれと共通する点もあれば、相違点もある (図 6). 3'.....NC—P—M.....L5' の順は、共通である. しかし、(i) 2つのNS遺伝子がNCに先行すること、(ii) FとG (HNに相当) の順序が逆であること、(iii) RSにユニークな 1a・22k が、MとLとの間に挿入されていることの点で、RS の遺伝子配列は、HVJ のそれと際立った対比を示している.

こうしたユニークな、ゲノム上の遺伝子配列と、複雑な構造をもつ遺伝子間塩基配列とを、あわせ考えると、RSウイルスが進化上、パラミクソウイルス群の中でも、特異な位置を占めるのではないかと想像される. 1つの仮説として、祖先 HVJ 様ウイルスが、何らかの遺伝子供与体と組み換えを起こした結果が、祖先 RS 様ウイルスになったと考える. また別の仮説としては、祖先インフルエンザ様ウイルスの各分節が、様々な仕方で連結されて、祖先 HVJ 様ウイルスや、祖先 RS 様ウイルスになったと考える. いずれにしてもこれらの仮説の当否を考える為には、より多くのパラミクソウイルスのゲノム構造が明らかにされ、その間の比較ができるようになることが、先決と思われる.

(2) 転 写

RSウイルスの転写の機構については、現在殆んどわかっていない. しかし基本的な点は、VSV・HVJ などと同様と考えられるので、研究の進んでいる VSV について簡単に紹介する.

VSV では 1 本の⊖鎖ゲノム RNA から、5 個の monocistronic な mRNA が転写されるが、ポリメラーゼの侵入部位に関して、①ゲノムの 3' 末端 1 カ所まで侵入して、5' 側に向けて、各遺伝子を順番に転写していく (single entry site モデル). ②ゲノム上の各遺伝子の 3' 末端に、同時に多数部位に侵入して、各遺伝子を 5' 側に向けて転写する (multiple entry site モデル)、との 2 つのモデ

ルがある. ②の説をとれば、各遺伝子の mRNA は、独立に転写されて生成するのだから、等モル比ずつ存在するはずである. しかし実際には、in vivo ではそうならない. また UV 不活化法による転写の解析で、各遺伝子の不活化の程度を、その遺伝子のサイズで補正した結果は、全遺伝子が均等に不活化されることにはならない. こうした点から、②の説は実情にそぐわないように思える. 逆に UV 不活化法の結果は、各遺伝子がある順番をもって、不活化されることを示している. 即ち、①の説をとれば、ゲノム 3' 末端に近い遺伝子程、不活化されにくく、遠い遺伝子程、不活化されやすいわけである. 実際に UV 不活化法により推定された、VSV の各遺伝子の転写地図は、ゲノム上の構造的な遺伝子配列と一致する^{97,98}. 同様の解析は、HVJ⁹⁹・NDV¹⁰⁰・RS ウイルス⁹⁵でも試みられた. さらに、精製した VSV ゲノム RNA と、精製したポリメラーゼとの in vitro での再構成系でも、ポリメラーゼはゲノムの 3' 末端にのみ結合し、各遺伝子の転写は、ゲノムの 3' 端から 5' 端に向けて順番におこる¹⁰¹.

さてポリメラーゼの single entry site モデルが正しいとして、次に monocistronic な mRNA がどのようにして生成されるか? ①ゲノムの 3' 端から 5' 端まで連続して転写が進行し、その長い転写産物が endonuclease により切断されて、monocistronic な mRNA が生ずる (cleavage モデル). ②ゲノムの 3' 端から、まず初めの遺伝子を転写し、その遺伝子の 5' 端に達した所で転写を一時停止し、monocistronic な mRNA を遊離する.

その後ポリメラーゼは隣接の遺伝子に移行して、転写を再開する (stop and start モデル).

VSV の in vitro 転写産物中には、隣接遺伝子を read through した RNA が少量存在する. この中のあるものには、結合部位に長い poly A 鎖が介在しており、開裂によって monocistronic な mRNA になる前駆体と考

えられた^{102,103)}。しかしその後、in vivo の read through 転写産物の結合部位の塩基配列は、ゲノムの正確なコピーであり、その中に長い poly A 鎖が存在することはないことが、VSV¹⁰⁴⁾・HVJ⁹⁴⁾ で示された。mRNA の poly (A) 鎖は、ゲノム上の poly (A) 付加信号 U₇ 配列を、ポリメラーゼが何度も反復して読むことにより生成されると考えられている^{105,106)}。従って、poly (A) 鎖を含まない in vivo の read through が開裂を受けた後、poly (A) 鎖を付加すると考えるのは、少々無理があり、現在は stop and start モデルが多く支持されているようである。このモデルでは、read through は、stop が効かなかった偶発の産物とみなされる。

VSV の転写のもう 1 つの特徴は、ゲノム上の 3'側遺伝子から隣接の 5'側遺伝子に転写が進行する際に、抑制がかかり転写反応を終止してしまう傾向があることである (attenuation)。VSV 感染細胞中の各遺伝子 mRNA 合成量を、各々の cDNA クローン DNA との hybridization により測定した結果、遺伝子がゲノム 3' 末端から離れる程、その合成量は低下する¹⁰⁷⁾。各遺伝子の転写速度自体は同じなので、転写量が低下するのは、先行遺伝子の転写終了後、次の遺伝子の転写の再開が起こる可能性が低くなるからである。この attenuation の機構には、遺伝子結合部位近傍の塩基配列が、深く関与しているはずであるが、その構造が RS ウイルスの場合、VSV・HVJ とはやや異なることは前に述べた。そうした構造上の差異が、転写の attenuation といった機能に、どのように反映されているのか、今後の問題と思われる。

polar・sequential・discontinuous な転写反応の帰結する所は、感染細胞内の各 mRNA の合成量が、その遺伝子のゲノム上の相対位置によって決まるということである。仮に、各 mRNA の蛋白への翻訳効率が同程度とすれば、蛋白としての発現量も、同時に支配されることになる。ウイルスにとって合目的に考えれば、必要量の多い蛋白程、ゲノムの 3' 側に位置しなければならないのかもしれない。RS ウイルスの場合もこうした議論が可能だとすれば、NC 遺伝子に先行して、2 つの NS 遺伝子がゲノム 3' 端に位置することが、どのような意味を持つのか、関心がもたれる。

(3) 複製

RS ウイルスの複製の機構もまた、その転写の機構と同様に、殆んど調べられていない。そこで再び、VSV に範をとって、簡単に述べることにする。

非分節の ⊖ 1 本鎖 RNA ウイルスにとって、転写・複製の両方の機能を遂行するのは、ある意味でパラドクスである。転写の場合には monocistronic な mRNA を、複製の際にはゲノム全長をコピーしなければならないか

らである。RNA 合成が常にゲノム全長にわたって行なわれ、開裂により monocistronic な mRNA が生成され (転写)、開裂されない時が複製であると考えられることも可能である¹⁰⁸⁾。しかし現在の所、cleavage モデルには実験的根拠がなく、mRNA は初めから monocistronic なものとして合成されると、考えられている。そこで、転写と複製の mode をどのようにして切り換えるのが、問題となる。

VSV 感染細胞で、蛋白合成を阻害しておく、1 次転写は起こるが、複製は起こらないことが観察されていた。Kolakofsky らの提唱した仮説^{109,110)} は、以下の通りである。ポリメラーゼがゲノム 3' 末端の leader 遺伝子をコピーして、⊕ 鎖 leader が合成される時、ウイルス蛋白の合成が進行していなければ、⊕ 鎖 leader は裸のままである。この場合は、leader と NC 遺伝子との間で、attenuation がきき、一たんコピー反応は停止し、新生 ⊕ 鎖 leader は遊離される。そうして後、stop and start モデルに従って、ポリメラーゼは次の NC 遺伝子の転写を再開する。各遺伝子間では常に attenuation がきき、monocistronic な mRNA が生成される (転写 mode)。しかしウイルス蛋白の合成が進行して、NC 蛋白が十分に供給されるようになると、ゲノム 3' 端からコピーされつつある ⊕ leader 鎖に、NC 蛋白が結合する。そして encapsidate された場合には、leader—NC 間の attenuation がきかなくなり、ポリメラーゼは結合部位を read through すると考える。一たん encapsidate されたコピーには、蛋白間相互作用で NC 蛋白が次々に集合し、各遺伝子間の attenuation を突破して、ゲノム全長のコピーができる (複製 mode)。

実際に、約 50 塩基長の ⊕ 鎖 leader の 5' 側 3 分の 1 部分に、NC 蛋白との結合部位が存在することが示された、また NC 蛋白は自己集合性の蛋白でもある¹¹¹⁾。一方 NC 蛋白の変異株で、おそらく encapsidation がうまく働かない為に、read through 転写産物の生成量が著しく増加する例が、報告されている¹¹²⁾。

ゲノムからアンチゲノムの複製は、以上のように説明されているが、アンチゲノムからゲノムの複製も、同様に説明される。ゲノムの 3' 末端 leader 部分と、ゲノムの 5' 末端とは互いに部分的に相補的であるので、アンチゲノムの 3' 末端部分は、ゲノムの 3' 末端 leader と相同な配列を持つことになる。従ってアンチゲノム 3' 末端部分からコピーされる、⊖ 鎖 leader¹¹³⁾ にも、NC 蛋白の結合部位が存在すると予想される。

Leader 遺伝子・leader についてまとめてみると、① ⊕ 鎖 leader の 5' 側約 3 分の 1 部分に、NC 蛋白の結合部位が存在する。② 中央 3 分の 1 部分は A・U に富み、

真核細胞の TATA box に似ており、ウイルスポリメラーゼのプロモーター部位と考えられている。ポリメラーゼ (L と NS) が、この部位に結合することが示されている¹¹⁴⁾。③ VSV 感染細胞では宿主の RNA 合成が強く抑制されるが、この現象は、leader RNA の存在に起因している¹¹⁵⁾。しかも leader 鎖の中央部 3 分の 1 部分のとり、高次構造のあり方が、宿主 RNA 合成阻害の為に重要であるという¹¹⁶⁾。またこの点に関連して、感染早期には、leader が細胞核内に蓄積することが観察されている¹¹⁷⁾。④ ⊕ 鎖 leader の 3' 側 3 分の 1 部分は、宿主 La 蛋白の結合部位である¹¹⁸⁾。

以上のように leader 遺伝子・leader の存在は、VSV の転写・複製の調節、宿主細胞との相互作用に、極めて重要な役割を果たしている。HVJ にも leader 遺伝子の存在が知られているが、RS ウイルスの場合、その存在の有無はまだ確認されていない。ゲノムの 3' 末端・5' 末端の構造解析が待たれる。また仮説によれば、転写から複製への切り換えに、leader とともに NC 蛋白が必須であるが、RS ウイルスの場合、NC 遺伝子に先行して 2 つの NS 遺伝子が、ゲノム 3' 末端に存在する。転写・複製の調節に、NC 蛋白がどのように関与しているのか、興味ある問題と思われる。

IV おわりに

RS ウイルスは、パラミクソウイルス群の中でも、ユニークな位置を占めていると考えられる。第 1 の観点は、各遺伝子の code している蛋白の構造であり、第 2 には、ゲノム全体の構造の点からである。この 2 点について、RS・他のパラミクソウイルス間に、相似点もあれば、極めて異なる点も指摘できる。今後の研究課題としては、① RS ウイルスの各遺伝子の code する蛋白の機能を、真核細胞系の発現ベクターを用いて解析する。② ゲノムの 1 次構造の大体が解明されたので、転写・複製の機構を調べる土台ができた。③ 構造・機能の両面から、さらに詳しいパラミクソ・ミクソウイルスの比較ができる、といったことが挙げられると思う。

謝 辞

大阪大学微生物病研究所、保坂康弘先生の御推薦がなければ、本誌に執筆する機会はありませんでした。保坂先生に深く感謝致します。また掲載を許可して頂いた、東京大学医科学研究所、山内一也先生にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Chanock, R. M., Kim, H. W., Brandt, C. D., and Parrot, R. H., (1982) in *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*, Evans, A. S. Ed., pp. 471-489, Plenum, New York.
- 2) Gimenez, H. B., and Pringle, C. R. (1978) *J. Virol.* 27 : 459-464.
- 3) 塩田達雄, 洪田博 (1984) ウイルス 34 : 99-108.
- 4) Huang, Y. T., and Wertz, G. W. (1982) *J. Virol.* 43 : 150-157.
- 5) Levine, S. (1977) *J. Virol.* 21 : 427-431.
- 6) Fernie, B. F., and Gerin, J. (1982) *Infect. Immun.* 37 : 243-249.
- 7) Lambert, D. M., and Pons, M. W. (1983) *J. Virol.* 130 : 204-214.
- 8) Walsh, E. E., and Hruska, J. (1983) *J. Virol.* 47 : 171-177.
- 9) Walsh, E. E., Brandriss, M. W., and Schlesinger, J. J. (1985) *J. Gen. Virol.* 66 : 409-415.
- 10) Walsh, E. E., Schlesinger, J. J., and Brandriss, M. W. (1985) *J. Gen. Virol.* 65 : 761-767.
- 11) Peeples, M., and Levine, S. (1979) *J. Virol.* 95 : 137-145.
- 12) Bernstein, J. M., and Hruska, J. F. (1981) *J. Virol.* 38 : 278-285.
- 13) Dubovi, E. J. (1982) *J. Virol.* 42 : 372-378.
- 14) Venkatesan, S., Elango, N., and Chanock, R. M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 1280-1284.
- 15) Collins, P. L., and Wertz, G. W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 3208-3212.
- 16) Collins, P. L., Huang, Y. T., and Wertz, G. W. (1984) *J. Virol.* 49 : 572-578.
- 17) Huang, Y. T., and Wertz, G. W. (1983) *J. Virol.* 46 : 667-672.
- 18) Elango, N., and Venkatesan, S. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11 : 5941-5951.
- 19) Satake, M., and Venkatesan, S. (未発表データ)
- 20) Collins, P. L., and Wertz, G. W. (私信)
- 21) Shioda, T., Hidaka, Y., Kanda, T., Shibuta, H., Nomoto, A., and Iwasaki, K. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11 : 7317-7330.
- 22) Rosenblatt, S., Eisenberg, O., Ben-Levy, R., Lavie, V., and Bellini, W. J. (1985) *J. Virol.* 53 : 684-690.
- 23) Blumberg, B. M., Giorgi, C., Rose, K., and Kolakofsky, D. (1984) *J. Gen. Virol.* 65 : 769-779.
- 24) Satake, M., Elango, N., and Venkatesan, S. (1984) *J. Virol.* 52 : 991-994.
- 25) Gallione, C. T., Greene, J. R., Iverson, L. E., and Rose, J. K. (1981) *J. Virol.* 39 : 529-539.
- 26) Kingsbury, D. W., Hsu, C. H., and Morgan, E. M. (1981) in *The Replication of Negative Strand Viruses*, Bishop, D. H. L., and Compans, R. W. Ed., pp. 821-827, Elsevier, New York.

- 27) Kingsford L., and Emerson, S. U. (1980) *J. Virol.* 33 : 1097-1105.
- 28) Hsu, C. H., Morgan, E. M., and Kingsbury, D. W. (1982) *J. Virol.* 43 : 104-112.
- 29) Dethlefsen, L., and Kolakofsky, D. (1983) *J. Virol.* 46 : 321-324.
- 30) Dowling, P. C., Giorgi, C., Roux, L., Dethlefsen, L. A., Galantowicz, M. E., Blumberg, B. M., and Kolakofsky, D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 : 5213-5216.
- 31) Giorgi, C., Blumberg, B. M., and Kolakofsky, D. (1983) *Cell.* 35 : 829-836.
- 32) Lamb, R. A., and Choppin, P. W. (1978) *Viol.* 84 : 469-478.
- 33) Bellini, W. J., Englund, G., Richardson, C. D., and Rozenblatt, S. (1984) *J. Virol.* 50 : 939-942.
- 34) Bellini, W. J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., and Richardson, C. (1985) *J. Virol.* 53 : 908-919.
- 35) Paterson, R. G., Harris, T. J. R., and Lamb, R. A. (1984) *Viol.* 138 : 310-323.
- 36) Chinchar, V. G., and Portner, A. (1981) *Viol.* 109 : 59-71.
- 37) Deshpande, K. L., and Portner, A. (1985) *Viol.* 140 : 125-134.
- 38) Satake, M., and Venkatesan, S. (1984) *J. Virol.* 50 : 92-99.
- 39) Hidaka, Y., Kanda, T., Iwasaki, K., Nomoto, A., Shioda, T., and Shibuta, H. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12 : 7965-7973.
- 40) Blumberg, B. M., Rose, K., Simona, M. G., Roux, L., Giorgi, C., and Kolakofsky, D. (1984) *J. Virol.* 52 : 656-663.
- 41) Rose, J. K., and Gallione, C. J. (1981) *J. Virol.* 39 : 519-528.
- 42) Clinton, G. M., Little, S. P., Hagen, F. S., and Huang, A. S. (1978) *Cell* 15 : 1455-1462.
- 43) De, B. P., Thornton, G. B., Luk, D., and Banerjee, A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 7137-7141.
- 44) Shimizu, K., and Ishida, N. (1975) *Viol.* 67 : 427-436.
- 45) Yoshida, T., Nagai, Y., Yoshii, S., Maeno, K., Matsumoto, T., and Hoshino, M. (1976) *Viol.* 71 : 143-161.
- 46) Blobel, G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 : 1496-1500.
- 47) Morrison, T. G., and Lodish, H. F. (1975) *J. Biol. Chem.* 250 : 6955-6962.
- 48) Knipe, D. M., Baltimore, D., and Lodish, H. F. (1977) *J. Virol.* 21 : 1178-1139.
- 49) Lamb, R. A., and Choppin, P. W. (1981) *Viol.* 112 : 729-737.
- 50) Lamb, R. A., Zebedee, S. L., and Richardson, C. D. (1985) *Cell* 40 : 627-633.
- 51) Collins, P. L., and Wertz, G. W. (1985) *J. Virol.* 54 : 65-71.
- 52) Elango, N., Satake, M., and Venkatesan, S. (1985) *J. Virol.* 55 : 101-110.
- 53) Huang, Y. T., Collins, P. L., and Wertz, G. W. (1985) *Virus Res.* 2 : 157-173.
- 54) Collins, P. L., and Wertz, G. W. (1985) *Viol.* 143 : 442-451.
- 55) Collins, P. L., and Wertz, G. W. (1985) *Viol.* 141 : 283-291.
- 56) Elango, N., Satake, M., Coligan, J. E., Norrby, E., Camargo, E., and Venkatesan, S. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13 : 1559-1574.
- 57) Collins, P. L., Huang, Y. T., Wertz, G. W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81 : 7683-7687.
- 58) Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157 : 105-132.
- 59) Austen, B. M. (1979) *FEBS Let.* 103 : 308-313.
- 60) Heijne, G. V. (1983) *Eur. J. Biochem.* 133 : 17-21.
- 61) Gething, M. J., White, J. M., and Waterfield, M. D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 2737-2740.
- 62) Homma, M., and Ohuchi, M. (1973) *J. Virol.* 12 : 1457-1465.
- 63) Gruber, C., and Levine, S. (1985) *J. Gen. Virol.* 66 : 417-432.
- 64) Paterson, R. G., Harris, T. J. R., and Lamb, R. A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 6706-6710.
- 65) Blumberg, B. M., Giorgi, C., Rose, K., and Kolakofsky, D. (1985) *J. Gen. Virol.* 66 : 317-331.
- 66) Richardson, C. D., Sheid, A., and Choppin, P. W. (1980) *Viol.* 105 : 205-222.
- 67) Richardson, C. D., and Choppin, P. W. (1983) *Viol.* 131 : 518-532.
- 68) Gething, M. J., Bye, J., Skehel, J., and Waterfield, M. (1980) *Nature* 287 : 301-306.
- 69) Krystal, M., Elliott, R. M., Benz, E. W., Young, J. F., and Palese, (1982) *P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 4800-4804.
- 70) Nakada, S., Creager, R. S., Krystal, M., Aaronson, R. P., and Palese, P. (1984) *J. Virol.* 50 : 118-124.
- 71) Pfeifer, J. B., and Compans, R. W. (1984) *Virus Res.* 1 : 281-296.
- 72) Hsu, M. C., Scheid, A., and Choppin, P. W. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5862-5866.
- 73) Lamb, R. A., and Choppin, P. W. (1983) in *Annu. Rev. Biochem.* 52 : 467-506.
- 74) Porter, A. G., Barber C., Carey, N. H., Hallowell, P. A., Threlfall, G., and Emtage, J. S. (1979) *Nature* 282 : 471-477.
- 75) Bosch, F. X., Garten, W., Klenk, H. D., and Rott, R. (1981) *Viol.* 113 : 725-735.
- 76) Garten, W., Bosch, F. X., Linder, D., Rott, R., and Klenk, H. D. (1981) *Viol.* 115 : 361-

- 374.
- 77) Satake, M., Coligan, J. E., Elango, N., Norrby, E., and Venkatesan, S. (1985) Nucl. Acids Res (印刷中)
- 78) Wertz, G. W., Collins, P. L., Huang, Y., Gruber, C., Levine, S., and Ball, L. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82 : 4075-4079.
- 79) Hiebert, S. W., Paterson, R. G., and Lamb, R. A. (1985) J. Virol. 54 : 1-6.
- 80) Blumberg, B., Giorgi, C., Roux, L., Raju, R., Dowling, P., Chollet, A., and Kolakofsky, D. (1985) Cell 41 : 269-278.
- 81) Schuy, W., Garten, W., Linder, D., and Klenk, H. D. (1984) Virus Res. 1 : 415-426.
- 82) Markoff, L., and Lai, C. T. (1982) Virol. 119 : 288-297.
- 83) Blok, J., Air, G. M., Laver, W. G., Ward, C. W., Lilley, G. G., Woods, E. F., Roxburgh, C. M., and Inglis, A. S. (1982) Virol. 119 : 109-121.
- 84) Ronin, C., Bouchilloux, S., Granier, C., and Rietschoten, J. V. (1978) FEBS Let. 96 : 179-182.
- 85) Bause, E. (1979) FEBS Let. 103 : 296-288.
- 86) Oloffson, S., Blomberg, J., and Lycke, E. (1981) Arch. Virol. 70 : 321-329.
- 87) Jhonson, D. C., and Spear, P. G. (1983) Cell 32 : 987-997.
- 88) Shida, H., and Dales, S. (1981) Virol. 111 : 56-72.
- 89) Niemann, H., and Klenk, H. D. (1981) J. Mol. Biol. 153 : 993-1010.
- 90) Kozak, M. (1981) Nucl. Acids Res. 9 : 5233-5252.
- 91) Venkatesan, S., Satake, M., and Elango, N. (未発表データ)
- 92) Rose, J. K. (1985) Cell 19 : 415-421.
- 93) Gupta, K. C. and Kingsbury, D. W. (1984) Nucl. Acids Res. 12 : 3829-3841.
- 94) Gupta, K. C., and Kingsbury, D. W. (1985) Virol. 141 : 102-109.
- 95) Dickens, L. E., Collins, P. L., and Wertz, G. W. (1984) J. Virol. 52 : 364-369.
- 96) Richardson, C. D., Berkovich, A., Rosenblatt, S., and Bellini, W. J. (1985) J. Virol. 54 : 186-193.
- 97) Abraham, G., and Banerjee, A. K. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 : 1504-1508.
- 98) Ball, L. A. and White, C. N. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 : 442-446.
- 99) Glazier, K., Raghov, R., and Kingsbury, D. W. (1977) J. Virol. 21 : 863-871.
- 100) Collins, P. L., Hightower, L. E., and Ball, L. A. (1980) J. Virol. 35 : 682-693.
- 101) Emerson, S. U. (1982) Cell 31 : 635-642.
- 102) Herman, R. C., Adler, S., and Lazzarini, R. A. (1978) Cell 15 : 587-596.
- 103) Herman, R. C., Schubert, M., Keene, J. D., and Lazzarini, R. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 4662-4665.
- 104) Masters, P. S., and Samuel, C. E. (1984) Virol. 134 : 277-286.
- 105) Schubert, M., and Lazzarini, R. A. (1981) J. Virol. 38 : 256-262.
- 106) Schubert, M., Keene, J. D., Herman, R. C., and Lazzarini, R. A. (1980) J. Virol. 34 : 550-559.
- 107) Iverson, L. E., and Rose, J. K. (1981) Cell 23 : 477-484.
- 108) Ball, L. A., and Wertz, G. W. (1981) Cell 26 : 143-144.
- 109) Blumberg, B. M., Leppert, M., and Kolakofsky, D. (1981) Cell 23 : 837-845.
- 110) Lazzarini, R. A., Keene, J. D., and Schubert, M. (1981) Cell 26 : 145-154.
- 111) Blumberg, B. M., Giorgi, C., and Kolakofsky, D. (1983) Cell 32 : 559-567.
- 112) Perrault, J., Clinton, G. M., McClure, M. A. (1983) Cell 35 : 175-185.
- 113) Leppert, M., Rittenhouse, L., Perrault, J., Summers, D. F., and Kolakofsky, D. (1979) Cell 18 : 735-747.
- 114) Keene, J. D., Thornton, B. J., and Emerson, S. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 6191-6195.
- 115) McGowan, J. J., Emerson, S., and Wagner, R. R. (1982) Cell 28 : 325-333.
- 116) Grinnell, B. W., and Wagner, R. R. (1984) Cell 36 : 533-543.
- 117) Kurilla, M. G., Piwnica-Worms, H., and Keene, J. D. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 5240-5244.
- 118) Kurilla, M. G., and Keene, J. D. (1983) Cell 34 : 837-845.