特集 2 : RNA ウイルス研究の新展開

4. 細胞融合誘導に関わるパラミクソウイルス 糖タンパクの解析

鶴留 雅人

(三重大学医学部微生物学)

はじめに

モノネガウイルス目のパラミクソウイルス科に属するパラミクソウイルス亜科は、3つの属(レスピロウイルス, ルブラウイルス, モルビリウイルス)で構成されている³⁸⁾。そのうち、レスピロウイルス属とルブラウイルス属のウイルスは、そのエンベロープに2種類の糖蛋白, HN (=Hemagglutinin-neuraminidase) 蛋白およびF (=Fusion) 蛋白, を持つことが特徴である^{8, 28)}。Type II の膜蛋白であるHN蛋白は四量体のスパイクを形成し⁵¹⁾, その膜外領域はGlobular head およびStalkと呼ばれる2つの領域からなるものと想定される(図1参照)。この蛋白は受容体への結合能(Hemagglutinin 活性) およびその破壊能(Neuraminidase 活性)を持ち, その活性中心はいずれもGlobular head 領域内に存在する^{47, 51)}。一方, F蛋白はType I の膜蛋白で, 三量体のスパイクを形成する⁴⁰⁾。F蛋白の前駆体F0は細胞由来の蛋白分解酵素により解裂してS-S結合で結ばれたF1とF2のサブユニット構造となり, 融合能が活性化される^{20, 42)}。すなわちF0の解裂によりF1のN末端にFusion peptideと呼ばれる疎水性領域が生じ, これが膜融合誘導に直接関わるものと考えられている^{15, 22, 25, 34)}。F1の膜外領域には2つのHeptad repeat (HR) 配列(Fusion peptideのC末端に隣接するHR1および膜貫通領域近くのHR2)があり⁵⁾, HR2の配列をもとに合成されたペプチドは

膜融合阻止活性を示すことが知られている^{29, 39, 64)}。これら2つのHR配列の間には(8つのシステイン残基を含む)特徴的なCys-rich領域が存在し⁵⁾, おそらく4つのループを形成している²⁴⁾。さらにHR1とCys-rich領域との間には第3のHR配列(HR3)も見い出されている¹⁶⁾(図1参照)。

さて, 1980年代の末頃まで, 筆者らを含めて一部の研究グループ^{21, 37, 58, 59)}は, 膜融合や細胞融合を抑制する抗HNモノクローナル抗体(mAb)の性質から, ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2), ムンプスウイルス(MuV)あるいはセンダイウイルスのHN蛋白がその第3の機能として融合制御能を持つ可能性を指摘していたが, 一般的合意は得られていなかった。そのうえ1985年には, シミアンウイルス5(SV5)W3A株のF蛋白を(SV40ベクターにより)CV1細胞に発現させると単独で細胞融合を誘導したというPatersonらの報告³⁵⁾がなされていたこともあり, 細胞融合におけるHN蛋白の直接的な関与はどちらかといえば考慮されない傾向にあった。そのような状況下の1989年に, 坂井と渋谷⁴¹⁾がウシパラインフルエンザウイルス3型のHN蛋白がF蛋白による細胞融合に直接関与することを(ワクシニアベクターでの蛋白発現系を用いて)示したことは正に画期的であった。これを嚆矢として, 細胞融合の誘導にはHN蛋白とF蛋白の同時発現が必要であるという報告が続々となされるようになったが, それは1995年までにはほぼすべてのルブラウイルスとレスピロウイルスを網羅することになった^{2, 14, 18, 23, 32, 33, 48, 56)}。その結果, HN蛋白が第3の機能(Fusion promotion)を持っており, 細胞融合はHN蛋白とF蛋白の機能的相互作用により誘導されることが確実になったが, その一方で, SV5のF蛋白が単独での融合能を示す事実はむしろ例外的な現象であると見なされるに至った。またこのHN-F相

Analyses of Paramyxovirus Glycoproteins Involved in the Induction of Cell Fusion.

Masato Tsurudome

Department of Microbiology, Mie University School of Medicine

2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, JAPAN

〒514-8507 三重県津市江戸橋2-174

図1 細胞融合に関わる領域のマッピング^{26, 56, 57, 66)}

SP: Signal peptide, FP: Fusion peptide, TM: 膜貫通領域。

相互作用は、ウイルス特異的であることから、HN 蛋白と F 蛋白との物理的接触を伴っていることが予想された。そこで筆者らは蛋白発現系を用いて HN-F 相互作用に関わる領域をこれらの蛋白上に同定すること、また、SV 5 の F 蛋白の (例外的な) 単独での細胞融合能の実体を解明すること、を目的として研究を進めてきた。以下にそこから得られた知見を紹介したい。なお、この分野では蛋白の発現に様々なウイルスベクター (ワクシニア、ワクシニア-T7、SV40、アデノなど) を用いるのが一般的であり、特にワクシニア-T7 系などでは β -ガラクトシダーゼによる発色を利用することで細胞融合の定量が高感度でおこなえるようになってきた。しかし後述するように、ウイルスベクター系には、用いたウイルスによる CPE あるいはそのウイルス蛋白による未知の影響など、細胞融合を観察、評価する上で大変不都合な側面がある。そこで筆者らは武部等の開発したプラスミド発現ベクター (pcDL-SR α 296)⁴⁶⁾ をヘルパーウイルスなしで用いることにより、この問題を極力回避することにした。

細胞融合誘導におけるウイルス糖蛋白の交差反応性

ルブラウイルス属とレスピロウイルス属のウイルスの間では、細胞融合誘導における HN 蛋白同士あるいは F 蛋白同士の互換性はない。たとえば hPIV 2 の HN 蛋白と hPIV 3 の F 蛋白を同時に発現させても細胞融合は誘導されない²³⁾。そこで筆者らは、ルブラウイルス属内の 6 種のウイルス、すなわち hPIV 2、SV

41、SV 5、hPIV 4 A、MuV、およびニューカッスル病ウイルス (NDV) の HN 蛋白と F 蛋白を様々な組合せで HeLa 細胞や BHK 細胞に同時発現させてみた。すると興味深いことに、hPIV 2 の HN 蛋白は SV 41 や hPIV 4 A の F 蛋白との同時発現でも細胞融合を誘導し、MuV の HN 蛋白は hPIV 2 や SV 5 (WR 株) の F 蛋白との同時発現でも細胞融合を誘導することが見い出された^{26, 56, 57)} (表 1)。なお、SV 5 (WR 株) の F 蛋白は単独では細胞融合を誘導しない (後述)。このような現象 (HN 蛋白や F 蛋白の交差反応性) はウイルス蛋白の一次構造の近縁性を反映していると思われるが、不思議なことにいずれの場合でも交差反応性は一方通行であった (ただし、SV41、SV 5 および hPIV 4 A の HN 蛋白は Homologous な F 蛋白との同時発現でも、誘導される細胞融合の index は低い。そのため、これらの HN 蛋白の交差反応性が検出されなかった可能性は否定できない)。従って、異なるウイルス同士の HN-F 相互作用の有無を規定しているのは、おそらく立体構造上の微妙な相補関係、たとえば鍵 (=HN 蛋白) に対する鍵穴 (=F 蛋白) の許容度、の相違ではないかと思われた。すなわち、hPIV 2 や MuV の HN 蛋白はそれぞれ異なる F 蛋白群に対応するマスターキー的構造をもっているものと推測された。

hPIV 2 と SV41 のキメラ HN 蛋白を用いた解析

表 1 に示すように、hPIV 2 の HN 蛋白は SV41 の F

表1 各種ルブラウイルスのHN およびF 蛋白の同時発現による細胞融合*の誘導^{26,56,57)}

F	HN					
	hPIV 2	SV41	SV 5 †	MuV	hPIV 4 A	NDV
hPIV 2	56.6	—	—	42.6	—	—
SV41	6.2	17.2	—	—	—	—
SV 5 †	—	—	17.7 †	37.9 †	—	—
MuV	—	—	—	93.3	—	—
hPIV 4 A	13.7	—	—	—	7.7	—
NDV	—	—	—	—	—	20.1

*各プラスミドを HeLa 細胞に transfect して24時間後に固定染色した。任意の顕微鏡画像内で融合細胞（多核巨細胞）が占める面積をその全画像面積で除したものを百分率で表して Fusion index とし、それぞれ三画像の平均を記した。面積測定に使用したソフトウェアは NIH image (Ver 1.52)。

†BHK 細胞における Fusion index. SV 5 は WR 株の HN と F を用いた。

蛋白との同時発現でも細胞融合を誘導するが、その index は hPIV 2 の F 蛋白との同時発現で誘導される細胞融合の index の 1/10程度である。逆に、SV41のHN蛋白と hPIV 2 の F 蛋白を同時発現させても細胞融合は誘導されない(あるいは検出できない)。また、hPIV 2 の HN 蛋白は hPIV 4 A の F 蛋白との同時発現で細胞融合を誘導するが SV41の HN 蛋白にはこの性質が認められない。一方、hPIV 2 の HN 蛋白と SV 41の HN 蛋白はルブラウイルス属内では構造的に最も近縁関係にあり⁵⁴⁾、機能的なキメラの作製が比較的容易であることが期待された。以上のような理由から、hPIV 2 の HN 蛋白と SV41の HN 蛋白のキメラ蛋白を用いれば F 蛋白との機能的相互作用に関わる領域を HN 蛋白上にマップすることが可能であろうと考えて実験をおこなった。その結果は以下のようなものである(図1参照)。1) hPIV 2 の HN 蛋白が hPIV 2 の F 蛋白との同時発現で細胞融合を誘導するために必要な領域は hPIV 2 HN の Stalk 領域の膜近傍部 (a. a. 37-94) に存在することを見出した⁵⁶⁾。したがって、この領域が hPIV 2 の F 蛋白との特異的相互作用に関与していることが推察された。ちなみに、F 蛋白との相互作用における Stalk 領域の膜近傍部の重要性は、hPIV 3, NDV およびセンダイウイルスの HN 蛋白に関しても同様なキメラ解析により確認されている^{9,10,49)}。2) a. a. 83-91をエпитープとする抗 HN mAb (M 1-1 A) は hPIV 2 感染細胞における細胞融合を完全に阻止したが、受容体結合能や受容体破壊能には全く影響をあたえなかった^{56,58,66)}ことから、この mAb はおそらく HN-F 相互作用を阻害することにより、細胞融合を阻止するものと解釈された。3) hPIV 2 の HN 蛋白が PIV 4 A の F 蛋白との同時発現で細胞融合を

誘導するためには Stalk 領域の膜近傍部だけでなく Globular head 内にある他の領域 (a. a. 148-209) も必要であった⁵⁶⁾。

hPIV 2 と SV41とのキメラ F 蛋白を用いた解析

hPIV 2 の F 蛋白と SV41の F 蛋白もルブラウイルス属内では構造的に最も近縁関係にある⁵³⁾ので、F 蛋白に関しても同様に hPIV 2 と SV41とのキメラ F 蛋白を作製して解析することにした。なおこの場合、hPIV 2 の F 蛋白が hPIV 2 や MuV の HN 蛋白との同時発現では細胞融合を誘導するが、SV41の HN 蛋白との同時発現では細胞融合を誘導しない、という点を指標にした。その結果、1) hPIV 2 の F 蛋白が hPIV 2 の HN 蛋白との同時発現で細胞融合を誘導するためには F 1 中央部の領域 (a. a. 227-370) が必要であり、この領域を SV41の F 蛋白の当該部位に置換すれば SV41の HN 蛋白との同時発現でも細胞融合を誘導できることがわかった⁵⁷⁾。なお、この領域の中でも特に N 末端の一部 (a. a. 227-253) および C 末端の一部 (a. a. 326-370すなわち Cys-rich 領域の N 末端側半分) が HN 蛋白との機能的相互作用に関わっていることが推察された⁵⁷⁾ (図1)。ちなみに、モルビリウイルス属の麻疹ウイルスによる細胞融合誘導でも、その F 蛋白の Cys-rich 領域の N 末端側半分 (その中にある 2 つのループ構造)²⁴⁾が HA 蛋白との相互作用に関わっているようである⁵²⁾。2) hPIV 2 の F 蛋白が MuV の HN 蛋白と相互作用して細胞融合を誘導するために必要な領域は 2箇所同定された。その 1つ (a. a. 254-370) は上に述べた F 1 中央部の領域 (a. a. 227-370) 内に存在し、他の 1つ (a. a. 453-496) は HR 2 から TM 内の数アミノ酸にかけての領域であった⁵⁷⁾ (図

1)。

以上の成績から、細胞融合誘導における HN 蛋白と F 蛋白のウイルス特異的な機能的相互作用は、基本的には HN 蛋白の Stalk 領域と F 蛋白の F1 中央部の物理的接触を介して起こるものと考えている (図 1)。

なお、HN 蛋白の Globular head の一部や F1 の HR2 領域などは、この物理的接触に副次的に関与することで交差反応性に影響を与えているのであろう。

SV5 の F 蛋白の単独での細胞融合誘導能

既に述べたように、SV5 (W3A 株) の F 蛋白は (SV40ベクター系において) 単独で細胞融合を誘導する^{21, 35)}ことが知られていたが、奇妙なことにこの現象はワクシニアベクターあるいはワクシニア-T7系では観察されず、(他のパラミクソウイルスと同様に) HN 蛋白を同時発現させなければ細胞融合が誘導されない^{18, 21)}。このくい違いの説明として、ワクシニアウイルスの CPE により細胞間接着が不十分になるために HN 蛋白が細胞間接着を補填する必要があるのだという見解が報告された²¹⁾が、これに対する反論も報告された¹⁸⁾。その一方、筆者らは、SV40のウイルス蛋白あるいは SV40によって宿主細胞に誘導される未知の蛋白が SV5 の HN 蛋白の機能を代替しているのではないかと、また、他の SV5 株の F 蛋白は HN 蛋白を必要とするのではないかと感じていた。そこでまず手持ちの SV5 (WR 株) の F 蛋白と HN 蛋白の cDNA をクローニングして発現ベクターに組み込んだ。これらを BHK 細胞に同時発現させたところ細胞融合が誘導されたが、半ば予想したとおり F 蛋白単独での融合活性は見られなかった²⁶⁾。WR 株と W3A 株の F 蛋白の推定アミノ酸配列の相違は 22 (Leu-Pro), 443 (Pro-Ser) および 516 (Ala-Val) の三箇所に認められたので、WR 株の F 蛋白中のこれらのアミノ酸が W3A 株の F 蛋白中のそれになるような点変異体を 3 種作製し、さらにこれらの変異体をもとに W3A 株の F 蛋白の cDNA を構築してこれらの活性を調べてみた。その結果は以下のようであった。

1) W3A 株の F 蛋白は単独発現で細胞融合を誘導したが、WR 株の F 蛋白の 22Leu を Pro に改変した変異体 (L22P) も単独での細胞融合能を示したことから、W3A 株の F 蛋白の 22Pro (F2 の N 末端から 3 番目) がその細胞融合誘導能を規定していることが判明した²⁶⁾。また、F 蛋白単独の細胞融合能に対する SV40の直接的な関与はおそらくないが、ワクシニアウイルスはなんらかの抑制的な影響を与えているもの

と思われた。2) 還元状態での SDS-PAGE において、W3A 株の F1 や L22P の F1 のかなりの Population が真っ二つに分解していたが、WR 株の F1 は正常であった。しかし非還元状態ではこういった分解産物は見られなかったので、W3A 株の F1 や L22P の F1 の Cys-rich 領域のループ²⁴⁾の少なくとも 1 つが細胞由来の蛋白分解酵素で切断されたものと考えられた (伊藤他, 投稿準備中)。3) 細胞表面に発現している L22P には結合するが、WR 株の F 蛋白には結合できない抗 F mAb が得られた。この mAb (21-1) は細胞内膜系にある WR 株の F 蛋白とは結合できることから、立体構造依存性の抗体であること、また細胞表面における WR 株の F 蛋白と L22P の立体構造が異なることが示唆された。興味深い事に、mAb21-1 は L22P による細胞融合を完全に抑制する活性を持っていた (鶴留他, 投稿準備中)。4) L22P の単独融合能は発現させる細胞の種類に依存した。すなわち HeLa 細胞や BHK 細胞では融合が惹起されるが、MDCK 細胞や L929細胞では融合は観察されなかった。そこで L22P を構成的に発現する L929細胞株を作製した。この細胞株は形態的には通常の L929細胞と同様であったが、SV5 や MuV の HN 蛋白を発現させることにより細胞融合が誘導された。また、この細胞株と BHK とを混合培養すると細胞融合が誘導された (鶴留他, 投稿準備中)。

以上のことから、細胞表面にある W3A 株の F 蛋白や L22P の立体構造は WR 株の F 蛋白のそれとはなんらかの相違がある (図 2A, B) ため、HN 蛋白との相互作用がなくても容易に構造変化を起こし、細胞融合を誘導できるものと推察される。この立体構造の相違は Cys-rich 領域の蛋白分解酵素感受性や mAb21-1 エピトープの露出などに象徴されており、これらが F2 の N 末端のアミノ酸 (22Pro) で規定されることが注目される。なお、L22P や W3A 株の F 蛋白の構造変化の引き金になる要因については不明であるが、BHK 細胞など感受性の細胞表面には F 蛋白に対する受容体が存在するのかもしれない。

膜融合誘導における蛋白の構造変化

ウイルス媒介膜融合の分野で最も研究が進んでいるインフルエンザウイルスの HA 蛋白は三量体で 1 本のスパイクを形成しており、受容体結合能と膜融合能とを合わせ持っている。この蛋白は Type I の膜糖蛋白であり、前駆体 HA0 が解裂することにより S-S 結合で連結された HA1 と HA2 のサブユニット構造に

図2 F 蛋白 (スパイク) の構造 (A, B) と細胞融合誘導におけるその構造変化 (C, D) (推定)

A: 一般的な F 蛋白は比較的安定な状態にあり, 構造変化を起こすためには HN 蛋白を必要とする。
 B: SV 5 (W 3 A 株) の F 蛋白や L22P は HN 蛋白なしでも構造変化を起こし得る。これは, 22Pro に起因するなんらかの構造的ゆらぎによるものと考えられる。
 C: インフルエンザウイルスの HA 2 の構造変化から想定される F 蛋白の構造変化。その第一段階では HR 1 が Coiled-coil 構造の 3 量体になり, Fusion peptide (FP) が標的膜に挿入される。
 D: その第二段階では HR 2 が HR 1 の 3 量体の外面に (逆向きで) 結合する^{1,12)}。その結果, FP と TM (膜貫通) 領域が接近する。即ち, 対面する 2 つの膜が近接することになる。この後さらに膜融合が起こるためには複数の F 蛋白スパイクの共同作用が必要であると思われる。

なる。Wilson ら⁶³⁾は約18年前, HA スパイクをウイルス粒子から切り離して精製, 結晶化し, その立体構造を明らかにした。それによると膜貫通サブユニットで

ある HA 2 には特徴的な 2 つ (長短) の α -ヘリックス構造があり, それらはループ状の介在部で連結されている。C 末端側の長いヘリックスは膜に対してほぼ

垂直であり、Coiled-coil 構造の三量体を形成している。一方、N 末端側の短いヘリックスはループを介してこの三量体の外面に懸垂し、その N 末端に隣接する Fusion peptide の先端は三量体の下部付近で Coiled-coil の内部（芯）方向へと巻きこまれている。

さてその13年後の1994年には、Bullough ら³⁾が膜融合誘導時 (low pH) における HA 2 のコア (Fusion peptide や膜近傍領域などを除いたもの) の立体構造を明らかにした。それに基づいて考えられた HA 2 の構造変化は以下のようなものである。1) Low pH の環境になると HA 2 のループ状の介在部がヘリックス構造へと変化する。その結果、このヘリックスと長短2つのヘリックスとが纏まってさらに長いヘリックスとなり、その N 末端にある Fusion peptide が標的膜に向かって突き出される。(この時、Fusion peptide が標的膜の脂質 2 重層に挿入されることが Photo-crosslink 法を用いて証明された^{13, 17, 44, 55)}。2) さらにこの長くなったヘリックスの C 末端近くの部分が外側へ反転することにより、膜貫通領域と (標的膜に埋まっている) Fusion peptide とが近接する。以上の状況下で2つの膜が密着状態になるとともに膜融合が起こると考えられる。

パラミクソウイルスの F 蛋白による細胞融合の誘導過程でも HA 蛋白と同様な構造変化が起こるものと想定される (図 2 C, D) が、F 蛋白の構造変化の引き金は何であるかは解明されていない。おそらく、標的細胞膜の受容体に結合することによって HN 蛋白に構造変化が起こり、これが直接的に (HN 蛋白に結合している) F 蛋白の構造変化をもたらすのであろう^{27, 45)}。それに伴って F 蛋白は HN 蛋白から離脱し、Fusion peptide の標的膜への挿入、F 蛋白のオリエンテーションの変化など、膜融合をひき起こすための F 蛋白の一連の構造変化が起こるものと推察される。その際、複数の F 蛋白スパイク同士の共同作用も必要であろう。

ところで、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) やサル免疫不全ウイルス (SIV) の gp160,あるいはエボラウイルスの GP は HA 蛋白と同様に Type I の膜糖蛋白であり、受容体結合能と膜融合能とを具有しているが、中性環境下で膜融合を誘導する点は F 蛋白と似ている。また、これらの蛋白の膜貫通サブユニット (gp41あるいは GP 2) は Fusion peptide の他に F 1 の HR 1 や HR 2 と相同の構造をもっている。近年、これらの蛋白のコア部分 (HR 1 や HR 2 の相同領域およびその介在領域などを含むもの) を大腸菌で発現

させ、X 線結晶解析法や NMR 法による立体構造の解明がなされたが、それらは low pH における HA 2 の立体構造に類似していることが判明した^{4, 6, 60, 61)}。ちなみに HA 2 のコアを大腸菌で発現させると不思議なことに中性の環境下でも low pH 状態の立体構造をとるが、これがエネルギー的に最も安定な状態であるらしい⁷⁾。従って、明らかにされた gp41 や GP 2 の立体構造は、融合誘導後の状態を示しているものと考えられる。一方、パラミクソウイルスの F 1 の立体構造は未だに解明されていないが、Lamb のグループ^{1, 12)}は SV 5 (W 3 A 株) の F 蛋白の HR 1 および HR 2 領域に相当する合成ペプチドの CD 解析を行い、F 1 が上述の gp41 や GP 2 に類似した立体構造をとることを示唆している (図 2 D)。このように膜融合を誘導するウイルス糖蛋白はその最終段階で共通の立体構造を採ることが推測される。ただし、gp41, GP 2 および F 1 の融合誘導前の立体構造は不明であるため、実際に HA 2 と同様の構造変化 (図 2 C, D 参照) がこれらの蛋白に起こるかどうかは未確認である。なおその一方で、Caffrey ら⁴⁾が、SIV の gp41 コアの立体構造は融合の前後に関わらずほぼ同一である、という見解を示していることは附記しておかねばならない。

おわりに

近年、化学的架橋法や Co-immunoprecipitation 法あるいは Co-capping 法により、細胞表面に発現している HN 蛋白と F 蛋白のかんりの Population がお互いに結合していることが証明された^{45, 65)}。この結合がすでに小胞体内で起こっているという説^{43, 45, 50, 52)}が多数派であるが、細胞表面で起こるという説³⁶⁾、さらには細胞表面で HN 蛋白が受容体に結合した後に起こるという説¹¹⁾まであり、コンセンサスは得られていない。一方、HN 蛋白と F 蛋白との結合に直接関わる領域はキメラ解析によって推定されたわけであるが、Deng ら¹¹⁾はキメラ HN 蛋白を用いた Co-immunoprecipitation 法による成績から、HN 蛋白の Stalk 領域の一部が実際に F 蛋白との結合に関わることを示唆している。今後、部位特異的な Photo-crosslink 法^{19, 30)}が実用化されれば、結合に関わる領域をもっと詳細に解析できるものと思われる。

既に述べたように、単独での融合能を持つ F 蛋白の構造変化を起こす受容体が、特定の細胞株の表面に存在する可能性が見い出されたが、BHK 細胞や HeLa 細胞に特異的な受容体があるのか、あるいは細胞株によって受容体に量的な違いがあるのか、は不明であ

る。また、細胞間接着の程度が細胞株によって異なることがF蛋白単独での細胞融合誘導の成否を左右している可能性も否定できない。いずれにしても、W3A株のF蛋白やL22Pは構造変化する直前の(未知の)立体構造(図2B)を持っている可能性が高いので、その構造解析の今後の進展はパラミクソウイルスによる細胞融合における蛋白の分子動態の解明に貢献するものと思われる。

文 献

- 1) Bagai Joshi, S., Dutch, R. E., and Lamb, R. A. (1998) A core trimer of the paramyxovirus fusion protein : parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* **248**, 20-34.
- 2) Bousse, T., Takimoto, T., Gorman, W. L., Takahashi, T., and Portner, A. (1994) Regions on the hemagglutinin-neuraminidase proteins of human parainfluenza virus type-1 and Sendai virus important for membrane fusion. *Virology* **204**, 506-514.
- 3) Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**, 37-43.
- 4) Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Covell, D. G., Gronenborn, A. M., and Clore, G. M. (1998) Three-dimensional solution structure of the 44kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J.* **17**, 4572-4584.
- 5) Chambers, P., Pringle, C. R., and Easton, A. J. (1992) Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **73**, 1717-1724.
- 6) Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.
- 7) Chen, J., Wharton, S. A., Weissenhorn, W., Calder, L. J., Hughson, F. M., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1995) A soluble domain of the membrane-anchoring chain of influenza virus hemagglutinin (HA 2) folds in *Escherichia coli* into the low-pH-induced conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 12205-12209.
- 8) Collins, P. L., Chanock, R. M., and McIntosh, K. (1995) Parainfluenza viruses. In *Virology* 3rd edition (edited by Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., and Straus, S. E.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1205-1241.
- 9) Deng, R., Wang, Z., Mirza, A. M., and Iorio, R. M. (1995) Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike. *Virology* **209**, 457-469.
- 10) Deng, R., Mirza, A. M., Mahon, P. J., and Iorio, R. M. (1997) Functional chimeric HN glycoproteins derived from Newcastle disease virus and human parainfluenza virus-3. *Arch Virol.* **13** (Supplement), 115-130.
- 11) Deng, R., Wang, Z., Mahon, P. J., Marinello, M., Mirza, A., and Iorio, R. M. (1999) Mutations in the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein that interfere with its ability to interact with the homologous F protein. *Virol.* **253**, 43-54.
- 12) Dutch, R. E., Leser, G. P., and Lamb, R. A. (1999) Paramyxo virus fusion protein : characterization of the core trimer, a rod-shaped complex with helices in anti-parallel orientation. *Virology* **254**, 147-159.
- 13) Durrer, P., Galli, C., Hoenke, S., Corti, C., Gluck, R., Vorherr, T., and Brunner, J. (1996) H⁺-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA 2 amino-terminal fusion peptide but not the coiled coil region. *J. Biol. Chem.* **271**, 13417-13421.
- 14) Ebata, S. N., Côté, M. -J., Yong Kang, C., and Dimock, K. (1991) The fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins of human parainfluenza virus 3 are both required for fusion. *Virology* **183**, 437-441.
- 15) Gething, M. -J., White, J. M., and Waterfield, M. D. (1978) Purification of the fusion protein of Sendai virus : analysis of the NH 2-terminal sequence generated during precursor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2737-2740.
- 16) Ghosh, J. K., Ovadia, M., and Shai, Y. (1997) A leucine zipper motif in the ectodomain of Sendai virus fusion protein assembles in solution and in membranes and specifically binds biologically-active peptides and the virus. *Biochemistry* **36**, 15451-15462.
- 17) Harter, C., James, P., Bachi, T., Semenza, G., and Brunner, J. (1989) Hydrophobic binding of the ectodomain of influenza hemagglutinin to membranes occurs through the "fusion peptide". *J. Biol. Chem.* **264**, 6459-6464.
- 18) Heminway, B. R., Yu, Y., and Galinski, M. S. (1994) Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins. *Virus*

- Res. **31**, 1–16.
- 19) High, S., Martoglio, B., Gorlich, D., Andersen, S. S., Ashford, A. J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A., Dobberstein, B., and Brunner, J. (1993) Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J. Biol. Chem.* **268**, 26745–26751.
 - 20) Homma, M., and M. Ohuchi. (1973) Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III. Structural differences of Sendai virus grown in eggs and tissue culture cells. *J. Virol.* **12**, 1547–1463.
 - 21) Horvath, C. M., Paterson, R. G., Shaughnessy, M. A., Wood, R., and Lamb, R. A. (1992) Biological activity of paramyxovirus fusion proteins : factors influencing formation of syncytia. *J. Virol.* **66**, 4564–4569.
 - 22) Hsu, M. -C., Scheid, A., and Choppin P. W. (1981) Activation of the Sendai virus fusion protein (F) involved a conformational change with exposure of a new hydrophobic region. *J. Biol. Chem.* **256**, 3557–3565.
 - 23) Hu, X., Ray, R., and Compans, R. W. (1992) Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *J. Virol.* **66**, 1528–1534.
 - 24) Iwata, S., Schmidt, A. C., Titani, K., Suzuki, M., Kido, H., Gotoh, B., Hamaguchi, M., and Nagai, Y. (1994) Assignment of disulfide bridges in the fusion glycoprotein of Sendai virus. *J. Virol.* **68**, 3200–3206.
 - 25) Kohama, T., Garten, W., and Klenk, H. -D. (1981) Changes in conformation and charge paralleling proteolytic activation of Newcastle disease virus glycoproteins. *Virology* **111**, 364–376.
 - 26) Ito, M., Nishio, M., Kawano, M., Kusagawa, S., Komada, H., Ito, Y., and Tsurudome, M. (1997) Role of a single amino acid at the amino terminus of the simian virus 5 F 2 subunit in syncytium formation. *J. Virol.* **71**, 9855–9858.
 - 27) Lamb, R. A. (1993) Paramyxovirus fusion : a hypothesis for changes. *Virology* **197** : 1–11.
 - 28) Lamb, R. A., and Kolakofsky, D. (1995) Paramyxoviridae : the viruses and their replication. In *Virology 3rd edition* (edited by Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., and Straus, S. E.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1177–1204.
 - 29) Lambert, D. M., Barney, S., Lambert, A. L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D. E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G., and Petteway Jr., S. R. (1996) Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2186–2191.
 - 30) Martoglio, B., Hofmann, M. W., Brunner, J., and Dobberstein, B. (1995) The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* **81**, 207–204.
 - 31) Miura, N., Uchida, T., and Okada, Y. (1982) Glycoproteins of Sendai virus (HVJ)-induced envelope fusion and cell fusion are blocked by monoclonal anti-HN protein antibody that does not inhibit hemagglutination activity of HVJ. *Exp. Cell Res.* **141**, 409–420.
 - 32) Morrison, T., McQuain, C. and McGinnes, L. (1991) Complementation between avirulent Newcastle disease virus and a fusion protein gene expressed from a retrovirus vector : requirements for membrane fusion. *J. Virol.* **65**, 813–822.
 - 33) Nishio, M., Tsurudome, M., Komada, H., Kawano, M., Tabata, N., Matsumura, H., Ikemura, N., Watanabe, N., and Ito, Y. (1994) Fusion properties of cells constitutively expressing human parainfluenza virus type 4 A haemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **75**, 3517–3523.
 - 34) Novick, S. L., and Hoekstra, D. (1988) Membrane penetration of Sendai virus glycoproteins during the early stages of fusion with liposomes as determined by hydrophobic photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7433–7437.
 - 35) Paterson, R. G., Hiebert, S. W., and Lamb, R. A. (1985) Expression at the cell surface of biologically active fusion and hemagglutinin/neuraminidase proteins of the paramyxovirus simian virus 5 from cloned cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7520–7524.
 - 36) Paterson, R. G., Johnson, M. L., and Lamb, R. A. (1997) Paramyxovirus fusion (F) protein and hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein interactions : intracellular retention of F and HN does not affect transport of the homotypic HN or F protein. *Virology* **237**, 1–9.
 - 37) Portner, A., Scroggs, R. A., and Metzger, D. W. (1987) Distinct functions of antigenic sites of the HN glycoprotein of Sendai virus. *Virology* **158**, 61–68.
 - 38) Pringle, C. R. (1999) Virus taxonomy–1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the international committee on taxonomy of viruses during 1998. *Arch. Virol.* **144**, 421–429.

- 39) Rapaport, D., Ovadia, M., and Shai, Y. (1995) A synthetic peptide corresponding to a conserved heptad repeat domain is a potent inhibitor of Sendai virus-cell fusion : an emerging similarity with functional domains of other viruses. *EMBO J.* **14**, 5524-5531.
- 40) Russell, R., Paterson, R. G., and Lamb, R. A. (1994) Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* **199**, 160-168.
- 41) Sakai, Y., and Shibuta, H. (1989) Syncytium formation by recombinant vaccinia viruses carrying bovine parainfluenza 3 virus envelope protein genes. *J. Virol.* **63**, 3661-3668.
- 42) Scheid, A., and Choppin, P. W. (1974) Identification and 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.
- 43) Segawa, H., Kato, M., Yamashita, T., and Taira, H. (1998) The roles of individual cysteine residues of Sendai virus fusion protein in intracellular transport. *J. Biochem.* **123**, 1064-1072.
- 44) Stegmann, T., Delfino, J. M., Richards, F. M., and Helenius, A. (1991) The HA 2 subunit of influenza hemagglutinin inserts into the target membrane prior to fusion. *J. Biol. Chem.* **266**, 18404-18410.
- 45) Stone-Hulslander, J., and Morrison, T. G. (1997) Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. *J. Virol.* **71**, 6287-6295.
- 46) Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., and Arai, N. (1988) SR α promoter : an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus40 early promoter and the R-U 5 segment of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 466-472.
- 47) Takimoto, T., Laver, W. G., Murti, K. G., and Portner, A. (1992) Crystallization of biologically active hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein dimers proteolytically cleaved from human parainfluenza virus type 1. *J. Virol.* **66**, 7597-7600.
- 48) Tanabayashi, K., Takeuchi, K., Okazaki, K., Hishiyama, M., and Yamada, A. (1992) Expression of mumps virus glycoproteins in mammalian cells from cloned cDNAs : both F and HN proteins are required for cell fusion. *Virology* **187**, 801-804.
- 49) Tanabayashi, K., and Compans, R. W. (1996) Functional interaction of paramyxovirus glycoproteins : identification of a domain in Sendai virus HN which promotes cell fusion. *J. Virol.* **70**, 6112-6118.
- 50) Tanaka, Y., Heminway, B. R., and Galinski, M. S. (1996) Down-regulation of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein surface expression by a mutant fusion protein containing a retention signal for the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **70**, 5005-5015.
- 51) Thompson, S. D., Laver, W. G., Murti, K., and Portner, A. (1987) Isolation of a biologically active form of the hemagglutinin-neuraminidase protein of Sendai virus. *J. Virol.* **62**, 4653-4660.
- 52) Tong, S., and Compans, R. W. (1999) Alternative mechanisms of interaction between homotypic and heterotypic parainfluenza virus HN and F proteins. *J. Gen. Virol.* **80**, 107-115.
- 53) Tsurudome, M., Bando, H., Kawano, M., Matsu-mura, H., Komada, H., Nishio, M., and Ito, Y. (1991) Transcripts of simian virus41 (SV41) matrix gene are exclusively dicistronic with the fusion gene which is also transcribed as a monocistron. *Virology* **184**, 93-100.
- 54) Tsurudome, M., Bando, H., Nishio, M., Iwamoto, Y., Kawano, M., Kondo, K., Komada, H., and Ito, Y. (1990) Antigenic and structural properties of a paramyxovirus simian virus 41 (SV41) reveal a close relationship with human parainfluenza type 2 virus. *Virology* **179**, 738-748.
- 55) Tsurudome, M., Glück, R., Graf, R., Falchetto, R., Schaller, U., and Brunner, J. (1992) Lipid interactions of the hemagglutinin HA 2-terminal segment during influenza virus-induced membrane fusion. *J. Biol. Chem.* **267**, 20225-20232.
- 56) Tsurudome, M., Ito, M., Nishio, M., Kawano, M., Okamoto, K., Kusagawa, S., Komada, H., and Ito, Y. (1998) Identification of regions on the fusion protein of human parainfluenza type 2 virus which are required for haemagglutinin-neuraminidase proteins to promote cell fusion. *J. Gen. Virol.* **79**, 279-289.
- 57) Tsurudome, M., Kawano, M., Yuasa, T., Tabata, N., Nishio, M., Komada, H., and Ito, Y. (1995) Identification of regions on the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 2 important for promoting cell fusion. *Virology* **213**, 190-203.
- 58) Tsurudome, M., Nishio, M., Komada, H., Bando, H., and Ito, Y. (1989) Extensive antigenic diversity among human parainfluenza type 2 virus isolates and immunological relationships among paramyxoviruses revealed by monoclonal antibodies. *Virology* **171**, 38-48.

- 59) Tsurudome, M., Yamada, A., Hishiyama, M., and Ito, Y. (1986) Monoclonal antibodies against the glycoproteins of mumps virus : fusion inhibition by anti-HN monoclonal antibody. *J. Gen. Virol.* **67**, 2259-2265.
- 60) Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K. -H., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1998) Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP 2 , from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol. Cell* **2**, 605-616.
- 61) Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **347**, 426-430.
- 62) Wild, F. T., Fayolle, J., Beauverger, P., and Buckland, R. (1994) Measles virus fusion : role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J. Virol.* **68**, 7546-7545.
- 63) Wilson, I. A., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1981) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**, 366-373.
- 64) Yao, Q., and Compans, R. W. (1996) Peptides corresponding to the heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *Virology* **223**, 103-112.
- 65) Yao, Q., Hu, X., and Compans, R. W. (1997) Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. *J. Virol.* **71**, 650-656.
- 66) Yuasa, T., Kawano, M., Tabata, N., Nishio, M., Kusagawa, S., Komada, H., Matsumura, H., Ito, Y., and Tsurudome, M. (1995) A cell fusion-inhibiting monoclonal antibody binds to the presumed stalk domain of the human parainfluenza type 2 virus hemagglutinin-neuraminidase protein. *Virology* **206**, 1117-1125.