学会報告

「Options for the control of influenza virus IV」報告

原 好勇

(久留米大学 医学部 ウイルス学講座)

上記のインフルエンザウイルスに関する国際学会が平成12年9月23～28日の6日間、ギリシャ・クレタ島のヘルソニソス市（会場：クノッソスロイヤルビレッジホテル）で開催された。この学会はインフルエンザウイルスの全貌を明らかにし、制圧する目的で1985年より4年に1度開催されており、今回で4度目である。インフルエンザウイルスの最新の研究成果について基礎から臨床分野まで、また新しい抗インフルエンザウイルス薬、次世代ワクチンの研究開発、新型インフルエンザウイルスの解析と今後の対策、世界各国のインフルエンザ対策などの分野にわたって発表、討論が行われた。シンポジウム・ワークショップ部門では総数約180の演題が発表され、ポスター部門では約200の演題が掲示された。

前回の1996年大会からこの4年間に起こったインフルエンザウイルスのトピックとして以下のものがあげられる。

①これまでトリの間でしか流行しないと考えられていたウイルスがヒトへ直接伝播する新型インフルエンザウイルスが出現した。1997年に香港で出現したH5N1型により6名が死亡した。また、同じトリ型のH9N2型が最近ヒトへ感染したことが分かった。これらの新型インフルエンザウイルスについて病原性および遺伝子解析が行われ、8個のウイルス遺伝子のなかで6個は非常に相同性が高く、互いに近縁であることが

分かった。

②1918年、世界で死者2,000～4,000万人を出したスペイン風邪（H1N1）について、当時の保存されていた患者検体からウイルスの遺伝子解析が行われ、HAとNAの塩基配列全長が決定された。その結果、ブタのH1N1型に非常に近縁であることが分かった。さらにその起源はトリ型であることが推測された¹⁶⁾。

③プラスミドにウイルス遺伝子を挿入し、人工的にインフルエンザウイルスを作製するリバーシジェネティックス法が大きく改良され、ヘルパーウイルスを必要としない、8個のプラスミドのみから作り出す系が確立された。

④ウイルスのノイラミニダーゼ（NA）を標的とする2種類の新しい抗インフルエンザウイルス薬「ザナミビル」、「オセルタミビル」が認可され、インフルエンザの治療・予防に有効であることが示された。

⑤WHOは世界4ヶ所にCollaborating Center（アトランタ、ロンドン、メルボルン、東京）、82カ国に110ヶ所のNational Centerを設置し、インフルエンザウイルスのnetwork global surveillanceを行い、またearly warning systemを備えることで新型インフルエンザウイルスの監視体制を強化した。

学会では以上のトピックを中心に進行したが、演題数が非常に多かったため、全ての発表を聞くことはできなかった。ここでは、個人的な興味が大きく入ってしまうが、我々の発表も含め、聞くことのできた演題の中からいくつかを簡単に紹介したい。

インフルエンザウイルスの過去～現在～未来

初日のシンポジウムでは、インフルエンザウイルスの「過去～現在～未来」についての講演が行われた。Schoenbaum S.（米国）は、1918～1919年シーズンに大流行し、大勢の死者を出したスペイン風邪の教訓をもとに、インフルエンザウイルスの世界的大流行がも

Report of "Options for the control of influenza virus IV"

Koyu Hara

Department of Virology, Kurume University School of Medicine

67Asahimachi, Kurume, Fukuoka 830-0011

〒830-0011 福岡県久留米市旭町67

久留米大学医学部ウイルス学講座

tel: 0942-31-7549

fax: 0942-31-7697

e-mail: koyu@med.kurume-u.ac.jp

たらず社会的影響について講演した。インフルエンザの世界的流行は、戦争や経済状況、人口集中、食料供給体制など人間社会がもたらす社会的現象であり、今後の対策として、世界的なインフルエンザウイルスの監視体制（サーベイランスシステム）と迅速で大量に製造できるような新しいワクチンの開発が必要であると提言した。インフルエンザウイルスの「現在」については、Cox N.J.（米国）、Watson J.M.（英国）、Leese J.（英国）、らが今シーズン1999～2000年を例に講演を行った。今シーズンに流行したほとんどはA型（H3N2）であり、ウイルス毒性は過去3年間とほぼ同じであった。米国では新しいサーベイランスシステムやウイルスの迅速検出キットが増えたこと、また英国ではミレニアム・ウィンター・プランとして、ワクチン接種、家庭での抗ウイルス薬の服用および自己管理を推奨している。インフルエンザウイルスの「未来」については、Monto A.（米国）が新しいワクチンと抗ウイルス薬について講演を行った。新しいワクチンとして、cold-adapted vaccine（低温下でしか増殖できないように改良したインフルエンザウイルスを生ワクチンとして使用する）の有効性を取り上げた。また、新しい抗ウイルス薬として最近使用されているザナミビル、オセルタミビルの有効性についても報告があった。

H9N2型インフルエンザウイルス

H9N2型は、トリ型のインフルエンザウイルスである。1990年までは主に北米でしか分離されていなかったが、1997年までの調査では中国、韓国、中近東、ヨーロッパ、南アフリカとほぼ世界中の家禽類（ニワトリ、カモ、ウズラ、七面鳥）で流行していることが分かった。H9N2型には多くの系統があるが、その中でも特にウズラから分離されたQa/HK/G1/97の系統は、1997年、香港でヒトに感染した強毒型H5N1ウイルスと非常に近縁であることが分かり強い関心が寄せられている。8本のウイルスゲノムのうち6本がH5N1型と高い相同性を示すことが報告されている⁸⁾。そして1998年、中国南東部で初めてH9N2型のヒトへの感染が確認された。インフルエンザウイルス特有の症状を示す5人の患者からH9N2型が分離され、さらに1999年には香港で2人の患者から分離されている。幸いにも重症化には至らず、いずれの場合も回復している。

Chen W.（中国）は1998年3～10月まで、広東の8都市で8,563人の咽頭ぬぐい液を調べたところ、9人（全体の4%）からH9N2型を検出した。一方、H5

N1型は全く検出されていない。

Webster R.G.（米国）は、H9N2型インフルエンザウイルスはいまだ中国南東部では終息していないので、引き続きサーベイランスを継続する必要があることと強調した。

H5N1型インフルエンザウイルス

Kawaoka Y.（日本）は、リバーシジェネティクス法を用いて、インフルエンザウイルスの病原性を左右する因子について報告した。1997年に香港で出現したH5N1型インフルエンザウイルスは、ニワトリに対しては全て強毒で致死性である。しかし、マウスに対しては致死的な全身感染を引き起こすグループ（LD₅₀=0.3～11PFU）と、局所感染にとどまり致死性を示さないグループ（LD₅₀>6×10³PFU）に分けられる⁹⁾。そこで、H5N1型ウイルスの何がマウスでの病原性を決定しているかについて調べた。ウイルスが細胞に感染するためにはレセプター結合タンパクHAが宿主のプロテアーゼで解裂する必要がある。トリにおいては、HAが解裂しやすいウイルスほど強毒性を発揮することが分かっている。同じようにマウスでもHAが解裂しやすいほど全身感染を引き起こし、強毒性を示すことが分かった。さらに、PB2の627番目のアミノ酸がLysであることが強毒性に重要であると報告した。

新型インフルエンザウイルスのHAの立体構造

Ha Y.（米国）は、H5N1型およびH9N2型のHAの立体構造を明らかにした。インフルエンザウイルスのHAの立体構造はH3-like型とH5-like型の2つに分けることができる。H3-like型にはH3、H4、H14が、H5-like型にはH1、H2、H5、H9およびその他が位置付けられるとし、H5型およびH9型の新型インフルエンザウイルスは、H3とは立体構造上かなり異なることが示された。

インフルエンザウイルスのNS1タンパクの機能

Krug R.M.（米国）はインフルエンザウイルスの非構造タンパクNS1がウイルス遺伝子および宿主遺伝子の発現に果たす多彩な機能について講演を行った。A型インフルエンザウイルスのNS1は宿主細胞mRNAの3'poly(A)合成時に機能するCPSFとPA-BIIに結合することで、3'poly(A)の合成を阻害する¹⁰⁾。その結果、3'poly(A)の合成が阻害された不完全なmRNAは核外へ移行できなくなり、核内へ蓄

積する。そこでウイルスは蓄積した宿主細胞 mRNA の 5'-cap を自身の mRNA を合成するプライマーとして利用する。さらに、宿主細胞 mRNA 前駆体のスプライシングに関与する U 6 snRNA にも NS 1 は結合し、宿主細胞 mRNA のスプライシングを阻害する。NS 1 の U 6 snRNA への結合はウイルス mRNA の核外移行を促進することも示唆されている。一方、B 型インフルエンザウイルスの NS 1 は、宿主細胞 mRNA の 3' poly (A) 合成およびスプライシングには関与せず、異なった機能をもつ。ISG15 は B 型インフルエンザウイルスに感染した時だけインターフェロン (IFN) により誘導されるタンパクであるが、これに NS 1 が結合することで、宿主の防御反応を阻止する。NS 1 は A 型および B 型で異なった機能を有していることが示された。

Palese P. (米国) は、この NS 1 遺伝子をノックアウトしたインフルエンザウイルスについて講演を行った。NS 1 は、宿主の IFN によるウイルス防御反応を阻害するといわれている。Interferon Regulatory Factor 3 (IRF-3) は IFN β の発現を促進する因子であり、この活性化には 2 本鎖 RNA が関与しているのではないかと考えられている。NS 1 はこの 2 本鎖 RNA に結合することで IFN β の発現を抑制し、宿主のウイルス防御反応を阻止しているというモデルが提唱されている¹⁵⁾。そこで、NS 1 遺伝子をノックアウトしてみると、そのインフルエンザウイルスは増殖能が約 1/10 に低下した (6~7 日後の孵化鶏卵)^{7,14)}。また、マウスでの病原性について調べてみると、高濃度 (1×10^6 PFU/ml) でウイルスを接種しても全て生き残った。さらにこれが生ワクチンとして利用できないかマウスを免疫したところ、免疫後のインフルエンザウイルス接種に対し強い防御反応を示した。また、B 型インフルエンザウイルスに対しても同じ効果がみられ、生ワクチンとして利用できる可能性が示された。さらに NS 1 の C 末端側約半分を欠失させた mutant NS 1 (NS 1-99) をもつウイルスは、NS 1 ノックアウトウイルスと野生株の中間の性質を示し、ウイルスの病原性に NS 1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ

インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼは、3 つのサブユニット (PB 1, PB 2, PA) で構成されており、ウイルス遺伝子の転写と複製の両方を担っている。インフルエンザウイルスは遺伝子の転写開始

に、宿主細胞の mRNA の 5' 末端キャップ構造を自身の mRNA 合成のプライマーとして利用する。最初に PB 1 にウイルス RNA の 5' 末端が結合すると、PB 2 が活性化されて宿主細胞 mRNA の 5' 末端キャップ構造に結合する。さらに PB 1 にウイルス RNA の 3' 末端が結合すると PB 1 のもつエンドヌクレアーゼ活性が活性化され、宿主細胞 mRNA の 5' 末端キャップ構造を含む短い RNA (10~13 塩基) が切断される。これをプライマーとして PB 1 の働きにより RNA の伸長がスタートする。これらの 3 つの RNA ポリメラーゼサブユニットで、まだ機能がよく分かっていないのが PA である。ウイルス遺伝子の複製に関与しているものと推定されているが、詳細な機能はまだ明らかにされていない。我々はこの PA にキモトリプシン様のセリンプロテアーゼ活性が存在することを見出し、RNA ポリメラーゼにプロテアーゼ活性が同定された最初の例として報告した⁹⁾。精製した PA は、ペプチド基質およびタンパク質を分解し、セリンプロテアーゼ特異的阻害剤 DFP と結合した。またウイルス粒子中の RNP でも活性が検出された。DFP 結合部位のアミノ酸を他のアミノ酸へ置換、または欠失させるとプロテアーゼ活性が消失したことから、Ser624 が活性中心であることが分かった。RNA ポリメラーゼがプロテアーゼ活性をもつ意義は今のところ分からないが、最近、遺伝子の転写・組換え装置に関わる因子の中にプロテオソームと共通の因子を有することが発見され、その生物学的意義が注目されている。

PB 1 はインフルエンザウイルスの 2,341 塩基 (A/PR 8/34) からなる第 2 分節から 757 アミノ酸として翻訳される。しかしながら、Yewdell J. (米国) は、これとは違う新たな Open Reading Frame (ORF) が存在することを報告した。インフルエンザウイルス感染により CD 8 + の T 細胞が誘導されてくるが、この T 細胞が認識する全てのペプチドをスクリーニングした結果、87 アミノ酸からなるウイルス由来のペプチドが同定され、PB 1 と同じ第 2 分節に由来していることが分かった。このことから、同定されたペプチドは PB 1 とは異なる ORF を利用して発現していることが分かり、さらにウイルス感染細胞内では、他のウイルスタンパクの 10 倍もの約 3,000 コピーが発現していることが示された。

ウイルスの粒子形成および出芽について

インフルエンザウイルスは細胞の特定の部位 (細胞の頂端側) から出芽するが、どのようにして出芽すべ

き正常な部位を認識しているかは、まだ明らかにされていない。ウイルスの出芽は、細胞膜上のスフィンゴ脂質とコレステロールが豊富な部位 (Rapids Raft) で起こることがいわれている。Lamb R.A. (米国) はウイルスの2種類のスパイクタンパク HA, NA について、これらがどのような機構で正常な出芽部位に運ばれるのか、ウイルス出芽のしくみについて講演した。Rapids Raft は界面活性剤不溶性の糖脂質画分 (Detergent-insoluble glycolipid complexes ; DIG) として分離できる。HA と NA はそれぞれ細胞質側領域で、この DIG と結合していることが分かった¹⁷⁾。さらに M1 が DIG とも結合することが分かった。しかし、DIG との結合部位を欠損させた HA, NA は正常に出芽部位へと運ばれたことから、互いの結合が出芽部位への選択的輸送に直接関与しているわけではないことが示された。HA, NA の出芽部位への輸送には他の因子の存在が示唆された。

M1 はウイルスのエンベロープを裏打ちしてウイルス粒子の構造を支えているマトリックスタンパクである。表面が+に荷電している M1 は-に荷電している Rapids Raft に静電的に引き寄せられることが示唆されており、Ruigrok R.W.H. (フランス) は、M1 のウイルス出芽への関与について発表した。中性 pH での M1 タンパク N 末端側の結晶構造解析を行ったところ、M1 は溶液中では単量体で存在していることが確認された。人工リボソームを使ったモデル実験系で、M1 は N 末端側で細胞膜と結合し、C 末端側でウイルス RNP と結合することが示された¹³⁾。また、M1 は感染細胞内では細胞膜と RNP に対する親和性が低い状態と、多量体を形成しやすく細胞膜と RNP への親和性が高い状態の2種類のコンホメーションをとりうることを示唆した。

Digard P. (英国) は細胞のアクチン骨格が、ウイルスが細胞頂端側から正常に出芽するのに重要であることを示した³⁾。

人工インフルエンザウイルス

プラスミドから人工インフルエンザウイルスを作製するリバースジェネティクス法は、色々と改良が重ねられ、今回、Hoffmann E. (米国) らのグループはインフルエンザウイルスの各遺伝子をそれぞれ入れた最少8個のプラスミドから作り出すことに成功した¹⁰⁾。これまでは、*in vitro* でウイルス RNP を人工合成し、これをヘルパーウイルスとともに細胞へトランスフェクションしてウイルス粒子を作らせる方法⁴⁾、または

RNA ポリメラーゼ I をプロモーターとしてウイルスゲノム RNA を合成させ、同様にヘルパーウイルスを感染させてウイルス粒子を作らせる方法¹¹⁾がとられていた。しかし、この2つの方法はヘルパーウイルスを必要としたため、目的とする組換え体ウイルスを、ヘルパーウイルスの混在する中から選抜する必要があった。しかし、昨年、2つのグループ^{5,12)}が、ヘルパーウイルスを必要としない系を確立した。さらに今年になり Hoffmann E. らは、これまでで最少の8個のプラスミドのみをトランスフェクションすることで人工ウイルスを合成した。ウイルス遺伝子の各 cDNA の 5' 末端に RNA ポリメラーゼ II プロモーター (pol II)、そして 3' 末端に RNA ポリメラーゼ I のプロモーター (pol I) を置く。pol I は 5' キャップと 3' ポリ A を付加しない RNA を合成するので、ウイルス遺伝子 cDNA の 3' 末端におくことで、マイナス鎖 RNA が合成され、これはウイルス粒子中にゲノム RNA としてパッケージされる。また pol II からは mRNA が転写されウイルスタンパクが合成される。このシステムにより、293T-MDCK 細胞に8個のプラスミドをトランスフェクションし72時間後、A/Teal/HK/W312/97 (H6N1) では 2×10^5 viruses/ml、A/WSN/33 (H1N1) では 2×10^7 viruses/ml の感染性のある人工インフルエンザウイルスを合成することができた。従来の方法より簡単に速く人工ウイルスを合成することができ、ワクチン開発にも非常に役立つことが示された。

抗インフルエンザウイルス薬

ノイラミニダーゼ (NA) は、ウイルス表面に突出しているタンパクで、主に新生ウイルス粒子が細胞から出芽する際に細胞膜と出芽中のウイルス粒子をつなぎ止めている細胞膜上のシアル酸を除去し、ウイルス粒子を遊離させる働きをする。この NA を標的とした抗インフルエンザウイルス薬は現在、ザナミビルとオセルタミビルの2種類が認可されている。ザナミビルは米国、ヨーロッパ、オーストラリアで吸入剤として、オセルタミビルは米国、カナダ、スイスで経口投与剤として使用されている。最近、新たに NA を標的とする「RWJ-270201」(経口投与剤)が開発され、昨年から臨床試験が開始された。Hyden F.G. (米国) らはこれらの抗 NA 剤の有効性について発表した。抗 NA 剤はアマンタジン、リマンタジンと比較して、インフルエンザ発症期間を短縮させ、また耐性ウイルスの出現はかなり低いことを示した。耐性ウイルスが

出現したとしても NA の活性が低下しているため、ウイルスの病原性は弱まっていることを動物モデルで示した。

ワクチン

現行のインフルエンザウイルスワクチンは、精製した全ウイルス粒子をホルマリンで不活化した whole particle vaccine が用いられている。また日本ではウイルス粒子の脂質画分を除去したスプリットワクチンが用いられている。いずれも不活化したワクチンである。最近、より効果的に粘膜免疫や細胞性免疫の応答を刺激できる弱毒生ワクチンの開発が行われており、Belshe R.B. (米国) はアメリカでの弱毒生ワクチンの臨床試験結果 (1996~1998年の2年間) について報告した。ワクチンには寒冷馴化して弱毒化した A/Texas/36/91-like (H1N1), A/Wuhan/359/95-like (H3N2), B/Harbin/7/94-like vaccine の3種類を混合した3価ワクチンを使用し、経鼻噴霧により投与した。2年間の試験結果で、ワクチンによる防御効果は92%と高い値を示した¹⁾。特に1998年は、ワクチン株とは大きく異なる変異型 A/Sydney (H3N2) が最も多く流行したにもかかわらず、ワクチンによる防御効果は86%と高い値を示した。これはワクチン接種により広い交差免疫原性が誘導され、変異ウイルスに対しても交差防御効果が発揮されたことを示している。小児ではプラセボ投与群と比較したところ、熱性疾患が19~21%減少し、また発熱性上気道疾患は16~33%減少した。成人ではインフルエンザ様疾患の罹患日数が短縮され、熱性疾患では23%、重症熱性疾患では27%短縮し、cold-adapted vaccine の有効性が示された。

おわりに

本学会における発表は、基礎的研究から応用的研究に至るまで非常に幅広い内容であった。また、WHOをはじめとした各国からは、インフルエンザウイルス対策を疾病対策の優先事項としてとらえ、サーベイランスの強化とワクチンの整備に重点を置いていることが紹介された。なお、この学会で発表された内容は、近々 Elsevier Science から出版されるので、詳細な内容を知りたい方は、そちらを参照して頂きたい。

文 献

- 1) Belsche, R. B., Mendelman, P. M., Treanor, J., King, J., Gruber, W. C., Piedra, P., Bernstein, D. I., Hayden, F. G., Kotloff, K., Zangwill, K., Iacuzio, D., and Wolff, M. (1998). The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1405-1412.
- 2) Chen, Z., Li, Y., and Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly (A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* **18**, 2273-2283.
- 3) Digard, P., Elton, D., Bishop, K., Medcalf, E., Weeds, A., and Pope, B. (1999). Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J. Virol.* **73**, 2222-2231.
- 4) Enami, M., Luytjes, W., Krystal, M., and Palese, P. (1990). Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3802-3805.
- 5) Fodor, E., Devenish, L., Engelhardt, O. G., Palese, P., Brownlee, G. G., and Garcia-Sastre, A. (1999). Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J. Virol.* **73**, 9679-9682.
- 6) Gao, P., Watanabe, S., Ito, T., Goto, H., Wells, K., McGregor, M., Cooley, A. J., and Kawaoka, Y. (1999). Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J. Virol.* **73**, 3184-3189.
- 7) Garcia-Sastre, A., Egorov, A., Matassov, D., Brandt, S., Levy, D. E., Durbin, J. E., Palese, P., and Muster, T. (1998). Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* **252**, 324-330.
- 8) Guan, Y., Shortridge, K. F., Krauss, S., Chin, P. S., Dyrting, K. C., Ellis, T. M., Webster, R. G., and Peiris, M. (2000). H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J. Virol.* **74**, 9372-9380.
- 9) Hara, K., Shiota, M., Kido, H., Ohtsu, Y., Kashiwagi, T., Iwahashi, J., Hamada, N., Mizoue, K., Tsumura, N., Kato, H., and Toyoda, T. (2001). Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser 624 in the active site. *Genes to Cells*, in press.
- 10) Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., and Webster, R. G. (2000). A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6108-6113.
- 11) Neumann, G., Zobel, A., and Hobom, G. (1994). RNA polymerase-I-mediated expression of influenza viral RNA molecules. *Virology* **202**, 477-479.

- 12) Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., and Kawaoka, Y. (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9345–9350.
- 13) Ruigrok, R. W. H., Barge, A., Durrer, P., Brunner, J., Ma, K., and Whittaker, G. R. (2000). Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology* **267**, 289–298.
- 14) Talon, J., Salvatore, M., O'Neil, R. E., Nakaya, Y., Zheng, H., Muster, T., Garcia-Sastre, A., and Palese, P. (2000). Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins : a vaccine approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4309–4314.
- 15) Talon, J., Horvath, C. M., Polley, R., Basler, C. F., Muster, T., Palese, P., and Garcia-Sastre, A. (2000). Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* **74**, 7989–7996.
- 16) Taubenberger, J. K., Reid, A. H., and Fanning, T. G. (2000). The 1918 influenza virus : a killer comes into view. *Virology* **274**, 241–245.
- 17) Zang, J., Pekosz, A., and Lamb, R. A. (2000). Influenza virus assembly and rapid raft microdomains : a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J. Virol.* **74**, 4634–4644.