

〔総説〕

ウイルスと細胞とのかかわり合い：

アルファウイルスの一生

清 水 文 七*

(昭和59年3月6日受付)

Keywords： ウイルスの侵入，リソソーム，脱外皮，複製，スパイク蛋白質，出芽**略語一覧：** SIN： Sindbis ウイルス，SF： Semliki Forestウイルス，RER： 粗面小胞体

はじめに

動物ウイルスの感染については古くからファージの系をモデルとして考えていた。がウイルスの宿主細胞への侵入過程，それにつぐ複製過程を経て細胞から出ていく過程の精密な分子機構は，現在なお研究中の課題である。ウイルスのライフサイクルはファージよりもかなり複雑であるにもかかわらず，ウイルスに特有な反応はきわめて少ないことが最近はっきりしてきた¹⁾。ウイルスのライフサイクルの大部分は宿主細胞の正常な代謝反応を利用するのであり，ウイルスに特有な侵入経路がある訳でもなければ，特有な輸出経路を利用して出ていくものでもない。RNA型で構造も極めて単純なアルファウイルスを用いた最近の研究では，ウイルスはまず細胞膜に包み込まれるようにして細胞内に入ることが判明した。つまり，細胞の代謝に必要な多くの物質と同じ経路で細胞に取り込まれるのである。リソソーム内に運び込まれたウイルスはここで脱外皮(uncoating)が起り，ウイルスRNA(遺伝子)の翻訳と転写が始まり，子ウイルスの素材が合成される。複製されたRNAは塩基性の蛋白質と結合し核蛋白質(ヌクレオカプシド)となり細胞表面近くに運ばれ，同時にウイルス糖蛋白質は宿主細胞の糖蛋白質分泌経路を経て，先のヌクレオカプシドと合流し細胞表面から出芽(budding)によって細胞外に出るのである。

本稿ではウイルスの侵入と脱出に焦点をあて最近のデータを紹介し，いくつかの問題点について考察したい。

アルファウイルスとは

世界中の温帯，亜熱帯，熱帯に広く分布するウイルス

で，トガウイルス科(Togaviridae，トガとは外套の意でこのウイルスが厚い外皮膜に包まれていることから名付けられた)に属し蚊によって脊椎動物に媒介される1群のウイルスより成り，現在は25種が知られている²⁾。この中にはヒトに脳炎，発疹，関節痛などを起こす病原ウイルスが含まれており東部，西部ウマ脳炎，チクングニヤウイルスなどがその例である。日本脳炎や黄熱のウイルスも近縁でトガウイルス科に属するが，構造，生化学的性状が異なるのでフラビウイルス属としてアルファウイルス属とは区別されている。アルファウイルスの中でシンドビス(SIN)とセムリキ森林(SF)ウイルスはほとんどヒトに病原性がなく，かつ取扱い易いため生化学や分子生物学の研究にRNA型動物ウイルスの良いモデルとして利用されてきた。

これらウイルスは小型の球形ウイルスである^{2,3)}。芯(capsid)にはRNAが入っており，周りをコア蛋白質がとりかこんでいる。これをヌクレオカプシドと呼び，ヌクレオカプシドは周りを厚い外皮膜によって覆われている。遺伝子はプラス1本鎖のRNAで13,000個のヌクレオチドから成る(42S RNA)^{1,2)}。ウイルスのなかでも小型で比較的単純なウイルスであり，構成蛋白質もたった3種から成る(SFウイルスでは例外的に4種)。RNAを包んでいるヌクレオカプシドは180個のカプシド(C)蛋白質から成る⁴⁾。各蛋白質は267個のアミノ酸から成り^{5,6)}，塩基性で正20面体構造をとってRNAを保護している。ヌクレオカプシドの外側にある厚い外皮膜は脂質二重膜より成りその外表面には電子顕微鏡でスパイクが認められる。このスパイクは2種の蛋白質(E1とE2)のheterodimerから成っている¹⁻³⁾。SIN

千葉大学医学部第1微生物学教室

Bunsiti SIMIZU: Virus-Host Cell Interactions: Life Cycle of Alphaviruses.

First Department of Microbiology, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, March 6, 1984.

ウイルスでは E1 は 439 個, E2 は 423 個のアミノ酸から成り, いずれの蛋白質にも 2 種の糖鎖が付いている⁶⁾。E1, E2 の NH₂ 末端側の約 90% は脂質二重膜外に突出し, 先に述べたようにスパイクを形成している。E1, E2 の COOH 末端側は膜内にうまっていて, ごく一部が膜をつきぬけてカプシドに接している。これら 3 種の蛋白質 (C, E1, E2) の一次構造は RNA のヌクレオチド配列から推定されており, C 蛋白質には強い塩基性アミノ酸配列部分がありその部分で RNA と結合していることが推定されている^{6,7)}。E1 と E2 は共に通常見られない配列部分を持っていることが明らかになっている。その部分は, 主として疎水性アミノ酸から成っている¹⁾。疎水性アミノ酸が続く配列は細胞内の水溶性蛋白質にはめずらしい訳であるが, このような性質は膜結合免疫グロブリンなどにも見られ, 膜糖蛋白質に共通している性質のようである。このようにアルファウイルスのスパイク蛋白質が宿主細胞自身の膜糖蛋白質とよく似ているので生合成されてから細胞表面に輸送される過程で後述のように共通性が見られるのであろう⁸⁾。

アルファウイルスの外皮膜についてみると膜脂質分子は宿主からのものであり, 細胞膜と全く同一のものである。脂質分子には構造の少しずつ違ったものがあるが, ウイルス粒子の脂質組成は宿主細胞膜のそれを正確に反映していることが確認されている⁹⁾。

ウイルスの侵入

ウイルスが宿主細胞に侵入する過程については長い間ははっきりしていなかった。1 つの考え方はウイルス粒子の外皮膜と細胞膜とが膜融合を起し, 次いでヌクレオカプシドは細胞質内に放出されるとするものである。このような膜融合現象はパラミクソウイルスのセンダイウイルスでは実際に起る訳であるが, 感染の主経路かどうかは分っていなかった。もう 1 つの考えは細胞が代謝に必要な物質を取り込むときのように, 細胞膜がウイルスの周りに小胞 (vesicles) をつくり, その小胞は細胞膜から離れてウイルスを細胞質内へ運搬するとしている。すなわち, endocytosis (= viropexis) と呼ばれる過程を経て侵入するという考え方で, Helenius 一派は SF ウイルスを用いて侵入過程を追跡し後述の如く感染初期段階を説明した¹⁰⁾。彼らの説明は他の外皮膜を持つウイルスについても当てはまることが次第に明らかになってきた。

第 1 段階はスパイク蛋白質の細胞膜への吸着で始まる¹¹⁾。SF ウイルスのスパイクは移植抗原を含む細胞膜上の糖蛋白質に結合するとされているが, 真の受容体に

ついてはなお不明である^{12,13)}。ウイルス粒子は細胞の microvilli (微絨毛) の表面に付着し易い。次いでウイルス粒子は絨毛の軸に沿って細胞の中心へ向かう。まもなく絨毛の基部にある coated pit (厚皮くぼみ) に取り込まれる¹⁴⁾。このくぼみの内側はクラスリン (clathrin) と名づけられる蛋白質で裏うちされていて電子顕微鏡で厚く見える¹⁵⁾。このくぼみはたえず作られていて, いったんできると, 細胞内側に折れ曲って細胞内に孤立した厚皮小胞 (coated vesicles) となる¹⁶⁾。この小胞はクラスリンに囲まれて細胞内へと運ばれる。奥深く運ばれるに従ってクラスリンは失われ, 小胞はエンドソーム (endosome, prelysosomal vacuoles) と融合する^{10,11)}。これらの融合は細胞の営む正常な生理機能であり, リソソームは細胞内にできた不要な産物を分解することと, エンドサイトーシスで取り込まれた外部からの物質を利用する場所である。リソソーム内には種々の蛋白質, 核酸分解酵素が含まれていて内部の pH は低く (<4.8) ここで消化が起り易い。このような経路で細胞内にとり込まれる物質としては, リボ蛋白質, タンパク質ホルモン, ビタミン, 成長因子などが知られている¹⁴⁾。このうちで最もよく研究されているのは血清中でコレステロールを運搬する低比重リボ蛋白質である。この蛋白質は coated pit を通って細胞に入りリソソームで分解されることがすでによく知られている。

細胞がウイルスを取り込む能力は大きく, BHK 細胞で 1 分間に約 3,000 個を取り込むことができる。これに見合う小胞が作られなくてはならない訳であるが, 小胞形成成分は物質をエンドソームに送りこむとすぐに再び膜表面に戻る。このようにクラスリンは“お駕籠”のような役目をもって目的地まで荷物を運ぶと元の場所に戻る。分子量は 18 万で, 電顕的に小胞膜のまわりに, 五角形と六角形の格子の集まったバスケットとして観察される¹⁵⁾。ウイルスはまさにこの経路によってリソソームまで運ばれるのである^{17,18)} (図 1)。

脱外皮 (uncoating)

リソソーム内に入ったウイルスは各種酵素作用によって分解されてしまい, ここで感染性を失うのではないかと考えられていたが, むしろ逆にリソソーム内に入ることによってウイルスの脱外皮 (uncoating) が起りウイルスにとっては好都合であることが最近分ってきた¹⁹⁾。非荷電状態で膜を通過するようなアミン類 (メチルアミン, アンモニウム塩酸, クロロキン) などで処理するとリソソーム内に数分内にとり込まれ, そこが酸性のためプラスに荷電されリソソームから出られなくなり, pH

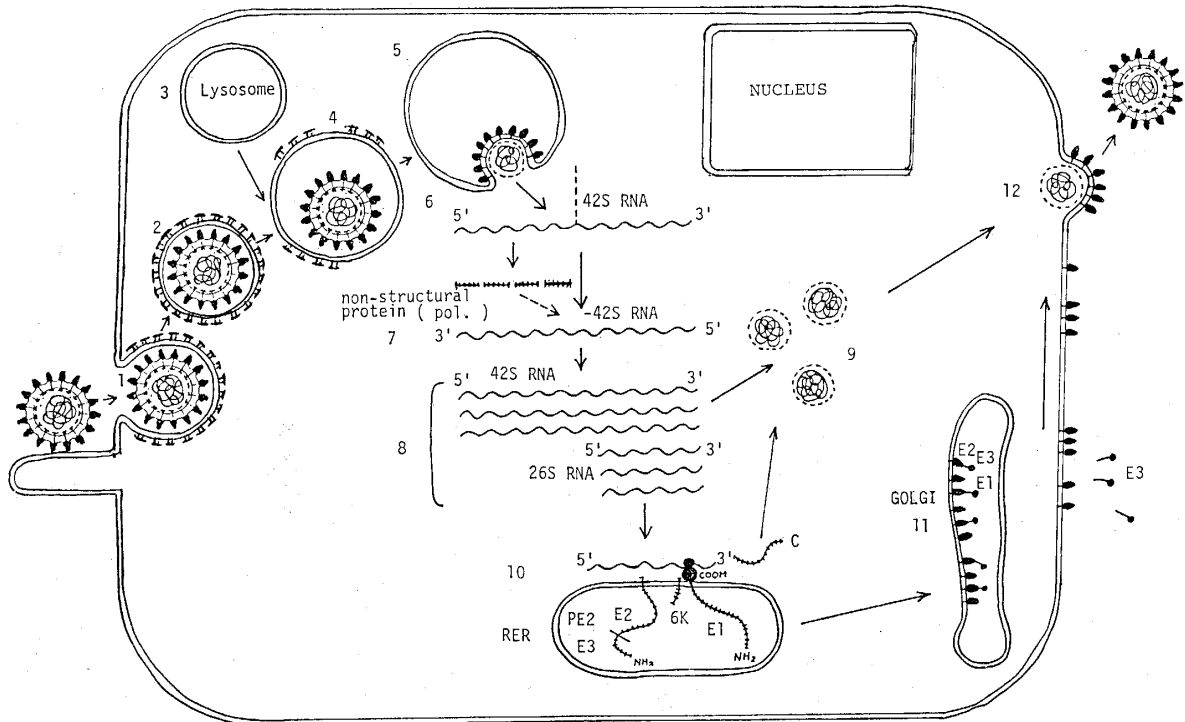


図 1. (1) 微絨毛表面レセプターへ吸着したウイルスは厚皮くぼみから細胞に取り込まれ、(2) 厚皮小胞によって細胞内へ運ばれる。小胞はクラスリンを失い、液泡（エンドソーム）と融合する。これまではエンドサイトーシスである。ついで (3) 小胞はリソソームと融合を起し、(4) ここで低い pH の環境下で (5) 脱外皮が行われる。(6) ヌクレオカプシドの放出にともない (6) 機能蛋白質（RNA ポリメラーゼを含む）の翻訳が行われ、(7) ついで -42S RNA が少量転写され、ひき続き (8) 42S RNA と 26S RNA の合成が起る。26S RNA から翻訳される構造蛋白質のうち (9) カプシド蛋白質は合成直後に新生 42S RNA と結合しヌクレオカプシドを形成し、自由運動で細胞膜付近に達する。(10) カプシド蛋白質以後に作られる PE2 (E3+E2) と 6K+E1 ペプチドは RER 内へ挿入され、(11) ゴルジ装置を通り、この間に種々の修飾を受けながら細胞膜へ送られる。(12) 細胞膜に挿入された E1・E2 は heterodimer を作り E2 の C 末端とヌクレオカプシドがイオン結合を起し出芽が完了する。E3 は SF ウイルス以外では細胞培養中に放出される。（文献 1 と 3 より作成）

を 6.5 以上にしてしまう²⁰⁾。このようなアミン類を感染の初期に与えると感染は完全に阻止されるが感染後 10 分以上経ってから与えた場合は感染の阻止効果は著しく減少する。これらの事実はウイルス粒子は感染の極めて初期でしかも初期翻訳が起る前にアミン感受性部を通過しなければならないことを示す。この“関門”を通過してはじめてヌクレオカプシドが細胞質内に放出されるのである。阻害剤は SF ウイルスの細胞への吸着やリソソームへの移動を妨げるためではない。リソソーム内の pH の上昇によってウイルス膜とリソソーム膜との融合が阻止されるためである^{21, 22)}。この膜融合は低い pH 下で起ることが次の実験からも確かめられた。リポソーム (liposome) を人工的に作り²³⁾、その内側に RNase をとり込ませ、更に SF ウイルスと混ぜる。pH を下げると即座に膜融合が起り電子顕微鏡でみるとリポソームはウイルスのスパイク蛋白質で囲まれていて内に入ったヌク

レオカプシドの RNA は分解されていた²⁴⁾。

生きた細胞内でもウイルス粒子は同じようにしてリソソームから出るのであろう。この過程は速いため (1 分以内) ニュクレオカプシドはリソソームの分離酵素の影響を免れて、しかし蛋白質分離酵素の作用を少々うけながら細胞質内に放出されるのであろう。このように修飾を受けたヌクレオカプシドからは遺伝子 RNA が効率よく脱出し初期翻訳が始まる (図 1)。

この膜融合にはスパイク蛋白質のうち E1 が重要な役割をはたすことが判明した^{1, 25, 26)}。E1 分子には 16 個の疎水性アミノ酸から成る部分が膜の外側にあり、酸性になると三次構造に変化をきたしこの部分が露出して膜融合を起すと考えられている²⁷⁾。事実このアミノ酸配列はアルファウイルス間でよく保存されていて、他の膜融合活性をもつ蛋白質ともよく似ている¹⁸⁾。膜融合専用の F 蛋白質 (F = fusion) を持つパラミクソウイルスの場

合には侵入の際に膜融合活性が働くことは十分考えられるが、先の“関門”を通過する必要があることが分り、細胞膜とウイルス粒子が融合してその場で脱外皮を起すことはなさそうである^{19,28)}。

上述のようにアルファウイルスの研究によってはじめてヌクレオカプシドが細胞質内に放出される点までの侵入経路を追うことができた。まもなくインフルエンザ、狂犬病、水疱性口内炎ウイルスでもこの経路が確められ外皮膜をもつウイルスに共通した現象であることが認められるに至った²⁹⁻³³⁾。

ウイルス RNA の複製と蛋白質合成

ヌクレオカプシドがリソソームから放出されるとウイルス RNA による初期翻訳が始まる^{3,34)}。この過程は宿主細胞の蛋白質合成系をそのままそっくりかりて行われるのである。アルファウイルスでは RNA がヌクレオカプシドから出るやいなや翻訳がはじまり 5' 末端から 4 種類の機能蛋白質が合成される (初期翻訳)^{35,36)}。これらの蛋白質のうち 1 つは RNA 依存 RNA 合成酵素である。この酵素は宿主細胞にはないので、ウイルスの遺伝子によってコードされなくてはならない。その他の機能蛋白質の働きについては良く分っていないが、複製の過程で重要な役割を持っているのは明らかである。遺伝子の機能蛋白質をコードする部分に変異のある温度感受性変異株などを使い各々の蛋白質の機能について解析が行われている³⁷⁾。

初期翻訳によって作られた RNA-RNA 合成酵素を使って転写が始まり、まず、ウイルス核酸に相補的なマイナス RNA が少量転写される。このマイナス RNA を鋳型として子ウイルス用のプラス 42S RNA が大量に複製される^{2,3)}。それ以外に短い 26S RNA が作られる。この RNA はウイルス遺伝子の 3' 末端側 1/3 部分のコードをもつ mRNA で SF ウイルスでは 4,170 個のヌクレオチドから成り、前述のマイナス RNA から転写される。このような subgenomic RNA が作られるのはアルファウイルスに特徴的である^{2,3)}。この 26S RNA はウイルス構造蛋白質専用の mRNA であって感染の中期まで大量に合成される。感染の後期には 26S RNA の翻訳 (後期) が盛んになり、宿主の mRNA にとってかわり 4 種の蛋白質が 1 本のポリペプチドとして多量に合成される²⁾。そのために宿主の蛋白質合成は急速に減少し細胞自身の巨大分子合成阻害が起る³⁸⁾。ウイルスによる蛋白質合成系の“乗っとり”の機序については不明な点が多く、今後に残された重要課題である³⁸⁾。

構造蛋白質は 26S RNA から 5'-C-PE2 (E3-E2)-

E1-3' のオーダーでまとめて翻訳される^{6,7)} (E3 は SF ウイルス以外では構成成分に加わらない)。C は最初に合成され、それ自身の持つ蛋白質分解酵素活性によって続いて合成されてくる PE2 以下の蛋白質を切断し³⁹⁾、細胞内にとどまり新生される子ウイルス 42S RNA と結合しヌクレオカプシドを形成する³⁴⁾。C 以後に作られる蛋白質は膜糖蛋白質として C と一旦別れて後述の経過で細胞膜に輸送される⁴⁰⁾。

膜蛋白質の生成と輸送

動物細胞の膜糖蛋白質の構成とその合成については詳細に研究されているが、アルファウイルスの膜糖蛋白質についても最近研究が進み宿主のそれらに大筋において良く似ていることが分ってきた⁸⁾。E3 と E2 は合成され細胞膜面に達するまでは PE2 と呼ばれる前駆蛋白質として E1 蛋白質と一諸に行動する^{34,41)}。PE2 と E1 の N 末端にはシグナル配列があり粗面小胞体 (RER) のある部分と特別に結合する性質を持っている⁴²⁾。シグナル配列部分が合成されると、リボソームは RER に付着し翻訳が続く。シグナルペプチド部分は RER につきささり後続のペプチドを RER 内腔に導入する。この過程は Blobel と Dobberstein⁴³⁾ によって開発された方法によって SF ウイルスの膜糖蛋白質で確かめられた。すなわち、*in vitro* 蛋白質合成系で 26S RNA の翻訳を行わせる際に RER を加えないと膜蛋白質は正しく作られなかったが、加えると C 蛋白質は RER の外に、そして PE2 と E1 は RER 膜に挿入されていた^{44,45)}。

C 蛋白質が切断されると PE2 のシグナル配列が露出し、この部分が RER につきささる。このためのシグナルは E3 蛋白質の N 末端附近の疎水性アミノ酸配列部分が想定されている⁶⁾。シグナルペプチドとしての E3 が動物細胞の膜糖蛋白質のそれとことなる点は E3 が 66 のアミノ酸残基から成り長いこと (通常は 20~30 個)、糖鎖が付加されること、最終的に細胞外に出ていって SF ウイルスではウイルス膜に組み込まれるなどである^{34,46)}。一方 E1 のシグナルペプチドについてみると E1 の N 末端と E2 の C 末端の間には 6K のペプチドが存在し全体として疎水性を呈することから、この 6K ペプチドがシグナルペプチドとして働くことが知られていて、RER 腔内に入ると切断されて外に出ることはない³⁴⁾。PE2 も E1 もこのように RER 腔内に大部分は挿入されるが、C 末端近くの疎水性部分で RER 膜内へ挿入が止まる。さらに C 末端側にわずかな親水性のアミノ酸残基があり、この部分は腔外 (細胞質) にとどまる⁴⁾。いずれの蛋白質も末端近くの疎水性部位によって RER を

貫通し、かつ膜内に固定されることになる(図1)。

かくしてC蛋白質と別行動をとったスパイク蛋白質はRERからゴルジ装置へと移動する^{41,47)}。その際または装置内で糖鎖や脂肪酸の付加を受け、更に糖鎖の修飾などを受けながら細胞膜へと輸送されていく⁸⁾。脂肪酸の付加は細胞膜や他のウイルス膜の糖蛋白質についても知られている³⁴⁾。さらにゴルジ装置通過中に糖蛋白質の行先が決められ、スパイク蛋白質は分泌蛋白質として細胞膜面に向う。RERからゴルジ装置を経て細胞膜に達する過程に受ける修飾の生物学的意義はよく理解されていないが、ウイルスの場合には温度感受性変異株などの使用や、通過を阻止する薬剤を使って分析が進められている⁸⁾。

ゴルジ装置から細胞膜への輸送ははっきりしてはいないが、一説によると coated (transport) vesicle によると考えられている⁴⁸⁾。vesicle は細胞膜と融合し、inside-out となり、今まで vesicle 内にあった糖蛋白質の親水性部分のほとんどが細胞外に出て、C末端側のわずかな親水性部分は、そのまま細胞質内に留まる。こうしてスパイク蛋白質もホルモンや血清蛋白質などの多くの分泌蛋白質がたどる経路を経て細胞膜に到達するのであって、ここでもウイルスは細胞の正常代謝経路を利用していることを知る。細胞内微小管や微小繊維系はウイルス感染によって強い変化を来すが、ウイルス膜糖蛋白質の細胞内輸送には直接的に関与しているという証拠は得られていない。

アルファウイルスは、細胞表面から出芽によって粒子形成を行い脱出する⁴⁹⁾。この過程はインフルエンザ、麻疹、狂犬病ウイルスなどのように外皮膜を持つウイルスに共通して見られる。出芽の機序は Simons のグループによって明らかにされてきた⁴⁾。完成されたヌクレオカプシドはおそらく自由運動で細胞膜付近に達し、細胞膜に挿入されたスパイク蛋白質の特に E2 のC末端近くにある僅かな親水性部分によって認識されイオン結合する。ヌクレオカプシドに結合するスパイク蛋白質の分子が次第に多くなるにつれ、ヌクレオカプシド・スパイク蛋白質複合体は強化され、その部分の細胞質膜は乳頭状にくびれてくる。くびれることによって更に多くのスパイク蛋白質がヌクレオカプシドに接近し、周囲を取り囲む結果となる(図1)。180分子のC蛋白質の全部がスパイク蛋白質(E1, E2各180分子)と結合したとき、ヌクレオカプシドは完全に外皮膜に包み込まれ、膜はちぎれ、ウイルス粒子が細胞から脱出する。膜には孔は残らず、膜はひとりでに閉じる。この段階でヌクレオカプシドに親和性のない宿主蛋白質はウイルスのスパイク蛋白質の

密度が高まるにつれその場から排除されるので完成したウイルス粒子に宿主蛋白質が混入することがないのはこのためであろう⁵⁰⁾。さらにウイルス外皮膜の脂質が宿主細胞に由来するという事実をうまく説明できる³⁾。

あとがき

アルファウイルスをモデルとしてウイルスと宿主細胞のかかわり合いについて述べてきたが、侵入、複製、脱出の精密な分子機構は、なお現在研究中の領域である³⁾。ウイルスは宿主の正常な代謝系を利用して合成される訳であるが、逆にこのような単純なウイルスを使うことによって真核細胞の膜蛋白質の生合成や細胞内輸送の機構解明に役立つことにもなる。それは少数のウイルス糖蛋白質が短時間に大量に合成されることや、アルファウイルスでは膜蛋白質のプロセッシングや輸送過程に欠損をもつ温度感受性変異株を使うことができるからである³⁷⁾。

ウイルスが宿主細胞の正常機能を十分利用しているということは抗ウイルス剤の開発を困難にしている最も大きな点である。有効な抗ウイルス剤を見つける事は、ウイルスに特異的な数少ない機能を抑えることに向けなければならない。ウイルスの複製がはじまる前にリソソームに於て脱外皮が起らなくてはならないのでウイルス膜とリソソーム膜との融合を阻害する薬剤は有効な抗ウイルス剤となる可能性がある。また複製過程で細胞が具備しない RNA-RNA 合成酵素はウイルス感染によってのみ合成されるのでこの酵素の阻害剤は最も有力な抗 RNA ウイルス剤となろう。DNA 合成酵素に比して RNA 合成酵素の本態については不明な点が多く、これからの研究に期待がかけられている。

また、予防のためのワクチンの開発について考えてみると、精製粒子そのものを使うよりは RNA などを除いたコンポネントワクチンが望ましい。この場合、スパイク蛋白質が必要であることは当然であるがこれら蛋白質は今日では組換え DNA 技術で作ることは可能となっている。しかし E1, E2 いずれの蛋白質をどんな形で投与するかが問題となろう。おそらくは両蛋白質を人工リポソーム膜などにうめ込み粒子に近い立体構造を作った上で免疫系に提示するのがよからう。このアイディアは最近の E1 E2 蛋白質の機能分担に関する研究によるものである⁵¹⁾。ウイルスの中和作用、感染防御作用は複雑な反応であって、抗体が細胞へのウイルスの吸着を阻止するだけでこれらの作用が発現するとは限らない^{52,53)}。モノクローナル抗体の分析では抗 E1 抗体はウイルスの細胞への吸着を阻止するが、中和作用が弱かつ

たり、E2 は細胞への吸着の直接の手と考えにくいのに、抗 E2 抗体に中和作用の強いものがあり⁵¹⁾、E1、E2 両蛋白質ともが感染防御には必要のようである。従って、ウイルス蛋白質の構造と機能を深く追求することにより、より有効なワクチンや抗体を作製することが可能となり、ウイルス病の予防と治療への道が開かれるものとする。

文 献

- 1) Garoff, H., Kondor-Koch, C. and Riedel, H.: Structure and assembly of alphaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **99**, 1-50, 1982.
- 2) Strauss, J. H. and Strauss, E. G.: Togaviruses. In: *The molecular biology of animal viruses*. Nayak, D. P. ed. Marcel Dekker, pp. 111-166, New York, 1977.
- 3) 清水文七: アルファウイルスについて一特に構造タンパク質を中心として. *ウイルス* **33**, 87-101, 1983.
- 4) Simons, K. and Garoff, H.: The budding mechanism of enveloped animal viruses. *J. Gen. Virol.* **50**, 1-21, 1980.
- 5) Garoff, H., Frischauf, A.-M., Simons, K., Lehrach, H. and Delius, H.: The capsid protein of Semliki forest virus has clusters of basic amino acids and proteins in its aminoterminal region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 6376-6380, 1980.
- 6) Rice, C. M. and Strauss, J. H.: Nucleotide sequence of the 26S mRNA of Sindbis virus and deduced sequence of the encoded virus structural proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 2062-2066, 1981.
- 7) Garoff, H., Frischauf, A.-M., Simons, K., Lehrach, H. and Delius, H.: Nucleotide sequence of cDNA coding for Semliki forest virus membrane glycoproteins. *Nature (London)* **288**, 236-241, 1981.
- 8) 橋本雄之: ウイルス糖タンパク質の生成と細胞内輸送. *生化学* **54**, 1033-1047, 1982.
- 9) Lenard, J.: Lipids of alphaviruses. In: *Togaviruses*. Schlesinger, R. W., ed. Academic Press, pp. 335-341, New York, 1980.
- 10) Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. and Fries, E.: On the entry of Semliki forest virus into BHK cells. *J. Cell Biol.* **84**, 404-420, 1980.
- 11) Marsh, M. and Helenius, A.: Adsorptive endocytosis of Semliki forest virus. *J. Mol. Biol.* **142**, 430-454, 1980.
- 12) Helenius, A., Morein, B., Fries, E., Simons, K., Robinson, P., Schirmacher, V., Terhorst, C. and Stominger, J.: Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2d) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**, 3846-3850, 1978.
- 13) Oldstone, M. B. A., Tishon, A., Dutko, F. J., Kennedy, S. I. T., Holland, J. J. and Lampert, P. W.: Does the major histocompatibility complex serve as a specific receptor for Semliki forest virus? *J. Virol.* **34**, 256-265, 1980.
- 14) Goldstein, J. L., Anderson, R. G. and Brown, M. S.: Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature (London)* **279**, 679-685, 1979.
- 15) Pearse, B. M. F.: Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* **97**, 93-98, 1975.
- 16) Keen, J. H., Willingham, M. C. and Pastan, I.: Clathrin and coated vesicle proteins. *J. Biol. Chem.* **256**, 2538-2544, 1981.
- 17) Keen, J. H., Willingham, M. C. and Pastan, I. H.: Clathrin-coated vesicles: Isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell* **16**, 303-312, 1979.
- 18) Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A. and Cohn, Z. A.: Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* **96**, 1-27, 1983.
- 19) Lenard, J. and Miller, D. K.: Uncoating of enveloped viruses. *Cell* **28**, 5-6, 1982.
- 20) Helenius, A., Marsh, M. and White, J.: Effect of lysosomotropic weak bases on Semliki forest virus penetration into the host cell. *J. Gen. Virol.* **58**, 47-61, 1981.
- 21) White, J., Kartenbeck, J. and Helenius, A.: Fusion of Semliki forest virus with the plasma membrane can be induced by low pH. *J. Cell Biol.* **87**, 264-272, 1980.
- 22) Marsh, M., Matlin, K., Simons, K., Reggio, H., White, J., Kartenbeck, J. and Helenius, A.: Are lysosomes a site of enveloped virus penetration? *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **46**, 835-843, 1982.
- 23) Bangham, A. D., Hill, M. W. and Miller, N. G. A.: Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In: *Methods in Membrane Biology*. Vol. 1. E. Korn, ed. Plenum Press. 1-68, 1974.
- 24) White, J. and Helenius, A.: pH-dependent fusion between the Semliki forest virus membrane and liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 3273-3277, 1980.
- 25) Kondor-Koch, C., Burke, B. and Garoff, H.: Expression of Semliki forest virus pro-

- teins from cloned complementary DNA. I. The fusion activity of the spike glycoprotein. *J. Cell Biol.* **97**, 644-651, 1983.
- 26) Yamamoto, K., Suzuki, K. and Simizu, B.: Hemolytic activity of the envelope glycoproteins of western equine encephalitis virus in reconstitution experiments. *Virology* **109**, 452-454, 1981.
 - 27) Skehel, J. J., Bayley, P. M., Brown, E. B., Martin, S. R., Waterfield, M. D., White, J. M., Wilson, I. A. and Wiley, D. C.: Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 968-972, 1982.
 - 28) Lenard, J. and Miller, D. K.: pH-dependent hemolysis by influenza, Semliki forest virus, and Sendai virus. *Virology* **110**, 479-482, 1981.
 - 29) White, J., Matlin, K. and Helenius, A.: Cell fusion by Semliki forest, influenza and vesicular stomatitis viruses. *J. Cell Biol.* **89**, 674-679, 1981.
 - 30) Maeda, T. and Ohnishi, S.: Activation of influenza virus by acidic media causes hemolysis and fusion of erythrocytes. *FEBS Lett.* **122**, 283-287, 1980.
 - 31) Huang, R. T. C., Wahn, K., Klenk, H.-D. and Rott, R.: Fusion between cell membranes and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus. *Virology* **104**, 294-302, 1980.
 - 32) Matlin, K. S., Reggio, H., Helenius, A. and Simons, K.: Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J. Mol. Biol.* **156**, 609-631, 1982.
 - 33) Ohuchi M., Ohuchi, R. and Mifune, K.: Demonstration of homolytic and fusion activities of influenza C virus. *J. Virol.* **42**, 1076-1079, 1982.
 - 34) Schlesinger, M. J. and Kääriäinen, L.: Translation and processing of alphavirus proteins. In: *Togaviruses*. Schlesinger, R. W. ed. Academic Press, pp.371-392, New York, 1980.
 - 35) Keränen, S. and Ruohonen, L.: Nonstructural proteins of Semliki forest virus: Synthesis, processing, and stability in infected cells. *J. Virol.* **47**, 505-515, 1983.
 - 36) Strauss, E. G., Rice, C. M. and Strauss, J. H.: Sequence coding for the alphavirus nonstructural protein is interrupted by an opal termination codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 5271-5275, 1983.
 - 37) Strauss, E. G. and Strauss, J. H.: Mutants of alphaviruses: Genetics and physiology. In: *Togaviruses*. Schlesinger, R. W. ed. Academic Press, pp. 393-426, New York, 1980.
 - 38) Simizu, B.: Inhibition of host cell macromolecular synthesis following togavirus infection. In: *Comprehensive Virology*. Vol. 19, Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R. R. ed. Plenum Press. in press. New York and London. 1984.
 - 39) Aliperti, G. and Schlesinger, M. J.: Evidence for an autoprotease activity of Sindbis virus capsid protein. *Virology* **90**, 366-369, 1978.
 - 40) Garoff, H., Kondor-Koch, C., Pettersson, R. and Burke, B.: Expression of Semliki forest virus proteins from cloned complementary DNA. II. The membrane-spanning glycoprotein E2 is transported to the cell surface without its normal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* **97**, 652-658, 1983.
 - 41) Hashimoto, K. and Simizu, B.: A temperature-sensitive mutant of western equine encephalitis virus with an altered envelope protein E1 and a defect in the transport of envelope glycoproteins. *Virology* **119**, 276-287, 1982.
 - 42) Blobel, G. and Dobberstein, B.: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* **67**, 835-851, 1975.
 - 43) Blobel, G. and Dobberstein, B.: Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* **67**, 852-862, 1975.
 - 44) Dobberstein, B., Garoff, H. and Warren, G.: Cell-free synthesis and membrane insertion of mouse H-2D^a histocompatibility antigen and β_2 -microglobulin. *Cell* **17**, 759-769, 1979.
 - 45) Garoff, H., Simons, K. and Dobberstein, B.: Assembly of the Semliki forest virus membrane glycoproteins in the membrane of the endoplasmic reticulum in vitro. *J. Mol. Biol.* **124**, 587-600, 1978.
 - 46) Simizu, B., Hashimoto, K. and Ishida, I.: A variant of western equine encephalitis virus with nonglycosylated E3 protein. *Virology* **125**, 99-106, 1983.
 - 47) Green, J., Griffiths, G., Louvard, D., Quinn, P. and Warren, G.: Passage of viral membrane proteins through the Golgi complex. *J. Mol. Biol.* **152**, 663-698, 1981.
 - 48) Rothman, J. E. and Fine R. E.: Coated

- vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 780-784, 1980.
- 49) Acheson, N. H. and Tamm, I.: Replication of Semliki forest virus: an electron microscopic study. *Virology* **32**, 128-143, 1967.
- 50) Strauss, E. G.: Mutants of Sindbis virus. III. Host polypeptides present in purified HR and ts 103 virus particles. *J. Virol.* **28**, 466-474, 1978.
- 51) Yamamoto, K., Chiba, J., Hashimoto, K. and Simizu, B.: Analysis of functions of western equine encephalitis virus glycoproteins with monoclonal antibodies. *Virology* in preparation. 1984.
- 52) Schmaljohn, A. L., Johnson, E. D., Dalrymple, J. M. and Cole, G. A.: Non-neutralizing monoclonal antibodies can prevent lethal alphavirus encephalitis. *Nature (London)* **297**, 70-72, 1982.
- 53) Schmaljohn, A. L., Kokubun, K. M. and Cole, G. A.: Protective monoclonal antibodies define maturational and pH-dependent antigenic changes in Sindbis virus E1 glycoprotein. *Virology* **130**, 144-154, 1983.
-