

# 1. GFP 発現組換えウイルスを用いた麻疹ウイルスの 細胞侵入の解析

## —低効率の SLAM 非依存性細胞侵入の証明—

橋元 宏治, 柳 雄介

野生型麻疹ウイルスの細胞侵入を定量的に解析するために、GFP を発現する組換えウイルスを作製した。このウイルスは、麻疹ウイルスレセプターである SLAM を発現している細胞に感染すると緑色蛍光を発する合胞体を形成した。一方、SLAM 陰性細胞にも低頻度の感染が起こったが合胞体は形成しなかった。感染後に緑色蛍光を発する細胞の数を定量すると、SLAM 陰性細胞は、陽性細胞に比べて細胞侵入効率が 1/100 から 1/1,000 であった。SLAM 陰性細胞への感染は抗 CD46 抗体で阻止できなかった。また、エンドサイトーシスは関与していなかった。以上の結果より、効率は非常に低いものの、SLAM や CD46 以外のレセプターを用いた麻疹ウイルスの細胞侵入経路があることが示された。上皮細胞、内皮細胞、神経細胞など SLAM が発現していないとされる細胞における麻疹ウイルス感染にこのような経路が関与しているかもしれない。

### はじめに

麻疹は小児の代表的なウイルス性疾患である。生ワクチンの開発により先進国での患者数は激減したが、発展途上国などワクチン接種が十分でない地域では、今なお年間約百万人の死者が出ている。麻疹の原因ウイルスである麻疹ウイルスは *Paramyxoviridae* 科 *Morbillivirus* 属に分類され、非分節の一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムとし、H タンパクと F タンパクの 2 種類のエンベロープタンパクをもつ。麻疹ウイルスが細胞に侵入する際、まず細胞表面のレセプターと H タンパクが結合して立体構造に変化が起

こる。それに続き、F タンパクにも構造変化が起こり膜融合活性を示すようになって、細胞膜とウイルスのエンベロープとの間に膜融合が生じる。その結果、ウイルスゲノムを含むヌクレオキャプシドが細胞内に放出され、ウイルスの複製が開始される<sup>1)</sup>。

麻疹ウイルスの細胞レセプターとしては、1993年に Edmonston 株などワクチン株のレセプターとして、補体制御因子の一つである CD46 が同定された<sup>9,23)</sup>。CD46 は C3b や C4b といった補体成分に結合してそれらを不活化する働きを持っており、赤血球を除くヒトのすべての細胞表面上に存在することがわかっている<sup>18)</sup>。この CD46 の分布を反映して Edmonston 株をはじめとしたワクチン株は、ほとんどすべてのヒト細胞株に侵入することができる<sup>43)</sup>。これまで、麻疹ウイルスに関する研究は、この CD46 をレセプターとするワクチン株を主体としてなされてきた。しかしながら、Edmonston 株をはじめとしたワクチン株は、実験的に感染させたサルに病原性を示さない<sup>1,16)</sup>。

臨床検体からの麻疹ウイルスの分離にはアフリカミドリザル腎細胞由来の Vero 細胞が頻用されてきた。しかし、1990年に Kobune らは新世界ザルのマーモセットの B

九州大学大学院医学研究院ウイルス学 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

Measles virus entry as examined by a recombinant virus expressing green fluorescent protein

Koji Hashimoto, Yusuke Yanagi

Department of Virology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Fukuoka 812-8582, Japan

TEL: 092-642-6135, FAX: 092-642-6140

E-mail: yyanagi@virology.med.kyushu-u.ac.jp

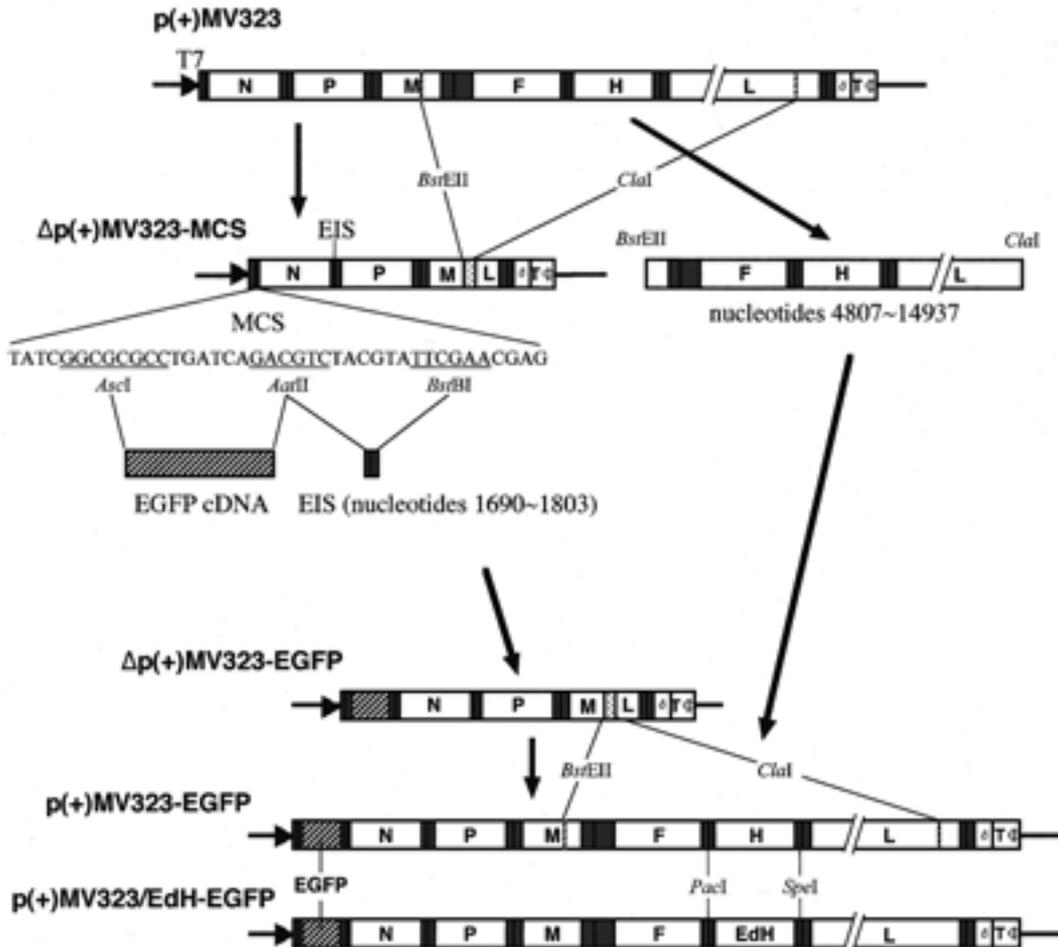


図1 EGFP 発現組換え麻疹ウイルス cDNA 作成過程の模式図  
 詳細は文献12を参照のこと。P(+)-MV323は文献41による。

細胞株である B95a 細胞を用いると、ウイルス分離が非常に効率よくできることを報告した<sup>16)</sup>。Vero 細胞で分離したウイルスは Edmonston 株と同じく CD46 をレセプターとして使うことができるが、B95a 細胞で分離した麻疹ウイルスは、一部のリンパ球系細胞株にしか侵入できない<sup>6, 17, 34, 42, 43)</sup>。つまり、B95a 分離株は CD46 をレセプターとして使うことができない。我々は B95a 分離株のレセプターは CD46 以外の他の分子であると考え、vesicular stomatitis virus (VSV) シュードタイプを用いた発現クローニング法により、新たなレセプターの同定に取り組んだ。その結果、未熟胸腺細胞、CD45RO<sup>high</sup> メモリー T 細胞、活性化された T 細胞、B 細胞<sup>7, 38)</sup>、単球<sup>21)</sup>、及び樹状細胞<sup>24)</sup> など一部の免疫系細胞にのみ発現している signaling lymphocyte activation molecule (SLAM; 別名 CD150) が野生型麻疹ウイルスのレセプターであることを突き止めた<sup>44)</sup>。興味深いことに SLAM は野生型麻疹ウイルスだけでなく Edmonston 株などのワクチン株のレセプターとしても機能する。SLAM の分布は CD46 とは異なり、患者体内での麻疹ウイルスのトロピズムを非常によく反映す

る<sup>2, 7, 21, 24, 38, 44)</sup>。また、麻疹患者の咽頭ぬぐい液中に存在するウイルスは SLAM をレセプターとして効率よく利用することができるが、CD46 は利用できない<sup>26)</sup>。以上の結果から、患者体内での麻疹ウイルスの細胞侵入におけるレセプターは、SLAM によってほぼ説明可能であると思われる。

しかし、麻疹の病態は免疫系細胞をターゲットにしたものばかりではない。例えば麻疹患者の病理組織像からは SLAM を発現していないと考えられている血管内皮細胞<sup>10, 14, 15, 19, 22)</sup> や上皮系細胞<sup>19, 22, 40)</sup> のウイルス感染が確認されている。さらに亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) では神経系細胞にも感染の事実が証明されており<sup>3, 22, 37)</sup>、やはり SLAM 陰性細胞が関わっている。麻疹患者の体内に存在するウイルスが CD46 をレセプターとして使用しないであろうことを考えると、こうした SLAM 陰性細胞への麻疹ウイルスの感染は、SLAM や CD46 以外のいまだ同定されていない第三のレセプターが存在することを示唆するものである。

この問題を解決する手掛かりを得るために、我々は cDNA 化された野生型麻疹ウイルスゲノムより reverse genetics 法を用いて GFP 発現組換え麻疹ウイルスを作成

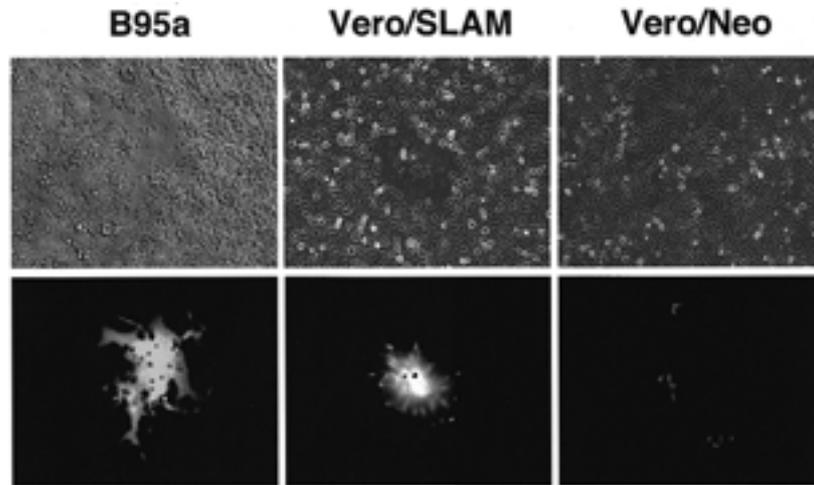


図2 IC323-EGFP 感染後24時間の顕微鏡像  
上段は光学顕微鏡像，下段は蛍光顕微鏡像を示す。

し、種々の細胞における麻疹ウイルスの侵入経路について詳細な検討を行った<sup>12)</sup>。

### GFP 発現組換え麻疹ウイルス

Reverse genetics 法を用いてこれまで多くのウイルスが cDNA から rescue されてきた。麻疹ウイルスに関しては 1995年に初めて Edmonston 株の rescue の報告がなされた<sup>29)</sup>。その後、様々な組換え麻疹ウイルスが作成され、多くの新たな知見が得られた<sup>27, 28, 32, 45, 46)</sup>。しかし、前述のように Edmonston 株をはじめとするワクチン株はサルでの実験的感染において病原性を示さない<sup>1, 16)</sup>。したがって麻疹患者体内に存在し実際に病原性を有しているウイルスの性質を研究するためには、野生型の組換え麻疹ウイルスによる研究が不可欠である。2000年に、Takeda らは野生型麻疹ウイルス株である Ichinose 株のゲノムを cDNA クロニ化し、サルの実験的感染において病原性を示すウイルスの rescue に成功した<sup>41)</sup>。

我々はこの技術をもとに enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現する Ichinose 株麻疹ウイルスの rescue に取り組んだ。図 1 は EGFP を組み込んだウイルスゲノムの cDNA 作成過程を模式的に示したものである。まずクローン化された Ichinose 株のゲノム p(+)MV323 の N 遺伝子 3' 側の non-coding 領域に外来遺伝子を挿入するための multicloning site (MCS) を作成した。ここに PCR によってクローニングした EGFP 遺伝子の cDNA とウイルス遺伝子の転写開始/終了に必要な特定の塩基配列 (EIS; nucleotides 1690~1803) を挿入し p(+)MV323-EGFP を作成した。我々はさらに p(+)MV323-EGFP の H 遺伝子を Edmonston 株の H 遺伝子と置き換えることにより p(+)MV323/EdH-EGFP も作成し、各々のベクターから rescue された組換えウイルスをそれぞれ IC323-

EGFP, IC323/EdH-EGFP と命名した。作成した組換えウイルスの B95a 細胞での増殖能は親株である IC323 とほぼ同じであったことから、1 kb 弱の外来遺伝子の挿入や H 遺伝子の置き換えによって増殖能に変化を来さないことがわかった。

次に感染細胞の形態学的変化について検討した。光学顕微鏡下では、IC323-EGFP は IC323 と同様に B95a 細胞に合胞体を形成し、その合胞体は蛍光顕微鏡で、緑色の蛍光を発することが確認できた (図 2)。また Vero/SLAM 細胞や MT-2 細胞など他の SLAM 陽性細胞でも同様に緑色の蛍光を発する合胞体を確認する事ができた (図 2)。ちなみに IC323/EdH-EGFP は Edmonston 株と同様に SLAM または CD46 を発現する細胞に合胞体を形成し、同じく蛍光顕微鏡で緑色の蛍光を発することを確認した。一方、Vero/Neo 細胞や Jurkat 細胞などの SLAM 陰性細胞に IC323-EGFP を接種したところ、合胞体は形成しないものの EGFP 発現細胞を確認する事ができた (図 2)。これらの EGFP 発現細胞をさらに 5 日間に渡り観察したが、合胞体の形成はなく、周囲の細胞への感染の波及もほとんど確認できなかった。

EGFP 発現麻疹ウイルスを用いると、感染細胞をウイルス接種後 12 時間ほどで一つの EGFP 発現細胞として確認することができる。この段階ではまだ合胞体の形成はなく、感染細胞を非常に早い段階から経時的に観察できるといふ点で非常に優れていることがわかる。

### SLAM 非依存性細胞侵入経路の存在

SLAM 陰性細胞にも認められた野生型麻疹ウイルスの感染を定量的に検討するために、様々な細胞株における IC323-EGFP と IC323/EdH-EGFP の感染効率を決定した (図 3)。感染効率はウイルス接種後 24 時間の EGFP 発現

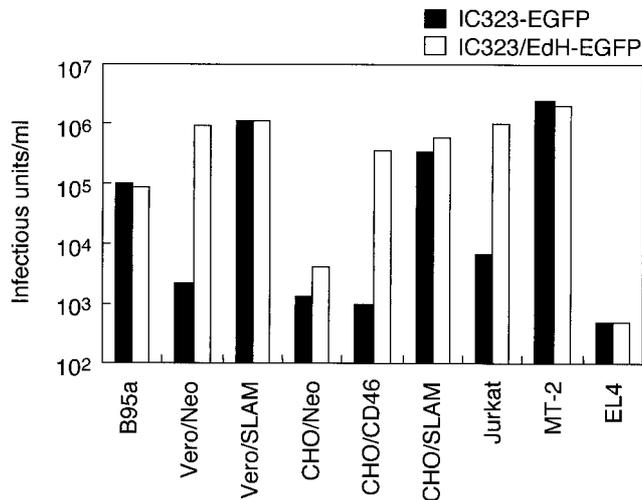


図3 様々な細胞株におけるIC323-EGFP及びIC323/EdH-EGFPの感染効率(文献12による)

細胞数を計測し infectious units (IU) として表現した。また、感染後の合胞体形成は感染細胞数の正確な計測を妨害するので、ウイルス接種後に合胞体形成を抑制する fusion block peptide (Z-D-Phe-Phe-Gly)<sup>30)</sup>を medium 中に加える工夫をした。予想通り、IC323-EGFP は B95a 細胞、Vero/SLAM 細胞、CHO/SLAM 細胞、MT-2 細胞といった SLAM 陽性細胞に非常に効率よく感染することができた。これに対して、Vero/Neo 細胞、CHO/CD46 細胞、CHO/Neo 細胞、Jurkat 細胞、EL 4 細胞といった SLAM 陰性細胞にも、SLAM 発現細胞と比較しておよそ 1/100 から 1/1,000 の効率で、感染できることがわかった。興味深いことに、IC323/EdH-EGFP も、既知のレセプターである SLAM または CD46 を発現していない CHO/Neo 細胞や EL 4 細胞などにやはり 1/100 から 1/1,000 の低い効率で感染した。

IC323-EGFP の SLAM 非依存性細胞侵入が CD46 を介するものでないことを確認するために、CD46 に対するモノクローナル抗体 (M75)<sup>35)</sup>を用いた感染ブロックの実験を行った。その結果、CHO/CD46 細胞に対する IC323/EdH-EGFP の感染が十分に抑制される条件下であっても、CHO/Neo 細胞あるいは CHO/CD46 細胞に対する IC323-EGFP の感染は全く抑制されなかった。これらの結果から野生型麻疹ウイルスは SLAM 陰性細胞に侵入する際、CD46 をレセプターとして利用していないことが確認された。また、当然のことであるが、CHO/Neo 細胞あるいは CHO/CD46 細胞に対する IC323-EGFP の感染は SLAM に対するモノクローナル抗体 (IPO-3)<sup>38)</sup>によって全く抑制されなかった。以上のことから、麻疹ウイルスの細胞侵入には、感染効率は劣るものの SLAM や CD46 といった既知のレセプターのみでは説明できない第三の侵入経路が存在することが定量的に確認された。

エンドサイトーシスは細胞が様々な粒子を細胞内に取り込む際に用いる手段の一つである<sup>47)</sup>。我々が明らかにした SLAM 非依存性細胞侵入は SLAM や CD46 と比較して 1/100 から 1/1,000 の低い効率でしか起こらないため、単にエンドサイトーシスによって非特異的にウイルスが細胞内に取り込まれている可能性がある。そこで、我々は CHO/Neo 細胞と Vero/Neo 細胞を chloroquine で処理し、IC323-EGFP の細胞侵入がどのように変化するかを検討した。chloroquine はエンドゾーム内の pH 低下を抑制させてエンドサイトーシスによるウイルスの侵入を抑制する薬剤である<sup>25)</sup>。実験の結果、細胞侵入の際にエンドサイトーシスを必要とする VSV<sup>5)</sup>の感染を完全に抑制し、エンドサイトーシスを必要としないヒトサイトメガロウイルス (HCMV)<sup>8)</sup>の感染を抑制しない条件下において、IC323-EGFP の感染はほとんど抑制されないことがわかった。以上のことから、麻疹ウイルスの SLAM 非依存性細胞侵入は細胞のエンドサイトーシスによる非特異的な取り込みによるものではなく、麻疹ウイルスが SLAM や CD46 を介して細胞内に侵入する際と同様に、細胞膜とエンベロープとの直接の膜融合によって起こっていることが強く示唆された。

では、SLAM 非依存性細胞侵入におけるウイルス因子の役割はどうか。我々はこの細胞侵入経路における麻疹ウイルスの二つのエンベロープタンパクの役割を検討するため、以下の二つの実験を行った。まず、Vero/Neo 細胞における IC323-EGFP の感染が H タンパクに対するモノクローナル抗体<sup>20)</sup>で抑制されるかどうかを調べたところ、H タンパクに対する抗体は濃度依存的に IC323-EGFP の感染を抑制した。次に F タンパクの役割を検討するため、fusion block peptide の存在下で IC323-EGFP を同じく Vero/Neo 細胞に感染させたところ、感染は完全に抑制された。以上のことから、麻疹ウイルスの SLAM 非依存性細胞侵入には、SLAM や CD46 を介して感染する場合と同様に、H タンパクと F タンパクの機能が不可欠であると考えられた。

#### EGFP 発現ウイルスを用いて明らかになった麻疹ウイルスの細胞侵入機構

EGFP 発現麻疹ウイルス (IC323-EGFP) を用いる最大の利点は、感染細胞が生きたまま緑色の蛍光を発するため、感染細胞を高感度かつ経時的に検出できることである。我々は以前、VSV シュードタイプを用いた実験から、SLAM を発現していない細胞は野生型麻疹ウイルスに対して感受性をほとんど有さないであろうと考えていた<sup>43)</sup>。しかし、IC323-EGFP を用いることで、SLAM 陰性細胞も実際には野生型麻疹ウイルスに対してある程度感受性を有することを定量的に示すことができた。

我々は SLAM が麻疹ウイルス野生株及びワクチン株の

両者のレセプターとして機能することを報告した<sup>44)</sup>。また、麻疹患者の咽頭ぬぐい液中に存在するウイルスの多くは、SLAMをレセプターとして利用することを報告した<sup>26)</sup>。SLAMの分布は麻疹ウイルスのトロピズムや免疫抑制、白血球減少などの病態を説明する上で非常に都合がよいが、多くの病理学的検討から、麻疹患者の体内においては、SLAMが発現していないとされる血管内皮細胞<sup>10, 14, 15, 19, 22)</sup>、上皮系細胞<sup>19, 22, 40)</sup>、神経細胞<sup>3, 22, 37)</sup>にも感染の報告がなされている。

このパラドックスは如何にして説明することができるだろうか。まず第一に、量的には非常に少ないが麻疹ウイルスの感染を可能にするだけのSLAMがこうした細胞に発現している可能性がある。我々は、気道上皮細胞や血管内皮細胞などヒト正常培養細胞上に *in vitro* でSLAMが発現しているかどうかを flow cytometry で検討したが、いずれの細胞においてもSLAMの発現を確認することはできなかった (Hashimoto et al. 未発表データ)。また、気道上皮細胞や血管内皮細胞に対するIC323-EGFPの感染はSLAMやCD46に対するモノクローナル抗体によって全く抑制することができなかった (Hashimoto et al. 未発表データ)。以上の結果から、第一の仮説はほぼ否定的であるといえるだろう。第二に、CD46や他の分子を効率よく使用できる変異型の麻疹ウイルスが患者体内で生じたのではないかという可能性が考えられる。RNAウイルスの高い変異率から考えるとこの仮説はより現実的に思える。実際に、野生型麻疹ウイルスにおいて、レセプターとの結合能を有するHタンパクのたった一つのアミノ酸が置換されただけで(481番目がチロシンに、あるいは546番目がグリシンに)、野生株はCD46をレセプターとして利用することができるようになる<sup>4, 13, 17, 31, 36, 48)</sup>。しかし、この仮説もまた否定的である。なぜならば、IC323-EGFPをSLAM陰性細胞であるVero細胞やJurkat細胞に感染させた後にウイルスを回収し、H遺伝子の変異を確かめたところ、そのような変異は認められなかったからである。また、CD46のような、SLAM以外の分子を高効率のレセプターとして利用できる変異ウイルスが生じたとすれば、最初に感染した細胞から周囲の細胞に容易に感染が波及するはずであるが、そうした現象は認められなかったことから、第二の仮説は否定されるであろう。やはり、麻疹ウイルスには感染効率は低いもののSLAM及びCD46以外の第三のレセプターが存在すると考えるのが最も妥当である。

#### おわりに

最後に強調して起きたいことは、ここで示したSLAMやCD46以外の麻疹ウイルスレセプターはその感染効率の低さから、決してSLAMの代替レセプターとして機能しているとは考えられないということである。前述のように、麻疹患者体内ではSLAM陰性と思われる多くの細胞

においてウイルス感染が報告されている。このような細胞の感染に、この第三のレセプターが一役買っているのかも知れない。ただし、これらの細胞におけるウイルス感染が麻疹の病態においてどれだけの意義をもつかは今後慎重に検討していく必要があると思われる。

現時点においては第三のレセプターを同定するには至っていない。図3の結果から考えると、このレセプターは種を超えて広く分布していることが予想される。そのため、SLAMを同定した時に用いた発現クローニングはその同定には相応しくないだろう。CD46が見つかった時のように抗体によるスクリーニングが最も現実的かも知れない。

#### 文 献

- 1) Auwaerter, P. G., Rota, P. A., Elkins, W. R., Adams, R. J., DeLozier, T., Shi, Y., Bellini, W. J., Murphy, B. R., and Griffin, D. E. (1999). Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J. Infect. Dis.*, **180**, 950-958.
- 2) Aversa, G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Cocks, B. G., and de Vries, J. E. (1997). Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J. Immunol.*, **158**, 4036-4044.
- 3) Bacsko, K., Lampe, J., Liebert, U. G., Brinckmann, U., ter Meulen, V., Pardowitz, I., Budka, H., Cosby, S. L., Iserte, S., and Rima, B. K. (1993). Clonal expansion of hypermutated measles virus in a SSPE brain. *Virology*, **197**, 188-195.
- 4) Bartz, R., Brinckmann, U., Dunster, L. M., Rima, B., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (1996). Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *Virology*, **224**, 334-337.
- 5) Blumenthal, R., Bali-Puri, A., Walter, A., Covell, D., and Eidelman, O. (1987). pH-dependent fusion of vesicular stomatitis virus with Vero cells. Measurement by dequenching of octadecyl rhodamine fluorescence. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13614-13619.
- 6) Buckland, R., and Wild, T. F. (1997). Is CD46 the cellular receptor for measles virus? *Virus Res.*, **48**, 1-9.
- 7) Cocks, B. G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Yssel, H., de Vries, J. E., and Aversa, G. (1995). A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*, **376**, 260-263.
- 8) Compton, T., Nepomuceno, R. R., and Nowlin, D. M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology*, **191**, 387-395.
- 9) Dorig, R. E., Marcil, A., Chopra, A., and Richardson, C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*, **75**, 295-305.
- 10) Esolen, L. M., Takahashi, K., Johnson, R. T., Vaisberg, A., Moench, T. R., Wesselingh, S. L., and Griffin, D. E. (1995). Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. *J. Clin. Invest.*, **96**, 2478-2481.

- 11) Griffin, D. E.(2001). Measles virus, p. 1401–1441. In Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., and Straus, S. E.(ed.), *Fields Virology*, 4 ed. Lippincott–Raven, Philadelphia.
- 12) Hashimoto, K., Ono, N., Tatsuo, H., Minagawa, H., Takeda, M., Takeuchi, K., and Yanagi, Y.(2002). SLAM (CD150)–independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.*, **76**, 6743–6749.
- 13) Hsu, E. C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M. S., Udem, S. A., Dillehay, D. L., Xu, W., Rota, P. A., Bellini, W. J., and Richardson, C. D.(1998). A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J. Virol.*, **72**, 2905–2916.
- 14) Kimura, A., Tosaka, K., and Nakao, T.(1975). Measles rash. I. Light and electron microscopic study of skin eruptions. *Arch. Virol.*, **47**, 295–307.
- 15) Kirk, J., Zhou, A. L., McQuaid, S., Cosby, S. L., and Allen, I. V.(1991). Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis : ultrastructural and *in situ* hybridization evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **17**, 289–297.
- 16) Kobune, F., Sakata, H., and Sugiura, A.(1990). Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J. Virol.*, **64**, 700–705.
- 17) Lecouturier, V., Fayolle, J., Caballero, M., Carabana, J., Celma, M. L., Fernandez–Munoz, R., Wild, T. F., and Buckland, R.(1996). Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation : phenotypic markers that differentiate vaccine and wild–type MV strains. *J. Virol.*, **70**, 4200–4204.
- 18) Liszewski, M. K., Post, T. W., and Atkinson, J. P.(1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD 46) : newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.*, **9**, 431–455.
- 19) McChesney, M. B., Miller, C. J., Rota, P. A., Zhu, Y. D., Antipa, L., Lerche, N. W., Ahmed, R., and Bellini, W. J.(1997). Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology*, **233**, 74–84.
- 20) McFarlin, D. E., Bellini, W. J., Mingioli, E. S., Behar, T. N., and Trudgett, A.(1980). Monospecific antibody to the haemagglutinin of measles virus. *J. Gen. Virol.*, **48**, 425–429.
- 21) Minagawa, H., Tanaka, K., Ono, N., Tatsuo, H., and Yanagi, Y.(2001). Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2913–2917.
- 22) Moench, T. R., Griffin, D. E., Obriecht, C. R., Vaisberg, A. J., and Johnson, R. T.(1988). Acute measles in patients with and without neurological involvement : distribution of measles virus antigen and RNA. *J. Infect. Dis.*, **158**, 433–442.
- 23) Nanche, D., Varior–Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T. F., Rossi, B., Roubardin–Combe, C., and Gerlier, D.(1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.*, **67**, 6025–6032.
- 24) Ohgimoto, S., Ohgimoto, K., Niewiesk, S., Klagge, I. M., Pfeuffer, J., Johnston, I. C., Schneider–Schaulies, J., Weidmann, A., ter Meulen, V., and Schneider–Schaulies, S.(2001). The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells *in vitro*. *J. Gen. Virol.*, **82**, 1835–1844.
- 25) Ohkuma, S., and Poole, B.(1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3327–3331.
- 26) Ono, N., Tatsuo, H., Hidaka, Y., Aoki, T., Minagawa, H., and Yanagi, Y.(2001). Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.*, **75**, 4399–4401.
- 27) Patterson, J. B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M. A., and Oldstone, M. B.(2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors *in vivo*. *Virology*, **267**, 80–89.
- 28) Radecke, F., and Billeter, M. A.(1996). The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells. *Virology*, **217**, 418–421.
- 29) Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G., and Billeter, M. A.(1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.*, **14**, 5773–5784.
- 30) Richardson, C. D., Scheid, A., and Choppin, P. W.(1980). Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N–termini of the F 1 or HA 2 viral polypeptides. *Virology*, **105**, 205–222.
- 31) Rima, B. K., Earle, J. A., Baczkko, K., ter Meulen, V., Liebert, U. G., Carstens, C., Carabana, J., Caballero, M., Celma, M. L., and Fernandez–Munoz, R.(1997). Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J. Gen. Virol.*, **78**, 97–106.
- 32) Schneider, H., Kaelin, K., and Billeter, M. A.(1997). Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology*, **227**, 314–322.
- 33) Schneider–Schaulies, J., Dunster, L. M., Kobune, F., Rima, B., and ter Meulen, V.(1995). Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J. Virol.*, **69**, 7257–7259.
- 34) Schneider–Schaulies, J., Schnorr, J. J., Brinckmann, U., Dunster, L. M., Baczkko, K., Liebert, U. G., Schneider–Schaulies, S., and ter Meulen, V.(1995). Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild–type and vaccine strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3943–3947.
- 35) Seya, T., Hara, T., Matsumoto, M., and Akedo, H.(1990). Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down–regulated during cell differentiation. *J. Immunol.*, **145**,

- 238–245.
- 36) Shibahara, K., Hotta, H., Katayama, Y., and Homma, M. (1994). Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J. Gen. Virol.*, **75**, 3511–3516.
- 37) Sidhu, M. S., Crowley, J., Lowenthal, A., Karcher, D., Menonna, J., Cook, S., Udem, S., and Dowling, P. (1994). Defective measles virus in human subacute sclerosing panencephalitis brain. *Virology*, **202**, 631–641.
- 38) Sidorenko, S. P., and Clark, E. A. (1993). Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J. Immunol.*, **151**, 4614–4624.
- 39) Takada, A., Robison, C., Goto, H., Sanchez, A., Murti, K. G., Whitt, M. A., and Kawaoka, Y. (1997). A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14764–14769.
- 40) Takahashi, H., Umino, Y., Sato, T. A., Kohama, T., Ikeda, Y., Iijima, M., and Fujisawa, R. (1996). Detection and comparison of viral antigens in measles and rubella rashes. *Clin. Infect. Dis.*, **22**, 36–39.
- 41) Takeda, M., Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Nagai, Y., and Tashiro, M. (2000). Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J. Virol.*, **74**, 6643–6647.
- 42) Tanaka, K., Xie, M., and Yanagi, Y. (1998). The hemagglutinin of recent measles virus isolates induces cell fusion in a marmoset cell line, but not in other CD46-positive human and monkey cell lines, when expressed together with the F protein. *Arch. Virol.*, **143**, 213–225.
- 43) Tatsuo, H., Okuma, K., Tanaka, K., Ono, N., Minagawa, H., Takade, A., Matsuura, Y., and Yanagi, Y. (2000). Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.*, **74**, 4139–4145.
- 44) Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, **406**, 893–897.
- 45) Tober, C., Seufert, M., Schneider, H., Billeter, M. A., Johnston, I. C., Niewiesk, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J. Virol.*, **72**, 8124–8132.
- 46) Valsamakis, A., Schneider, H., Auwaerter, P. G., Kaneshima, H., Billeter, M. A., and Griffin, D. E. (1998). Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes *in vivo*. *J. Virol.*, **72**, 7754–7761.
- 47) Wileman, T., Harding, C., and Stahl, P. (1985). Receptor-mediated endocytosis. *Biochem. J.*, **232**, 1–14.
- 48) Xie, M., Tanaka, K., Ono, N., Minagawa, H., and Yanagi, Y. (1999). Amino acid substitutions at position 481 differently affect the ability of the measles virus hemagglutinin to induce cell fusion in monkey and marmoset cells co-expressing the fusion protein. *Arch. Virol.*, **144**, 1689–1699.