

1. ピコルナウイルス

武田 直和

はじめに

ピコルナウイルス (Picornaviruses) は極めて小さい (ピコ = pico), リボ核酸 (ルナ = rna) を遺伝子にもつウイルスである¹⁾。ポリオウイルスをはじめとして200以上の血清型のウイルスがこのグループを構成する²⁾。急性灰白髄膜炎, 無菌性髄膜炎, ヘルパンギーナ, 手足口病, 心筋炎, 急性出血性結膜炎, 急性肝炎, 急性胃腸炎, 上下気道炎など, 個々のウイルスによって引き起こされる症状は多彩である³⁾。ウイルス遺伝子の5'末端に共有結合するVPgの発見, Cap非依存的翻訳開始に機能するIRESの発見, 宿主細胞のeIF4Gを分解しshutoffをおこす2Aプロテアーゼの発見, 正二十面体粒子の5回対称軸頂点を同心円状に取り囲むキャニオンとよばれるレセプター結合部位の発見など, 多くの新事実がピコルナウイルスで明らかにされてきた⁴⁻⁷⁾。ポリオウイルスはプラス一本鎖RNAウイルスとしては最初に全塩基配列が明らかにされたウイルスである⁸⁾。全長遺伝子を組み込んだプラスミドに感染性があることがはじめて証明されたのもポリオウイルスであり, PVはその後のリバーシジェネティックスの隆盛を切り開いてきた⁹⁾。本稿ではポリオウイルスを中心にピコルナウイルスについての知見を概説する。

200を超える血清型

1999年のICTV第7回報告 (Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses) において, ピコルナウイルス科は9つの属に分類されることになった (図1)。これまではウイルス粒子の物理化学的性状および血清学的性状で分類されてきたが, 今回はこれらのほかに塩基配列の類似性が加味された。9つの属のうち, エンテロウイルス (Enterovirus), ライノウイルス (Rhinovi-

rus), ヘパトウイルス (Hepatovirus), パレコウイルス (Parechovirus), コブウイルス (Kobuvirus) の5つの属に含まれるウイルスがヒトの疾病に関与している。カルディオウイルス (Cardiovirus), アフソウイルス (Aphthovirus), エルボウイルス (Erbovirus), テスコウイルス (Teschovirus) は, それぞれマウス, 偶蹄類, ウマ, ブタを宿主とするウイルスである²⁾。エンテロウイルスだけをとてもポリオウイルス1~3型, A群コクサッキーウイルス1~24型, B群コクサッキーウイルス1~6型, エコーウイルス1~33型, エンテロウイルス68~71の64種類の血清型が知られている (後の解析によって, 実は同じウイルスであったり, ほかの属のウイルスであったりしたため合計数は71より少ない)³⁾。ライノウイルスには100以上の血清型があるが, ヘパトウイルスであるA型肝炎ウイルスの血清型は1つだけである。パレコウイルスは, 以前にエコーウイルス22型と23型といわれたウイルスであり, 今回新しい属として独立した。コブウイルスのアイチウイルスは最近になって愛知県衛生研究所の山下らによって発見されたウイルスである¹⁰⁾。鳥や魚類を宿主とするウイルスにも類似のウイルスがあり, 脊椎動物の世界に広く浸透しているウイルスである。

丸く見えるが実は正二十面体

ピコルナウイルス粒子を電子顕微鏡で観察すると, 直径が約30nmのエンベロープを持たない小型の球形ウイルスにみえる³⁾。1985年, ほぼ時期を同じくしてポリオウイルス1型とライノウイルス14型粒子の三次構造がX線結晶解析で明らかにされたが^{7,8)}, 以来, カルディオウイルスのメンゴウイルスやアフソウイルスのFMDVをはじめ, 多くのピコルナウイルスで構造解析がなされた^{12,13)}。これらの解析から電子顕微鏡下に丸く見えたウイルス粒子も, 実は正二十面体で, 4種類の構造蛋白 (VP1~4) がそれぞれ60分子集合してひとつの粒子を形成することが明らかになった。VP1~3は粒子表面に, VP4は粒子内部に位置すること, VP1~3はアミノ酸配列が異なるにもかかわらず類似の立体構造をとること, VP4はそれ自身で機能するというより, むしろVP2のアミノ末端としての役割があるらしいことがわかっている。事実, パレコウイル

国立感染症研究所ウイルス第2部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)

Picornaviruses

Naokazu Takeda

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases

Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

TEL: 03-5285-1111

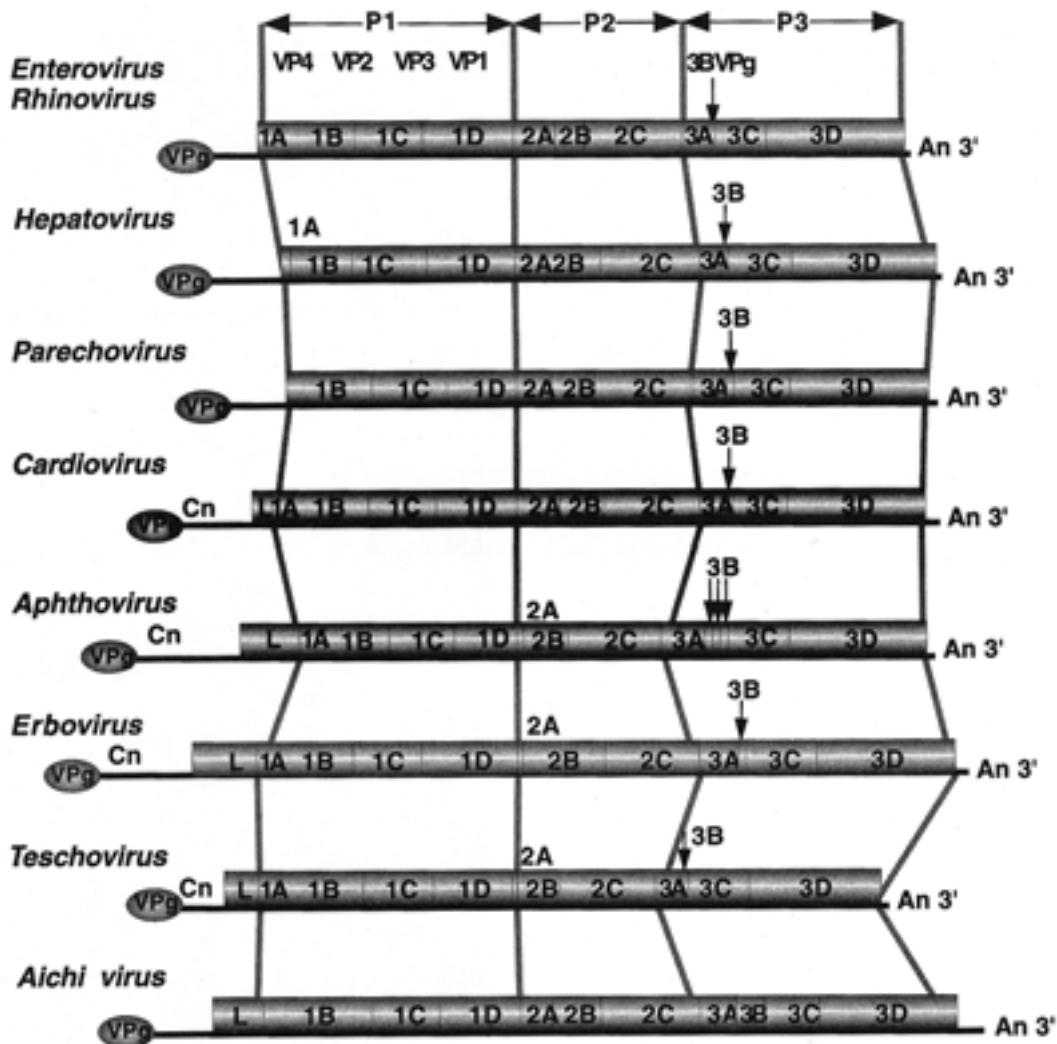


図1 ピコルナウイルスの遺伝子構造. 文献3)による.

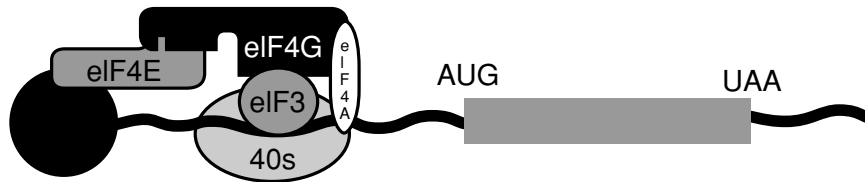
スではVP2とVP4の前駆体であるVP0のままでとり込まれて粒子が形成されている^{14,15)}. VP4のアミノ末端のグリシンにはミリスチン酸が結合しているが、粒子形成と構造蛋白の安定化に役立っているらしい^{16,17)}. 構造解析におけるもっとも大きな収穫は、粒子表面の5回対称軸を同心円状に取り囲むように深い溝キャニオン(canyon)が存在することを明らかにしたことである. 当初からキャニオンは宿主細胞表面にあるレセプター分子に結合する部位ではないかと予想されていたが、後にポリオウイルスとライノウイルスでこの仮説が証明されている. しかし、全てのピコルナウイルスがこの法則に従うわけではなく、カルデイオウイルスやアソウイルスではキャニオンはなく粒子のほかの領域がレセプターとの結合に使われている. キャニオンをもつピコルナウイルスでは、そのVP1で形成される基底部に疎水性の小さな小部屋があって、ポリオウイルス1型と3型ではスフィンゴシン(sphingosine)が^{18,19)}、コクサッキーウイルスB3では脂肪酸が入り込んでい

る²⁰⁾. ライノウイルスではこれが脂質であったり、全くの空っぽであることもある²¹⁾.

巧妙な宿主細胞乗っ取り法

ピコルナウイルスの遺伝子は、3'末端にポリAをもつ7~8.5kbのプラス一本鎖RNAで、それ自身が感染性を有する(図1). ポリオウイルスの場合、5'末端の塩基配列はUUAAAACAG—であるが、5'末端のウリジンにはVPg(virion protein, genome-linked)とよばれる小さな蛋白(22~24アミノ酸)が、VPgのN末端から3番目のチロシンと共有結合している^{22,23)}. VPgはウイルス遺伝子がコードする蛋白のひとつで、通常遺伝子上には1コピーだけであるが、面白いことにアソウイルスではアミノ酸配列が多少異なる3つのVPgが連続して遺伝子上にコードされている¹⁾. 感染細胞からポリオウイルスmRNAを分離してその5'末端を調べてみると、全てウリジンになっている. これは感染細胞中のunlinking enzymeによ

Cap 依存型



IRES 依存型

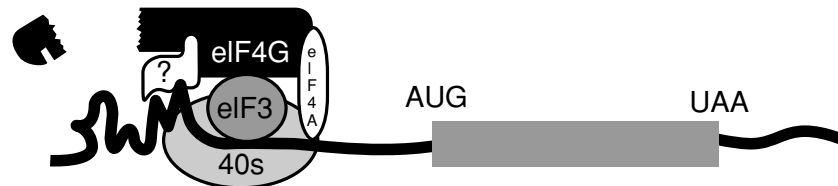


図2 ピコルナウイルスの翻訳開始機構. 文献1)による.

って VPg が取り除かれた結果であるが、mRNA とゲノム RNA との違いは VPg があるかないかだけである²⁴⁾。感染宿主細胞では cap 構造をもった mRNA の蛋白合成が完全に止まってしまうのに (shutoff という)、どうして Cap 構造がないポリオウイルス mRNA の翻訳は効率よく行われるのか? この答えはウイルスがコードするプロテアーゼ 2A^{pro} の機能解析と 5' 非翻訳領域にコードされる IRES (Internal Ribosome Entry Site) の発見によって明らかになった (図 2)。現在のモデルはこうである。通常の cap 依存的蛋白合成では、mRNA の 5' 末端で eIF 4 A (RNA ヘリカーゼ)、eIF 4 E (cap 結合蛋白)、eIF 4 G が複合体を形成し、eIF 3-40s リボソーム複合体が eIF 4 G を介して mRNA に結合して翻訳を開始する。ポリオウイルス感染細胞で何が起るかという、本来はウイルスの前駆体蛋白の切断に機能するプロテアーゼ 2A が eIF 4 G をも切断してしまう。そのため eIF 4 G は eIF 4 E に結合活性のある領域を持つ断片と eIF 3 に結合活性のある部位を持つ残りの断片に解離してしまい、cap 依存的蛋白合成開始複合体が形成されなくなる。一方、IRES 依存的蛋白合成開始では、たとえ切断を受けていようが eIF 4 G は IRES に特異的に結合する宿主細胞因子を介して mRNA に結合できるため、eIF 3-40S リボソーム複合体がこの eIF 4 G を介して翻訳を開始することができる。IRES はウイルス RNA のみならず細胞の mRNA でも見つかっている。事実、eIF 4 G 自身の mRNA も IRES をもっているため、たとえ宿主細胞が shutoff 状態でも供給はとぎれるがことなく、ポリオウイルスの蛋白合成が進行するわけである²⁵⁾。これまで IRES に結合する細胞因子として La, unr, ポリ

ピリミジン結合蛋白 (polypyrimidine tract-binding protein) などが見つかっているが、全てのピコルナウイルスで共通に機能する因子は見つかっていない。

複雑なマイナス鎖合成開始機構

RNA 複製の過程で生じた新生 RNA は、プラス鎖であろうとマイナス鎖であろうと、その 5' 末端には VPg が結合している。したがって VPg が RNA 合成開始に関与していると考えるのは当然のことである。VPg のみならずウリジル化された VPg (VPg-pUpU) がポリオウイルス感染細胞中にみつかること、感染細胞から分離した膜分画で VPg→VPg-pUpU 反応が進行すること、などが明らかになるにつれ、VPg が RNA 合成のプライマーらしいことが予想されていた。現在においては蛋白がプライマーとして機能する RNA 合成機構は確かなものとして受け入れられている。そのメカニズムは依然として不明であったが、ここ 2-3 年の研究で確かなものになってきた。まさにウイルスは全ての機能を総動員して複製に当たっているように見える。ポリオウイルスの場合は、遺伝子上のちょうど真中辺りにあって、ヘリカーゼと考えられる 2C 内に AAACA というモチーフが見つかったことによる。この配列は cre (cis-acting replication element) とよばれ、ピコルナウイルスに共通に見出される配列で、2C 内に形成されるステムループ構造のループ部にみいだされる。ライノウイルス 14 型では VP1 に、ライノウイルス 2 型では 2A^{pro} にみいだされる。提案されているモデルを図 3 に示した^{26,27)}。VPg は 3D^{pol} と複合体を形成し、3CD^{pro} とともに AAACA モチーフに結合する。ウリジル化における 3CD^{pro}

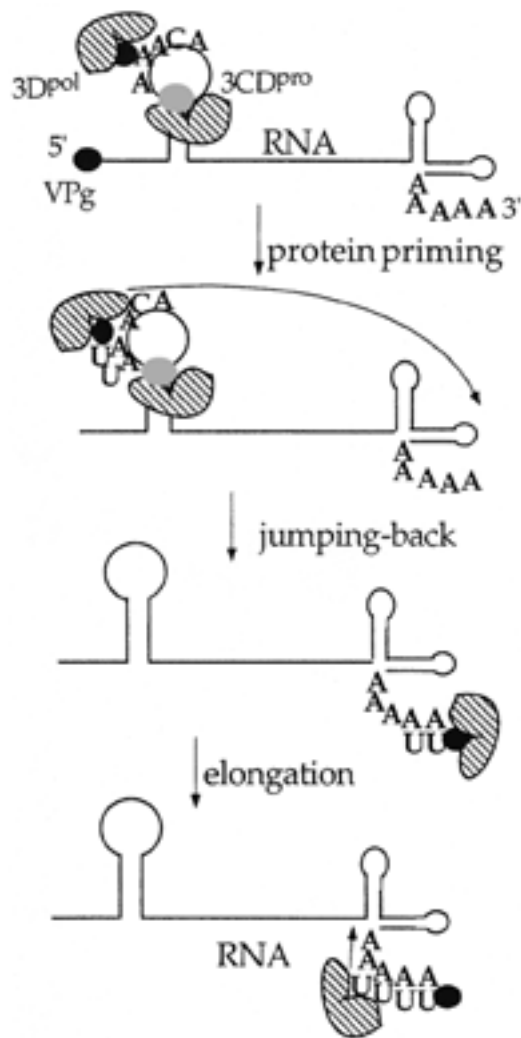


図3 ポリオウイルスマイナス鎖合成開始機構。
文献26)による。

おわりに

紀元前1400年のエジプトで記載があるほど歴史的に古いポリオウイルスは、南北アメリカ大陸とわが国を含む西太平洋地域で根絶された。百年前にろ過性病原体として発見されたFMDVは、一昨年ヨーロッパで猛威をふるった。十年前にはわが国で新種のピコルナウイルスとしてアイチウイルスが発見された。ピコルナウイルスは常に我々の身近にあって、脅威となってきたウイルスである。世界的に見ればかなり活発に研究されているウイルスではあるが、ウイルス複製のどの過程をとっても分子レベルで満足に説明できる部分は少ない。しかし、新たな事実が次々に明らかになってきているウイルスでもある。それに、まだまだウイルスハンティングを楽しめるウイルスでもある。若い研究者の参入を期待したい。

文 献

- 1) Racaniello VR: Picornaviridae: The Viruses and Their Replication; in Knipe DM and Howley PM (eds): Fields Virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, vol 1, pp685-722.
- 2) Pallansch MA, Roos RP: Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses; in Knipe DM and Howley PM (eds): Fields Virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, vol 1, pp723-775.
- 3) Family Picornaviridae; in van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR and Wickner RB (eds): Virus Taxonomy. San Diego, Academic Press, 2000, pp657-678.
- 4) Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, Wimmer E: A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; **74**: 59-63.
- 5) Stewart SR, Semler BL: RNA determinants of picornavirus cap-independent translation initiation. Semin. Virol. 1997; **8**: 242-255.
- 6) Toyoda H, Nicklin MJ, Murray MG, Anderson CW, Dunn JJ, Studier FW, Wimmer E: A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. Cell 1986; **45**: 761-770.
- 7) Hogle JM, Chow M, Filman DJ: Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. Science 1985; **229**: 1358-1365.
- 8) Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, Frankenberger EA, Griffith JP, Hecht HJ, Johnson JE, Kamerling G, Luo M, Mosser AG, et al.: Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. Nature 1985; **317**: 145-153.
- 9) Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E: Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature 1981; **291**: 547-553.
- 10) Racaniello VR, Baltimore D: Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. Sci-

の役割は不明であるが、これがあると反応が著しく促進される。3D^{pol}はこのモチーフの最初のAAを鋳型にして(3D^{pol}は鋳型依存性RNA合成酵素である)UUをVPgに付加してVPg-pUpUを生成する。3D^{pol}とVPg-pUpU複合体はモチーフを離れ、ジャンプして鋳型RNAの3'末端のポリAに付着する。VPg-pUpUがプライマーとなってマイナス鎖の伸長反応は進行してゆく。昨年の発表ではAAACAを鋳型にして進行するVPgのウリジリ化は、はじめにA₁A₂ACAモチーフのA₁が認識されてVPg-pUができる。おもしろいことにその後でVPg-pUはA₂に一塩基戻り(slide-back),再びA₁を認識してVPg-pUpUが生成する。結局、ウリジリ化の鋳型に使われているのはAAACAの最初のAだけということになる。ジャンプはどのようにしておこなうのか? プラス鎖の合成開始の場合はどうなのか? いろいろ疑問は残るが、着実な成果の一つとして紹介したい。

- ence 1981 ; **214** : 916–919.
- 11) Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa N, Takeda N, Miyamura T, Yamazaki S : Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. *J Virol* 1998 ; **72** : 8408–8412.
 - 12) Krishnaswamy S, Rossmann MG : Structural refinement and analysis of Mengo virus. *J Mol Biol* 1990 ; **211** : 803–844.
 - 13) Parry N, Fox G, Rowlands D, Brown F, Fry E, Acharya R, Logan D, Stuart D : Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* 1990 ; **347** : 569–572.
 - 14) Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, Kinnunen L, Stanway G : A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 ; **89** : 8847–8851.
 - 15) Oberste MS, Maher K, Pallansch MA : Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. *Virus Res* 1998 ; **56** : 217–223.
 - 16) Paul AV, Schultz A, Pincus SE, Oroszlan S, Wimmer E : Capsid protein VP 4 of poliovirus is N-myristoylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 ; **84** : 7827–7831.
 - 17) Chow M, Newman JF, Filman D, Hogle JM, Rowlands DJ, Brown F : Myristylation of picornavirus capsid protein VP 4 and its structural significance. *Nature* 1987 ; **327** : 482–486.
 - 18) Filman DJ, Syed R, Chow M, Macadam AJ, Minor PD, Hogle JM : Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *Embo J* 1989 ; **8** : 1567–1579.
 - 19) Yeates TO, Jacobson DH, Martin A, Wychowski C, Girard M, Filman DJ, Hogle JM : Three-dimensional structure of a mouse-adapted type 2/type 1 poliovirus chimera. *Embo J* 1991 ; **10** : 2331–2341.
 - 20) Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I, Diana G, Dutko FJ, Groarke J, Pevear DC, Rossmann MG : The structure of coxsackievirus B 3 at 3.5 Å resolution. *Structure* 1995 ; **3** : 653–667.
 - 21) Arnold E, Rossmann MG : Analysis of the structure of a common cold virus, human rhinovirus 14, refined at a resolution of 3.0 Å. *J Mol Biol* 1990 ; **211** : 763–801.
 - 22) Ambros V, Baltimore D : Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *J Biol Chem* 1978 ; **253** : 5263–5266.
 - 23) Rothberg PG, Harris TJ, Nomoto A, Wimmer E : O⁴-(5'-uridylyl) tyrosine is the bond between the genome-linked protein and the RNA of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978 ; **75** : 4868–4872.
 - 24) Ambros V, Pettersson RF, Baltimore D : An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* 1978 ; **15** : 1439–1446.
 - 25) Gan W, LaCelle M, Rhoads RE : Functional characterization of the internal ribosome entry site of eIF 4 G mRNA. *J Biol Chem* 1998 ; **273** : 5006–5012.
 - 26) Paul AV, Rieder E, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E : Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the *in vitro* uridylylation of VPg. *J Virol* 2000 ; **74** : 10359–10370.
 - 27) Rieder E, Paul AV, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E : Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 2000 ; **74** : 10371–10380.