

# 1. アイチウイルスの複製機構の解析

佐々木 潤

藤田保健衛生大学医学部 ウイルス・寄生虫学講座

アイチウイルスは 1989 年に愛知県で発生した胃腸炎集団発生の患者便から初めて分離されたピコルナウイルスである。我々はこの新規ウイルスの複製機構の解析を通し、ピコルナウイルスの複製機構に関する新たな知見を得ること目的とした研究を行ってきた。これまでに、ゲノム 5'末端領域および非構造タンパク質の一つである L タンパク質の機能を解析した結果、両者がともにゲノム複製と encapsidation の双方に関わることを明らかにした。

## 1. アイチウイルス

アイチウイルス (AiV) は、1989 年に愛知県で生カキが原因で集団発生した胃腸炎患者の便から初めて分離された<sup>29)</sup>。その後 1998 年にゲノムの全塩基配列が決定された。AiV のゲノムは 8,279 塩基と poly (A) からなるプラス鎖 RNA で、2,432 アミノ酸をコードし得る翻訳領域を有し、5'および 3'非翻訳領域はそれぞれ 744, 240 塩基であった<sup>19, 32)</sup> (図 1)。塩基配列およびアミノ酸配列の解析の結果、ピコルナウイルス科の新しい属、コブウイルス属に分類された。

国内外での疫学研究が進むにつれ、わが国のみならず東南アジアやドイツ、ブラジルでも胃腸炎患者からの検出例が報告されるようになり<sup>17, 30, 31)</sup>、世界的に広く分布するウイルスであることが分かってきた。ただ、わが国の胃腸炎集団発生事例において、ウイルス性食中毒の主要な原因ウイルスであるノロウイルスと AiV 両方の検出が試みられた 12 事例のうち、AiV 陽性は 3 事例であったが、ノロウイルスは 12 事例全てで検出されたという報告がある<sup>33)</sup>。従って現段階では、AiV が単独で胃腸炎を起こすのか否かは明らかでない。ヒト体内での増殖部位もいまだ特定されておらず、感染病理を明らかにすることは今後の重要な課題

である。

## 2. ピコルナウイルスの性状と複製

ピコルナウイルスはエンベロープのない、直径 30nm の球状ウイルスである。長さ 7000-8500 塩基の一本鎖、プラス鎖 RNA をゲノムとし、哺乳類に感染する。ピコルナウイルス科は現在 9 属 (エンテロウイルス属、ライノウイルス属、カルジオウイルス属、アフトウイルス属、ヘパトウイルス属、パレコウイルス属、エルボウイルス属、コブウイルス属、テスコウイルス属) に分類されており<sup>24)</sup>、ポリオウイルス (エンテロウイルス属) やライノウイルス (ライノウイルス属)、A 型肝炎ウイルス (ヘパトウイルス属)、口蹄疫ウイルス (foot-and-mouth disease virus; FMDV) (アフトウイルス属) など、人や動物のよく知られた病原体が本科に属する。

ウイルスが細胞に吸着・侵入した後、細胞質にゲノムが放出される。プラス鎖 RNA であるゲノムはまず mRNA として働く。ウイルスタンパク質はポリプロテインとして翻訳された後、ウイルス自身のコードするプロテアーゼによって、構造タンパク質やゲノム複製に関わる各種非構造タンパク質など、各々の機能を持つタンパク質へと切断される。プラス鎖ゲノムは続いてマイナス鎖合成の鋳型として利用され、さらに合成されたマイナス鎖を鋳型にプラス鎖 RNA が大量に合成される。新たに合成されたプラス鎖は構造タンパク質と会合しウイルス粒子が形成され、細胞の崩壊に伴い細胞外へと放出される。

新規ウイルスの複製機構の解析を通し、ピコルナウイルスの複製機構に関する新たな知見を得ること目的として、我々はこれまでに、AiV のゲノム 5'末端領域の機能解析と

### 連絡先

〒 470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98  
藤田保健衛生大学医学部 ウイルス・寄生虫学講座  
TEL : 0562-93-2486  
FAX : 0562-93-4008  
E-mail : jsasaki@fujita-hu.ac.jp

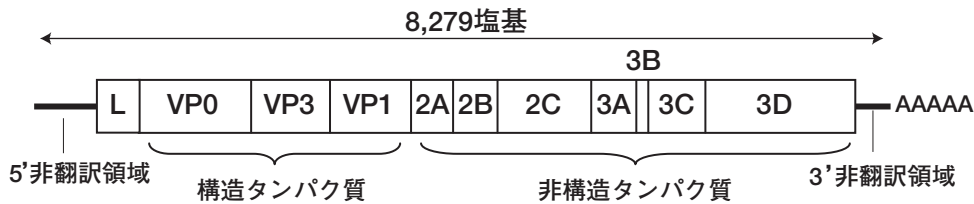


図1 アイチウイルスのゲノム構造.

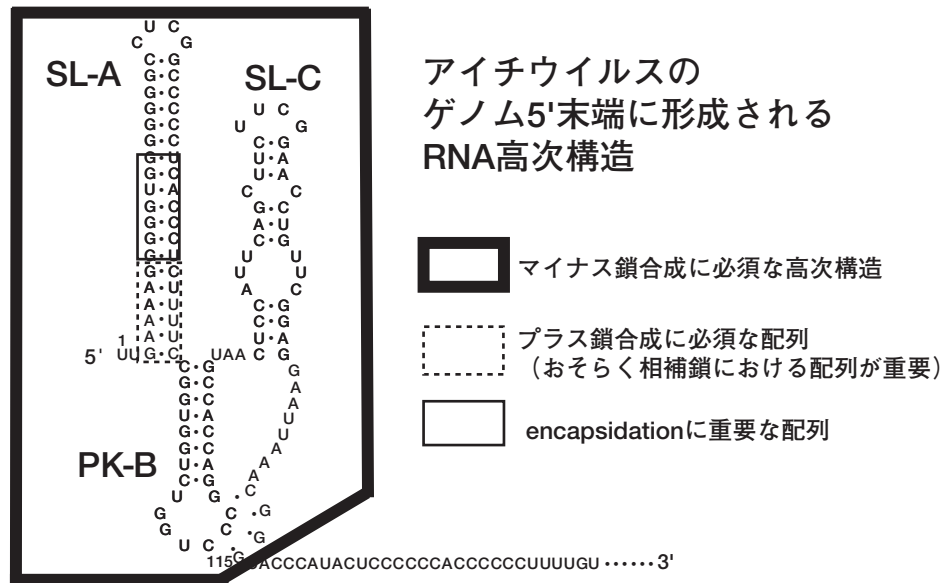


図2 ゲノム5'末端領域に形成される高次構造.

非構造タンパク質の一つ、Leader (L) タンパク質の機能解析を行ってきた。以下に、現在までに我々が得た知見を報告する。

### 3. ゲノム5'末端領域の解析

ピコルナウイルスのゲノム5'末端は、ゲノム複製に重要な働きをもつ領域である。ピコルナウイルスのゲノム5'末端に形成される二次構造には、大きく分けて2つのタイプがあり、エンテロウイルスやライノウイルスではクローバーリーフ構造、カルジオ・アフト・ヘパト・パレコウイルスではステム-ループ構造（シュードノット構造を含む場合もある）をそれぞれ形成する<sup>1, 2, 4, 7, 14</sup>。我々が研究を開始した時点では、ポリオウイルスゲノムのクローバーリーフ構造の研究に比べ、他のウイルスのステム-ループ構造に関する研究は少なかった。AiVゲノム5'末端領域をRNA二次構造予測プログラムを用いて解析したところ、ステム-ループ構造の形成が予測されたが、塩基配列やステム-ループ構造のサイズについては他のウイルスとは異なっていた。

そこで、ウイルス複製におけるこれら高次構造の重要性をリバースジェネティクスにより詳細に調査した。

RNA二次構造予測プログラムによりAiVゲノム5'末端領域に推測されたステム-ループ構造のステムの塩基対形成を壊したり、塩基対形成を壊さずに配列を置換した変異を導入した多数の変異体を作成した。これらの変異体の培養細胞でのRNA複製能とウイルス産生能を調べ、それぞれの二次構造や一次配列の重要性を決定した。その結果、ゲノム5'末端115塩基に形成される2つのステム-ループ(SL-AおよびSL-C)と1つのシュードノット構造(PK-B)(**図2**)のどのステム部分の塩基対形成を壊してもRNAが複製しなくなったことから、これらの高次構造がRNA複製に必要であることが分かった。また、最も5'末端に形成されるステム-ループSL-Aは、高次構造に加え、ステム下部の塩基配列もRNA複製に重要であった<sup>12, 13, 19</sup>(**図3A, mut9**)。さらに、AiVのIRESを別のピコルナウイルスである脳心筋炎ウイルス(encephalomyocarditis virus; EMCV)のIRESと入れ換えたキメラRNAをベースに、

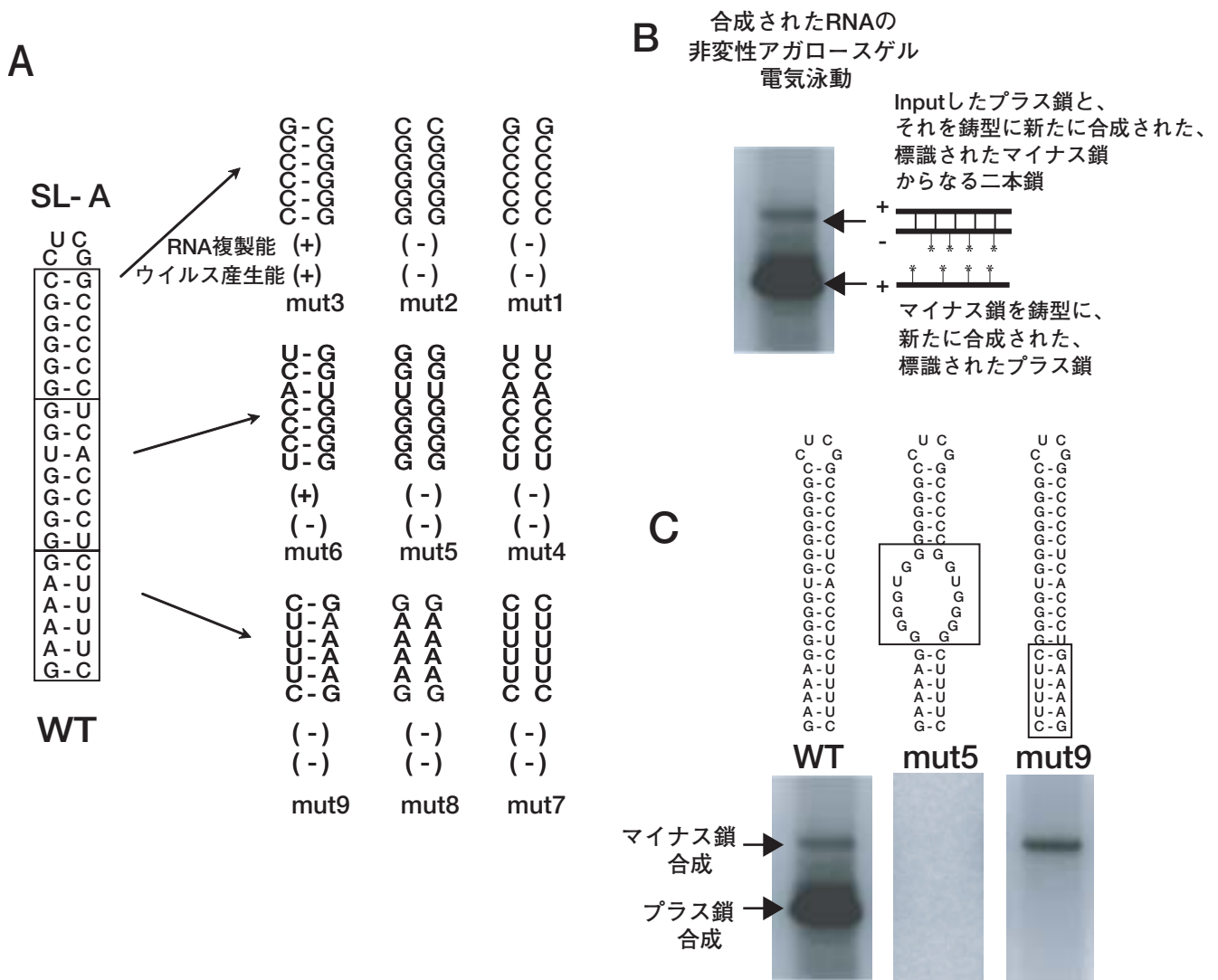


図3 A. SL-A の各種変異体の Vero 細胞での増殖能の解析結果. B. 無細胞翻訳-複製系におけるアイチウイルス RNA 合成の解析.  $[^{32}\text{P}]\text{CTP}$  を加えた反応液から抽出した全 RNA を非変性アガロースゲルで泳動し、シグナルを検出した. C. 無細胞翻訳-複製系における SL-A 変異体の RNA 合成の解析.

様々な長さの5'末端領域をもつ変異体を作成し、ゲノム複製に必要な領域の範囲を決定した(図4). その結果、シユードノット構造を含む5'末端115塩基がゲノム複製に最低限必要な領域であることが分かった.

#### 4. 無細胞翻訳-複製系を用いた解析

ある変異 RNA が培養細胞で複製しない時、マイナス鎖を合成できない場合とマイナス鎖は合成できるがプラス鎖を合成できない場合があり、これを判別することは、マイナス鎖合成とプラス鎖合成それぞれのメカニズムを明らかにしていく上で重要となる. この判別を容易に行うことが可能な手法が、無細胞翻訳-複製系である.

非感染培養細胞の細胞質抽出液にアミノ酸, rNTP,  $\text{K}^+$ ,

$\text{Mg}^{2+}$ などを補充し、さらにウイルス RNA を加えると、まずウイルス RNA からタンパク質が合成され、続いて RNA が複製し、最終的に感染性ウイルスが得られる. つまり、in vitro でウイルス複製を再現できる. この無細胞翻訳-複製系は1991年に HeLa 細胞質抽出液を用いてポリオウイルスで開発され<sup>11)</sup>, ゲノム RNA 複製をはじめ様々なポリオウイルス複製研究に利用されてきたが、他のウイルスではごく最近まで利用されていなかった<sup>10, 26)</sup>. 我々は AiV 感受性細胞である Vero 細胞の抽出液を用いて、AiV のための無細胞翻訳-複製系を確立した<sup>13)</sup>.

RI 標識塩基を加えて反応を行うと、反応液中で新たに合成された RNA が標識される. 反応液から全 RNA を抽出し、非変性アガロースゲルで電気泳動すると、二本鎖と一

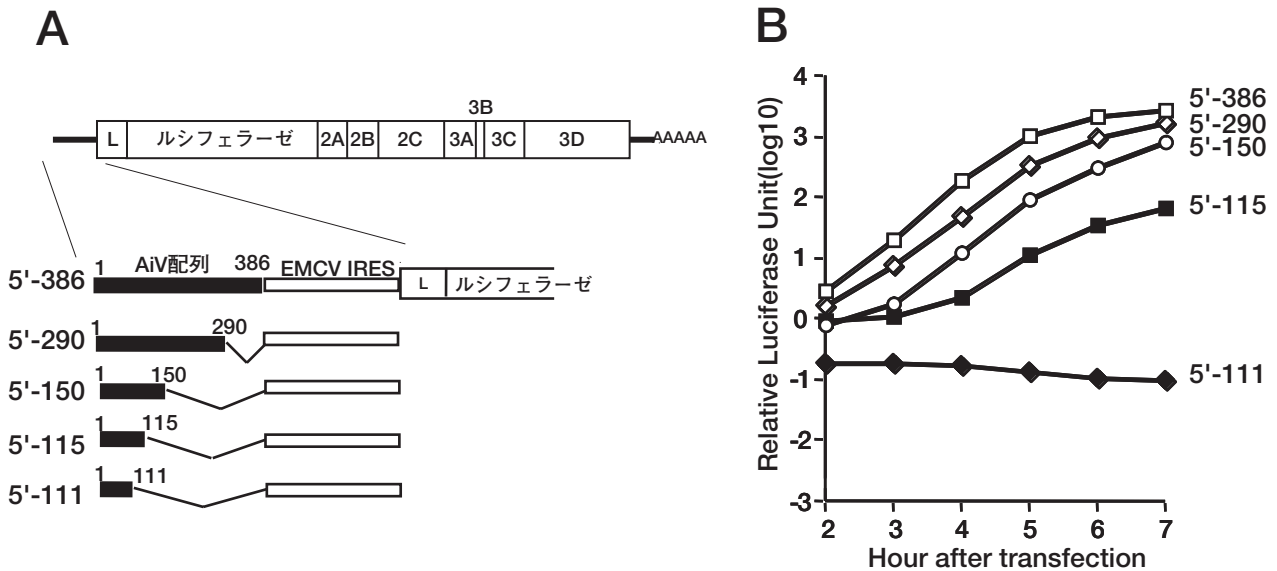
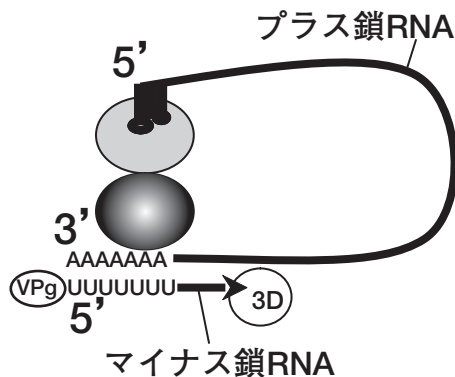


図4 A. キャプシドコード領域をルシフェラーゼ遺伝子に置き換えたレプリコンのIRESをさらにEMCV IRESと入れ換えたキメラレプリコン(5'-386)と、そのAiV由来5'末端配列の段階欠失変異体。B. Vero細胞におけるキメラレプリコンのRNA複製能。RNAをトランスフェクトしたVero細胞から経時的に抽出液を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

## マイナス鎖RNA合成



## プラス鎖RNA合成

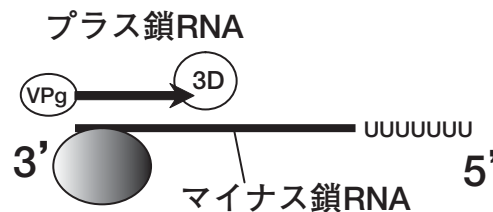


図5 アイチウイルスのマイナス鎖合成およびプラス鎖合成のモデル。ウイルスタンパク質VPgはプロテインプライマー、3DはRNA依存RNAポリメラーゼである。マイナス鎖合成開始時には、タンパク質を介したゲノム環状構造が形成されると推測される。一方、プラス鎖合成開始においては、マイナス鎖の3'末端の塩基配列が、プラス鎖合成に必要なタンパク質の結合部位として重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

本鎖の標識されたRNAが検出される(図3B)。二本鎖は、最初に加えたプラス鎖RNAを鋳型に新たにマイナス鎖が合成されてできたreplicative form(RF)であり、一本鎖は、その合成されたマイナス鎖を鋳型に、新たに大量に合成されたプラス鎖である。つまり、二本鎖はマイナス鎖合成の、一本鎖はプラス鎖合成の指標となる。

細胞で複製が認められなかったゲノム5'末端変異体のRNA合成をこの系で解析したところ(図3C)、SL-Aのス

テム構造を壊すとマイナス鎖合成も起こらなくなった(mut5)。SL-BやPK-Bのステム構造を壊しても同様の結果が得られた<sup>13)</sup>。一方、SL-A下部のステム形成を保ったまま塩基置換した変異体では、マイナス鎖合成は起こるがプラス鎖が合成されなかった(mut9)<sup>13)</sup>。以上の結果から、高次構造形成はマイナス鎖合成に、5'末端の塩基配列はプラス鎖合成に重要な働きをしていると考えられた。これは、ポリオウイルスゲノム5'末端のクローバーリーフ構造で明

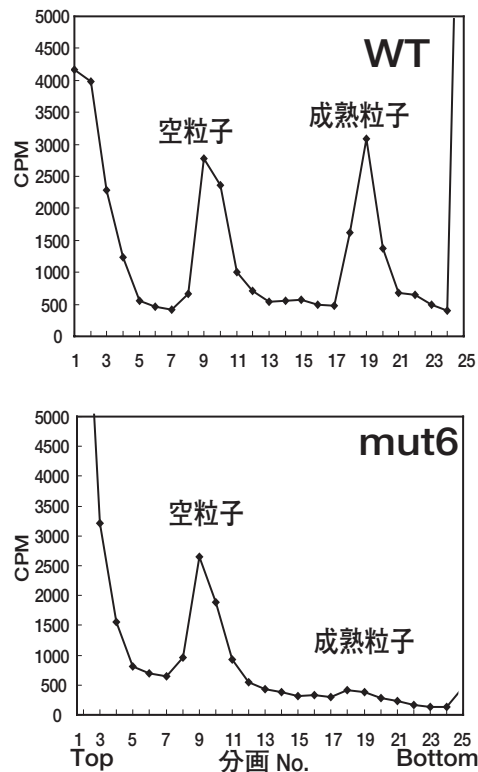


図6 Vero細胞における野生型 (WT) と mut6 の成熟粒子と空粒子産生量の比較. RNA をトランスフェクトした細胞を $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで標識した後, ウイルス粒子を回収し, ショ糖密度勾配遠心により成熟粒子と空粒子を分離した. 25分画に分け, 各分画のCPMを測定した.

らかにされた機能と同じであった<sup>3,9,23,28</sup>).

### 5. AiV のマイナス鎖合成とプラス鎖合成のモデル

AiVにおけるマイナス鎖合成とプラス鎖合成のモデルを図5に示した. ゲノム5'末端に形成される高次構造はマイナス鎖の合成に重要であったが, マイナス鎖の合成はゲノム3'末端の poly (A) を鋳型として開始することから, マイナス鎖合成開始時にはゲノム両末端が相互作用することが推測される. ポリオウイルスでは, ゲノム両末端にそれぞれ結合するタンパク質同志の結合を介してゲノムが環状構造をとることがマイナス鎖合成開始に必要であることが示されている<sup>9</sup>. また最近 FMDV では, ゲノム5'末端領域と3'非翻訳領域がタンパク質を介さずに直接相互作用することが報告された<sup>22</sup>).

AiVでも, ゲノム5'末端に特異的に結合するウイルスタンパク質と宿主タンパク質の存在が明らかとなっている(未発表). これらのタンパク質はポリオウイルスのゲノム5'末端に結合するタンパク質とは異なるものであった. 従って AiV のマイナス鎖合成において, PV の場合とは異なるタンパク質を利用したゲノム環状構造が形成される可能性が考えられた. FMDV で報告されたようなゲノム両末端

の直接的な相互作用については現時点では未検討である.

一方, プラス鎖の合成には SL-A の下部の塩基配列, つまり, ゲノム5'末端の一次配列が重要であった. プラス鎖の合成は, ゲノム5'末端の相補鎖であるマイナス鎖の3'末端を鋳型として開始する. このことから, マイナス鎖の3'末端の配列が, 3Dつまり RNA 依存 RNA ポリメラーゼを含めた, プラス鎖合成開始に関わるタンパク質の結合領域である可能性が考えられる. AiV のマイナス鎖3'末端に結合する因子については未検討であり, 今後明らかにしていきたい.

### 6. ゲノム5'末端領域の encapsidation への関与

AiV ゲノム5'末端領域は, ゲノム複製以外にも重要な働きをもつことが明らかとなった. SL-A のステム中央部に, ステム形成を保ったまま塩基配列を変える変異を導入した RNA (mut6) は, 効率良く複製するにもかかわらず, プラークを形成しないことが分かった<sup>19</sup> (図3A). 野生型 (WT) と mut6 とでは, 培養細胞で産生される成熟粒子とゲノムを取り込んでいない空粒子の産生量に違いがあり (図6), mut6 では空粒子は蓄積しているが, 成熟粒子量はごくわずかで, 野生型に比べ, encapsidation 効率が著しく低下し

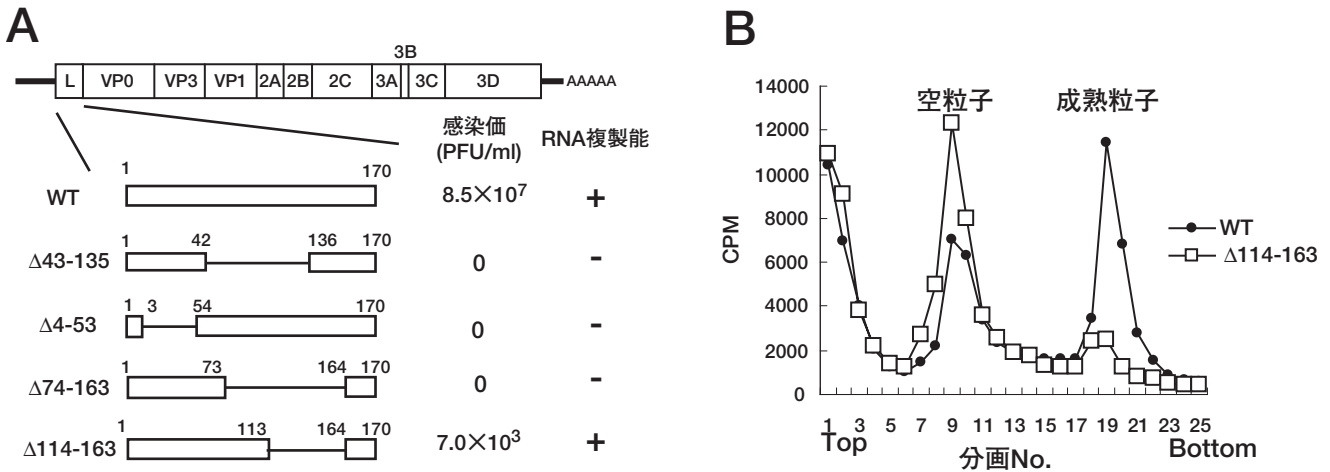


図7 A. Lタンパク質段階欠失変異体のVero細胞における感染性ウイルス産生能とRNA複製能. RNAをトランスフェクト後72時間で細胞を回収し, プラークアッセイを行うことにより感染性ウイルス産生能を決定した. B. Vero細胞における野生型 (WT) と  $\Delta 114-163$  の成熟粒子と空粒子産生量の比較.

ていることが示された<sup>21)</sup>.

以上の結果から, AiVゲノム5'末端領域は, ゲノムRNAの複製に加え, encapsidationにも重要な役割を果たしていることが明らかとなった. ピコルナウイルスの中で encapsidationに関与するRNA配列の存在が示されているのは, 現時点ではAiVだけである. ポリオウイルスではこれまでにゲノム5'末端領域の多種多様な変異体が解析されているが, 今のところ encapsidationとの関わりを示す報告はないため, ポリオウイルスの encapsidationに関与する配列は, 5'末端領域以外に存在するのかもしれない. 一方, パレコウイルスでは, ある程度のゲノム複製が起こるにもかかわらず, 感染性ウイルスを産生しないという性状を示す, ゲノム5'末端ステムループ構造の変異体が得られている<sup>14)</sup>. その論文で著者らは特に触れていないが, ゲノム5'末端ステムループ構造と encapsidationとの関わりを示している可能性も考えられ, 一層の調査が期待される.

### 7. Lタンパク質の機能

Leader (L) タンパク質は翻訳領域の先頭にコードされるタンパク質である. AiVのLタンパク質は170アミノ酸からなる (図7A). すべてのピコルナウイルスがLタンパク質をコードしているわけではなく, ポリオウイルスやライノウイルスはコードしない. また, コードしているウイルス間でも, 異なる属間ではアミノ酸配列の相同性は認められない. 今のところFMDVやカルジオウイルス属のEMCV, Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV), およびメンゴウイルスで機能解析が行われている. FMDVのLタンパク質はプロテアーゼであり, 自身のC末端側を切断する<sup>25)</sup>. また, 宿主の翻訳開始因子eIF4Gを切断すること

で, 宿主側の翻訳の shut-offにも関与する<sup>6)</sup>. 一方, カルジオウイルス属やAiVのLタンパク質にはプロテアーゼ活性はない.

AiVのLタンパク質のウイルス複製における機能を明らかにするために, 図7Aに示したような段階欠失変異体を作成し, それら変異体の性状を調査した. その結果, 43-135, 4-53, あるいは74-163番目のアミノ酸を欠失した変異体ではRNAが複製しなかったことから, AiVのLタンパク質がRNAの複製に必要であることが明らかとなった. また, 114-163番目のアミノ酸を欠失させた変異体 ( $\Delta 114-163$ ) は, RNA複製効率は野生型とほぼ同程度であったが, 感染性ウイルス産生量は野生型の1万分の1に減少した. そこで, 培養細胞中での $\Delta 114-163$ の成熟粒子および空粒子の形成を調べたところ, 野生型に比べ, 空粒子形成の増加と成熟粒子形成の著しい減少が認められ (図7B), AiVのLタンパク質が encapsidationにも関与しているものと考えられた<sup>20)</sup>.

他のピコルナウイルスのLタンパク質は培養細胞でのゲノム複製に必須ではないことが報告されているので<sup>5, 8, 18, 34)</sup>, 培養細胞でのゲノム複製に必須であるという点で, AiVのLタンパク質は他のウイルスとは異なっている. 一方, TMEVのLタンパク質が encapsidationに関与することが最近報告された<sup>27)</sup>. お互いに全くアミノ酸配列に相同性の認められないAiVとTMEVのLタンパク質が, encapsidationの過程において, それぞれどのような役割を果たしているのか, そのメカニズムの詳細が興味深い.

## 6. おわりに

細胞中でのピコルナウイルスゲノムの翻訳、複製、encapsidationは一連の流れの中で起こる。ゲノム RNA が複製するためには、まずその RNA からタンパク質を合成されなければならない<sup>15)</sup>、また、encapsidation の過程においては、新たに合成されたプラス鎖 RNA が、直ちにキャプシドタンパク質に取り込まれていくと考えられている<sup>16)</sup>。本研究では、ゲノム 5'末端領域と L タンパク質がゲノム複製と encapsidation 両方に関わることを明らかにした。今後、ゲノム複製から encapsidation に到る流れの中での、ゲノム 5'末端領域と L タンパク質の機能を明らかにしていければと考えている。

## 謝 辞

本研究にあたり御指導頂いた、藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座の谷口孝喜教授にお礼申し上げます。本研究のうち、ゲノム 5'末端の機能解析および未発表の成績は、当研究室の大学院生だった長嶋茂雄君（現在札幌医科大学医学部衛生学教室）と共同で行った実験によるものである。また、アイチウイルスの発見者である愛知県衛生研究所の山下照夫先生、栄賢司先生の様々な御助言に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, Baltimore D.: Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J* 12:3587-3598, 1993.
- 2) Andino R, Rieckhof GE, Baltimore D.: A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell* 63:369-380, 1990.
- 3) Barton DJ, O'Donnell BJ, Flanagan JB.: 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J* 20:1439-1448, 2001
- 4) Brown EA, Day SP, Jansen RW, Lemon SM.: The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro. *J Virol* 65:5828-5838, 1991.
- 5) Calenoff MA, Badshah CS, Dal Canto MC, Lipton HL, Rundell MK.: The leader polypeptide of Theiler's virus is essential for neurovirulence but not for virus growth in BHK cells. *J Virol* 69:5544-5549, 1995.
- 6) Devaney MA, Vakharia VN, Lloyd RE, Ehrenfeld E, Grubman MJ.: Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* 62:4407-4409, 1988.
- 7) Duke GM, Hoffman MA, Palmenberg AC.: Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation. *J Virol* 66:1602-1609, 1992.
- 8) Dvorak CM, Hall DJ, Hill M, Riddle M, Pranter A, Dillman J, Deibel M, Palmenberg AC.: Leader protein of encephalomyocarditis virus binds zinc, is phosphorylated during viral infection, and affects the efficiency of genome translation. *Virology* 290:261-271, 2001.
- 9) Herold J, Andino R.: Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* 7:581-591, 2001.
- 10) Komoda K, Naito S, Ishikawa M.: Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1863-1867, 2004.
- 11) Molla A, Paul AV, Wimmer E.: Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science* 254:1647-1651, 1991.
- 12) Nagashima S, Sasaki J, Taniguchi K.: Functional analysis of the stem-loop structures at the 5' end of the Aichi virus genome. *Virology* 313:56-65, 2003.
- 13) Nagashima S, Sasaki J, Taniguchi, K.: The 5'-terminal region of the Aichi virus genome encodes cis-acting replication elements required for positive- and negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 79:6918-6931, 2005.
- 14) Nateri AS, Hughes PJ, Stanway G.: Terminal RNA replication elements in human parechovirus 1. *J Virol* 76:13116-13122, 2002.
- 15) Novak JE, Kirkegaard K.: Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes Dev* 8:1726-1737, 1994.
- 16) Nugent CI, Johnson K, Sarnow P, Kirkegaard K.: Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J Virol* 73:427-435, 1999.
- 17) Oh D-Y, Silva PA, Hauroeder B, Diedrich S, Cardoso DD, Schreier E.: Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. *Arch Virol* 151:1199-1206, 2006.
- 18) Piccone ME, Rieder E, Mason PW, Grubman MJ.: The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J Virol* 69:5376-5382, 1995.
- 19) Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K, Takeda N, Taniguchi K.: Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. *J Virol* 75: 8021-8030, 2001.
- 20) Sasaki J, Nagashima S, Taniguchi K.: Aichi virus leader protein is involved in viral RNA replication and encapsidation. *J Virol* 77:10799-10807, 2003.
- 21) Sasaki J, Taniguchi K.: The 5'-end sequence of the genome of Aichi virus, a picornavirus, contains an element critical for viral RNA encapsidation. *J Virol* 77: 3542-3578, 2003.
- 22) Serrano P, Pulido MR, Sáiz M, Martínez-Salas E.: The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol* 87: 3013-3022, 2006.
- 23) Sharma N, O'Donnell BJ, Flanagan JB.: 3'-Terminal sequence in poliovirus negative-strand templates is the primary cis-acting element required for VPg-pUpU-primed positive-strand initiation. *J Virol* 79:

- 3565-3577, 2005.
- 24) Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Pal-lansch MA, Palmenberg AC, Skern T. In: "Virus Tax-onomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Eds. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Elsevier/Academic Press, London. p. 757-778, 2005.
  - 25) Strebel K, Beck E.: A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 58: 893-899, 1986.
  - 26) Svitkin YV, Sonenberg N.: Cell-free synthesis of encephalomyocarditis virus. *J Virol* 77:6551-6555, 2003.
  - 27) Takano-Maruyama M, Ohara Y, Asakura K, Okuwa T.: Theiler's murine encephalomyelitis virus leader protein amino acid residue 57 regulates subgroup-specific virus growth on BHK-21 Cells. *J Virol* 80: 12025-1203, 2006.
  - 28) Teterina NL, Egger D, Bienz K, Brown DM, Semler BL, Ehrenfeld E.: Requirements for assembly of poliovirus replication complexes and negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 75: 3841-3850, 2001.
  - 29) Yamashita T, Kobayashi S, Sakae K, Nakata S, Chiba S, Ishihara Y, Isomura S.: Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J Infect Dis* 164: 954-957, 1991.
  - 30) Yamashita T, Sakae K, Kobayashi S, Ishihara Y, Miyake T, Mubina A, Isomura S.: Isolation of cyto-pathic small round virus (Aichi virus) from Pakistani children and Japanese travelers from Southeast Asia. *Microbiol Immunol* 39:433-435, 1995.
  - 31) Yamashita T, Sakae K, Kobayashi S, Isomura S, Uta-gawa E.: Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. *J Clin Micro-biol* 31: 2938-2943, 1993.
  - 32) 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 associ-ated with acute gastroenteritis in humans. *J Virol* 72:8408-8412, 1998.
  - 33) 山下照夫: 新型ピコルナウイルス「アイチウイルス」の性状と疫学. *ウイルス* 49:183-191, 1999.
  - 34) Zoll J, Melchers WJG, Galama JMD, van Kuppeveld FJM.: The mengovirus leader protein suppresses alpha/beta interferon production by inhibition of the iron/ferritin-mediated activation of NF-kappa B. *J Virol* 76:9664-9672, 2002.

## Analysis of Aichi virus replication

**Jun SASAKI**

Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University School of Medicine

Aichi virus is a member of the Family *Picornaviridae*. This virus was first isolated in 1989 from a stool specimen from a patient with oyster-associated gastroenteritis in Aichi, Japan. We analyzed the function of the 5' terminal region of the genome and the leader protein in virus replication. The results indicate that both the 5' terminal region of the genome and the leader protein are involved in viral RNA replication and encapsidation.