

### 3. コロナウイルス

田口 文広

日本獣医生命科学大学獣医感染症学教室

コロナウイルス (CoV) はアーテリウイルスと共にニドウイルス目に属するウイルスであり、ゲノムは約 30 kb (+) 鎖でエンベロープを持つ RNA ウイルスである。CoV の特徴は、mRNA の構造にあり、ゲノム RNA 3'側から 5'側に違う長さで伸張する数本の mRNA から構成され、各々の mRNA の 5'末端にはゲノム RNA 5'末端に存在するリーダー配列を持つ。その構造から、mRNA は不連続の RNA 合成によりできあがることは推測されるが、その機構については、現在も 2つの仮説が存在し、いずれが正しいのか決定的な実験的証明はなされていない。ウイルス蛋白の翻訳は一般に各々の mRNA の 5'末端に存在する ORF からのみ翻訳される。ゲノム RNA (mRNA-1) の 5'末端約 20kb には 2つの ORF (1a と 1b で 802kDa をコードする) からなる。この ORF 間には、pseudoknot (Pn) と呼ばれる複雑な 3次構造を持つ領域があり、そのため 1a 蛋白だけで翻訳が終止する場合と、Pn により、1a + 1b 融合蛋白が合成されるケースがある。1a + 1b 蛋白は 16 個の調節蛋白に解裂され、プロテアーゼ、RNA polymerase として働く他に、細胞の蛋白合成を抑制するような蛋白も同定されている。基本的に、mRNA-2 以下のものからは、構造蛋白が翻訳される。マウス肝炎ウイルス (MHV) では、mRNA-3, 5b, 6, 7 から、それぞれ spike (S), envelope (E), integral membrane (M), nucleoprotein (N) が翻訳される。合成された M, E 蛋白は小胞体からゴルジ装置に至る細胞内小腔に親和性を持ち、M 蛋白に RNA-N 複合体と S 蛋白が結合し、小腔内に感染性粒子として出芽し、exocytosis で細胞外に放出される。最近、細胞外放出にも宿主のプロテアーゼが関与していることが報告されている。

#### はじめに

コロナウイルス (CoV) は、SARS アウトブレイク以前は、ヒトの鼻風邪の原因ウイルスの一つとして知られているにすぎず、ヒトに重症の疾患を引き起こすウイルスがなかったため医学領域での研究は限られていた。一方、家畜のウイルス性疾患としては大きな問題となるウイルスが多く、畜産国では盛んに研究がなされていた。SARS 勃発を機として<sup>1)</sup>、CoV は医学領域に限らず多く分野で盛んに研究がなされるようになった。特に、SARS に関係する研究は

現在も続いていて、SARS-CoV 発見後には、人から呼吸器病の原因 CoV が幾つか分離されたり<sup>2)</sup>、また、キクガシラコウモリから SARS-CoV 様のウイルス遺伝子が見つかったことから<sup>3)</sup>、コウモリが SARS のレゼルボアとして有力となり、多くの CoV がコウモリから見つかっている<sup>4)</sup>。残念ながら、培養細胞で増殖可能な CoV のコウモリからの分離には至っていない。SARS-CoV 等の細胞侵入機構については、2009 年の本誌にレビューとして紹介したので<sup>5)</sup>、本稿は、CoV の基本的なウイルス学、即ち、ウイルスの転写複製に関して、これまでに明らかにされていることを概説する。

#### 連絡先

〒180-8602  
東京都武蔵野市境南町 1-7-1  
日本獣医生命科学大学獣医感染症学教室  
TEL: 0422-31-4151 (内線 328)  
FAX: 0422-33-2094  
E-mail: ftaguchi@nvl.u.ac.jp

#### 1. 分類

CoV はニドウイルス目に属するウイルスであり、ニドウイルス目は CoV 科とアルテリウイルス科からなる。更に CoV 科は CoV 亜科とトロウイルス亜科に分かれている。最初 CoV と命名されたのは、人や家畜から分離されたウイルスが粒子表面に特徴的な約 20nm の王冠様 (コロナ) 突起 (スパイク) を持つことから、CoV と命名された<sup>6)</sup> が、

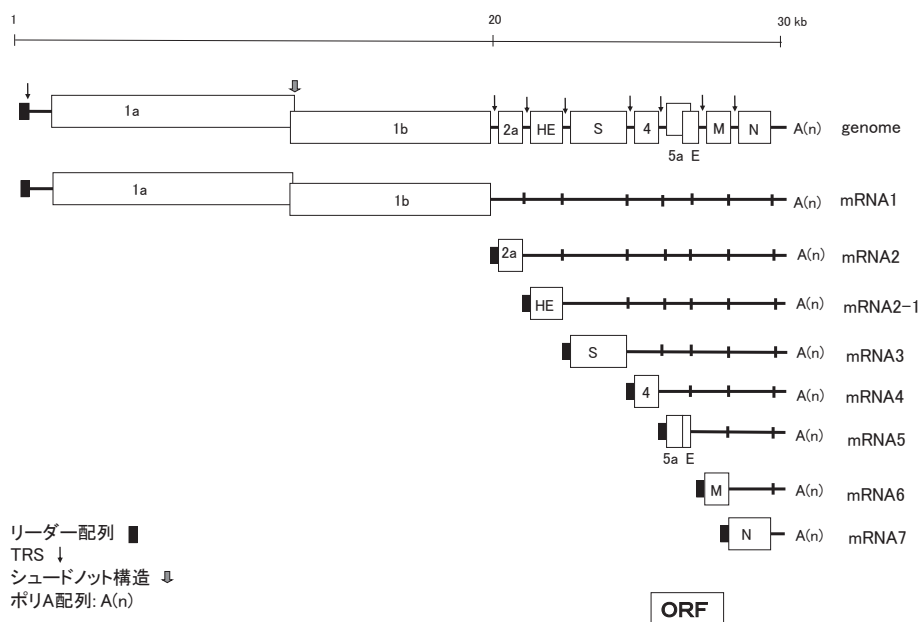


図1 コロナウイルスのゲノム及び mRNA の構造

ウイルスゲノムは約30kbからなり、各々の mRNA はゲノム RNA3'末端から異なる長さで5'末端に伸長する数本の mRNA からなる。この構造を3' co-terminal nested set と呼び、CoVに限らず Nidovirus 目のウイルスが共有する特徴である。

その後、CoV の遺伝子構造、転写複製の研究が進むにつれ、CoV と高い類似性を示すアルテリウイルスと共にニドウイルス目としてまとめられた<sup>7)</sup>。現在、CoV 亜科はアルファ CoV、ベーター CoV、ガンマー CoV の3属に分かれ、これまでグループ I から3として分類されていたものが属に格上げとなった。CoV 亜科のウイルスは約30kb プラス鎖のゲノムを有し、トロウイルスは約25kb、アルテリウイルスは約15kbといずれもRNAウイルス中では巨大ゲノムを持つエンベロープウイルスである。ニドウイルス目の特徴は mRNA の構造にあり、ゲノム3'末端から異なる長さの mRNA を持っている。この mRNA 構造を3' co-terminal nested set と呼び、nest からラテン語の Nido (ニド) と命名された (図1)<sup>7,8)</sup>。

## 2. CoV 粒子

CoV に属するウイルス粒子は直径約80-100nmである<sup>8)</sup>。また、これまで粒子形態は円形、楕円形、多形性を示すとされてきたが<sup>8)</sup>、これは濃縮、精製したウイルス粒子を電顕で negative 染色したものの結果であり、最近、cryo-electron tomography (CET) で解析した結果では、殆どが直径約100nmの円形(球形)を示し、楕円形や多形性を示す粒子はウイルスの精製過程の産物であることが示唆されている<sup>9)</sup>。また、CoV のヌクレオキャプシドについては、正20面体を示唆する報告もあるが<sup>10)</sup>、CETの結果から、従来考えられていた螺旋状のヌクレオカプシドであることが示された<sup>9)</sup>。ウイルス粒子の構造蛋白として

は、ゲノム RNA に結合するヌクレオ(N)蛋白が量的に最も多く、ゲノム RNA と結合し、ヌクレオキャプシドとなる。ヌクレオキャプシドを包み込むエンベロープには、3種類の蛋白、即ち王冠様突起をなす spike (S) 蛋白、integral membrane (M) 蛋白、envelope (E) 蛋白がある。CoV 科のトロウイルス亜科のウイルスは E 蛋白を持っていない<sup>11)</sup>。マウス肝炎ウイルス (MHV) や牛 CoV などのベーター CoV 属のウイルスは、エンベロープに第2の約10nm からなる小突起を持ち、hemagglutinin-estelase 活性があることから HE 蛋白と呼ばれている。HE 蛋白は、アルファ、ガンマー属の CoV には存在しないが、トロウイルスでは存在し、CoV の HE やインフルエンザウイルス (IFV) C の HE 蛋白と相同性の高い HE を持つことも報告されている<sup>12)</sup>。これらの HE 遺伝子は他のウイルス (例えば IFV) との組み換えにより生じた可能性が示されている。SARR-CoV では、他の蛋白質もウイルス粒子エンベロープに組み込まれることが報告されているが<sup>13)</sup>。

## 3. CoV のゲノム遺伝子と mRNA の構造と転写、翻訳機構

CoV はウイルス種により多少の差があるものの、およそ30キロベース (kb) の大きな (+) 鎖 RNA をゲノムとして持つ。5'末端20kbには open reading frame (ORF) が2個存在し、上流の1aの終止コドンの少し上流に2個目の1bの ORF の開始点がある。ORF1a, 1bの下流には構造蛋白の ORF が数個存在する。その数は CoV 種により若干の差がある。基本的に全ての CoV ゲノム上の遺伝子と

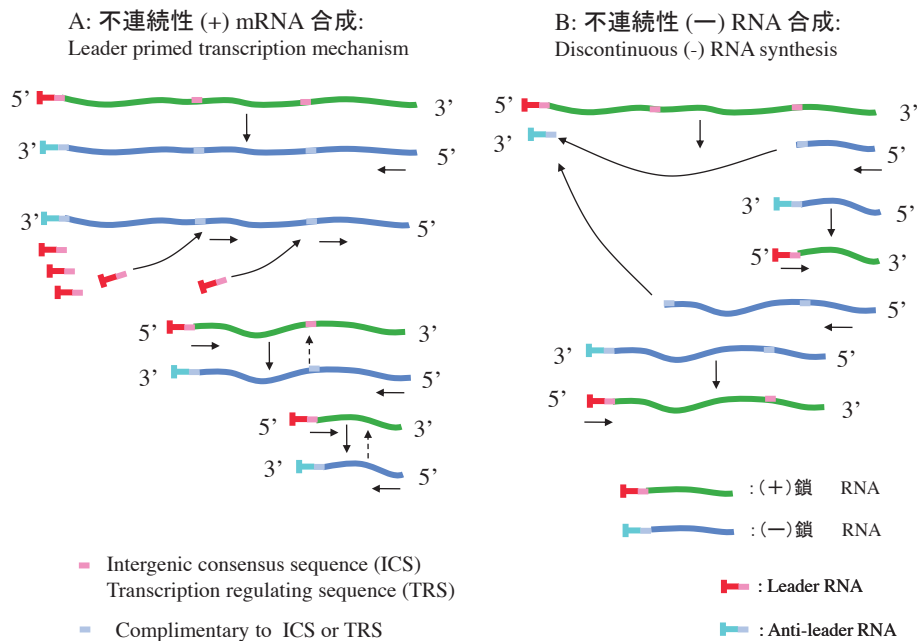


図2 コロナウイルスの mRNA 合成機構：

A：ゲノム RNA からそれに相補的な (-) 鎖 RNA が合成され、(-) 鎖 RNA の 3'末端に相補的な free leader RNA が合成される。free leader RNA の 3'末端領域の数ベースからなる TRS が (-) 鎖 RNA 上の TRS に相補的部位に結合し、サブゲノミック mRNA (sg-mRNA) の伸長が 3'末端まで続く。sg-mRNA から相補的 (-) 鎖 RNA が合成される。

B：ゲノム RNA から、各々の mRNA に対する相補的な (-) 鎖 RNA 合成が行われる。合成途中で TRS 部位に至ると、leader RNA の TRS に結合し、RNA 合成が続き、mRNA に相補的な (-) 鎖 RNA ができ上がる。各々の mRNA 相補的 (-) RNA から、mRNA 合成が行われる。A,B ともに、右向き、左向き矢印は RNA 合成方向を示す。

しては、5' 末端側から、非構造蛋白遺伝子 ORF1a, ORF1b, 構造遺伝子 S, E, M, N 遺伝子の順で存在しているが、S 遺伝子下流の領域にも幾つかの非構造蛋白遺伝子が存在する (図 1, 4)。

mRNA は、ゲノム RNA を mRNA-1 として、それより小さなサブゲノミック mRNA が数本~十数本存在する。その構造は、ゲノム RNA の 3'側から異なる長さで 5'側に伸長し、どの mRNA もゲノム RNA の 5'側に持つ約 70 ベースからなる leader 配列を有する。この構造は、3'-coterminal nested set と読まれ、nest のラテン語から Nidovirus (ニドウイルス) と命名された (図 1)。アータリウイルスの mRNA 構造も同様であるが、トロウイルスでは 5' 末端の leader 配列を欠いている。上述したような CoV の mRNA 構造では、ある mRNA はそれより一つ小さい mRNA の全ての ORF を含み、更に 5' 末端にその mRNA 特異的な ORF を持っている。

CoV の転写機構でまだはっきりとした結論が出されていないのは、どのようにして mRNA の 3'-coterminal nested set ができるかである。議論となったのは、mRNA にどのような機構でゲノム RNA 5'末端のリーダー配列が付加されるかということである。最初に提唱された機構は、ゲノム RNA を鋳型として、ゲノム長の相補的な (-) 鎖 RNA

が合成され、その (-) 鎖 RNA の 3'末端から leader 配列に対応する短い (+) 鎖 RNA (free leader RNA) が合成され、leader RNA の 3'末端にある transcription regulatory sequence (TRS) が (-) 鎖 RNA 上にある TRS と相補的な部位に結合し、(+ ) 鎖 RNA 合成が 3'末端まで伸長し mRNA となる、という考えであった (図 2A)<sup>14,15)</sup>。TRS は各々の ORF 間に存在して、leader RNA がその TRS と相補的な部位と結合し各々の mRNA が合成されるという考えは、各々の mRNA に相補的な (-) 鎖 RNA は存在しないと考えられていた頃には理に合った仮説である。その後、新たな方法でウイルス RNA 解析をしたところ、各々の mRNA に相補的な (-) 鎖 RNA が見つかったことで、別の転写機構を提唱する論文が現れた<sup>16)</sup>。即ち、ゲノム RNA を鋳型として、各々の mRNA に相補的な (-) 鎖 RNA が最初合成され、その (-) 鎖 RNA を鋳型として、それに相補的な各々の mRNA が合成されるという機構である<sup>8,16)</sup>。この場合、(-) 鎖 RNA はゲノム 3'末端を鋳型として合成が始まり、途中で (+) 鎖の leader 配列に合成が飛ぶという考えである (図 2B)。この場合にも、TRS が大きな役割を果たしていると考えられている。現在では、どちらの転写機構が正しいのかを立証した実験はないが、CoV 複製に関する仮説としては、後者のメカニ

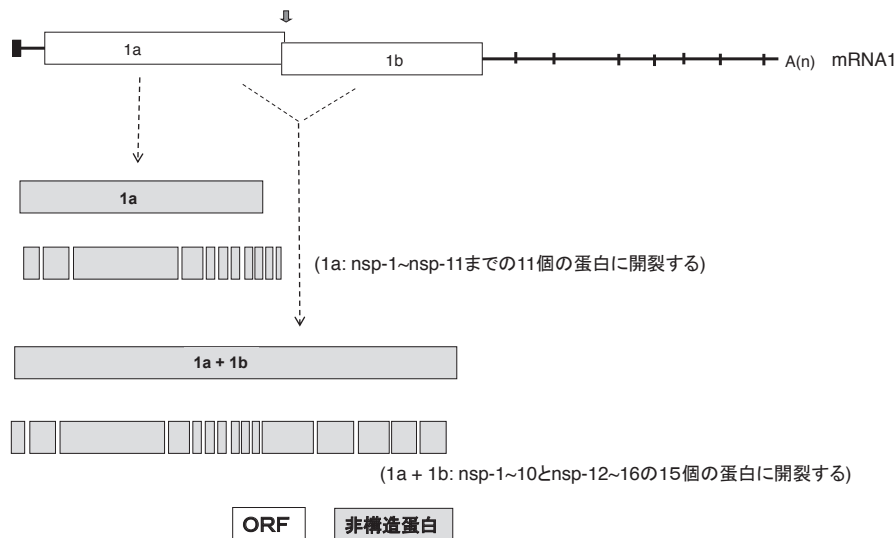


図3 ゲノム RNA (mRNA-1) からの翻訳:

ゲノム RNA は5'末端に巨大 ORF1a,1b を持ち、その間には pseudoknot(PN)が存在する。蛋白翻訳は、通常 1a の終止コドンで終了するが、20-30%の確立で、PN 構造のため frame-shift が起こり、1a 終止コドンが読まれず、引き続き 1b の翻訳へと続き、1a + 1b 蛋白ができ上がる。これらの巨大蛋白は自らが持つプロテアーゼにより、16 種類の蛋白に解裂される。

ズムが紹介されている場合が多い。

#### 4. 非構造蛋白の合成と解裂

CoV の蛋白合成は各々の mRNA の5'末端にある ORF だけが翻訳される。ゲノム RNA (mRNA-1) と mRNA-2 の ORF の間には2個の巨大 ORF、即ち ORF1a (496kDa 蛋白をコード) と 1b (362kDa 蛋白をコード) が存在する。mRNA-1 からは 1a 蛋白が翻訳されるが、1b 蛋白だけが翻訳されることはない。mRNA-1 の2つの ORF、ORF1a と 1b の間には複雑な3次構造をした pseudoknot (結び目のような構造) があり<sup>17)</sup>、この構造のためリボゾームが CoV ゲノム RNA の翻訳を進める時、一定の確率で frame-shift をおこし、1a の終止コドンが読まれることがなく、1b の ORF が引き続き読まれることになる。即ち、CoV のゲノム RNA からは、1a と 1a + 1b の2種類の蛋白が翻訳される。両者の割合は 1a が 1a+1b のと比べ、数倍高いとも言われている。1a は自らの蛋白分解酵素である nsp-3 (non-structural protein-3: papain-like proteases) と nsp-5 (main protease) により nsp-1 から nsp-11 までの非構造蛋白に開裂する。また、1a + 1b は nsp-1 ~ 10 に加え nsp-12 ~ 16 までの蛋白に翻訳中或いは翻訳後に開裂される(図3)<sup>8)</sup>。RNA-dependent RNA polymerase (nsp-12) や helicase (nsp-13) は 1b 領域から開裂産物として産生される<sup>7)</sup>。これらの多くの非構造蛋白はウイルス増殖に必須であったり、その効率を充進させる機能があると思われる。

#### 5. 構造蛋白の合成と粒子の形成

mRNA-2 より小さな mRNA の5'末端の ORF は、一般に構造蛋白をコードしている。ウイルス種により、ORF の数が異なるので、CoV の基準株マウス肝炎ウイルス (MHV-JHM 株) を例に挙げると、3番目 mRNA からは S 蛋白が合成され、5番目から E 蛋白、6番目から M 蛋白、7番目から N 蛋白が翻訳される。例外として、mRNA の5'末端に2つの特異的な ORF を持つ場合もある。例えば、MHV-E 蛋白は5番目 mRNA の5'特異的な2つの ORF の下流の ORF から翻訳される(図4)。E 蛋白合成は上流の ORF (5a) 中に存在する internal ribosome entry site (IRES) 様機能を利用して、蛋白合成が行われると報告されている<sup>18)</sup>。MHV などベータ CoV には、2-1 番目 mRNA からは、アルファ、ガンマ CoV には存在しない hemagglutinin-esterase 活性を持つ HE 蛋白が翻訳される。また、5番目の上流 ORF からは、粒子内に組み込まれない非構造蛋白が翻訳されるが、その機能についてはよく解っていない。CoV mRNA は最小のものを除き、複数の ORF を持ちながら、5'末端の遺伝子しか翻訳されないことから、構造的には polycistronic であり、機能的には monocistron であるといえる。

CoV 粒子形成は、ER から Golgi 装置に至る小腔 (ER-Golgi intermediate compartment: ERGIC) 内へと出芽 (budding) することによる<sup>8,19)</sup>。ゲノム RNA に相補的な (-) 鎖 RNA からゲノム RNA が複製され、更に mRNA 7 から合成された多量の N 蛋白がゲノム RNA と結合し、N-核酸複合体 (ribonucleoprotein: RNP) を形成し、ERGIC の膜上に翻訳され存在する M 蛋白の細胞質内ドメ

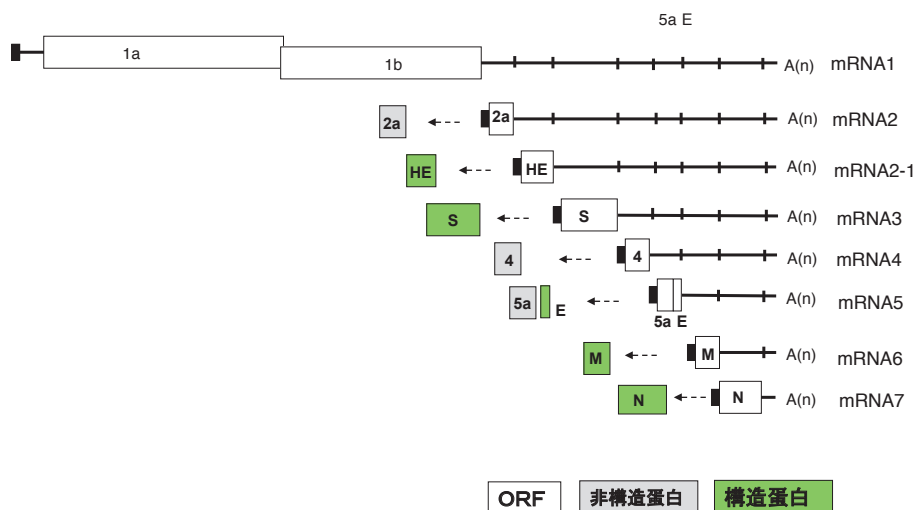


図4 genome RNA (mRNA-1) 以外のサブゲノミック mRNA からの翻訳：

各々の mRNA は図1で示したような3' co-terminal nested set を構成している。各々の mRNA の5'末端に特異的な ORF からのみ蛋白合成が行われる。通常の mRNA の特異的 ORF は1個であるが、複数個持つ場合もある。例えば、MHV の mRNA5 は2個の ORF から2種類の異なる蛋白質を合成する。この場合、5a ORF 中の IRES 様機能が E 蛋白合成開始に関与する可能性が示唆されている。

インと結合し、更に、S 蛋白と M 蛋白もお互いの細胞室内ドメインで結合し、ERGIC に集合したウイルス蛋白は、その腔内へ出芽することにより、感染性粒子が産生される<sup>8,15)</sup>。出芽には、E 蛋白質の重要性も報告されている。M 蛋白は ERGIC に親和性があり、合成後この部位に留まるが、S 蛋白は ERGIC から細胞質膜まで輸送され、膜融合活性を持つ S 蛋白は、隣接する細胞のウイルス受容体と結合し、細胞融合を誘導する。小腔内に出芽した粒子はその後、exocytosis により progeny virus として細胞外に放出される。最近、家畜 CoV の細胞外放出に関して、細胞膜結合性のプロテアーゼや細胞外に存在するプロテアーゼが細胞からのウイルス放出に重要であることが報告されている<sup>20)</sup>。これらのプロテアーゼが存在しない場合、感染性粒子が感染細胞の表面に付着した状態で存在し、プロテアーゼがこれらの粒子を感染細胞表面から離脱させるのに大きく関わっているようである。ウイルス粒子が細胞表面にクラスターを作るのかについては、HIV の tetherin 等のような細胞側の因子が関与している可能性も考えられる。

#### あとがき

CoV 研究は、効率よくウイルス増殖を許容する培養細胞が見つからなかったことやゲノムが巨大であるため reverse genetics の開発が遅れたことにより、他のウイルスと比べ、分子生物学的な解析はかなり遅れた。しかしな

がら、幸か不幸か、SARS-CoV の出現により、増殖の分子機構、病原性の解析などかなり急速に進んだ。また、幾つかの CoV で受容体が同定され、細胞侵入機構についても研究が進みつつある。CoV の多くは、家畜、ペットなどに、主に消化器系と呼吸器系の疾病を引き起すことが、その病原性発現機構はよく分かっていない。今後これらの CoV の感染機構や病原性発現機構を明らかにしていくことは、その予防、防御法の確立にとって不可欠である。

#### 参考文献

- 1) Pautanen SM, Low D, Henry B, Finkelstein S, Rose D et al. (2003) Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl. J. Med.* 348: 1995-2005.
- 2) Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM et al. (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* 10: 368-373.
- 3) Lau SKP, Woo PCY, Li KSM, Huang Y, et al. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14040-14050.
- 4) Poon LLM, Chu DKW, Chan KH, Wong OK, Ellis TM et al. (2005) Identification of a novel coronavirus in bats. *J. Virol.* 79: 2001-2009.
- 5) 田口文広, 松山州徳 : (2009) コロナウイルスの細胞侵入機構 *ウイルス* 59 : 15-22.
- 6) Tyrell DA, Almeida JD, Berry DM, Cunningham CH, Hamre D, Hofstad MS, Mulluci L and McIntosh K.

- (1968) Coronaviruses. *Nature (Lond.)* 220: 650.
- 7) Cavanagh D (1997) Nidovirales: a new order comprising coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142: 629-33.
  - 8) Masters P (2006) The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66 193-292.
  - 9) Barcena M, Oostergete GT, Bartelink W, Faas FG, Verkeleij A, Rotter P, Koster AJ, Bocsh BJ (2009) Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 582-7.
  - 10) Risco C, Anton IM, Enjuanes L, Carrascosa JL (1996) The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J. Virol.* 70: 4773-77.
  - 11) Snijder E, Horzinek MC, Spaan WJM (1990) A 3'-coterminal nested set of independently transcribed messenger RNAs is generated during Berne virus replication. *J. Virol.* 64: 331-338.
  - 12) Smits SL, Gerwig GJ, van Vliet ALW, Lissenberg A, Briza P et al. (2005) Nidovirus sialate-O-acetyltransferases Evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes. *J. Biol. Chem.* 280: 6933-41.
  - 13) Weiss SR and Navas-Martin S. (2005) Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 635-664.
  - 14) Lai MMC. (1986) Coronavirus leader-RNA-primed transcription: An alternative mechanism to RNA splicing. *BioEssays* 5: 257-60.
  - 15) Lai M.M.C and Cavanagh D (1997) The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 49: 1-100.
  - 16) Sethna PB, Hung SL, Braian DA (1991) Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5626-30.
  - 17) Brieley I, Digard P, Inglis SC. (1989) Characterization of a efficient coronavirus ribosome frameshifting signal: Requirement for an RNA pseudoknot. *Cell.* 57: 537-547.
  - 18) Thiel V, Siddell SG. (1994) Internal ribosome entry in the coding region of murine hepatitis virus mRNA5. *J. Gen. Virol.* 75: 3041-3046.
  - 19) Tooze SA, Tooze J, Warren G (1984) Replication of coronavirus MHV-A59 in Sac- cells: Determination of the first site of budding of progeny virion. *Eur. J. Cell. Biol.* 33: 281-293.
  - 20) Shirato K, Matsuyama S, Ujike M and Taguchi F. (2011) Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J. Virol.* 85: 7872-80.

## Coronaviruses

**Fumihiko TAGUCHI**

Nippon Veterinary and Life Science University,  
Laboratory of Virology and Viral Infections.

Coronaviruses contain positive-stranded RNA with ca. 30 kb as a genome, which is wrapped by the envelope, and constitute *Nidovirales* together with *Arteriviridae*. The feature of viruses in *Nidovirales* is the unique structure of the mRNA set, called 3' co-terminal nested set. Coronaviruses have several to more than 10 different species of subgenomic mRNA and generally only the OFR located in the 5' end of each mRNA is translated. The 5' 20 kb of the coronavirus genome or mRNA-1 consists of two ORFs, 1a and 1b, between that there is a unique RNA structure called pseudoknot. From mRNA-1, 1a as well as 1a+1b are translated: the latter 1a+1b results from the translation due to ribosomal frame-shifting facilitated by the pseudoknot structure. From those two proteins, totally 16 proteins are produced as a result of auto-cleavage by the proteases included in 1a protein. Those proteins exhibit different functions, such as RNA-dependent RNA polymerase, helicase, proteases and proteins that regulate cellular functions. mRNAs smaller than mRNA-2 translate in general the structural proteins, nucleocapsid (N) protein, spike (S) protein, integrated membrane (M) protein and envelope (E) proteins. Those proteins assemble to the vesicles located from ER to Golgi (ER Golgi intermediate compartment) and virions bud into the vesicles. Those virions are released from infected cells via exocytosis.