

SARS コロナウイルス

国立感染症研究所ウイルス第3部

田口文広

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園4-7-1

はじめに：

昨年11月に中国広東省で発生した新興感染症の異型肺炎は、その後香港、ベトナム、シンガポールなどに伝播し、世界30か国以上で8400を越える症例と約800の死者を出した。この感染症は、重症急性呼吸器症候群(SARS)と呼ばれ、高い死亡率と感染拡大の速さから、感染発生国のみならず全世界を震撼させた。SARSの原因ウイルスは、従来とは異なるタイプの新たなコロナウイルス(SARS コロナウイルス、SARS-CoV)であることが明らかにされ、発見後一か月待たずして、ゲノム全長の約30000塩基の配列が決定された。6月の終息後の新たな集団発生はないが、インフルエンザウイルスとの感染も絡み、冬期の感染の再発が心配される。SARS-CoVは、発見されてから日が浅く、その多様な側面が分かっている訳ではないが、ウイルス学的(ウイルスの構造、増殖様式)には、他のコロナウイルスと類似点が多いと考えられる。本稿では、一般的なコロナウイルス学について概説し、これまで報告されたSARS-CoVの性状に言及したい。

コロナウイルス研究の背景

コロナウイルスは1960年代半ばにネガティブ染色した粒子の電子顕微鏡による観察から、特徴的な突起(スパイク)を持つウイルス群としてTyrell等によって報告された(1)。このスパイクは、長さ約20nmで先端部位が大きく膨らんだノブ状になっていて、王冠或いは花弁のような形態を持つ。コロナウイルスと命名されたのは、スパイクの形状によるもので、王冠(ラテン語でコロナ)から来ている。一般に、コロナウイルスは、通常の培養細胞で増殖することが稀で、特殊な細胞が使われることが多い。増殖や定量に適した培養細胞の不在が、コロナウイルス研究の大きな障害であった。SARS-CoVはウイルス発見から1ヶ月を待たず全ゲノム構造が明らかになるなど、驚くべきスピードで解析が進んだ(2, 3, 4)。国際共同研究の結果とみることもできるが、SARS-CoVが増殖出来る細胞が容易に発見され、オーソドックスなウイルス学が展開され得たことも勝因の一つである。SARS-CoVも他のコロナウイルスと同様、細胞のより好みは激しく、Vero細胞の他に増殖できる細胞は殆どないようである。

また、コロナウイルスゲノムが約30キロベース(kb)の巨大RNAであることが、ゲノム解析、reverse geneticsの進展を遅らせた。ウイルスゲノムは、研究開始当初はせいぜい15kb位だと想像されていたが、研究が進むにつれ30kbであることが判明し、多くのコロナウイルス研究者を驚かせた。ゲノムの巨大性のために、全ゲノムを用いたreverse geneticsが出来ようになったのもつい最近である(5)。SARS-CoVでは、既に

米国の Baric 等によって infectious cDNA が作成され、ウイルス遺伝子の操作が可能になった(6)。SARS-CoV の出現により、今まで注目されなかったコロナウイルス学が、異様な勢いで牽引されていくようである。

コロナウイルスの分類:

ヒトの鼻風邪コロナウイルスが特徴的なスパイクを持つウイルスとして Tyrell 等によって報告されてから、多くのウイルスがその形態学的特徴からコロナウイルス属に分類された(7, 8)。コロナウイルス属は現在トローウイルス(torovirus)と共にコロナウイルス科(Coronaviridae)を構成している。mRNA セット構造の類似性から、コロナウイルス科、ア・テリウイルス科(arteriviridae)及びロニウイルス科(roniviridae)がニドウイルス目(Nidovirales)としてまとめられている(9)。コロナウイルス属のウイルスは、抗原的交差(塩基配列及びアミノ酸配列の相同性)から、3グループに分けられる(表 1)。各々のグループに属するウイルス間の相同性は、グループの異なるウイルスと比べ有為に高い。SARS-CoV は1~3のいずれにも相同性が低く、第4番目のグループに属すると考えられるが、グループ2へ分類する研究者もいる(10)。これまでの研究から、グループ1に属するTGEV, FIPV, HCoV-229EとSARSウイルス間には、血清学的交差が見られるが(4)、グループ2に属するウイルスとの交差は報告されていない。

ウイルス粒子及びゲノム構造

コロナウイルス粒子は約 20 nm の特徴的なスパイクを持つエンベロープウイルスで直径 100 から 200nm の円形、楕円形および多形成の形状を示す(図1)。電子顕微鏡で観察された SARS-CoV の形態も同様である。粒子表面のスパイクは S 蛋白からなる。また、エンベロープには、その他に、膜(M)蛋白、エンベロープ(E)蛋白が存在し、グループ2のコロナウイルスには更に hemagglutinin-esterase (HE)蛋白がある(7, 8)。エンベロープに囲まれてゲノム RNA が存在し、それに核(N)蛋白が結合し、螺旋状のヌクレオキャプシドを形成している。SARS-CoV(2, 3, 4, 11)を含むコロナウイルスは、現在知られるウイルス RNA としては最大の約 30 kb の(+鎖)ゲノム RNA を持つ(図2)(8)。ゲノム RNA5' 末端には cap 構造、3' 末端には poly(A)が存在する。30 kb からなるゲノム 5' 末端には約 70 ベースから成る leader sequence があり、その下流に RNA polymerase (ORF1a, 1b)、S、E、M、N 遺伝子の順で存在する。非構造蛋白遺伝子 (ORF1a, 1b) が全体の 2/3 (20 kb) を占め、ウイルス構造蛋白 (約 10 kb) は S 遺伝子下流領域から作られる(図2)。グループ2に属するウイルスには ORF1b と S 遺伝子の間に、

HE 遺伝子が存在するが、グループ1と3及び SARS-CoV には HE 遺伝子はない。SARS-CoV は M、N 遺伝子間に他のコロナウイルスには見られない数個の ORF を持つが、どのような蛋白が作られるのか分かっていない。また、ヒトから分離された SARS-CoV とハクビシンなどの野生動物から分離された SARS-CoV ウイルスとを比較すると、ヒト SARS-CoV には N 遺伝子上流に 29 塩基の欠損が存在し、そのためハクビシン SARS-CoV の大きな ORF が二つの小さな ORF に分かれる(図3)(12)。Tiel 等は Frankfurt-1 株を Vero 細胞で3継代すると29 塩基欠損する部位の近く(図4の ORF7 b)に 45 塩基の欠損が認められたことを報告している(11)。この SARS-CoV に特有な小さな ORF が数個存在する領域は、欠損がおこりやすい部位なのかもしれない。

ウイルス蛋白の構造と機能

SARS-CoV ゲノムは、他のコロナウイルス同様、5 末端の ORF1a, 1ab からは分子量約 500、800 kDa の蛋白が翻訳される(11)。ORF1a と1bの間では翻訳されるフレームにシフトがあり、そのまま読まれると1b 部分は蛋白として翻訳されないが、pseudoknot と slippery sequence とよばれるエレメントにより、リボゾームの—1のフレームシフトにより、融合した巨大蛋白が翻訳される(8, 11)。この蛋白は、その中に幾つかの蛋白分解酵素を持ち、これらの酵素により、RNA polymerase や helicase 等の機能蛋白が作られる(8, 11)。N 蛋白は分子量 50-60 kDa の塩基性アミノ酸のクラスターを持つ RNA 結合性のリン酸化蛋白である。機能は、ゲノム RNA の複製、mRNA 合成や翻訳に関与すると考えられている。M 蛋白は分子量 20-25 kDa の糖蛋白で、大部分がエンベロープ内に存在し、N 末端約 10% が粒子外部に突き出ている。粒子外部には糖付加部位があり、MHV、BCoV では O-結合形糖付加が報告されている。M 蛋白は ER で合成され Golgi まで輸送され、その過程で糖付加などの修飾を受けるが、細胞膜まで輸送されることはない。M 蛋白は E 蛋白(分子量約 8 kDa で殆ど全部がエンベロープ内に埋もれている)と共に、ウイルス粒子形成に重要な蛋白であり、M、E 蛋白の発現でウイルス様粒子(virus like particle)が形成されると報告されていたが、最近 reverse genetics を用いて作成した E 遺伝子欠損ウイルスを用いた研究では、E 蛋白は粒子形成に必須ではないことが明かにされた(13)。S 蛋白は、粒子表面のスパイクを構成するタイプ I の分子量 180-200 kDa の糖蛋白で、3 量体が一本のスパイクを形成する。MHV、IBV、BCoV の S 蛋白は、合成後細胞由来の蛋白分解酵素により、2つのフラグメントに開裂するが、FIPV、TGEV の S 蛋白は開裂しない(7, 8)。SARS-CoV-S 蛋白も開裂シグナルを持たない。S 蛋白の開裂は、融合活性など S 蛋白の機能発現には必須ではない

(14)。開裂した N 末端フラグメントを S1、C 末端側で膜貫通するフラグメントを S2 と呼ぶ。S1 はスパイクの外層のノブ状部位を、S2 はその下のステム状部位を構成する。S1 と S2 は、ジスルフィド結合のような共有結合で結ばれているわけではなく、その結合は弱い。S 蛋白は、ウイルスの持つ多くの生物活性(受容体結合、細胞内侵入、中和エピト-プ、T 細胞エピト-プ、病原性など)を担っている(8, 15)。S 蛋白の多くの中和エピト-プは、殆どが S1 に存在する。S 蛋白上には T 細胞エピト-プも存在する。S 蛋白に変異や欠損を持つ変異株が異なる病原性を示すことから、病原性への関与が示唆されてきた。S 蛋白にのみ変異を持つ MHV が reverse genetics により作製され、S 蛋白の病原性への関与が証明された(16)。グループ2のコロナウイルスのみが持つ HE 蛋白は、血球凝集活性と esterase 活性がある。HE 蛋白を欠くウイルス変異株も、親株同様よく感染する。SARS-CoV の N、M、E 及び S 蛋白については、まだ詳細な解析はない。

ウイルス受容体

コロナウイルスの受容体としては、これまで2種類の蛋白が同定されている(17)。MHV の受容体は、carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule1(CEACAM1)と呼ばれる細胞接着分子で、4個或いは2個の細胞外ドメインとを持つ。CEACAM1 は、MHV の標的細胞(肝細胞を始め血管内皮細胞、腸管上皮細胞球など)と共に非標的細胞(腎臓の最尿管上皮細胞など)にも発現されている。また、脳内細胞にも発現されているが、どの細胞種なのか明らかではない。CEACAM1 の S 蛋白への結合部位は、N 末端ドメインにあり、ウイルス結合活性及び結合後の S2 の構造変化を惹起し、S 蛋白の融合活性を活性化する(18)。CEACAM1 の細胞接着活性部位は MHV 受容体活性部位と同じ領域に存在する。グループ1に属するヒトの HCoV-229E、ネコの FIPV、ブタの TGEV、イヌ CCoV は、各々の自然宿主種の aminopeptidase N (APN)を受容体として利用する。ネコの APN は、FIV の他 HCoV-229E、TGEV、CCV の受容体としても機能する(19)。APN はタイプ2の糖蛋白であり、腸管上皮細胞等に発現されている。酵素活性部位とウイルス受容体活性部位とは異なり、APN インヒビターでウイルス受容体活性が抑えられることはない。CEACAM1 と APN のコロナウイルス受容体活性部位には、アミノ酸配列上の相同性は認められていない。

最近、SARS-CoV の受容体は angiotensin-converting enzyme 2(ACE-2)であると報告された(20)。ACE-2 遺伝子は VeroE6 細胞から分離され、SARS-CoV 非感受性 293T 細胞で発現することにより感受性を付与でき、可溶性 ACE-2 は SARS-CoV 中和

活性を持つことが明らかにされた。SARS-CoV 受容体の発見により、感受性マウスの作成、抗ウイルス剤の開発など多方面での研究の進展が期待される。

ウイルスの細胞内増殖

1) 細胞侵入機構

受容体結合後の細胞内侵入機構としては、S 蛋白による細胞融合活性が pH 非依存性であることから、endosome の関与しない、直接細胞膜から侵入する non-endosomal pathway である考えられている。コロナウイルスの受容体への結合は S 蛋白による。MHV では、S1 の N 末端 330 個のアミノ酸(S1N330)に受容体結合活性があり(21)、S1N330 の2つの部位が特に重要である。また、グループ1の TGEV, HCoV 229E では、MHV と異なり N 末端部位ではなく、S1 の中程(アミノ酸 S 蛋白 N 末端から 400—550 個辺り)が関与する(22)。最近報告された SARS-CoV S 蛋白は、N 末端 297 個のアミノ酸からなる領域はリセプター結合活性がなく、S1 相当部位の発現蛋白は活性を示した(20)ことから、SARS-CoV のリセプター結合部位は、グループ1 コロナウイルスと同様、S1 蛋白中ほどに存在する可能性を示唆している。膜貫通フラグメント S2 は、受容体結合後のエンベロープと細胞膜の融合に重要な働きをなす。S2 の膜貫通部位の上流にある2つの α -helix 構造をとる heptad repeat は、S1 と受容体の結合が引き金となり、互いに近接するヘアピン構造に変化し、それがエンベロープ・細胞膜融合のトリガーになると考えられる(23)。HIV 感染では、エンベロープ蛋白 gp41 の C 末端側に存在する heptad repeat の合成ペプチドが、受容体結合後のヘアピン構造変化を抑え、抗ウイルス作用を示すことが報告されているが(24)、MHV についても、S2 の heptad repeat に相当する合成ペプチドが感染を抑制することが明らかにされた(23)。また、SARS-CoV についても同様のペプチドが抗ウイルス活性を持つと報道されている。

2) ウイルス RNA の複製と転写:

細胞内に侵入したコロナウイルス(+)鎖ゲノムから、その5末端にコードされる RNA polymerase が翻訳され、この酵素を利用して、(+)鎖ゲノム RNA から相補性の(-) RNA の転写が起ると考えられる。更に、(-)鎖ゲノム RNA から 6-8 本の subgenomic (sg) mRNA が合成されると考えられてきた(8)。sg mRNA の構造は、3'末端から異なる長さで 5'方向に延び、或る sg mRNA はそれより短い sg mRNA に加えて付加部位を持つ。また、いずれの sg mRNA の 5'末端にもゲノム RNA 5'末端に存在するの約 70

ベースからなる leader sequence がある。この特徴的な mRNA セット構造を nested set と呼び、同じような mRNA の nested set を持つウイルス群としてニド(nest=ラテン語で nido)ウイルス目と分類された。この構造から、sg mRNA 合成には、不連続性の RNA 合成過程が必要であると予想された(8)。MHV 感染細胞から sg mRNA だけが発見され、それに相補的な(-)鎖 sg RNA は検出されなかったため、不連続な RNA 合成は sg mRNA 合成段階で起ると考えられた(8)。その後、合成されないと考えられていた (-)鎖 sg RNA が TGEV 感染細胞から検出され、更に MHV 感染細胞からも分離された。このことから、(+)鎖ゲノム RNA から直接6—8本の(-)鎖 sg RNA が合成され、これを鋳型として、ウイルス蛋白を翻訳する sg mRNA が合成される可能性も示唆された(24)。何れの場合にも、最初に合成される sg size RNA は、不連続な転写によって合成されることになるが、その不連続転写が sg mRNA 合成過程か(-)鎖 sg RNA 合成過程かは、議論が多い。SARS-CoV の mRNA については、Tiel 等によって報告されている(11)。今まで見られたコロナウイルスより多い9本の mRNA が合成される。また、M,N 遺伝子間に存在する機能が分かっていない蛋白を翻訳する mRNA も合成されている(図4)。

3) 蛋白合成及び budding(出芽)

各々の sg mRNA から、原則としてその 5' 末端の ORF からのみ蛋白が翻訳される。MHV の mRNA7, 6, 5, 3 からは各々 N, M, E, S 蛋白が翻訳される(8)。S 蛋白が翻訳される mRNA3 は、その下流に E, M, N 遺伝子を持つが、これらの蛋白は mRNA3 から合成されることはない。コロナウイルス mRNA は構造的には polycistronic であるが、機能的には 5' 末端の cistron のみ働く monocistronic である(8)。例外的に1本の mRNA の 5' 末端の2あるいは3個の ORF が翻訳される場合がある。例えば、MHV の mRNA5 からは2種類の蛋白が翻訳され、ウイルス増殖に重要である E 蛋白は2番目 ORF から作られる。コロナウイルスの蛋白集合、出芽は、細胞膜から直接細胞外に放出されるのではなく、ER から Golgi 装置に至る internal compartment で起こる。合成された N 蛋白はゲノム RNA と結合しヌクレオキャプシドを構成し、親和性の高い M 蛋白発現部位、即ち internal compartment に集合し出芽すると考えられる。Genome RNA がエンベロープを持つ粒子内に取り込まれるための packaging signal は、ORF1b の 3' 末端に存在するため(25)、この部位を持たない sg RNA は粒子内に取り込まれることはない。internal compartments 内腔に出芽した子孫ウイルスはその後 exocytosis により細胞外へ放出される。

コロナウイルスの遺伝学

1) 変異、欠損

コロナウイルスには、多種多様の変異株が報告されている(8)。化学発癌剤を用いて分離された温度感受性変異株には、少なくとも7つの相補グループがある。また、数多くの中和単クローン抗体抵抗性の変異株が分離されて、全ての変異株が S 蛋白に点変異か欠損を持つことが報告されている。MHV では、化学発癌剤や単クローン抗体などの selection pressure がなくても、培養細胞で継代を繰り返している間に、様々な欠損ウイルスが出現し、major population になることがよく観察される(27)。これらの変異株の殆どは、S1 の hypervariable region と呼ばれる領域に、150-460 塩基の欠損を持ち、動物に対する病原性が異なることが多い。また、MHV 持続感染培養細胞からも、様々な変異株が分離されるが、その殆どが S 遺伝子に変異を持つ。TGEV, FIPV では、感染動物体内で組織親和性、病原性の異なる変異株の出現が報告されている(28, 29, 30)。

2) 組み換え

コロナウイルス感染では高率に組み換え体が検出される(31)。2種類の異なったコロナウイルスが同一細胞に重複感染すると、親株とは異なる組み換え体が産生される。この組み換え体は相同組み換えによるもので、そのメカニズムはコロナウイルスゲノム RNA の複製と関係がある。MHV のゲノム複製では、合成途中の RNA がその鋳型から剥がれ落ち、再び他の鋳型に結合し、RNA 合成が進むと考えられている。組み換え現象は、MHV だけではなく IBV や TGEV についても、報告されている。MHV では、2種類の株をマウス脳内に感染させることにより、脳から組み換え体を回収した報告があるし、IBV の場合には、フィールドでワクチンに抵抗性株が組み換えにより出現することなどの報告がある。一方、この高率に起る組み換え現象を利用して、目的とする組み換えウイルスを作製する手法が開発され、コロナウイルス遺伝子の機能解析に必須なテクニックとなっている。

3) DI RNA

MHV, IBV, TGEV などのコロナウイルスでは、他の RNA ウイルス同様、高 moi (multiplicity of infection)感染でウイルス継代することにより、DI(defective interfering)粒子、DI RNA が出現する。最初に発見された MHV の DI RNA は、一番良く研究されているが、以下の3種類の DI RNA が知られている(32)。1)ゲノムより少し小さく、完全な polymerase と N 遺伝子を持ち粒子内に取り込まれるタイプ、2)ゲノムの3、5末端とその他の遺伝子の一部を持つ RNA で helper virus 存在下では効率よく複製す

るが、粒子内には取り込まれないタイプ、それに2)のタイプで packaging signal を持つため粒子内に効率に取り込まれるタイプである(25, 32)。どの DI RNA も二つの ORF が fusion して蛋白を翻訳し得る ORF を持っている。DI RNA は helper virus RNA と高率に組み換えを起こす。これらの DI RNA は、コロナウイルスの RNA の機能(RNA packaging signal, replication signal, transcription signal や組み換え現象)を研究する上で、非常に有益な手段となった(8)。

4) Reverse genetics

コロナウイルスはそのゲノムが巨大なため、ゲノム全長の cDNA を用いて、感染性粒子を作ることは困難であったが、最近幾つかの方法が開発された。どの方法もゲノム cDNA から、in vitro で作成した RNA 転写産物を細胞へ導入し、感染性粒子を得るという方法である。この方法による最初の報告は、TGEV である。クローニングに用いられたベクターとして、BAC(5)が使われたが、cDNA 複製途中で変異が入りやすいため、組み換え vaccinia virus が使用され、HCoV-229E, TGEV, MHV の reverse genetics に成功している(33)。また、Baric 等は TGEV の 28.5 kb のゲノムをカバーする数個の cDNA を制限酵素認識部位を含む primer を用いて PCR で作製し、プラスミドで増幅後制限酵素で切り出し、再び in vitro で ligation した。In vitro で ligation した DNA から RNA 転写産物を作製し細胞に transfection することにより、感染性ウイルスを回収することに成功した(34)。この実験では、彼等は同じ方法を用いて、SARS-CoV の感染性クローンを作製したことを報告している(6)。ゲノム全長を用いた reverse genetics が確立される前は、ゲノム 3'末端 10 キロの部分的な reverse genetics が利用されてきた。この方法は Masters 等が開発したもので、3'末端 10kb の cDNA から DI(defective interfering) RNA 活性を持つような RNA を作るため、5'末端にゲノム 5'末端を繋いで作製したものである。この RNA を MHV 感染細胞へ導入することにより、細胞内では RNA の増幅、感染 MHV との homologous recombination が起こり、3'末端 10 kb が導入した RNA に置き換えることが可能である(35)。この導入 RNA の S 遺伝子をネコの FIPV-S 遺伝子を置き換えた RNA を用いて、FIPV-S を持つ MHV を作製された。このウイルスはネコ細胞にしか感染しないため、MHV—S 遺伝子に変異を導入し、組み換え体を得るのに極めて有用である(36)。

コロナウイルスの持続感染

コロナウイルスでは、多くの持続感染の報告がある。培養細胞レベルでは容易に持続感染が成立し、ウイルス、細胞両者の性質が著しく変化する(37)。MHV の持続感染系

では、感染が進むにつれ、親株と比べ細胞変性効果や動物に対する病原性の低いウイルスに変化する。また、数年間持続感染を維持した場合、本来の MHV 受容体 CEACAM1 以外の分子を受容体として利用できる株(マウス細胞以外にもヒト、サル、ハムスター由来の細胞にも感染し得る変異株)が出現する報告もある(38)。この持続感染から得られた細胞は、通常、MHV に対する感受性の低下が見られ、CEACAM1 発現量の低下がその原因となっている。また、MHV 感染マウス脳内では、感染性の MHV は2週間くらいしか検出されないが、ウイルス RNA は数カ月に亘り脳内に存在すると報告されている。脳内で MHV-RNA が長期間存在する機構は、詳しく解析されていないが、MHV 感染でみられる脱髄と関わりがある可能性もある。

持続感染とは少し異なるかもしれないが、MHV 経口感染マウスから感染性ウイルスが極めて長期間に亘り、糞便から分離されるケースが知られている。マウスは MHV 感染により、高い中和抗体を持っているが、マウス腸管上皮細胞では、抗体の攻撃から逃れ、MHV が細々と生き延びていくメカニズムがあるようである。

コロナウイルスの病原性:

表1に示されるように、様々なコロナウイルスがヒト、家畜等多くの動物に感染し、異なる疾患を引き起こすが、コロナウイルスの主要な標的組織は、消化器および呼吸器である。また、殆どの場合、感染に対して抵抗力の低い幼若令の動物が重篤な症状に陥るが、成熟した動物では致死的な感染を起こすことはない。例外的に MHV 及び FIPV 感染では、ウイルス株、宿主側の諸因子により、急性の致死感染の経過をとることがある。MHV では自然発症例からは病原性の高いウイルスは分離されないが、古くから肝炎、脳炎のモデルとして使われてきた株の中には、極めて病原性の高い株も存在する。一般に MHV 感染では、病原性の高さやマクロファージでの増殖能に相関があり、病原性の弱い株は、マクロファージで増殖することはできないが、強い株はよく増殖する(39)。FIPV の病原性についても、マクロファージでよく増殖する場合、強い病原性を示す。FIPV 感染では、抗ウイルス抗体が必ずしも防御的に作用するのではなく、抗体による感染増強作用が報告されている(40)。これは、ウイルスに結合した抗体の Fc とマクロファージの Fc リセプターの相互作用より、ウイルスがマクロファージに取り込まれる結果である。これは、デングウイルス等で報告されている現象に類似する。2種類のヒトコロナウイルス、229E と OC43 株が知られているが、いずれも 20-30% の鼻風邪の原因ウイルスで、SARS のような重篤な呼吸器疾患に至ることはない。

一般にコロナウイルスは種特異性が高く、固有宿主以外の動物に感染することはな

いが、SARS-CoV はヒト以外にもサル、ネコ、フェレット(41, 42)やマウス、ラットなどにも感染する。SARS-CoV の高い病原性は、ウイルスの増殖に伴う直接的な細胞損傷というより、ウイルスが誘発する宿主反応が大きく影響していると考えられている(43, 44)。SARS-CoV 感染でみられる肺炎は、1997 年に発生したインフルエンザ H5N1 感染と同様、cytokine による強い炎症反応に類似し、大量の cytokine が産生され(cytokine storm)、その結果宿主の異常なまでの強い炎症反応を誘発した結果ではないかと考えられる。SARS-CoV の強い病原性の分子基盤は未だ解明されていないが、cytokine に抵抗性になるようなウイルス蛋白が存在するのかもしれない。

SARS-CoV の起源

SARS-CoV が発見された当初は、動物、ヒトのコロナウイルスの組み換えによって出現した可能性も示唆されたが、ゲノム全容が明らかになり、少なくとも現存するコロナウイルスの組み換え体や変異ウイルスではないことは明白になった。ここでは、SARS-CoV の起源について、これまでの報告をもとに考察を試みた。

1) 野生動物由来

SARS-CoV の発祥地は、中国広東省であると推測されている。広東省など中国南部では、生きた野生動物が食用として市場で売られているため、ヒトと野生動物、或は異なる野生動物間の接触が極めて濃厚であり、野生動物からヒトに感染が広がる可能性がある。特に、新興感染症ではこれまでヒトが経験したことのないため免疫がなく、急速に感染が拡大ことが予想される。新型インフルエンザウイルスの出現も、中国南部地帯であり、野生動物、家畜、ヒトの濃厚な生活様式が新たな病原性ウイルスの出現を可能にしている。SARS-CoV も野生動物が持っていたウイルスが変異して、種のバリアを超えてヒトに感染する様になったのではないかと考えても不思議ではない。広東省のハクピシン、タヌキなどの野生動物には、SARS-CoV ゲノムやその抗体が検出されている(12)。野生動物由来 SARS-CoV ゲノムには、人由来の SARS-CoV と比べ、N 遺伝子上流に 29 塩基余分に存在する(12)([図3](#))。コロナウイルス感染では、ウイルスゲノムに細胞由来の遺伝子断片 RNA が取り込まれるという報告は殆ど無い。逆に、ウイルスゲノムの一部欠損は容易に且つ頻繁に起ることは、幾つかのコロナウイルスで証明されている(26)。即ち、野生動物で蔓延していた SARS-CoV は、本来はヒトに感染しないが、欠損により種のバリアを超えて人に感染する様になった可能性が考えられる。逆に、SARS-CoV が人から野生動物に感染し、29 塩基を野生動物内で獲得する可能性は極めて低い。一方、広東省で初期の患者から分離された SARS-CoV

(GZ01)は、ハクビシンから分離されたウイルス同様 29 塩基を持っていると報告された(12)。このことは、逆にハクビシンから分離された SARS-CoV はヒト由来である可能性も示している。

2)ヒト由来

SARS 発祥地の広東省では、野生動物取り扱い業者の血清疫学調査から、SARS-CoV に対する抗体保有者が極めて高いことが報告されている(12, 45)。抗体保有者は、SARS 様疾患に罹った経験は無い。また、広東省では発祥地でありながら、香港、シンガポールなどで経験された激しい SARS のアウトブレイクは報告されていない。これに反し、SARS アウトブレイクのあった地域では、SARS 様症状を示さない感染者、即ち不顕性感染は殆ど報告されていない。このことは、最初広東省で感染がみられた SARS-CoV は病原性が低い株で、アウトブレイクの原因となった病原性の極めて強い株とは異なる可能性がある。それでは、病原性の強い SARS-CoV はどこからやってきたのだろうか。動物のコロナウイルス感染で興味ある報告がなされている。ネコの伝染性胃腸炎ウイルス(FIPV)感染は、コロナウイルス感染では珍しく、成育したネコに対しても高い病原性を示し、10%以上の致死率を示す。ネコの消化器系コロナウイルス(FECoV)は、腸管で増殖するが殆ど病原性はない。自然感染では、この 2 種類のウイルスが同時に感染していることが多く、両者の遺伝子には殆ど違いは見られない。Poland 等は、ネコ免疫不全ウイルスに感染したネコに FECoV を接種すると、FIP 様症状を示すネコが現れ、FIPV が分離されたと報告している(28, 29)。即ち、ネコの体内で病原性の低い FECoV から高い FIPV に変異が起こったことを実験的に証明した。一方、ブタのコロナウイルス感染症では、4 週令以下の弱令ブタで致死率の高い伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)が感染豚内で、呼吸器に親和性を持つブタ呼吸器系コロナウイルス(PRCoV)に変わることが知られている。TGEV の S 蛋白に欠損が起こることが原因である(30)。ネココロナウイルス感染の場合と同様に、病原性の低い SARS-CoV precursor から病原性 SARS-CoV が出現した可能性も考えられるのではないだろうか。この可能性については、Ng 等の論文に述べられている(46)。もし、この仮説が正しければ、変異を起こし病原性の強い SARS-CoV に変わる前の precursor ウイルスがどのようなウイルスなのか興味深い。なぜなら、そのウイルスは SARS-CoV に対して抵抗性を付与するワクチンとなる可能性が強いからである。

終わりに:

SARS-CoV が SARS の原因ウイルスであることが明かにされてから、まだ一年を経えていないが、この短期間に SARS-CoV に関して得られたウイルス学的知見は決して少なくない。ウイルスゲノムの構造、mRNA 合成を含めた複製機構などに関しては、今まで蓄積されたコロナウイルス学を基盤にして解析された。また、感染性 cDNA が作られ、リセプターも発見された。さらに、SARS-CoV は従来のコロナウイルスと異なり、かなり多種の動物に感染することも分かってきた。一方、SARS-CoV の起源は今のところよく分かっていないが、SARS の再発生対策を考える上で非常に重要である。また、何故 SARS-CoV がヒトの鼻風邪コロナウイルスと違い、致死率の高い重症肺炎を引き起こすか、などの病原性に関する解析は、動物モデルが確立されていない現段階では難しい。SARS-CoV リセプターが発見されたことから、リセプター発現マウスなどの感受性動物が作製されれば、有効なワクチン、抗ウイルス剤の開発も期待できそうである。

文献

1. Tyrell DA, Almeida JD, Berry DM. et al. (1968) Coronaviruses. *Nature (Lond.)* 220: 650
2. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS et al. (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 300, 1394-1399
3. Marra MA, Jones SJM, Astell CR et al. (2003) The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300, 1399-1404
4. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C et al. (2003) A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New Engl. J. Med.* 348: 1953-1966
5. Almazan F, Gonzalez JM, Penzes Z et al. (2000) Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *97*, 5516-5521
6. Yount B, Curtis KM, Fritz EA et al. (2003) Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12995-13000
7. Sturman LS and Holmes KV. (1983) The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 28; 35-112
8. Lai MMC and Cavanagh D (1997) The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48: 1-100
9. Gorbalenya AE (2001) Big nidovirus genome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494: 1-17
10. Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC et al. (2003) Unique and conserved features

- of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 331, 991-1004
11. Thiel V, Ivanov KA, Putics A. et al. (2003) Mechanism and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.*
 12. Guan Y, Zheng BJ, He YO. et al. (2003) Isolation and characterization of viruses related the SARS coronavirus from animals in southern china. *Science* 302 276-278
 13. Kuo I and Masters PS (2003) The small envelope protein is not essential for murine coronavirus replication. *J. Virol.* 77: 4597-4608
 14. Taguchi F. (1993) Fusion formation by uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant cl-2. *J. Virol.* 67. 1195-1202
 15. Taguchi F. (1999) Biological functions of mouse hepatitis virus (MHV) spike (S) and implication of S protein-MHV receptor interaction in virus virulence. *Curr. Topics Virol.* 1:245-252
 16. Phillips JJ, Chua MM, Lavi E. et al. (1999) Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses; the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. *J. Virol.* 73: 7752-7760
 17. Holmes KV and Compton SR (1995) Coronavirus receptors. *The coronaviridae* (ed. Siddell SG) pp 56-66 Plenum press.
 18. Miura HS, Nakagaki K and Taguchi F. (2003) N terminal domain of murine corona-virus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the spike protein . *J. Virol.* in press
 19. Tresnan DB, Levis R, Holmes KV. (1996) Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine and human coronaviruses in serogroup I. *J. Virol.* 70, 8669-8674
 20. Li W, Moore MJ, Vasilleva N et al. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450-454
 21. Kubo H, Yamada Y, Taguchi F. (1994) Localization of neutralizing epitopes and the receptor binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J. Virol.* 68, 5403-5410
 22. Bonavia A, Zelus BD, Wentworth DE et al. (2003) Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E. *J. Virol* 77; 2530-2538
 23. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM et al. (2003) The coronavirus spike protein

- is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* 77, 8801-8811
24. Chen D and Kim PS. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* 93: 681-684
 25. Makino S, Yokomori R, Lai MMC. (1990) Analysis of efficiently packaged defective-interfering RNAs of mouse coronavirus: Localization of a possible packaging signal. *J. Virol.* 64, 6045-6053
 26. Sethna PB, Hofmann MA, Brian DA (1989) Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 5626-5630
 27. Parker SE, Gallagher TM, Buchmeier JM (1989) Sequence analysis reveals extensive polymorphism and evidence of deletions within the E2 glycoprotein gene of several strains of murine hepatitis virus. *Virology* 173, 664-673
 28. Poland AM, Vennema H, Foley J et al. (1996) Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with feline enteric coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 34, 3180-3184
 29. Vennema H, Poland AM, Floyd-Hawkins et al. (1995) A comparison of the genomes of FeCVs and FIPVs and what they tell us about the relationship between feline coronaviruses and their evolution. *Feline Pract.* 23, 40-44
 30. Rasschaert D, Duarte M, Laude H. (1990) Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J. Gen. Virol.* 71, 2599-2607
 31. Lai MMC, Baric R, Makino S et al (1985) Recombination of non-segmented RNA genomes of murine coronaviruses. *J. Virol.* 56. 449-456
 32. Makino S, Fujioka N, Fujiwara K. (1985) Structure of the intracellular defective viral RNAs of defective interfering particles of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* 54, 329-336
 33. Tiel V, Herold J, Schelle B et al. (2001) Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol* 82: 1273-1281
 34. Yount B, Curtis KM, Baric RS (2000) Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.* 74, 10600-10611
 35. Masters PS (1999) Reverse genetics of the largest RNA viruses. *Adv. Virus Res.* 53:

245-264

36. Kuo L, Godeke GJ, Raamsman MJ et al. (2000) Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cells species barrier. *J. Virol.* 74, 1393-1406
37. Makino S, Taguchi F, Fujiwara K et al. (1982) Heterologous reponse of antiserum-treated cell clones from a persistently infected DBT cell line to mouse hepatitis virus. *Jap. J. Exp. Med.* 56, 297-302
38. Sawicki SG, Lu J, Holmes K. (1995) Persistent infection of cultured cells with mouse hepatitis virus (MHV) results from the epigenetic expression of the MHV receptor. *J. Virol.* 69, 5535-5543
39. Taguchi F, Yamaguchi R, Makino S et al. (1981) Correlation between growth potential of mouse hepatitis virus in macrophages and their virulence for mice. *Infect. Immun.* 34, 1059-1061
40. Vennema H, de Groot RJ, Harbour D et al. (1990) Early death after feline infectious peritonitis virus challenged due to recombinant vaccinia virus immunization. *J. Virol.* 64, 1407-1409
41. Fouchier RAM, Kuiken T, Schutten M et al. (2003) Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423, 240
42. Martina BEE, Haagmans BL, Kuiken T et al. (2003) SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature* 425, 915
43. Nicholls JM, Poon LM, Lee KC et al. (2003) Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361 1773-1778
44. Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC et al. (2003) Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia; a prospective study. *Lancet.* 361, 1767-1772
45. Prevalence of IgG antibody to SARS-associated coronavirus in animal traders- Guangdong Province, China, 2003, *CDC Morbidity and Mortality Weekly report* 52, 986-987
46. Ng TW, Turinici G, Danchin A (2003) A double epidemic model for the SARS propagation. *BioMed Central infect Dis.* 2003

図の説明

図1: コロナウイルス粒子の模式図

コロナウイルスのエンベロープには、S (spike) 蛋白、M (membrane) 蛋白、E (envelope) 蛋白が存在し、その内部には約 30 kb の(+)鎖ゲノム RNA とそれに結合する N (nucleocapsid)蛋白が螺旋状の構造をなす。

図2: コロナウイルス(グループ I~IV)ゲノム構造の比較

5'末端から ORF1a、1b、S、E、M、N の遺伝子がマップされている。グループ 2 には ORF2 と HE 遺伝子が ORF1b の下流にある。SARS-CoV の M と N 遺伝子間に小さな ORF が数個存在する。遺伝子名が明記されていない ORF() は非構造蛋白をコードしていると考えられる。

図3: ヒト由来 SARS-CoV と野生動物由来 SARS-CoV の N 遺伝子上流領域の差異

ヒト由来 SARS-CoV (hu) はハクビシン由来 SARS-CoV (pc) と比べ 29 塩基の欠損がある。そのため、ORF10 が 2 個の新たな ORF10 と 11 に分かれる(文献 12)。

図4: SARS-CoV のゲノムと mRNA 構造

コロナウイルス mRNA の構造は、どの mRNA もゲノム RNA の 3'末端から異なる長さをもつ RNA からなる (nested set と呼ぶ、本文参照)。それぞれの mRNA からは、原則として、その 5'末端にコードされる蛋白のみが翻訳される。SARS-CoV mRNA_{7b} には、培養細胞継代により 45 塩基の欠損が生ずる。(文献 11)。