

トピックス

SARS コロナウイルス

田 口 文 広

はじめに:

一昨年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²⁻⁴⁾。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、解析が進むにつれ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 が出来る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の研究が、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ーロウイルス属 (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、アーテリウイルス科 (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

国立感染症研究所ウイルス第3部
(〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1)
SARS coronavirus
Fumihito Taguchi
Laboratory chief, Laboratory of Respiratory Virol Diseases and SARS, Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases
4-7-1 Gakuen, Msashi-Murayama Tokyo 208-0011
TEL: 042-561-0771
FAX: 042-565-3315

表1 コロナウイルス

Acronym	ウイルス名	抗原性グループ
TGEV	ブタ伝染性胃腸炎ウイルス	1
(PRCoV)	ブタ呼吸器コロナウイルス	1
FIPV	ネコ伝染性腹膜炎ウイルス	1
FECov	ネコ呼吸器コロナウイルス	1
CCoV	イヌコロナウイルス	1
HCoV (229E)	ヒトコロナウイルス-229E	1
PEDV	ブタ流行性下痢症ウイルス	1
MHV (MCoV)	マウス肝炎ウイルス	2
BCoV	ウシコロナウイルス	2
HCoV (OC43)	ヒトコロナウイルス-OC43	2
HEV	ブタ血球凝集性脳炎ウイルス	2
IBV	ニワトリ伝染性気管支炎ウイルス	3
TCoV	七面鳥コロナウイルス	3
SARS CoV	SARS コロナウイルス	4 ?

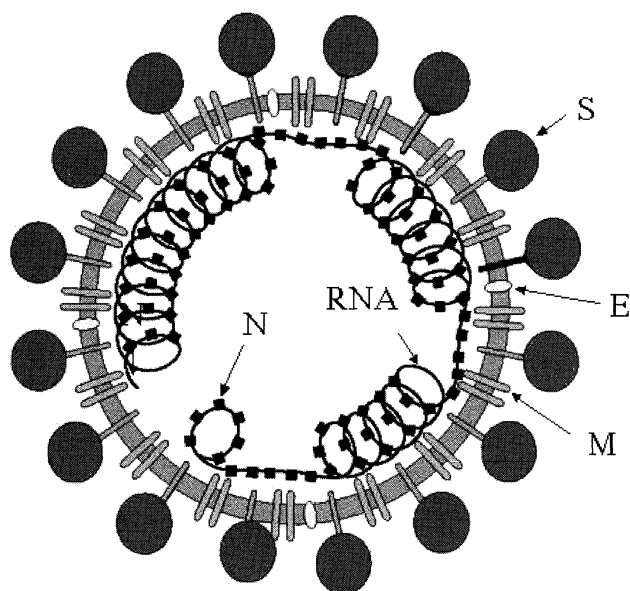


図1 コロナウイルス粒子の模式図

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30kb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。

ウイルス粒子及びゲノム構造

コロナウイルス粒子は約20nm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、楕円形および多形性の形状を示す(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^{2-4,11)}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30kbの(+)鎖ゲノムRNAを持つ(図2)⁸⁾。ゲノムRNA 5'末端にはcap構造、3'末端にはpoly(A)が存在する。30kb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 (ORF 1a, 1b), S, E, M, N 遺伝子の順で存在する。非構造蛋白遺伝子 (ORF 1a, 1b) が全体の2/3 (約20kb) を占め、ウイルス構造蛋白 (約10kb) 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ORF 1b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

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。

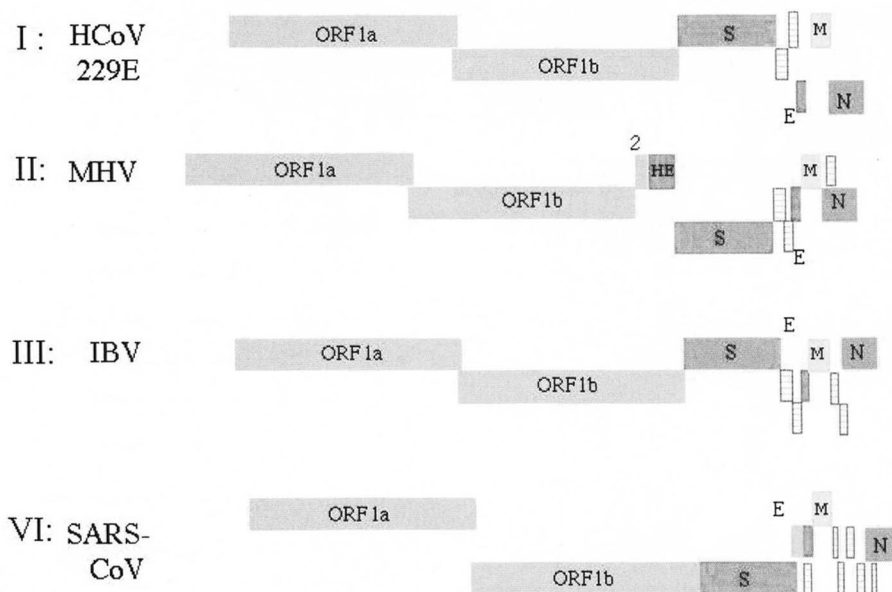


図2 コロナウイルス（グループI～IV）ゲノム構造の比較

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。

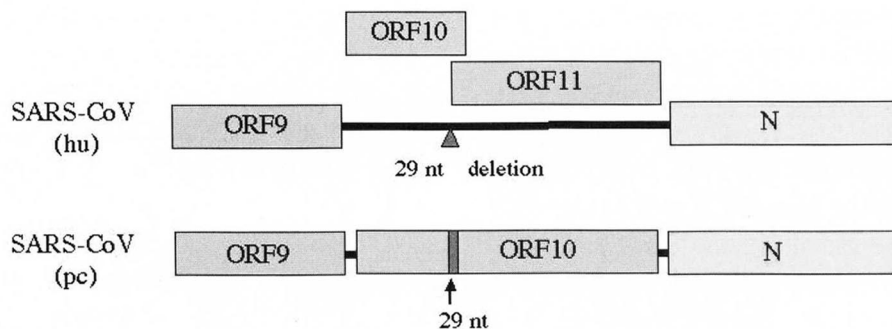


図3 ヒト由来SARS-CoVと野生動物由来SARS-CoVのN遺伝子上流領域の差異

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)。

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ORF7b)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に分子量約500, 800kDaの蛋白がコードされている¹¹⁾。ORF1aと1bの間では翻訳されるフ

レイムにシフトがあり、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のフレームシフトが起こり、1aと1b融合蛋白が翻訳される^{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50-60kDa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20-25kDa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

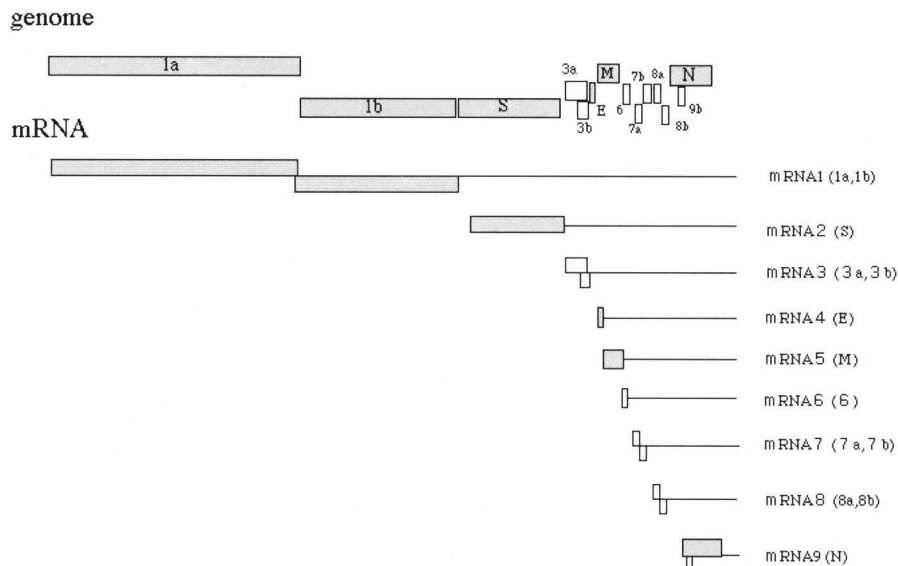


図4 SARS-CoV のゲノムと mRNA 構造

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、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 7 b には、培養細胞継代により 45 塩基の欠損が生ずる。(文献11)。

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 まで輸送される。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、reverse genetics を用いて作成した E 遺伝子欠損ウイルスを用いた最近の研究では、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、S-S 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、中和エピトープ、T 細胞エピトープ、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ープは、多くが S1 に存在する。S 蛋白上には T 細胞エピトープも存在する。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 molecule 1 (CEACAM 1) 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を持つ。CEACAM 1 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 (腎臓の細尿管上皮細胞など) 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。CEACAM 1 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⁾。CEACAM 1 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であると考えられている。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、HCoV229E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327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が示唆される。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)ウイルス目と命名された(図4)。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²⁵⁾。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、明らかでない。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mRNA 7, 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mRNA 3は、その下流にE, M, N遺伝子を持つが、これらの蛋白はmRNA 3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mRNA 5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、ORF 1b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蛋白に点変異が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^{28–30)}。

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り、IBVの場合には、フィールドでワクチンに抵抗性を示す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重要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については良く研究されており、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収められるタイプ、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、粒子内には収められないタイプ、3) は2)のタイプでpackaging signalを持つため粒子内に効率に収められるDI RNAである^{25, 32)}。どのDI RNAも2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、非常に有用な手段である。

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、BAC⁵⁾が使われたが、cDNA増幅途中で変異が入りやすいため、組み換えvaccinia virusが利用され、HCoV-229E、TGEV、MHVのreverse geneticsに成功している³³⁾。また、Baric等はTGEVの28.5kb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、*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⁾。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10kb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 RNA活性を持つようなRNAを作るため、10kbのcDNA5'末端にゲノム5'末端を繋いで作製したものである。*In vitro*転写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 RNAとのhomologous recombinationが起こり、3'末端10kbが導入したRNAに置き換えることが可能である³⁵⁾。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。一方、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2-3 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、家畜等多くの動物種に感染し、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。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、急性の致死的な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が存在する。一般に MHV 感染では、病原性の高さと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 (antibody-dependent enhancement, ADE) が報告されている⁴⁰⁾。ADE 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と理解されており、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 抵抗性を賦与する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、急速に感染が拡大することが予想される。SARS-CoV は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。広東省のハクビシン、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 RNA 断片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が容易に且つ頻繁に起こることは、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、欠損や変異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⁾。このことから、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否定できない。

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週令以下の幼若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 遺伝子等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、まだ一年を経っていないが、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膨大な量である。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成できれば、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 MHV 4 /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) pp56–66 Plenum press.
- 18) Miura HS, Nakagaki K and Taguchi F. (2004) N terminal domain of murine corona-virus receptor CEA-CAM 1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the spike protein . *J. Virol.* **78**, 216–223
- 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 E 2 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) Mastes 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 response 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