

総説

コロナウイルスの病原性因子の解析

神谷 亘 (大阪大学微生物病研究所・感染症国際研究センター・臨床感染症学研究グループ)

Kamitani, W. (2015). Analysis of pathogenesis viral protein of coronavirus

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 66, 1-4.

キーワード：コロナウイルス、非構造蛋白質、shutoff、
遺伝子発現制御

はじめに

コロナウイルスは、RNA をそのウイルスゲノムとして持つエンベロープウイルスである。コロナウイルスはニドウイルス目に分類され、その中にコロナウイルス科、そして、コロナウイルス亜科とトロウイルス亜科に分類される。コロナウイルス亜科はさらに、アルファコロナウイルス属、ベータコロナウイルス属、ガンマコロナウイルス属の3つの属に分類される。アルファコロナウイルス属には、ヒトコロナウイルス229E や豚流行性下痢ウイルスなどが含まれる。ベータコロナウイルス属には、2002年度に流行した重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome: SARS) コロナウイルスが含まれる。また、SARS コロナウイルスの発生から、おおよそ10年後の2012年度より中東で感染が広がっている、中東呼吸器症候群 (Middle East Respiratory Syndrome: MERS) コロナウイルスなどが含まれる。ガンマコロナウイルス属には、主に鳥類由来のコロナウイルスが含まれる。

ヒトにおいて、コロナウイルス感染症は、SARS コロナウイルスの発生以前では、風邪の原因ウイルスの1つとして考えられており、強い病原性を示すウイルス感染症ではなかった。そのため、SARS コロナウイルス発生以前のコロナウイルス研究はマウス肝炎ウイルスの研究が牽引してきた。

一方、獣医学領域においては、牛コロナウイルス、猫コロナウイルス、犬コロナウイルスなどそれぞれの動物種で固有のコロナウイルスが存在している。また、豚流行性下痢ウイルスも重要なウイルス感染症の1つであり、最近では2013年より日本国内において発生している。

コロナウイルスのウイルス学的特徴は、ウイルス粒子表面に特徴的な王冠様の構造物 (スパイクタンパク

質) が存在することであり、このウイルス粒子の外殻構造がコロナウイルスの由来である。コロナウイルスのウイルス粒子は主に3つの構造タンパク質 (S タンパク質、M タンパク質、E タンパク質) から構成されており、その中におおよそ30,000塩基のRNA がウイルスゲノムとして取り込まれている。このウイルスゲノムは、RNA ウイルスの中で最長であり、これがコロナウイルスの1つの特徴である。しかしながら、このように長いウイルスRNA ゲノムを有するため、他のRNA ウイルスで用いられている逆遺伝子操作系の取り扱いが非常に複雑で煩雑である。そのため、コロナウイルスの分子ウイルス学的な解析は、他のRNA ウイルスに比べて遅れているように思われる。

SARS コロナウイルスの非構造タンパク質

2002年度にアジアを中心に広がった重症急性呼吸器症候群の原因ウイルスであるSARSコロナウイルスは、WHO が終息宣言をするまでの僅か一年間の間に、おおよそ8,000人が感染したと報告されている。SARS コロナウイルスが突如としてヒトコロナウイルスの中でどのようにして強い病原性を保持するようになったか調べるために、我々のグループは、SARS コロナウイルスの非構造タンパク質に注目して研究を行っている。

SARS コロナウイルスは、9本のウイルス由来のRNA が細胞内に侵入した際にウイルスゲノムから合成される。ウイルスRNA はcap構造とpolyA構造を有しており、そのままmRNAとして翻訳に利用される。ウイルスRNA のおおよそ2/3を占めるORF1abには、ウイルスの複製に必要なウイルスタンパク質がコードされている。このORF1abからは、最終的に16個の非構造タンパク質が産生される。この16個の非構造タンパク質は、nsp1からnsp16タンパク質であり、それぞれ、RNA依存性RNAポリメラーゼ活性など、固有の機能を持っている。我々のグループは、非構造タンパ

ク質の中で最も5'末端側にコードされている nsp1 タンパク質に注目し、以下のように nsp1 タンパク質固有の機能を見出した。

SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質

SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質は、180個のアミノ酸からなる分子量約20kDaの細胞質に局在するタンパク質である。この nsp1 タンパク質を発現するプラスミドを培養細胞内に導入すると、細胞内で宿主の mRNA の分解が促進されることを明らかにした³⁾。さらに、nsp1 タンパク質を発現するプラスミドを導入した培養細胞では、インターフェロンの mRNA も分解されることを明らかにした⁵⁾。当然、宿主細胞の mRNA が SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質により分解されるため、その結果として、宿主細胞のタンパク質量も減少することを確認した。上述のように SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質は、感染細胞内において宿主 mRNA を分解することで、抗ウイルスタンパク質であるインターフェロンなどの宿主応答を抑制する機能を持つことを明らかにした。

SARS コロナウイルス nsp1 タンパク質とリボゾーム

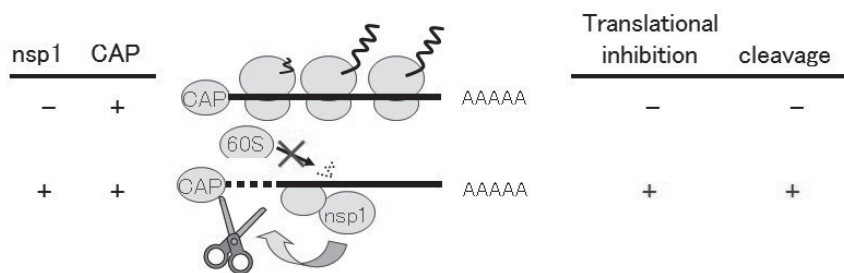
我々のグループは、SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質の機能解析をさらに推し進めるために、タンパク質合成過程のみを解析するのに適したウサギ網状赤血球翻訳システムを用いた。In vitro で合成したルシフェラーゼをレポーター遺伝子としてもち、両末端

に cap 構造と polyA 構造を有する RNA からのルシフェラーゼ・タンパク質の合成量を指標に、nsp1 タンパク質によるタンパク質合成阻害能を検討した。使用した nsp1 タンパク質は、大腸菌発現系を用いて GST 融合タンパク質として発現させた後、精製過程で GST を除去したものをを用いた。その精製した nsp1 タンパク質をウサギ網状赤血球翻訳システムの反応系に加え、nsp1 タンパク質によるタンパク質合成阻害効果を評価した。

その結果、nsp1 タンパク質は cap 依存性翻訳だけでなく、IRES 依存性翻訳を抑制することを明らかにした。また、このウサギ網状赤血球翻訳システムにおいて、nsp1 タンパク質は RNA の分解促進を引き起こさずにタンパク質の合成を阻害することを明らかにした。

さらに、このウサギ網状赤血球翻訳システムを用いた解析により、nsp1 タンパク質は翻訳阻害を引き起こすために、リボゾームの構成ユニットの1つである40S リボゾーム複合体と結合することを明らかにした。つまり、この40S リボゾームと nsp1 タンパク質との結合により、60S リボゾームのリクルートを阻害し、結果的に80S リボゾームが形成されないことを明らかにした⁴⁾。

先に述べたように、このウサギ網状赤血球翻訳システムにおいて、nsp1 タンパク質は RNA の分解促進を引き起こさないことがわかっている。このことは培養細胞を用いた実験と異なる結果であった。この矛盾点



Nsp1タンパク質は40Sリボゾームに結合する

Nsp1タンパク質は80Sリボゾームの複合体の形成を阻害する

Nsp1タンパク質はRNAを5'末端で切断する

リボゾームはnsp1タンパク質によるRNA切断に必要である

図1. SARSコロナウイルス nsp1タンパク質による宿主遺伝子発現阻害

を解き明かすために、さらなる解析を行った結果、ウサギ網状赤血球翻訳システムにおいて、nsp1タンパク質は、少なくとも5'末端の近傍でRNAを切断していることを明らかにした。我々の研究成果から、少なくともnsp1タンパク質は、それ自身ではRNAを分解する活性を保持していないため、おそらく宿主のRNAを分解する機構を利用していると思われる。我々は、ウサギ網状赤血球翻訳システムでは、RNA切断に続いて起こる、RNAの分解機構が欠如しているため、nsp1タンパク質はウサギ網状赤血球翻訳システムにおいてRNA分解を引き起こさないと推測している。

いずれにしても、SARSコロナウイルスのnsp1タンパク質は、40Sリボソームを標的として、タンパク質合成阻害とRNA分解促進を引き起こすことを明らかにした(図1参照)。

SARS コロナウイルス nsp1タンパク質とウイルス RNA

SARSコロナウイルスのnsp1タンパク質がリボソームとの結合やRNA分解により、強力に宿主の遺伝子発現を抑制することを明らかにした。ところが、SARSコロナウイルスのウイルスRNAは、宿主のmRNAと同じようにcap構造とpolyA構造をもつことが知られている。そこで、我々は、nsp1タンパク質がどのように宿主RNAとウイルスRNAを区別し、さらに宿主の遺伝子発現のみを特異的に抑制できる機構を明らかにしようと試みた。

まず、はじめにnsp1タンパク質がRNAと結合する性質に着目した。他の研究グループの報告によると、nsp1タンパク質はRNAと結合することが示唆されている²⁾。また、SARSコロナウイルスは、感染細胞内で9本のウイルス由来のRNAを合成するが、その9本のRNAの両末端には、共通する配列が存在している。そこで、nsp1タンパク質がウイルス由来のRNAと結合するかどうかを検証した。

その結果、nsp1タンパク質はウイルス由来のRNAと特異的に結合することを明らかにした⁶⁾。さらに、nsp1タンパク質は、ウイルス由来RNAとの結合を介して、ウイルス由来のRNAに対しては、タンパク質合成の阻害やRNA分解を引き起こさないことを明らかにした。

コロナウイルスの遺伝子操作系

コロナウイルスはすでに述べたように、RNA ウィ

ルスの中で最長のRNAをウイルスゲノムとして有しているため、任意の変異を導入できる遺伝子操作系を確立するにはより複雑・煩雑な操作が必要となる。この理由から、コロナウイルスの遺伝子操作系は海外のごく限られたグループで使用されていたが^{1,7)}、我々のグループは、コロナウイルスの研究を推し進めるうえで、我が国においても、コロナウイルスの遺伝子操作系の必要性を痛感した。そこで、既報に基づいてコロナウイルスの遺伝子操作系の立ち上げを試みている。現在、我々が使用している方法は、Luis Enjuanes 博士らが開発したBacterial Artificial Chromosome (BAC)を用いる遺伝子操作系である¹⁾。

BACは、大腸菌内でコピー数が少なく、巨大なDNAを維持するのに優れている。我々は、まず、このBACシステムを用いて、SARSコロナウイルスのcDNA全長を保持するBACの作製に取り組んだ。SARSコロナウイルスcDNAの両末端に、サイトメガロウイルスのプロモータ配列とpolyA配列を付加することで、培養細胞内でサイトメガロウイルスのプロモータにより完全長のSARSコロナウイルス由来のmRNAが合成される。そして、このmRNAからウイルスタンパク質が翻訳され、最終的に感染性粒子が産生される仕組みである。実際に、我々のグループは、完全長のSARSコロナウイルスのcDNAを保持するBACの作製に成功し、その後、培養細胞に導入することで、感染性粒子を回収することに成功している。また、SARSコロナウイルスのアクセサリ遺伝子の1つである、7ab領域をGFPに置き換えることにより、GFP遺伝子を有するSARSコロナウイルスの作製にも成功している。このようなレポーターウイルスの作製は、より簡便なコロナウイルスのアッセイ系への応用に繋がると考えられる。

また、SARSコロナウイルス以外にも、MERSコロナウイルスや豚流行性下痢ウイルス、さらに猫コロナウイルスに対しても、同様の方法を用いて遺伝子操作系を確立するプロジェクトが進行している。コロナウイルスに対する遺伝子操作系を我々のグループ自身で確立することは、今後のコロナウイルスの発展に大きく貢献できると確信している。

おわりに

周知のとおり、SARSコロナウイルスは幸運にも一年で終息を迎えたが、その発生から約10年後にMERSコロナウイルスの発生、そして、豚流行性下痢ウイル

スの発生など、コロナウイルスによる感染症は、これからも注意しなければならない感染症の1つである。今回の内容は、コロナウイルスの基礎ウイルス学に偏った内容であるが、基礎ウイルス研究者として、今後はヒト・動物コロナウイルスを問わず、少しでも基礎研究を通してコロナウイルス感染症の征圧に向けて努力したい。

最後に、第86回日本豚病研究集会で特別講演をさせていただいたことに感謝申し上げます。今回の講演にあたり、お世話になりました動物衛生研究所鈴木亨先生ならびに世話人の先生方にこの場を借りてお礼申し上げます。

また、本研究を実施していただいた、田中智久博士(山梨大学)、坂井祐介博士(大阪大学)、寺田豊博士(山口大学)に心から感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Almazán F, et al. (2006) Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol*, 80: 10900-10906.
- 2) Almeida MS, et al. (2007) Novel beta-barrel fold in the nuclear magnetic resonance structure of the replicase nonstructural protein 1 from the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 81: 3151-3161.
- 3) Kamitani W, et al. (2006) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 12885-12890.
- 4) Kamitani W, et al. (2009) A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nat Struct Mol Biol*. 16: 1134-1140.
- 5) Narayanan K, et al. (2008) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J Virol*, 82: 4471-4479.
- 6) Tanaka T, et al. (2012) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host mRNA. *J Virol*, 86: 11128-11137.
- 7) Yount B, et al. (2003) Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 12995-13000.