

フラビウイルス科に属する
uncapped ウイルスのゲノム構造と
分子進化に関する研究

片 山 和 彦

1999年

**フラビウイルス科に属する
uncapped ウイルスのゲノム構造と
分子進化に関する研究**

片山和彦

1999年

目次

緒言	-----	1
第 I 章	フラビウイルス科に属する uncapped ウイルス である豚コレラウイルス (CSFV) のゲノム構造 と特徴	-----4
緒言	-----	5
方法	-----	7
	CSFV の培養	7
	RNA 抽出	7
	cDNA 合成および PCR	7
	塩基配列の決定および解析	8
	5' 末端及び 3' 末端の塩基配列の決定	8
	RNA-RNA ライゲーションによる 5'RACE	9
	DNA-DNA ライゲーションによる 5'RACE	10
	3' 末端の塩基配列の決定 (3'RACE)	10
結果	-----	12
	CSFV の 5' 末端、3' 末端の構造	12
	CSFV ・ALD 株と GPE (-) 株の比較	13
考察	-----	15
第 II 章	C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム 5' 末端の 構造と機能の解析	-----19
緒言	-----	20
対象	-----	23
方法	-----	24
	プライマー	24
	RNA 抽出および cDNA 合成	24
	PCR	24
	塩基配列の決定および解析	24
	In vitro 翻訳	25

結果	27
5'RACE による 5' 末端構造の比較	27
5'NCR の塩基配列変異と IFN 治療効果	27
HCV 各タイプにおける	
5'NCR の RNA 塩基配列と構造の比較	28
<i>In vitro</i> 翻訳	29
考察	30
HCV ゲノム 5' 末端の構造	30
5'NCR の塩基配列の多様性と IFN 感受性	30
HCV の 5' 末端のヘアピン構造	32

第 III 章 GB ウイルス C のゲノム塩基配列と構造の解析 --- 34

緒言	35
方法	38
GBV-C/HGV 感染者のスクリーニング	38
全塩基配列の決定	38
5' 末端の塩基配列決定	39
3' 末端の塩基配列決定	39
結果	41
5' 末端及び 3' 末端の特徴	41
GBV-C/HGV の ORF	41
GBV-C/HGV の genotype	42
3 つの genotype 間および同一 genotype 内の塩基配列、 アミノ酸配列の相同性	44
考察	45
GBV-C/HGV の 5' 末端、3' 末端の特徴	45
GBV-C/HGV の分子系統解析	46
GBV-C/HGV のアミノ酸コード領域の特徴	48

総括	フラビウイルス科 (uncapped ウイルスを中心として) のゲノム構造から見た分子進化-----	50
----	---	----

IRES トロピズムの可能性-----	51
フラビウイルス科の IRES による最初の分岐-----	51
Uncapped ウイルス (IRES を有するグループ) の分岐-----	52
複製開始機構の違いによる分岐の可能性-----	55

謝 辞-----	57
----------	----

引用文献-----	58
-----------	----

緒言

当初、フラビウイルス属は、沈降係数 42~49S で塩基数約 11kb のポジティブセンス一本鎖 RNA を遺伝子とし、外被膜を有する小型の球状ウイルスとして定義されており、トガウイルス科の一員として、アルファウイルス属、ルベラウイルス属、ベスチウイルス属とともに一つの科に分類されていた。しかし、その後ウイルス粒子の構造蛋白質、遺伝子 RNA の構造およびウイルスの複製増殖機構が研究され、1985 年にフラビウイルス属は独立したフラビウイルス科として分類されトガウイルス科から独立した [1, 2]。

フラビウイルス科には、黄熱病ウイルス (YFV)、デングウイルス、日本脳炎ウイルス (JEV) などから構成されるフラビウイルス属と、牛下痢症ウイルス (BVDV)、豚コレラウイルス (CSFV)、ヒツジボーダー病 (BDV) から構成されるベスチウイルス属として、1989 年に新たに発見された C 型肝炎ウイルス (HCV) を含む第 3 の属：名称未決定 (後に Hepacivirus と命名された。1999 年に至っても、この第 3 の属に含まれるウイルスは HCV のみであるため、本論文では HCV と表記する)、以上 3 種類の属が含まれている [3]。

フラビウイルス科に属する 3 つの属には、ゲノム RNA 上に single large open reading frame (ORF) が存在し、ウイルス感染時に自身が mRNA として機能するという共通点がある (図 1)。しかし、ゲノムの塩基配列に基づく分子進化遺伝学的隔たり (genetic distance または distance) および、ゲノム 5' 末端の構造の違いによって、これら 3 つの属は、フラビウイルス属とベスチウイルス属、HCV の 2 つに大きく分別される。フラビウイルス属に属するウイルスは、ゲノム RNA の 5' 末端にキャップ構造を有してお

り、真核生物で最も普遍的な蛋白質翻訳機構である、キャップ構造依存的翻訳を行うことが知られている[4、5、6]。一方、ベスチウイルス属、HCV に属するウイルスは、5'末端にキャップ構造が存在しない[7、8]。これらのウイルスの5'非翻訳領域(noncoding region: 5'NCR)には、internal ribosome entry site (IRES) と呼ばれる RNA の高次構造が構築され、キャップ構造非依存的翻訳を行うと考えられている[9、10、11]。現在までに明らかにされた IRES によるキャップ構造非依存的翻訳を行うウイルスは、ピコルナウイルス科に属する一群のウイルス[12]と、ベスチウイルス属、HCV のみであり、数あるウイルスの中でも少数派である。

1995 ~ 1998 年にかけて、第4番目の属と考えられる GB ウイルス (GB ウイルス A (GBV-A)、GB ウイルス B (GBV-B) [13]、および GB ウイルス C /G 型肝炎ウイルス (GBV-C/HGV)) が発見された[14]。この GB ウイルスについては、どのような翻訳開始を行うのか、どのようなゲノム構造を有するのかが解析されておらず、はっきりとした分類はなされていない。

他方、フラビウイルス科に属するウイルスは、多様な自然宿主、異なる病原性を有している。フラビウイルス科のフラビウイルス属は、人獣共通感染症の原因ウイルスであり、蚊、ダニなどの吸血性節足動物で媒介される節足動物媒介ウイルス (arthropod-borne vertebrate virus: アルボウイルス)として知られている[15]。一方、残る2つの属は、ベスチウイルス属がウシ、ブタ、ヒツジ[16]、HCV は人間もしくはチンパンジーが自然宿主[17、18、19]であり、主に同一動物種内感染でのみ伝播する。新たに発見された GB ウイルスの GBV-A は新世界ザルに属するタマリンを自然宿主[13]としているが、GBV-B、GBV-C/HGV はヒトから発見されたため自然宿主がヒトである可能性が強く、同一属でありながら異なる動物種間で伝播している可能性が考えられる。

このような特徴を持つフラビウイルス科のウイルスは、脊椎動物及びヒトに感染すると重篤な疾病を起こすものが多く、ウイルス感染防御、治療の側面からウイルスの宿主特異性（トロピズム）、ウイルス病原性発現のメカニズムの解析が待たれている。

本研究では、ベスチウイルス属、HCV、GB ウイルス（これらをまとめて uncapped ウィルスと呼称する）のゲノム RNA の全塩基配列を決定し、ゲノムの構造を明らかにすることを目指した。さらに、ゲノム全長の塩基配列を対象とした分子進化遺伝学的解析によって、ウイルスがどのように病原性を発現するのか、どのようにスピーシーズバリアー（species barrier：種間の壁）を突破し分岐していったのかを探索した。

第 I 章

フラビウイルス科に属する uncapped ウイルスである

豚コレラウイルス (CSFV) のゲノム構造と特徴

緒言

豚コレラウイルス (CSFV) のゲノムは、約 13kb のポジティブセンス一本鎖 RNA である。約 370 スクレオチド(nt)の長い 5' NCR、約 12kb の ORF と約 230nt の 3' NCR から成るとされているが、5'末端の構造、及び塩基配列は明らかにされていない (図 1)[20]。CSFV の 5'NCR は約 370nt と長く、その中に翻訳開始コドンである ATG を多数含むこと、複雑な高次構造をとることが予測されることなど HCV との類似性から、5' NCR に IRES と呼ばれる RNA の特徴的な構造を有し、キャップ構造非依存的翻訳により、蛋白合成を行うと推測されている[10]。したがって、5'末端にキャップ構造を持たないと考えられている。一方、3' NCR はすでに 3'末端が決定されたベスチウイルス属の牛下痢症ウイルス (BVDV)との類似性から、BVDV 同様 CSFV にも poly A 配列が無いと考えられている。

キャップ構造を有するフラビウイルス属は、そのゲノム RNA 上に存在する ORF の 5' 末端側には、構造蛋白質がコードされている。当初、CSFV においても同様であると考えられていた。しかし、1991 年に BVDV において ORF の 5'末端側に非構造蛋白質である N-terminal autoprotease (Npro) をコードする領域の存在が明らかにされたことから[21、22]、CSFV も BVDV 同様、ORF の 5'末端側に Npro をコードしている可能性が示唆されている。これに続く ORF 下流の 1/4 は構造蛋白質遺伝子 (コアとエンベロープを構成すると思われる 3 種類の糖蛋白質、gp44/48、gp25、gp55)、残る 3/4 は非構造蛋白質遺伝子 (p54/NS2、p80/NS3、p10/NS4a、p30/NS4b、p58/NS5a、p75/NS5b) であると推測されている[23]。p80/NS3 には、ウイルス特異的蛋白質分解酵素、RNA ヘリカーゼのアミノ酸モチーフ[24]、p75/NS5b には RNA 依存性 RNA ポリ

メラゼ (RdRp) のアミノ酸モチーフ[25]の存在が報告されており、おのおのそれらの機能を有すると考えられている[20]。しかし、実際に機能が確認されているのは、NS3 のヘリカーゼ、ウイルス特異的蛋白質分解酵素のみであり、フラビウイルス属に比べゲノムの構造、機能に関する研究が遅れている。

CSFV の感染及び流行は、養豚に深刻なダメージを与えるため、このウイルスの感染防御の研究は 1989 年より盛んに行われてきた[26]。そのため世界各地から多様な野外流行株が分離されていることに加え、いくつかの弱毒化生ワクチン株も開発されている。しかし、分子生物学的な手法を用いた研究はフラビウイルス属に比べ遅れており、我が国には、CSFV 野外流行分離株であり強毒株である ALD 株、ALD 株を実験室で継代することによって作られた弱毒化生ワクチン株 GPE (-) 株が存在する[27]。本章では、これら 2 株の全ゲノム塩基配列を決定し、ウイルスの病原性発現のメカニズムを明らかにすることを目的として塩基配列の解析を行った。

方法

CSFV の培養

豚腎臓由来細胞株 PK15 細胞もしくは豚精巣初代培養細胞に、CSFV 野外流行強毒株である ALD 株、弱毒化生ワクチン株である GPE (-)株を moi 10 で感染させ、4~6 日間培養した後、その培養上清を回収した。回収した培養上清は、3000rpm の粗遠心により細胞残渣等を除去し、ウイルスの含まれる上清をシードウイルス液として得た。

RNA 抽出

シードウイルス液 10ml に含まれる CSFV 粒子から、酸グアニジン・フェノール・クロロフォルム法 (acid guanidine phenol chloroform extraction: AGPC) [28]に基づいて RNA を抽出した。

cDNA 合成および PCR

シードウイルス液から抽出した RNA を 100 μ l の TE buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA 2Na) に再溶解し、10 μ l を cDNA 合成に用いた。cDNA 合成は、プライマーにランダムヘキサマー、逆転写酵素として MuLV 由来逆転写酵素 superscript reverse transcriptase version II (GIBCO BRL) 200units を用い、酵素に付属のプロトコールにしたがって 37℃にて 4 時間行った。

1994 年 1 月時点のデータベース上に ORF 全長の塩基配列が公開されていたヨーロッパで分離された野外流行株、CSFV Brescia 株の塩基配列を基に PCR 増幅用のプライマーを設計した。増幅領域は、PCR 産物が 800 ~ 1200 nt のサイズになり、かつ、互

いに隣り合う領域の PCR 産物が 50 ~ 200 nt 重なり合うように ORF を 16 分割して増幅するように定めた。

PCR は、得られた cDNA を鋳型にして、熱変性 94℃ 1 分間、アニーリング 55℃ 1 分間、伸長反応 72℃ 3 分間の温度サイクルを 1 サイクルとし、45 サイクルを、PCR thermal cycler PJ2000 (Applied Biosystems) を用いて実施した。

得られた増幅産物は、3% NuSieve GTG アガロースゲル (宝酒造) により電気泳動し、分画分子量を確認した後、アガロースゲルより切り出した。切り出した増幅産物は、MERmaid DNA purification kit (BIO 101) を用いてキット付属のプロトコールに従い精製した。

塩基配列の決定および解析

精製した 16 種類の増幅産物は、dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて、キット付属のプロトコールに従い反応させ、Centri-Sep micro spin columns (Applied Biosystems) で分離精製後、ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) により直接塩基配列を決定した。なお、塩基配列は、増幅産物のセンスおよびアンチセンス側をそれぞれ 2 回以上解析し、結果が一致することを確認した。決定した塩基配列は配列解析ソフトウェアとして DNASIS-Mac (Hitach Software Engineering Co., Ltd.)、Genetyx-Mac (Software Development Co., Ltd.) を用いて解析した。

5'末端及び 3'末端の塩基配列の決定

5'末端の塩基配列については RNA-RNA ライゲーションに基づく Rapid amplification cDNA end (RACE) 法[29]および DNA-DNA ライゲーションに基づく RACE 法 [30]に

より決定した。3'末端の塩基配列については後述したポリアダニレーションによる 3'RACE 法 [31]を用いて決定した。

RNA-RNA ライゲーションによる 5'RACE

5'末端にリン酸基を持たない 30mer のオリゴ RNA、MCST7 RNA (5'-rAGG UAC CAA GCU UUA AUA CGA CUC ACU AUA-3')を合成し、前述の方法で抽出した CSFV ゲノム RNA の 5'末端に T4 RNA ライゲース 2units (宝酒造)を用いて、50mM Tris-HCl pH 7.5、5mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール、0.5 mM ATP、25% PEG 6000 存在下、20℃で 24 時間反応させ、ライゲーションした (RNA-RNA ライゲーション)。反応終了後ライゲーション反応液から RNA をフェノール、クロロホルムによって抽出し、エタノール沈殿によって回収した。逆転写用アンチセンスプライマーは、塩基配列決定に成功した 5'NCR の塩基配列をもとに設計し合成した。ライゲーションさせた RNA の高次構造に阻害されず、5'末端まで cDNA 合成が到達するように、逆転写酵素として耐熱性の高い AMV 由来逆転写酵素 reverse transcriptase XL (Life Science) 2units を用い、酵素に付属のプロトコールにしたがって 57℃にて 30 分間 cDNA 合成を行った。

合成した cDNA を鋳型として、MCST7 RNA と等しい配列を有するオリゴ DNA : MCST7 (5'-dAGG TAC CAA GCT TTA ATA CG-3')をセンスプライマーに、アンチセンスプライマーに cDNA 合成時に用いたものと同じのプライマーを用いて PCR を行った。PCR は、熱変性 94℃ 1 分間、アニーリング 57℃ 1 分間、伸長反応 72℃ 3 分間の温度サイクルを 1 サイクルとし、45 サイクル実施した。得られた増幅産物は、前述の方法にしたがってアガロースゲル電気泳動、MERmaid kit にて分離精製した。

精製した増幅産物は、pT7 Blue-1 vector クローニングキット (Novagen, Inc.) を用

い、プラスミドベクター pT7blue にクローニングした。得られたクローンを最低 5 クローン以上用いて、両方向から塩基配列を決定した後アライメントし、5'末端の塩基配列を決定した。

DNA-DNA ライゲーションによる 5'RACE

塩基配列決定に成功した 5'NCR の塩基配列をもとにアンチセンスプライマーを合成し、ゲノム RNA の 5'末端に到達するように逆転写酵素 AMV reverse transcriptase XL を用いて cDNA を合成した。cDNA 合成終了後、0.2N NaOH 存在下で 30 分間 65℃で加温することで反応液中に存在する RNA を加水分解処理し、cDNA を一本鎖にした後、等濃度の酢酸により中和してゲルろ過により分離精製した。

5'末端をリン酸化し、3'末端をアミノ基で修飾した 35 mer のオリゴ DNA、アンカー DNA (5'-p-dACC GAA TTC ACT ATC GAT TCT GGA ACC TTC AGA GG-NH₂ 3')を合成し、T4 RNA ライゲースを用いて合成した cDNA の 3'末端にアンカー DNA を接続した (DNA-DNA ライゲーション)。アンカー DNA と相補的な配列を有するオリゴ DNA、アンカープライマー (5'-dCTG GTT CGG CCC ACC TCT GAA GGT TCC AGA ATC GAT AG-3')をセンスプライマーとして合成し、cDNA 合成で用いたアンチセンスプライマーと共に用いて、PCR を行った。得られた増幅産物は pT7Blue にクローニングし、塩基配列を決定した。ライゲーション、PCR、クローニングは RNA-RNA ライゲーションで示した方法に従った。

3'末端の塩基配列の決定 (3'RACE)

抽出精製した CSFV ゲノムの 3'末端に poly A ポリメラーゼを用いて poly A 配列を

付加し、オリゴ dT (30mer) プライマーを用いた逆転写反応で cDNA を合成した。合成した cDNA は、配列を決定した 3'NCR の塩基配列をもとに設計したセンスプライマー、cDNA 合成に用いたオリゴ dT (30mer) プライマーを用いて PCR を施行し、増幅産物を得た。増幅産物は pT7Blue にクローニングし、3'末端の塩基配列を決定した。ライゲーション、PCR、クローニングは RNA-RNA ライゲーションで示した方法を順守した。

結果

CSFV の 5'末端、3'末端の構造

日本の野外流行強毒株である ALD 株、弱毒化生ワクチン株である GPE (-)株の 5'末端には、1995 年 3 月時点のデータベース (DDBJ、Genbank、ENBL) 上に公開されていた既報の CSFV 塩基配列には存在しない、新たな 9nt の塩基配列 (5'-p-rGUA UAC GAG-3')が存在することが明らかになった。この塩基配列は RNA-RNA ライゲーションに基づく RACE 法によっても、DNA-DNA ライゲーションに基づく RACE 法によっても、確認でき、テクニカルアーティファクトでは無いことが証明された。データベース上には既に CSFV 分離株である Alfort 株、Brescia 株、および CSFV と同じ属の BVDV 分離株である NADL 株、SD1 株の塩基配列が報告されている。そこで今回、塩基配列を決定した CSFV・ALD 株、GPE (-)株をこれら既報の塩基配列とアライメントしたところ、5'末端に新たに見つかった 9 nt の塩基配列は、BVDV の 5'末端の 9nt と同じ塩基配列であることが明らかになった (図 2)。CSFV・ALD 株のゲノムの 5'末端のグアニン (G) 残基をヌクレオチドポジション (ポジション) 1 とし、ポジション 1 ~ 132 までの RNA の 2 次構造 (ステムループ構造) をコンピューターに予測させたところ、minimum free energy (ΔG) = -39.93 ~ -40.12 Kcal/mol の熱力学的に安定したステムループ構造が形成されることが明らかになった。CSFV・ALD 株、GPE (-)株ともに、5'末端側から 2 つのヘアピン構造 (ステムループドメイン I、II) と、1 つのステムループ構造 (ステムループドメイン III) が形成されていた (図 3)。5'末端のヘアピン構造 (ステムループドメイン I) は、ポジション 1 ~ 9、ポジション 21 ~ 29 の互いに相補的な配列が、強固なステムを形成していた。このステムは、塩基配列は異なるも

の、CSFV だけでなく BVDV にも存在することが明らかとなった。

一方、ALD、GPE (-)株のゲノム RNA 3'末端には、既報の Alfort、Brescia 株と同様、YFV、デングウイルス、JEV などから構成されるフラビウイルス属の 3'末端に存在する poly A tail は存在しなかった。しかし、ORF の終止コドンである UGA 下流には、A, U rich 領域が存在し、さらにその下流の 3'末端 60nt には安定した RNA のヘアピン構造が形作られることが明らかとなった (図 4A)。CSFV に見られたこれらの特徴は、塩基配列が異なるものの BVDV にも確認された (図 4A、B)。

CSFV ・ ALD 株と GPE (-)株の比較

野外流行強毒株である ALD 株とその弱毒化生ワクチン株である GPE (-)株の全塩基配列を比較すると、225nt の塩基の違いが認められた。異なっていた 225nt のうち 6nt が 5'末端および 3'末端に存在する非翻訳領域 (NCR) に認められた。5'NCR のポジション 39 では、ALD 株の C が GPE (-)株で A に変異していた。同様にポジション 60 では A が U に、220 では U が G に変化していた (表 1)。3'NCR では、ポジション 12078 の U が C に、12150 の C が U に、12192 の U が C に変異していた。5'NCR のポジション 39、60 の塩基配列の違いにより、ALD 株と GPE (-)株では 5'末端のヘアピン構造 (ステムループドメイン I) に変化はなかったが、その下流に位置する第 2 のヘアピン構造 (ステムループドメイン II) が形成される位置に違いが生じていた (図 3)。また、さらに下流のポジション 220 の変異は、図には示さないが、ステムループドメイン III の下流に形成されるステムループドメイン IV の構造変化をもたらしていた。

一方、蛋白質コード領域に確認された 219nt の塩基配列の違いのうちアミノ酸の置換を伴う塩基変異は 46 ヶ所であった。これら 46 ヶ所の変異は、N 末端側から p23/Npro

領域に 8 ケ所、p14/コア領域に 1 ケ所、エンベロープを構成すると思われる 3 種類の糖蛋白質、gp44/48、gp25、gp55 領域にそれぞれ 3、2、7 ケ所、gp55 領域直下流の機能不明な領域に 1 ケ所、p54/NS2 領域に 3 ケ所、p80/NS3 領域に 2 ケ所、p10/NS4a、p30/NS4b からなる機能不明な領域に 7 ケ所、p58/NS5a、p75/NS5b 領域にそれぞれ 4、8 ケ所存在した (表 1)。興味深いことに、糖蛋白質のコード領域に存在する 31 ケ所の糖修飾部位のうち、gp44/48 上の 1 ケ所が GPE (-)株において消失していた。また、蛋白質の高次構造を保つうえで重要な Cys 残基は、ALD 株における N 末端側から 2414 残基目の Ser 残基が GPE (-)株において Cys 残基になっていたことを除いて、完全に保存されていた。

次に、既報の Alfort 株、Brescia 株を加え、蛋白質コード領域の相同性を比較したところ、最も相同性が高かった領域は p80/NS3 で、逆に最も相同性の低かった領域は p23/Npro、gp55 領域であった。しかし、糖修飾部位、Cys 残基は、すべての領域において良く保存されていた。

BVDV は、蛋白質コード領域に宿主細胞の遺伝子である ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) gene の一部が挿入されていることが知られている[32]。しかし、CSFV・ALD 株、GPE (-)株ともに既報のすべての CSFV 株と同様、宿主遺伝子の組み込みは認められなかった。

考察

フラビウイルス属は、そのゲノムにコードされているウイルス蛋白質の翻訳を、真核生物で一般的なキャップ構造依存的翻訳によって行うため、ゲノム RNA の 5'末端にはキャップ構造が存在していることが知られている[4、5、6、33]。しかし、1995 年時点では、同じフラビウイルス科のベスチウイルス属の 5'末端の構造は不明であった。一方、1995 年著者は、フラビウイルス属と同様、5'末端にキャップ構造を有するシンドビスウイルスのゲノム RNA [34]に RNA-RNA ライゲーション、DNA-DNA ライゲーションに基づく 5'RACE を試み、その結果を報告した。シンドビスウイルスは、DNA-DNA ライゲーションでは 5'RACE が成功し、5'末端の塩基配列が得られたが、RNA-RNA ライゲーションでは、ライゲーションが成立しなかった。T4 RNA ライゲースは、一本鎖 RNA の 3'-OH 末端と 5'-リン酸末端間のリン酸ジエステル結合を触媒する酵素であるが、シンドビスウイルスのゲノム RNA の 5'末端には、キャップ構造が存在するため、オリゴ RNA とゲノム RNA のライゲーションが阻害されたものと考えられた。本章の研究において、CSFV のゲノム RNA 5'末端は、T4 RNA ライゲースを用いたオリゴ RNA との RNA-RNA ライゲーションが可能であり、DNA-DNA ライゲーションによる 5'RACE と同じ結果が得られた。すなわち、T4 RNA ライゲースによる合成オリゴ RNA とのライゲーションが可能であった CSFV のゲノム RNA 5'末端は、リン酸基であり、キャップ構造やポリオウイルスに存在する VPg [35、36]のような修飾物質が付加していないことが強く示唆された。

著者が、CSFV のゲノム RNA 5'末端に新たに見いだした 9nt は、5'末端のヘアピン構造のステムを形成した。また、ゲノム RNA 3'末端には 5'末端のヘアピン構造よりも長

いシステムを持つヘアピン構造が認められた。フラビウイルス属では、ゲノム RNA の 3'NCR に複雑な RNA のステムループ構造が存在すること、特に L-ループと名付けられた L 字型をした 3'末端のステムループ構造は、YFV、デングウイルス、JEV に共通して認められ、ウイルスの複製に重要な役割を果たすことが報告されている[6]。著者が 1995 年に新たに見いだした CSFV のゲノム RNA 5'末端の 9nt およびヘアピン構造は、ALD 株、GPE (-)株に固有のものではなく、翌 1996 年に Gregor Meyers らによって、ほかの CSFV にも存在することが明らかにされている[37]。また、CSFV ゲノム全長の cDNA クローンより *in vitro* RNA 合成した CSFV RNA を用いた感染実験において、5'末端が 1nt でも欠落すると、感染性 RNA とは成りえないことも明らかにされている[38]。一方、ペスチウイルス属の他のウイルス、BVDV では 1992 年から 1996 年にかけて[7、38]、BDV では 1998 年に[39] CSFV と類似性の高い 5'末端の塩基配列とヘアピン構造が確認されている。さらに、現在では、フラビウイルス科の HCV、GBV-C/HGV の 5'末端と 3'末端にも類似性の高いヘアピン構造が認められている(第 2 章参照)。また、現在までに明らかにされた全ての CSFV 5'末端には、著者の見いだした 9nt の塩基配列が存在していることが確認されている。したがって、1995 年までに報告された CSFV の 5'末端の塩基配列が不ぞろいであったのは、ゲノム RNA のステムループ構造に起因するテクニカルエラーで末端の 9nt を決定できなかったのが原因であると思われる。以上のことからペスチウイルス属のゲノム両末端に存在するヘアピン構造はウイルスの複製にかかわる重要な構造であると考えられた。

強毒株である ALD 株と弱毒生ワクチン株である GPE (-)株の比較で明らかになった 5'NCR のポジション 39、60 の変異は、5'末端のヘアピン構造(ステムループドメイン 1)に影響を与えなかったが、その下流に位置する第 2 のヘアピン構造(ステムループ

ブドメイン II) が形成される位置に違いを生じさせていた。また、ポジション 220 の変異は、ステムループドメイン IV の構造に影響を与えていた。CSFV の 5'NCR は HCV との類似性から、IRES を有し、キャップ構造非依存的翻訳により、蛋白合成を行うと推測されている[40]。また、1995 年までに HCV ではステムループドメイン II 以降の RNA の高次構造が IRES による翻訳開始に必須であることが明らかにされている[11]。このことから、GPE (-)株における 3nt の変異は、IRES による翻訳開始効率に影響を与え、弱毒化に関与している可能性があると思われた。1998 年、BVDV genotype II において、野外強毒株と、弱毒株の全塩基配列の比較が行われ、弱毒化に関与する遺伝子変異が 5'NCR の 2nt であることが報告された[41]。CSFV の ALD 株、GPE (-)株においては、いまだ感染性を有する全長の CSFV RNA の合成に成功しておらず、著者の発見した 5'NCR の変異とウイルス毒性の関係を証明するには至っていない。しかし、BVDV genotype II の報告は、著者の仮説を強く支持すると考えられた。

蛋白質コード領域のアミノ酸変異を伴う塩基置換は、エンベロープを構成する糖蛋白質領域に多かった。シンドビスウイルスでは、この領域が、病原性に関与する領域の一つであることが明らかにされている[42]。このことから、5'NCR の変異のみではなく、これらの変異も ALD 株の弱毒化に関与している可能性がある。

GPE (-)株は、ALD 株を *in vitro* における細胞培養を長期にわたって行うことによって得られた親子株であるとされている[27]。ポリオウイルスでは、強毒株である Mahoney 株と弱毒生ワクチン株 Sabin 株が、*in vitro* における長期間の細胞培養によって得られた親子株であることが知られており、Mahoney 株と Sabin 株の塩基配列の違いは 57nt であることが報告されている[43]。CSFV の ALD 株と GPE (-)株では、なぜこのように 200nt 以上と多数の変異が生じたのか明らかではないが、アミノ酸変異を伴う塩基置換

の約半数が構造蛋白質領域に多く認められたことから、この領域を激しく変化させることで培養細胞に適合したのかもしれない。

第 II 章

C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム 5'末端の構造と機能の解析

緒言

HCV は約 9.5kb のポジティブセンス一本鎖 RNA をゲノムとして有する直径 40～60nm のエンベロープ ウィルスである。ゲノム RNA は、5'末端から、約 340nt の長い 5'NCR、約 9kb の ORF と約 70～120nt の 3'NCR で構成されている (図 1) [44]。このようなゲノム RNA の特徴や分子進化遺伝学的検討から、HCV はフラビウイルス科に属しヘパチウイルス属に近縁な新たな属を形成するウィルスであると考えられている [45]。HCV のゲノムには、ヘパチウイルス属同様、5'末端にキャップ構造が無いと考えられているが [46、47]、明らかにされていない。また、HCV ゲノムの 3'NCR には poly A 配列を持つフラビウイルス属と異なり、poly U 配列が存在することが報告されている [48]。しかし、ヘパチウイルス属の 3'NCR が A, U rich 配列と、その下流に位置し、3'末端のヘアピン構造を構成する 100 数十 nt の配列を有することを考慮に入れると、HCV はゲノムの完全な 3'末端まで塩基配列が決定されていない可能性がある。

1994 年までに HCV の genotype は少なくとも type 1～6 まで、合計 6 種存在することが明らかにされている [49]。しかし、世界的な HCV の分布調査の結果、主流を占める genotype は genotype 1・subtype a (type 1a)、genotype 1・subtype b (type 1b)、genotype 2・subtype a (type 2a)、genotype 2・subtype b (type 2b)、genotype 3・subtype a (type 3a)、であることが明らかにされている [50]。我が国では type 1b 感染者が全 C 型肝炎患者の 70% を占めており、type 2a 感染者はわずか 20%、type 2b やその他の感染者はそれぞれ 10% に満たないことが明らかにされている [51]。

Type 1b と type 2a は、ゲノム塩基配列の相同性が 65% を下回っていることに加え、インサージョン、デリージョンが存在し [48]、ヘパチウイルス属でたとえば BVDV、

CSFV の分子進化遺伝学的距離に相当するほど互いに隔たった関係にある。このため、同じ HCV でありながら type 1b と type 2a には、その性質にいくつかの大きな隔たりが存在する。中でも抗ウイルス剤として肝炎治療に使用されるインターフェロン (IFN) に対する感受性、肝炎患者の病態には顕著な差が報告されている[52]。Type 1b 感染患者は、IFN 療法が成功しウイルスが排除され肝機能が正常化する確率が 30% 未満であるのに対し、type 2a 感染患者は 75% を上回る治療成功率を示す[53]。また、慢性肝炎から肝硬変、肝癌に移行する患者は、type 2a 感染患者よりも type 1b 感染患者に高頻度認められることが明らかとなっている[54]。これらのことから、HCV において type 1b は強毒株、type 2a は弱毒株として位置付けられている。

HCV は、第 1 章で報告したベスチウイルス属との類似性から 5'NCR に IRES を有し、ここに宿主細胞由来の蛋白質が結合することによりキャップ構造非依存的翻訳がおり、蛋白合成を行うと考えられている[9、11]。ピコルナウイルス科に属するポリオウイルスでは、強毒株である Mahoney 株と弱毒化生ワクチン株である Sabin 株のゲノムの塩基配列を比較し、両ウイルス株間の塩基及びアミノ酸配列の違いが調べられ、弱毒化に関与する塩基及びアミノ酸配列変異の特定が、感染性 cDNA クローンを利用して行われた。その結果、ポリオウイルスでは、5'NCR に弱毒化に関与する塩基置換が存在することが明らかにされている[43]。しかし、HCV では 5'NCR の塩基配列の多様性について十分に調べられておらず、ゲノム RNA 全長に渡る type 1b、type 2a の比較も行われていない。また、type 1a、b、type 2a、b 以外はいまだに 5'末端の塩基配列が決定されていない。

本章では、IRES 機能を有する HCV 5'NCR の塩基配列の多様性と IFN 治療効果との関係を解析すること目的として、HCV に対する IFN 療法の効果が明らかな症例から得

られた type 1a、b、type 2a、b、および type 3a HCV の 5'NCR の全塩基配列を決定し、比較検討した。

対象

リコンビナントインターフェロン(rIFN α 2b)による抗ウイルス療法を受け、その後 6 ヶ月間の観察期間を経て、治療効果判定の明らかにされている慢性 C 型肝炎患者 66 例の IFN 投与前血清を用いた。

Genotype の内訳は、type 1a 1 例、type 1b 53 例、type 2a 6 例、type 2b 5 例、type 3a 1 例であった。抗ウイルス療法の治療効果は、表 2 にまとめた。

方法

プライマー

cDNA 合成および PCR に用いるプライマーは、データベース上に報告されている type 1a、b、type 2a、b の HCV の塩基配列をアライメントし、塩基配列が保存されている領域に設計した。シンドビスウイルスのプライマーは、データベース上に報告されている塩基配列に基づいて設計した。プライマーの塩基配列は表 3 にまとめて示した。

RNA 抽出および cDNA 合成

血清 100 μ l に含まれる RNA を AGPC 法を用いて、抽出精製した。抽出、精製した RNA をアンチセンスプライマー Env02 で逆転写し、cDNA を合成した。

PCR

PCR は、逆転写反応産物にセンスプライマー HCV14:3 を加え、熱変性 94 $^{\circ}$ C 1 分間、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 1 分間、伸長反応 72 $^{\circ}$ C 2 分間の温度サイクルを 1 サイクルとし、45 サイクルの PCR を行った。得られた増幅産物は、アガロースゲル電気泳動により分離し、ガラスパウダー法にて精製した。

塩基配列の決定および解析

精製した増幅産物のセンスおよびアンチセンス鎖をそれぞれ、ABI 社の dye terminator cycle sequencing kit をもちいて、直接塩基配列を決定を行った。5'末端の塩基配列につ

いては、RNA-RNA ライゲーションおよび DNA-DNA ライゲーションに基づく RACE 法により決定した。決定した塩基配列は genotype 別に分類し、各 genotype 内で互いに塩基配列の相同性を比較し、genotype 内をさらに塩基配列の異なる幾つかのグループに分別した。各グループの塩基配列が出現する頻度を算出し、各 genotype に最も高頻度に認められる塩基配列を典型例、その他を非典型例とした。

得られた塩基配列の解析には DNASIS-Mac および Genetyx-Mac を用いた。

***In vitro* 翻訳**

・コンストラクトの作製

HCV type 1a アイソレート K-0374、type 1b の典型例アイソレート K-0014、非典型例アイソレート K-0036、type 2a の典型例アイソレート K-0041、type 2a、非典型例アイソレート K-0040、2 種類の type 2b アイソレート K-0043、K-44、合計 7 種類のアイソレートの 5'末端に PCR を用いて T7 プロモーター を接続した後、pUC119 にクローニングし、各アイソレート について 5'NCR 全長のクローンを得た。接続した T7 プロモーターは、T7 RNA ポリメラーゼの RNA 合成が HCV の 5'末端からスタートするようにプロモーター末端に存在する 3nt の G (GGG)を欠失させたものを用いた。IRES による翻訳効率を ³⁵S 標識メチオニンの取り込みで測定するため、レポーターとして、HCV type 1b のアイソレート K-0014 のコア領域を接続し、コンストラクトを得た。コア領域の接続は、すべての 5'NCR のクローンの翻訳開始コドン ATG 直下にプライマー K74-3 5'-dAGG TTT AGG ATT AGT ACT CAT-3'、プライマー KHT7-GGG 5'-dAAG GTA CCA AGC TTT AAT ACG ACT CAC TAT A-3'を用いて、アイソレート K-0014 のコア領域の c 末端にプライマー K74-2 5'-dATG AGT ACT AAT

CCT AAA CCT-3', プライマー ENV03-3 を用いてそれぞれ PCR を行い、プライマー上にアンダーラインで示した *Sca* I site を導入し、この制限酵素 site を用いて各クローンに接続した。

・ RNA 合成および *in vitro* 翻訳

各コンストラクトのコア領域 C 末端側を制限酵素 *Eco* RI で切断して鋳型とし、T7 RNA ポリメラーゼをもちいて、*in vitro* RNA 合成を行った。得られた合成 RNA を 1 μ g 用いて、ウサギ網状赤血球ライセート (RRL) にて 35 S 標識メチオニン存在下 *in vitro* 翻訳を行った。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE) により、 35 S 標識メチオニンを取り込んだコア蛋白質を分離し、バイオイメージアナライザー Mac BSA 1000 システムを用いて 35 S 標識メチオニンの取り込み量を測定した。

結果

5'RACE による 5'末端構造の比較

HCV は 5'末端決定に用いたいずれのタイプのウイルスも、RNA-RNA ライゲーション、DNA-DNA ライゲーションともに 5'末端の決定が可能であり、同様の結果が得られた。しかし、5'末端にキャップ構造を有する一本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスとして、シンドビスウイルスを用い HCV と比較したところ、シンドビスウイルスは、DNA-DNA ライゲーションによる 5'RACE は可能であったが、RNA-RNA ライゲーションによる 5'RACE は、PCR による増幅産物が得られず成立しなかった。

5'NCR の塩基配列変異と IFN 治療効果

PCR 直接塩基配列決定法によって決定した 53 例の type 1b HCV の塩基配列のうち、5'NCR の ポジション -297 ～ポジション -1 (プロトタイプ HCV である HCV-1 の開始コドン ATG の A を 1 とし、ポジションを表記した) をアライメントした(図 5)。27/53 例 (51%) は、互いに完全に等しい塩基配列であった。残り 26 例は前述の塩基配列とは 1～数 nt 異なる塩基配列であった。このことから、HCV type 1b の 5'NCR には、このタイプを代表する典型的な塩基配列を持つウイルスと、数 nt の変異を伴った非典型的な塩基配列を持つウイルスが存在することが明らかとなった。また、同一患者で典型的なタイプと非典型的なタイプが共存していることはなかった。

同様に type 2a HCV の塩基配列を調べたところ、5/6 例が互いに等しい塩基配列を示し、1 例が 3nt 異なる塩基配列を示した。このことから、type 2a にも type 1b と同様にタイプを代表する典型的な塩基配列と、非典型的な塩基配列が存在することが明らかに

なった。一方、type 2b HCV は、3/5 例、2/5 例が互いに等しい塩基配列を示したため、どちらの塩基配列が典型的な配列であるか特定できなかった。

Type 1b HCV の典型的な配列を有するウイルスに感染している症例では、わずか 5/27 (18.5%) の IFN 著効率であったのに対し、典型的な配列と 2nt 以上異なる非典型的な塩基配列を有するウイルスに感染している症例の IFN 著効率は 7/18 (38.8%) と有意に高かった ($P < 0.01$)。IFN 著効例に認められた塩基配列変異が、HCV 5'NCR に形成される RNA の二次構造上どこに存在するかを調べたところ、ポジション -328 の変異を除いて、ポジション -223、-137、-94、-2 の IRES として機能する領域内に存在していた (図 6)。一方、type 2a HCV の場合、典型的な配列を有するウイルスに感染している 5 症例、非典型的な配列を有するウイルスに感染している 1 症例ともに、全例が IFN 著効例であった。

HCV 各タイプにおける 5'NCR の RNA 塩基配列と構造の比較

Type 1a、type 3a の 5'末端の塩基配列、2 種類の type 2b の 5'末端の塩基配列ならびに、type 1b、type 2a の典型例アイソレートの 5'末端の塩基配列を 5'RACE 法を用いて決定したところ、type 1a、b、type 2a、b は、互いに 94% 以上の相同性を示し、既報の塩基配列とはほぼ同じであった。しかし、Type 3a の 5'NCR の塩基配列は、type 1a、b、type 2a、b の 5'NCR と 94% 未満の相同性しか示さなかった。特筆すべきことに、5'末端の 20nt は既報の type 1a、b、type 2a、b との相同性が 30% 未満であり、著しく異なる塩基配列を有することが明らかとなった。

5'NCR のステムループ構造を type 1b、2a の典型的な塩基配列と、type 3a の塩基配列を用いて比較したところ、5'末端 20nt の塩基配列は type 1a、b、type 2a、b と著

しく異なっていたにもかかわらず、3つのタイプの HCV は全て、5'末端 20nt に熱力学的に安定した RNA のヘアピン構造（ステムループドメイン I）をとることが明らかになった（図 6）。また、type 1b、3a は、5'末端のヘアピン構造の下流 100nt（ポジション -320 ~ -229）に、共通のステムループ構造（ステムループドメイン II）が形作られた。しかし、type 2a は、ポジション -312 に存在する A to G 変異によって type 1b、3a に認められた β ブランチが消失し、これらとは異なるステムループ構造をとることが明らかになった（図 7）。

In vitro 翻訳

5'NCR の塩基配列の多様性が HCV の IRES による翻訳効率にどのような影響を与えているのかを明らかにするため、type 1a、典型的な type 1b、非典型的な type 1b、典型的な type 2a、非典型的な type 2a、そして type 2b の 2 種類、合計 6 種類のコンストラクトから合成した RNA を用いて、RRL による *in vitro* 翻訳を行った。典型的な type 1b 配列を有する RNA の翻訳効率を 100%とすると、非典型的な type 1b は 40%、典型的な type 2a は 70%、非典型的な type 2a は 45%、2 種類の type 2b は 1 つが 30%、もう 1 つが 120%であった。典型的な type 1b と典型的な type 2a のみを比較すると type 2a は、type 1b の約 2/3 の翻訳効率であった（図 8）。

考察

HCV ゲノム 5'末端の構造

1994 年、HCV は、5'NCR に IRES を有しキャップ構造非依存的翻訳により、蛋白質合成を行うと考えられていた[9、11]。したがって、HCV のゲノム RNA の 5'末端には、キャップ構造が存在しないと推定されていたが、その証明は得られていなかった[46]。本章の研究において、シンドビスウイルスのゲノム RNA と HCV のゲノム RNA を用いて、5'RACE を施行し両者の結果を比較したところ、HCV では DNA-DNA ライゲーション、RNA-RNA ライゲーションの 2 種類の RACE 法とも、PCR による増幅産物が得られ、5'末端を決定することが可能であった。一方、シンドビスウイルスでは RNA-RNA ライゲーションに基づく RACE 法において増幅産物を得ることができず、DNA-DNA ライゲーションによってのみ 5'末端を決定可能であった。これは、第一章で述べたように、T4 RNA ライゲースによって触媒される一本鎖 RNA の 3'-OH 末端と 5'-リン酸末端間のリン酸ジエステル結合が、シンドビスウイルスのゲノム 5'末端のキャップ構造により阻害されたためであると考えられた。これに対し HCV は T4 RNA ライゲースによって触媒される、合成オリゴ RNA と HCV のゲノム RNA のライゲーションが正常に起こり、RNA-RNA ライゲーションによる 5'末端の決定が可能であったことから、HCV のゲノム RNA 5'末端はリン酸基であり、キャップ構造やポリオウイルスに存在する VPg[35、36]のような修飾物質が付加していないことが強く示唆された。

5'NCR の塩基配列の多様性と IFN 感受性

HCV のゲノム RNA 変異速度は $0.22 \sim 7.51 \times 10^{-3}$ nucleotide substitution/site/year で、

ポリオウイルスや D 型肝炎ウイルス (HDV)、ヒト免疫不全症ウイルス type 1 (HIV-1) とほぼ同等にゲノム RNA の変異速度の速いウイルスであることが報告されている[55]。中でも、E1 (エンベロープ蛋白質) 領域に存在する超可変領域 (HVR) は、同一患者内において、多数のクアジスピーシーズが存在するばかりでなく、経時的に激しくクアジスピーシーズが入れ替わって変化していくことが明らかにされている[56]。本章の研究では、HCV は、ゲノム RNA の中で最も保存された領域の一つである 5'NCR においても genotype を代表する典型的な配列と、非典型的な配列が存在することが明らかになった。HCV は、type 1b と type 2a では、その IFN 感受性や病原性に著しい差が存在することが明らかにされている。HCV において genotype 間のウイルス性質の違いと genotype 間の塩基配列の多様性の関係を調べるためには、それぞれ genotype を代表する典型的な塩基配列を有するアイソレート同士を比較しなければならないと考えられた。

本章の研究で type 1b、type 2a のそれぞれ典型的な 5'NCR の塩基配列、さらに新たに決定した type 3a の塩基配列を用いて、RNA のステムループ構造を比較したところ、type 1b、type 3a は 1992 年に Brown らによって報告されたもの[8]と同じステムループ構造を形作ったが、type 2a のみ異なる構造をとることが明らかになった。Type 2a における構造変化はポジション -313 に存在する A to G change によって、RNA の熱力学的なバランスが変化したため生じたものと考えられた。共通のレポーター (type 1b のコア遺伝子) をつないだコンストラクトによる *in vitro* 翻訳の結果を比較すると、type 1b の典型例は type 2a の典型例の約 1.6 倍の翻訳効率があった。ポリオウイルスでは、IRES に存在するポジション 480 (Mahoney 株の 5'末端を 1 とした位置) に存在する 1nt の変異によって *in vitro* 翻訳効率に 5 倍の差が生じ、ブラークサイズにも影響を与え、ひいてはそれが弱毒生ワクチンの Sabin 株と強毒の Mahoney 株との神経毒性の違いを

もたらしているとされている[43]。したがって、ポリオウイルスの変異と同様に、HCV の IRES ポジション -313 の A から G への塩基置換による構造変化は、IRES の翻訳効率に影響を与えるばかりでなく、ウイルスの複製効率に影響を与えている可能性がある。IFN 著効率の低い type 1b に対し、IFN 著効率の高い type 2a は、血清中の HCV-RNA titer が type 1b よりも低い値を示すことが知られている[54]。HCV の IRES 上に存在する翻訳効率を低下させる核酸変異が、ウイルスの複製効率をも低下させ、さらに、IFN 抵抗性を奪っているのかもしれない。しかし、実際に IRES がこのような構造をとるかどうかにについては、さらに詳細な検討が必要であり、-313 以外の塩基置換による影響も否定できない。また、HCV は 1999 年現在においても、効率のよいウイルス培養系が構築されていないため、実際に IFN がどのようなメカニズムで抗 HCV 効果を示すのか、IRES との関係はどのようなものなのかは全く明らかにされておらず、今後の重要な研究課題である。

HCV の 5'末端のヘアピン構造

HCV の 5'末端ポジション -341 ~ -320 の塩基配列は、type 1b、type 2a と type 3a 間の相同性が 34%未満を示したにもかかわらず、これらの genotype に共通したヘアピン構造をとることが本章の研究で明らかになった。このような構造は、IRES を有するバスタウイルス属だけでなく、キャップ構造を有するフラビウイルス属にも認められている[6]。フラビウイルス属では、ゲノム RNA 5'末端に存在するヘアピン構造がウイルスゲノムの複製に必須の構造であることが明らかにされている[6]。また、ポリオウイルスでは、ゲノム RNA 5'末端に存在するヘアピン構造を含むステムループ構造（全体の形からポリオウイルスでは clover leaf 構造と呼ばれている）がウイルスゲノムの複製に

必須であることが明らかにされている[57]。これらのことから、HCV においてもこのヘアピン構造はウイルスゲノムの複製に重要な役割を果たすものであると考えられた。

第 III 章

GB ウイルス C のゲノム塩基配列と構造の解析

緒言

1964 年、原因不明の肝炎を発症したシカゴ在住の外科医（イニシャル G.B.）の血清を、南米原産新世界サルであるタマリンに接種したところ肝炎の発症が確認された。この肝炎を発症したタマリンの血清を別の個体に接種したところ、この個体も肝炎を発症し、外科医 G.B.の血清中に含まれる未知の因子は、タマリンで継代が可能であることが証明された。この未知の因子は、最初の発症者である外科医のイニシャルをとり、GB agent と名付けられた[58]。

1995 年、タマリンで 12 代の継代を経たタマリンの血清から GBV-A、GBV-B という 2 種類のウイルスが発見された[13]。GBV-A、GBV-B は、それぞれ約 9.5kb のゲノムを有するポジティブセンス一本鎖 RNA ウイルスであり、ORF はそれぞれ約 2900 アミノ酸をコードしていることが明らかにされている[59]。GBV-B は、445nt の長い 5'NCR を有し、HCV やベスチウイルスの 5'NCR と塩基配列の相同性が高いことから、IRES による翻訳開始を行うと考えられている(図 1)[59]。一方、GBV-A については、1996 年においても、5'末端の塩基配列、RNA の構造に加え、開始コドン AUG の位置も明らかにされていない。また、5'末端付近の塩基配列は、HCV、ベスチウイルス、GBV-B との相同性も低く、どのような翻訳開始を行うのか不明である。GBV-A は、GB agent の継代に供されたタマリン以外のタマリンからもその核酸が RT-PCR によって検出されることから、タマリンに固有のウイルスであると考えられている[60]。一方 GBV-B は、GB agent の継代に関与する血清以外から検出された報告はない。また、1999 年現在に至るまで、このアイソレートが知られるのみであり、自然宿主は不明である。

1995 年、GB agent の探索にかかわっていたアメリカのアボット社のグループは、

GBV-A、GBV-B の推定上のコア、NS3、NS4、NS5 領域の recombinant 蛋白質を抗原とした抗体アッセイ系を構築した。このアッセイ系によるスクリーニングで、陽性を呈した西アフリカ在住の供血者血清を対象にして、GBV-A、GBV-B の NS3 領域のアミノ酸配列に基づいてデザインした degenerated プライマーによる RT-PCR を行ったところ、GBV-A、GBV-B の NS3 領域の核酸配列に類似した新たな核酸断片を検出することに成功した[14]。この断片をもとに、西アフリカ在住の供血者血清の cDNA ライブラリーより、ヒトを宿主とする新たなウイルス GBV-C がクローニングされた (この prototype GBV-C アイソレート を GBV-C/WE とした) [61]。その直後、1996 年にアメリカの National Institute of Health (NIH) から Hepatitis G virus (HGV) と名付けられたウイルスが、新たな肝炎ウイルスとして報告された (ここで報告された 2 アイソレート を HGV/US-P1、HGV/US-P2 とした) [62]。1996 年から、著者は NS3 領域、5'NCR の塩基配列に基づく分子進化遺伝学的な解析を行ない、GBV-C/WA と HGV/US-P1、P2 は、同一属の異なる genotype であることを明らかにした。1997 年に、これら 2 つのウイルスは、まとめて GBV-C/HGV と呼ばれるようになった。

1997 年 2 月時点、核酸データベース (DDBJ) 上には、HGV/US-P1、HGV/US-P2、GBV-C/WA の 3 アイソレート が完全長ゲノムとして登録されていた。これらの塩基配列から、GBV-C/HGV のゲノムは、全長約 9600nt の一本鎖 RNA で、5'末端側から約 350 ~ 500nt の 5'NCR、約 9kb の ORF、約 320nt の poly U、poly A 配列を持たない 3'NCR からなると推定されている。ORF には、5'末端側から 1/4 に構造蛋白質 (E1、E2) がコードされ、続く下流 3/4 に非構造蛋白質遺伝子 (NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5b) がコードされていると推測されている (図 1)[61]。

GBV-C/HGV は、分子系統樹上ベスチウイルス属、HCV に近縁なフラビウイルス科の

ウイルスとされているため、そのゲノムの翻訳開始は、IRES によるのではないかと考えられている[60]。しかし、前述の 3 アイソレートの塩基配列をアライメントしても、ゲノムの両末端は不揃いであり、5'末端もしくは 3'末端について十分な解析がなされておらず、IRES 機能の有無については確認されていない。また、開始コドンには幾つもの候補があり、どの開始コドンから実際に ORF にコードされた蛋白質の翻訳が開始されるのか不明であるため、フラビウイルス科では一般的に ORF のアミノ末端 (N 末端) 側にコードされるコア蛋白質が、GBV-C/HGV では見つかっていない。

GBV-C/HGV には、GBV-C/WA の属するグループと HGV/US-P1、P2 の属するグループの 2 種類のグループが存在し、HCV やベスチウイルスのように genotype が幾つか存在すると考えられている[63]。したがって、GBV-C/HGV においても、HCV のように塩基配列の多様性と肝炎の関係が注目されているが、その解析は全くなされていない。本章では、GBV-A、B、C のこれら GB ウイルスのうち、ヒトを宿主とする GBV-C/HGV に解析の対象を絞り、GBV-C/HGV のゲノムの構造を明らかにするとともに、ゲノムの機能について考察した。

方法

GBV-C/HGV 感染者のスクリーニング

慢性ウイルス性肝障害が疑われた日本人の非 A 非 B 型肝炎患者 137 例の血清を用いた。与芝らによって報告された GBV-C/HGV の推定上の NS-3 を増幅領域とするプライマーセットおよび、RT-PCR 法 [64]を用いて GBV-C/HGV RNA 陽性者のスクリーニングを施行した。このスクリーニングで陽性を呈した 10 例の患者血清を GBV-C/HGV ゲノムの全塩基配列決定に用いた。

全塩基配列の決定

・ RNA 抽出、cDNA 合成および PCR

GBV-C/HGV RNA は、前述のスクリーニングによって得られた 10 例の陽性者の血清から、AGPC 法を用いて抽出し、cDNA 合成に用いた。cDNA は、random プライマー (6 mer)を用いて、MuLV 由来逆転写酵素 superscript reverse transcriptase version II (GIBCO BRL) による逆転写反応を行い合成した。

既にデータベース上に ORF 全長の塩基配列が公開されている GBV-C/HGV のプロトタイプ 3 アイソレート (GBV-C/WA、HGV/US-P1、HGV/US-P2)をベースにし、ORF を 11 分割して増幅するように PCR プライマーを合成した。PCR 増幅産物は、隣合う増幅領域が互いに 100~200nt オーバーラップする様にデザインした。PCR は、cDNA を鋳型にして、熱変性 94℃ 1 分間、アニーリング 55℃ 1 分間、伸長反応 72℃ 3 分間の温度サイクルを 1 サイクルとし、45 サイクルの PCR を行った。得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、ガラスパウダー法にて精製した。

・塩基配列の決定および解析

精製した増幅産物は、dye terminator cycle sequencing kit をもちいて、直接塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、増幅産物のセンス側およびアンチセンス側をそれぞれ決定し、各領域に対して2回以上施行した。

得られた全塩基配列の解析には DNASIS-Mac、Genetyx-Mac および ODEN (国立遺伝学研究所)、Wisconsin Sequence Analysis Package version 8 (Genetics Computer Group) を用いた。

5'末端の塩基配列決定

5'末端の塩基配列については第 II 章に記した RNA-RNA ライゲーションに基づく Rapid amplification cDNA end (RACE) 法および DNA-DNA ライゲーションに基づく RACE 法により決定した。

3'末端の塩基配列決定

5'末端をリン酸化し、3'末端をアミノ基で修飾した 29 mer のオリゴ RNA、EcoSP6 RNA (5'-p-rUAG UGU ACC UAA AUG AAU UCC GA-NH₃ 3')を合成し、CSFV ゲノム RNA の 3'末端に T4 RNA ライゲースを用いてライゲーションさせた。ライゲーションさせた RNA と相補的な配列を有するオリゴ DNA、SP6rna-A20 (5'-TCG GAA TTC ATT TAG GTG AC-3')をアンチセンスプライマーとして合成し、cDNA 合成を行った。合成した cDNA は、配列を決定した 3'NCR の塩基配列をもとに設計したセンスプライマー、cDNA 合成に用いたアンチセンスプライマー (SP6rna-A20) を用いて PCR を施行し、増幅産物を得た。増幅産物は pT7Blue にクローニングし、3'末端の塩基配列を決定し

た。ライゲーション、PCR、クローニングは第II章に記した方法を順守した。

結果

5'末端及び3'末端の特徴

5'末端は、RNA-RNA ライゲーション、DNA-DNA ライゲーションいずれの RACE 法によって決定可能であり、塩基配列上同一の結果が得られた。5'末端を決定し得たのは前述の 10 アイソレート中の 9 アイソレートであった。さらに 5'末端から 3'末端までの全塩基配列を決定し得たのは前述の 10 アイソレート中の 7 アイソレートであった。データベース上に登録されていた HGV/US-P1 を用いて、GBV-C/HGV ゲノム 5'および 3'末端のステムループ構造を Genetyx-Mac により予測させた。これらすべての GBV-C/HGV アイソレートは、5'末端 (図 9A、B) および 3'末端 (図 9C) に minimum free energy (ΔG) = -17.3 Kcal/mol \sim -24 Kcal/mol の熱力学的に安定した RNA のヘアピン構造を有することが明らかになった。この構造は BVDV では 1995 年に Deng R. ら [10] によって、CSFV では 1996 年に著者が報告したものとはほぼ同様であった。さらに、HCV では 1997 年に、これまで 3'末端であるとされていた poly U 配列のさらに下流に 3' X region と呼ばれる 98nt の塩基配列が発見され、この配列の 3'末端がヘアピン構造を有することが報告された [65]。したがって、5'末端、3'末端に、安定した RNA のヘアピン構造を有するのは、フラビウイルス科の uncapped ウイルスに共通した特徴であることが明らかになった。

GBV-C/HGV の ORF

1997 年時点ではほぼ全長の塩基配列が決定されているアイソレート GBV-C/WA、HGV/US-P1、P2 および、本章で全塩基配列を決定した日本人患者由来の 7 アイソレ

ート (K1668、1737、1741、1789、1916、2141、3732) を対象として ORF の検索を行ったところ、7 アイソレートすべてのゲノム上に約 8600nt からなる single large ORF が存在することが明らかになった。しかし、5'NCR 内には複数の開始コドン AUG が存在し、その中には single large ORF に対して in frame になるものも含まれていた。また、複数の開始コドンの位置や数はアイソレートによって異なっており、7 アイソレートすべてに共通した single large ORF の開始コドンは、HGV/US-P1 の 5'末端の A をポジション 1 としたとき、ポジション 553~555 の AUG であった。同様に、7 アイソレートすべてに共通した終止コドンは、ポジション 9079 ~ 9081 の UGA であった。本章で全塩基配列を決定を試みた日本の 10 アイソレートのうち前述の 7 アイソレート (K1668、1737、1741、1789、1916、2141、3732) は、9391nt のゲノム長を有し、G+C 含有率 59.27~59.55%、ポジション 553~555 の AUG を開始コドンとしたとき、ORF の長さは 8622nt で 2873 アミノ酸をコードしていた。アイソレート K606、1775 は、3'末端が決定できなかったが、ORF は 7 アイソレートと同様であった。残る 1 アイソレート (F1029) については、後述した。

GBV-C/HGV の genotype

アフリカ大陸 (GBV-C/WE)、アメリカ大陸 (HGV/US-P1、P2)、そして日本の 9 アイソレートのアミノ酸配列をアライメントし、Jukes and Cantor 法により distance を算出した後、unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) で分子系統解析を行った。その結果、GBV-C/HGV は異なる地域で発見されたアイソレートが、それぞれ 3 つの独立したクラスターを形成し分岐することが明らかとなった (図 10)。GBV-C/HGV のクラスター間の distance は、CSFV の genotype 間の distance とほぼ同等

であった。3つのクラスター間のゲノム全長の塩基配列、アミノ酸配列の相同性をベスチウイルス、HCVと比較したところ、genotype間の核酸の相同性はHCVやBVDVより遙かに高く、CSFVのgenotype間相同性と類似した数値を示した。アミノ酸の相同性も同様の結果であった。以上の結果から、GBV-C/HGVに、少なくとも3種類のgenotypeが存在することが明らかになった。

劇症肝炎の患者から分離されたアイソレート F1029 は、ゲノム RNA の 5'末端、3'末端が決定できなかった。しかし、他のアイソレートとアライメントしたところ、推定上の NS5a 領域が他のアイソレートよりも 36nt、12 アミノ酸残基分長かった (図 11A、B)。この 36nt、12 酸残基の配列は、データベース上に登録されているヒトの遺伝子との相同性はなく、F1029 のゲノムこの配列の直前に位置する塩基配列のダイレクトリビートであることが明らかになった。また、F1029 は、他の全てのアイソレートと塩基配列の相同性が低かった。そこで、F1029 の分子系統上の位置を調べるため、本章で明らかにした日本の 10 アイソレートのうち K1775 を除く 9 アイソレート、1998 年の時点で DDBJ データベース上に報告されていた GBV-C/HGV 18 アイソレート、GBV-A 2 アイソレートのゲノム全長の塩基配列を用いて、Nei and Gojobori らの パラメーター [66]により distance を算出した後、neighbor-joining method (NJ 法)により分子系統樹を描いて解析を行った (図 12)。GBV-A をアウトグループとした NJ 法では、まず祖先ウイルスから GBV-A、GBV-C/HGV の分岐がおこり、次に genotype 2 と genotype 1 および genotype 3 (F1029 を除いた日本のアイソレート) の分岐が起こり、その次に genotype 1 と genotype 3 の分岐があり、最後に genotype 1 と F1029 の分岐が起こったことが明らかになった。F1029 は、GBV-C/WA と共に一つのクラスターを形成しており、他の日本のアイソレートのクラスターや genotype2 のクラスターからは bootstrap

value 100%で分岐していた。しかし、F1029 と genotype 1 である GBV-C/WA との distance は、F1029 を第 4 の genotype として位置づけるには十分ではなかった。

3つの genotype 間および同一 genotype 内の塩基配列、アミノ酸配列の相同性

3つの genotype 間および同一 genotype 内の塩基配列、アミノ酸配列の相同性を、推定上の 5'NCR、E1、E2、NS2、NS3、NS4、NS5a、NS5b、3'NCR について領域別に比較した(図 13)ところ、最も高度に塩基配列の保存された領域は 3'NCR であり、次に保存された領域は 5'NCR であった。3'NCR は、genotype 間、genotype 内ともに 96% 以上の相同性があった。一方、5'NCR は genotype 内相同性は 3'NCR と同様に高かったが、genotype 間相同性は 85%程度に低下する事が明らかになった。蛋白質コード領域の内、NS3 領域は、genotype 間、内を問わず塩基配列の多様性が認められたが、そのほとんどはアミノ酸変異を伴わない塩基置換であった。したがって、アミノ酸配列は genotype 内はもちろん、genotype 間においても高度に保存されていた。NS5b 領域は、アミノ酸配列の genotype 間相同性が高い領域であるばかりでなく、塩基配列の相同性も 3'NCR、5'NCR に次いで高度に保存されていた。さらに、NS5b のアンチセンス鎖には、全ての genotype に共通する約 90 アミノ酸から成る ORF が存在する事が明らかとなった。NS5a 領域は genotype 間アミノ酸配列の相同性値と genotype 内アミノ酸配列の相同性値が最も有意に相違する領域であった。

考察

GBV-C/HGV の 5'末端、3'末端の特徴

GBV-C/HGV の 5'末端、3'末端には熱力学的に安定したヘアピン構造が存在していた。特に、3'末端を含めた 3' NCR には、RNA の高次構造の存在が予測され、1998 年に HCV の poly U 配列以降に発見された 98nt の 3'X region [65]との類似性から、GBV-C/HGV もこの領域が HCV の 3'X region に相当する領域であると思われる。また、ゲノム両末端のヘアピン構造は、GBV-C/HGV だけでなく、CSFV、HCV にも共通して存在しており、第 1 章で述べたように、CSFV の *in vitro* で合成した RNA を用いた研究では、ゲノム RNA の末端の塩基を 1 nt でも欠くとレプリコンとなり得ないことが明らかにされている[38]。さらにポリオウイルスでは 5'末端の clover leaf 構造ならびに 3'末端の poly A の前に形成されるヘアピン構造がウイルスゲノムの複製に必須の構造であることが明らかにされている[57]。このようなプラス鎖 RNA ウィルスと GBV-C/HGV との類似性から、GBV-C/HGV の 5'末端、3'末端は、ウイルスゲノムの複製に必須な構造であると考えられた。

GBV-C/HGV の 5'末端は RNA-RNA ライゲーションが可能であり、これを用いた 5'RACE 法は DNA-DNA ライゲーションを用いた 5'RACE 法と等しい結果を示したことから、GBV-C/HGV の 5'末端は、HCV やベスチウイルス属と同様にキャップ構造や VPg は無く、リン酸基であると思われる。GBV-C/HGV の 5'NCR には、内部に複数の AUG コドンが存在していたが、single large ORF の開始コドンとして可能性のあるものは、すべてのアイソレートに共通して存在したポジション 553~555 の AUG であると思われる。ここを開始コドンとした場合、GBV-C/HGV は複雑な RNA の高次構造が予測さ

れる 552nt の長い 5'NCR を持ち、HCV やベスチウイルス属の 5'NCR と同様の特徴を有していた。また、1996 年、Simons らは GBV-A と GBV-C/HGV 5'NCR を用いた *in vitro* 翻訳、細胞への RNA の導入と翻訳実験を行い、GBV-C/HGV の 5'NCR が IRES として機能することを示唆した[60]。以上のことから、GBV-C/HGV の本領域に IRES の機能が存在すると考えられた。また、GBV-C/HGV の 5'NCR は genotype 内相同性は 3'NCR と同様に高かったが、genotype 間相同性は 85%程度と低下する特徴があった。このような特徴は、HCV やベスチウイルス属にも同様に認められた。したがって、本領域の塩基配列は IRES としての機能を維持するために塩基配列依存的に変異の制約がかかっている部分と、RNA の高次構造依存的に制約がかかっている部分が存在すると考えられた。

GBV-C/HGV の分子系統解析

今回塩基配列を決定した日本人患者由来の 10 アイソレートのうち F1029 を除く 9 アイソレートは全て distance 0.06 以下の関係にあり、一つのクラスターを形成していた。現在までに、いくつかのグループから、GBV-C/HGV には地理的分布を反映した幾つかのタイプが存在するとした報告が行われている[67、63]。しかし、これらの結果は、5'NCR や NS3 のパーシャルシーケンスに基づいた分子系統解析によるものであり、ウイルスゲノム全長を用いた報告はない。パーシャルシーケンスで分子系統解析を行うと、異なるゲノム間でおこる homologous recombination やそれによるインサージョンが存在した場合には、解析対象として選んだ領域によって、結果が異なる可能性がある。GBV-C/HGV には、アイソレート F1029 に認められたような NS5a 領域のダイレクトリピートによる塩基配列長の違いが存在したため、同一ゲノム上でおこる RNA の高次

構造による RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) のミスリードによるインサージョンやデリージョンの他に、異なるゲノム間でおこる homologous recombination の可能性が示唆された。しかし、本章のゲノム全長を対象とした分子系統解析においても、GBV-C/HGV には genotype が少なくとも 3 種類以上存在し、さらに地域によって典型的な genotype が異なることが明らかとなり、既報のパーシャルシーケンスを用いた分子系統解析の報告と等しい結果となった。さらに結果には示さなかったが、本章の解析に用いた全てのアイソレートのゲノムを用いて、領域 (コア、E1、E2、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5b) ごとに系統樹を作成しても、3 つの genotype および F1029 の分岐の結果 (クラスタリング) は等しかった。また、F1029 を除く全てのアイソレートは、そのゲノム上にダイレクトリピートを持たなかった。以上のことから、GBV-C/HGV では、異なるゲノム間でおこる homologous recombination により、F1029 のようなインサージョンもしくはデリージョンを有する新たな株が出現する可能性は、きわめて低いと考えられた。したがって、F1029 の NS5a 領域のダイレクトリピートによる塩基配列長の違いは、異なるゲノム間でおこる homologous recombination ではなく、同一ゲノム上でおこる RdRp のミスリードによるインサージョンやデリージョンによってもたらされたと考えられた。本章の研究において、GBV-A をアウトグループとした NJ 法による系統解析の結果、F1029 の分岐は、GBV-C/HGV の 3 つの genotype が祖先ウイルスから分岐した後に関起ったことが明らかになった。すなわち、アイソレート F1029 の NS5a 領域のダイレクトリピートは、GBV C/HGV の進化の流れの中でウイルスゲノムの複製の際に RdRp のミスリードによって挿入された 36nt のインサージョンである可能性が強く、GBV-C/HGV が進化の中で欠失していったデリージョン配列ではないと思われた。

GBV-C/HGV のアミノ酸コード領域の特徴

GBV-C/HGV のアミノ酸コード領域の内、NS3 領域にはプロテアーゼ、ヘリカーゼのアミノ酸モチーフの存在が[68]、NS5b 領域には RdRp のアミノ酸モチーフ (GDD 配列) の存在が[69、25]それぞれ報告されており、アミノ酸レベルでの強い機能的制約を受けているため、genotype 間および genotype 内を問わず、アミノ酸配列が高度に保存されていたと考えられた。しかし、塩基配列の保存性を見ると、NS3 領域の塩基配列は、アミノ酸変異を伴わない核酸変異 (synonymous substitution) が多く、E2 領域に次いで塩基配列の多様性の高い領域であった。GBV-C/HGV のゲノム RNA 変異速度は $9.0 \times 10^{-6} \sim 3.9 \times 10^{-4}$ nucleotide substitution/site/year であり、HCV との比較では、10~1000 倍低い、ウイルスの中では比較的高速に核酸変異が起きるものと考えられた。したがって、アミノ酸配列に機能的制約が加わっており、核酸に加わらなければ NS3 領域のように塩基配列の多様性が高くなる可能性がある。それに対し、NS5b 領域はアミノ酸配列ばかりでなく、塩基配列も 5'NCR に匹敵するほど高度に保存されていることから、この領域は蛋白質の機能的制約だけでなく、核酸レベルで機能的制約を受けていると考えられた。プロトタイプである HGV-P1 は、非 A~非 E 型慢性肝炎患者の血漿から構築された cDNA ライブラリーから、患者血清を用いたイムノスクリーニングによって得られた 1 つの陽性クローンが手がかりとなり、全長が決定されたことが知られている。このクローンは、E2 領域のアンチセンス鎖にコードされる 118 アミノ酸を発現しており、実際にこのクローンの発現するタンパク質と反応する抗体を有する非 A~非 E 型慢性肝炎患者血漿が多数存在したことが報告されている。しかし、その後、現在に至るまで、E2 領域や、本章で発現の可能性を示唆した NS5b 領域のアンチセンス鎖に存在する ORF のタンパク質発現を調べた報告はない。また、依然として GBV-C/HGV のコ

アタンパク質をコードする領域は、そのゲノム上から発見されておらず、コアタンパク質がアンチセンス鎖にコードされる可能性も残されている。今後、これらの可能性について考察を進めるためには、アンチセンス鎖の発現実験、発現タンパク質を用いたイムノスクリーニングなど、さらなる実験を行う必要がある。

総括

フラビウイルス科 (uncapped ウイルスを中心として) のゲノム構造から見た分子進化

IRES トロビズムの可能性

フラビウイルス科の IRES による最初の分岐

ウイルスゲノム全長を解析対象にしてフラビウイルス科の進化を分子進化遺伝学的に解析した結果、推定上の起源ウイルス（分子系統樹上の根に相当する）からの分岐は、吸血節足昆虫により哺乳類や人に感染するフラビウイルス属と、哺乳類にのみ感染する属であるベスチウイルス属、HCV および GB ウイルス (A~C) のクラスターが始めに分岐し、次に偶蹄目に感染するベスチウイルス属のクラスターと霊長類に感染する HCV および GB ウイルス (A~C) のクラスターの分岐、GB ウイルス (A~C) と HCV の分岐の順であることが報告された[70]。興味深いことに、フラビウイルス科の最初の分岐は、蛋白質翻訳機構の違いと一致していた。

IRES が機能するためには、いくつもの宿主因子が IRES に結合することが必須であることが知られている[71]。また、IRES が機能するにはゲノム RNA の塩基配列に由来する高次構造も重要であることが本研究で明らかにされた。さらに、IRES を有する代表的なウイルスであるピコルナウイルス科のポリオウイルスや A 型肝炎ウイルス (HAV) では、IRES に結合する宿主因子により、感染臓器、感染細胞が決定されるといふ IRES トロビズムが存在することが報告されている[72、73、74]。1997 年、HCV の 5'NCR から E1 領域までを昆虫細胞である SF9 細胞に導入し、IRES 活性を測定したところ、SF9 細胞では HCV の IRES が機能しないことが明らかにされた[75]。IRES を有するグループは、昆虫をベクターとすることがない。昆虫という宿主では、フラビウイルス科の IRES が機能するために必要な宿主因子が欠落しており、このため IRES を有するウイルスを受け入れず、この分岐がおきた可能性がある。

1999 年になり、昆虫ウイルスで IRES を有するものが発見され、驚くべきことに翻訳開始コドンが CUU であることが明らかにされた[76]。このようなコドンで翻訳開始に使う例は、この昆虫ウイルス以外に報告が無いことから、昆虫ウイルスの IRES は、動物ウイルスの IRES とは性質が異なる事が考えられた。したがって、このような IRES の性質の違いが前述の分岐に関係している可能性もある。

Uncapped ウイルス (IRES を有するグループ) の分岐

ウイルスのトロピズムには、レセプターによるもの、成熟したウイルス蛋白質を作るためのプロテアーゼによるものが知られている[77]。NS3 領域 (プロテアーゼ、ヘリカーゼ領域)、NS5b 領域 (RdRp 領域) は、フラビウイルス科に属するすべてのウイルスを通じて最も相同性の高いアミノ酸配列を有する領域である。これらの領域を用いた分子系統解析は、ゲノム全長及び 5'NCR よりもウイルス間の遺伝学的距離が短くなることが知られている[78、79]。一方、5'NCR で系統解析を行うと、ゲノム全長を用いて行った系統解析に比べ、ウイルス間の遺伝的距離がより広がるが、同一ウイルス間の遺伝的距離はより近くなることが報告されている[80]。また、1998 年 9 月、10 月に相次いでチンパンジーから新たな GBV-C が発見、報告された。これらのウイルスを含めフラビウイルス科に属する uncapped ウイルスの分子系統解析を 5'NCR、NS3、NS5b で行ったところ、ヘリカーゼをコードしている NS3 や、RdRp をコードしている NS5b よりも、5'NCR を用いた系統解析が、ホストである動物種の分岐と最も一致した系統関係になることが報告されている。さらに、チンパンジーから発見された新たな GBV-C とこれまでに報告されている人間の GBV-C/HGV の遺伝的距離は、E1'NS5b よりも 5'NCR のほうが離れており、より明確なクラスタリングが可能であることも報告されている[80、

81]。これらのことから、フラビウイルス科の IRES を有するグループにおける 5'NCR の塩基配列の著しい違いは、それぞれのウイルスが、それぞれの宿主因子を用いて IRES を機能させるために塩基配列を変化させ、適応した結果といえるかもしれない。他方、5'NCR は、塩基配列がウイルスにより著しく異なるが、RNA の高次構造には類似点が多いことを本研究で明らかにした。このことから本領域の構造の類似は、IRES 機能を維持するという選択圧が RNA の高次構造依存的にかかっているために生じたものであると考えられた。

ポリオウイルスの IRES は、神経細胞中では著しい活性を示すが、HeLa 細胞中では活性が弱いこと、さらに同様の活性の相違は *in vitro* 翻訳でも報告されている。これは、ポリオウイルスの IRES が神経細胞特有の宿主因子を必要とするためであると考えられている[73]。この宿主因子は、IRES の塩基配列を認識して結合している可能性が示唆されている。同じピコルナウイルス科である HAV の IRES は、肝臓由来の細胞では高い翻訳開始活性を示すのに対し、肝臓以外の細胞ではほとんどその活性を示さないことが報告されており、HAV IRES が肝臓特異的な宿主因子を必要とすることが HAV の臓器特異性に強く影響していることが示唆されている[74]。フラビウイルス科の uncapped ウイルスであるベスチウイルス属や GBV-C/HGV の IRES については研究が進んでおらず細胞特異性や臓器特異性については不明なままである。しかし前述のように HCV の IRES は、昆虫細胞 SF9 細胞中では機能しないことが報告されており、スピーシーズバリアーに関係する可能性があると考えられた。現在、HCV やベスチウイルス属については IRES に結合する宿主因子の検索が進んでおり、近い将来、細胞特異性や臓器特異性が解明されることが期待される。

一方、T7 RNA ポリメラーゼによって合成した HCV-RNA を RRL を用いた *in vitro* 翻

訳系で翻訳させ、大きなポリプロテインを得た後、イヌのマイクロソーム画分を加えることにより、蛋白質の1次配列上に予測されている切断部位でプロテアーゼによる切断が起きることが確認された[82、83、84]。この切断は、HCV-RNA をサルの細胞であるCOS7 細胞や昆虫細胞である SF9 に導入しても同様に異常なく起きることが確認されており、IRES にみられたような違いはなかった[85、86]。以上のことから、フラビウイルス科の uncapped ウイルスの進化においては、プロテアーゼによるトロピズムよりも、5'NCR に存在する IRES によるトロピズムによる拘束性の方が強いと思われる。

複製開始機構の違いによる分岐の可能性

一般に、プラス鎖 RNA ウイルスの複製には、ゲノム RNA のヘアピンあるいはステムループ構造のようなゲノム末端の高次構造とそこに結合する宿主因子が必要であるとされている[87、88]。フラビウイルス属では、ゲノム RNA の 3'NCR の高次構造が、ウイルスゲノムの複製に重要な働きをしていることが明らかにされている[89]。日本脳炎ウイルスでは、この領域に宿主因子が結合することが報告されている[90]。また、HCV でもこの領域に宿主因子であるオリゴピリミジン配列結合タンパク質 (PTB、または hnRNP 1) が結合し、ウイルスゲノムの複製に重要な機能を果たす可能性が示されている[91、92]。ポリオウイルスでは、ゲノムの 5'末端の 90nt 程の塩基配列は、クローバーリーフ構造と呼ばれる 4 つのヘアピン構造の組み合わせからなっており、IRES にはなくウイルスゲノムの複製に必須な構造であることが明らかにされている[93]。また、シンドビスウイルスや、トガウイルスでは、ゲノム両末端に存在する L 型ループがウイルスゲノムの複製に必須な構造であることが明らかにされている[94、95]。面白いことに、ピコルナウイルス属は、ポリオウイルス、ヒトライノウイルス、脳心筋炎ウイルス (EMCV) は、互いに 5'末端のクローバーリーフ構造の入れ換えを行っても、ウイルスの複製が行われることが知られている。しかし、同じピコルナウイルスであっても、コクサッキーウイルスとの入れ換えは成立しない[57]。これは、ゲノム末端の構造に結合するウイルスゲノムの複製に必要な宿主因子が、ウイルスによって異なることを示している。これらのプラス鎖 RNA ウイルスとの類似性から、今回明らかにしたフラビウイルス科の uncapped ウイルスの 5'末端および 3'末端に共通したヘアピン構造は、RdRp のコンプレックスや、宿主因子が結合するウイルスゲノムの複製に必須な構造であると

考えられる。さらに、この部分に結合する宿主因子によって、宿主域が制限されている可能性もある。しかし、フラヴィウイルス科の uncapped ウイルスは、細胞での培養に成功した例が特に少なく、いまだ解析が進んでいないが、本領域も 5'NCR の IRES と同様にトロビズムと関係しており、本グループの分岐に関係する可能性が高いと考えられた。

謝辞

本研究の実験を遂行するにあたり、多大なご指導及び助言を賜った国立感染症研究所の大谷明博士、山田章雄博士、竹内薫博士、棚林清博士、国立遺伝学研究所の鈴木善幸博士、五条堀孝博士に深く感謝いたします。また、実験遂行にあたり、ご協力賜った防衛医科大学第2内科学教室の石山業弘博士、杏林大学第3内科学教室の岡村博文博士に感謝いたします。

本論文の御校閲と有益なご助言を賜った東京大学農学部吉川泰弘教授、河村晴次助教授に謝意を表します。

引用文献

1. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JS, Russell PK, Trent DW. *Flaviviridae*. Intervirology 24: 183-92 (1985)
2. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JS, Russell PK, Trent DW. *Togaviridae*. Intervirology 24: 125-39 (1985)
3. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 2057-61 (1990)
4. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. Science 229: 726-33 (1985)
5. Westaway EG. Flavivirus replication strategy. Adv Virus Res 33: 45-90 (1987)
6. Brinton MA, Disposito JH. Sequence and secondary structure analysis of the 5' terminal region of flavivirus genome RNA. Virology 162: 290-9 (1988)

7. Brock KV, Deng R, Riblet SM. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhea virus by RNA ligation and PCR. *J Virol Methods* 38: 39-46 (1992)
8. Brown EA, Zhang H, Ping LH, Lemon SM. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 20: 5041-5 (1992)
9. Tsukiyama Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66: 1476-83 (1992)
10. Deng R, Brock KV. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res* 21: 1949-57 (1993)
11. Fukushi S, Katayama K, Kurihara C, Ishiyama N, Hoshino FB, Ando T, Oya A. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 425-32 (1994)
12. Jang SK, Wimmer E. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev* 4: 1560-72 (1990)

13. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, Muerhoff AS, Erker JC, Buijk SL, Chalmers ML, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3401-5 (1995)
14. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1: 564-9 (1995)
15. Miller BR, Monath TP, Tabachnick WJ, Ezike VI. Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector. *Trop Med Parasitol* 40: 396-9 (1989)
16. Moennig V, Plagemann PG. The pestiviruses. *Adv Virus Res* 41: 53-98 (1992)
17. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1: 459-63 (1978)
18. Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, Szmuness W, Mosley JW, Stevens CE, Peters RL, Weiner JM, Werch JB, Lander JJ. Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* 10: 60-8 (1978)

19. Tabor E, Gerety RJ, Drucker JA, Seeff LB, Hoofnagle JH, Jackson DR, April M, Barker LF, Pineda-Tamondong G. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* 1: 463-6 (1978)
20. Meyers G, Rumenapf T, Thiel HJ. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171: 555-67 (1989)
21. Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rumenapf T, Meyers G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* 65: 4705-12 (1991)
22. Wiskerchen M, Belzer SK, Collett MS. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J Virol* 65: 4508-14 (1991)
23. Meyers G, Tautz N, Stark R, Brownlie J, Dubovi EJ, Collett MS, Thiel HJ. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191: 368-86 (1992)
24. Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17: 4713-30 (1989)

25. Koonin EV. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* 72: 2197-206 (1991)
26. De Clercq K, Koenen F, Strobbe R, Debecq J. Simultaneous vaccination of piglets against foot-and-mouth disease and classical swine fever. *Vet Microbiol* 20: 215-21 (1989)
27. Shimizu Y, Furuuchi S, Kumagai T, Sasahara J. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell cultures. *Am J Vet Res* 31: 1787-94 (1970)
28. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9 (1987)
29. Mandl CW, Heinz FX, Puchhammer-Stockl E, Kunz C. Sequencing the termini of capped viral RNA by 5'-3' ligation and PCR. *Biotechniques* 10: 484, 486 (1991)
30. Edwards JB, Delort J, Mallet J. Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by *in vitro* amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 5227-32 (1991)

31. Moormann RJ, Warmerdam PA, van der Meer B, Schaaper WM, Wensvoort G, Hulst MM. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* 177: 184-98 (1990)
32. Tautz N, Meyers G, Thiel HJ. Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology* 197: 74-85 (1993)
33. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649-88 (1990)
34. Niesters HG, Strauss JH. Defined mutations in the 5' nontranslated sequence of Sindbis virus RNA. *J Virol* 64: 4162-8 (1990)
35. Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, Wimmer E. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 268: 208-13 (1977)
36. Wimmer E. Genome-linked proteins of viruses. *Cell* 28: 199-201 (1982)
37. Meyers G, Thiel HJ, Rumenapf T. Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. *J Virol* 70: 1588-95 (1996)

38. Moormann RJ, van Gennip HG, Miedema GK, Hulst MM, van Rijn PA. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol* 70: 763-70 (1996)
39. Becher P, Orlich M, Thiel HJ. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol* 72: 5165-73 (1998)
40. Poole TL, Wang C, Popp RA, Potgieter LN, Siddiqui A, Collett MS. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206: 750-4 (1995)
41. Topliff CL, Kelling CL. Virulence markers in the 5' untranslated region of genotype 2 bovine viral diarrhea virus isolates. *Virology* 250: 164-72 (1998)
42. Lustig S, Jackson AC, Hahn CS, Griffin DE, Strauss EG, Strauss JH. Molecular basis of Sindbis virus neurovirulence in mice. *J Virol* 62: 2329-36 (1988)
43. Nomoto A, Omata T, Toyoda H, Kuge S, Horie H, Kataoka Y, Genba Y, Nakano Y, Imura N. Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 5793-7 (1982)

44. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2451-5 (1991)
45. Francki R, Fauquet C, Knudson D, F. B. Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch Virol* 126 (suppl 2): 223 (1991)
46. Inchauspe G, Zebedee S, Lee DH, Sugitani M, Nasoff M, Prince AM. Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10292-6 (1991)
47. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67: 3338-44 (1993)
48. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 72: 2697-704 (1991)

49. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74: 2391-9 (1993)
50. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes [letter]. *Hepatology* 19: 1321-4 (1994)
51. Okamoto H. Classification of hepatitis C virus genotypes and its application to molecular epidemiology. *Nippon Rinsho* 53 Suppl: 71-9 (1995)
52. Hino K, Sainokami S, Shimoda K, Iino S, Wang Y, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 42: 299-305 (1994)
53. Abe K, Miyakawa H, Kako M, Horikoshi K. HCV-serotype and IFN response. *Nippon Rinsho* 53 Suppl: 959-64 (1995)
54. Kobayashi M, Tanaka E. The prognosis of chronic hepatitis C-comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Nippon Rinsho* 53 Suppl: 648-51 (1995)

55. Ina Y, Mizokami M, Ohba K, Gojobori T. Reduction of synonymous substitutions in the core protein gene of hepatitis C virus. *J Mol Evol* 38: 50-6 (1994)
56. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Shimotohno K. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 220-8 (1991)
57. Rohlf JB, Percy N, Ley R, Evans DJ, Almond JW, Barclay WS. The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J Virol* 68: 4384-91 (1994)
58. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med* 125: 673-88 (1967)
59. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, Chalmers ML, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the *Flaviviridae* associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 69: 5621-30 (1995)

60. Simons JN, Desai SM, Schultz DE, Lemon SM, Mushahwar IK. Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. *J Virol* 70: 6126-35 (1996)
61. Erker JC, Simons JN, Muerhoff AS, Leary TP, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. Molecular cloning and characterization of a GB virus C isolate from a patient with non-A-E hepatitis. *J Gen Virol* 77: 2713-20 (1996)
62. Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JW, Young L, Piatak M, Jr., Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Kim JP, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 271: 505-8 (1996)
63. Muerhoff AS, Simons JN, Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Desai SM, Mushahwar IK. Sequence heterogeneity within the 5' terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol* 25: 379-84 (1996)
64. Yoshida M, Okamoto H, Mishiro S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *Lancet* 346: 1131-2 (1995)

65. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70: 3307-12 (1996)
66. Gojobori T, Ishii K, Nei M. Estimation of average number of nucleotide substitutions when the rate of substitution varies with nucleotide. *J Mol Evol* 18: 414-23 (1982)
67. Kao JH, Chen PJ, Hsiang SC, Chen W, Chen DS. Phylogenetic analysis of GB virus C: comparison of isolates from Africa, North America, and Taiwan. *J Infect Dis* 174: 410-3 (1996)
68. Gorbalenya AE, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. N-terminal domains of putative helicases of flaviviruses and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res* 17: 3889-97 (1989)
69. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* 8: 3867-74 (1989)
70. Ohba K, Mizokami M. Molecular evolutionary analysis of GB viruses and hepatitis G virus. *Nippon Rinsho* 55: 540-4 (1997)

71. Ehrenfeld E, Gebhard JG. Interaction of cellular proteins with the poliovirus 5' noncoding region. Arch Virol Suppl 9: 269-77 (1994)
72. Agol VI, Drozdov SG, Ivannikova TA, Kolesnikova MS, Korolev MB, Tolskaya EA. Restricted growth of attenuated poliovirus strains in cultured cells of a human neuroblastoma. J Virol 63: 4034-8 (1989)
73. La Monica N, Racaniello VR. Differences in replication of attenuated and neurovirulent polioviruses in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. J Virol 63: 2357-60 (1989)
74. Glass MJ, Summers DF. Identification of a trans-acting activity from liver that stimulates hepatitis A virus translation *in vitro*. Virology 193: 1047-50 (1993)
75. Wang YH, Trowbridge R, Gowans EJ. Expression and interaction of the hepatitis C virus structural proteins and the 5' untranslated region in baculovirus infected cells. Arch Virol 142: 2211-23 (1997)
76. Sasaki J, Nakashima N. Translation initiation at the CUU codon is mediated by the internal ribosome entry site of an insect picorna-like virus *in vitro*. J Virol 73: 1219-26 (1999)

77. Nagai Y. Virus activation by host proteinases. A pivotal role in the spread of infection, tissue tropism and pathogenicity. *Microbiol Immunol* 39: 1-9 (1995)
78. Ryan MD, Flint M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol* 78: 699-723 (1997)
79. Ryan MD, Monaghan S, Flint M. Virus-encoded proteinases of the *Flaviviridae*. *J Gen Virol* 79: 947-59 (1998)
80. Birkenmeyer LG, Desai SM, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Montes CC, Mushahwar IK. Isolation of a GB virus-related genome from a chimpanzee. *J Med Virol* 56: 44-51 (1998)
81. Adams NJ, Prescott LE, Jarvis LM, Lewis JC, McClure MO, Smith DB, Simmonds P. Detection in chimpanzees of a novel flavivirus related to GB virus- C/hepatitis G virus. *J Gen Virol* 79: 1871-7 (1998)
82. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5547-51 (1991)

83. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67: 4665-75 (1993)
84. Hijikata M, Mizushima H, Tanji Y, Komoda Y, Hirowatari Y, Akagi T, Kato N, Kimura K, Shimotohno K. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10773-7 (1993)
85. Matsuura Y, Harada S, Suzuki R, Watanabe Y, Inoue Y, Saito I, Miyamura T. Expression of processed envelope protein of hepatitis C virus in mammalian and insect cells. *J Virol* 66: 1425-31 (1992)
86. Matsuura Y, Suzuki T, Suzuki R, Sato M, Aizaki H, Saito I, Miyamura T. Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology* 205: 141-50 (1994)
87. Pogue GP, Hall TC. The requirement for a 5' stem-loop structure in brome mosaic virus replication supports a new model for viral positive-strand RNA initiation. *J Virol* 66: 674-84 (1992)

88. Pogue GP, Huntley CC, Hall TC. Common replication strategies emerging from the study of diverse groups of positive-strand RNA viruses. *Arch Virol Suppl* 9: 181-94 (1994)
89. Proutski V, Gaunt MW, Gould EA, Holmes EC. Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. *J Gen Virol* 78: 1543-9 (1997)
90. Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol* 71: 3466-73 (1997)
91. Ito T, Lai MM. Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J Virol* 71: 8698-706 (1997)
92. Tsuchihara K, Tanaka T, Hijikata M, Kuge S, Toyoda H, Nomoto A, Yamamoto N, Shimotohno K. Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J Virol* 71: 6720-6 (1997)

93. Xiang W, Harris KS, Alexander L, Wimmer E. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol* 69: 3658-67 (1995)
94. Nakhasi HL, Cao XQ, Rouault TA, Liu TY. Specific binding of host cell proteins to the 3'-terminal stem-loop structure of rubella virus negative-strand RNA. *J Virol* 65: 5961-7 (1991)
95. Pardigon N, Strauss JH. Cellular proteins bind to the 3' end of Sindbis virus minus-strand RNA. *J Virol* 66: 1007-15 (1992)

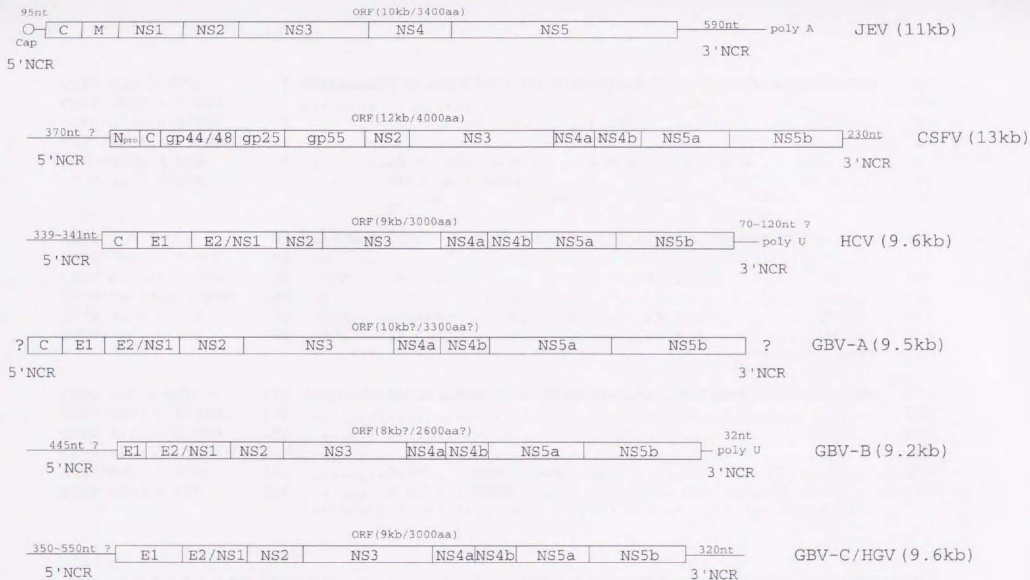


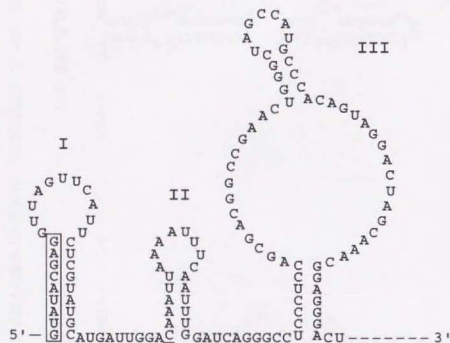
図1 JEV、CSFV、HCV、GBV-A、GBV-B、GBV-C/HGVのゲノム構造を模式的に示した。キャップ構造を○、noncoding region (NCR)を実線、ORFを□で示した。コアをC、膜をM、エンベロープをE、糖蛋白質をgpで示した。塩基配列や、機能が明らかにされていない部分は?で示した。塩基数(キロベース: kb または ヌクレオチド: nt) およびアミノ酸残基数(aa)は概数で示した。

CSFV/ALD 5'UTR	1	GUAUACGAG GUU-AGUUCAUU--CUCGUAUGCAUGAUUGGACAAAUAUAAAUUCAAUUU	57
CSFV/GPE(-) 5'UTR	1-.....--.....A.....	57
CSFV/Alfort 5'UTR	1	...-..C..U..--.....A.GAU.....U.C.C...U..CG-....	47
CSFV/Brescia 5'UTR	1-.....--.....C.....	48
BVDV/NADL 5'UTR	1AA.U...AAA.GGCA.....A.G.AU-...G...U.A.....AAU...A	59
BVDV/SD-1 5'UTR	1AACU...A.A.AUA.....A...AU-.....CAG....AA.U...A	59
		... ** ***** * .. ** .. ** .. ** .. *	
CSFV/ALD 5'UTR	58	GGAUACAGGGCCUCC----CUCC-AGCGACGGCCGAACUGGG-CUAGCCAUGCCACAGUA	111
CSFV/GPE(-) 5'UTR	58	..U.....-.....-.....-.....	111
CSFV/Alfort 5'UTR	48	..UCU....AC..-.....-.....A.....-.....U...	101
CSFV/Brescia 5'UTR	49	..U.....C..-.....-.....	102
BVDV/NADL 5'UTR	60	..CCU...AACAAAUCC...UC....A.....AA.A.G.....UU...	119
BVDV/SD-1 5'UTR	60	..CCU...AA.GAAUCC...UC....A.....AG.A.G.....UU...	119
		** ** .. ***** .. * .. ***** .. ****	
CSFV/ALD 5'UTR	112	GGACUAGCAAACGGAGGGACU-AGCCGUAGUGGCGAGCUCCUGGGUGGUCUAAGUCCUG	170
CSFV/GPE(-) 5'UTR	112	170
CSFV/Alfort 5'UTR	102	160
CSFV/Brescia 5'UTR	103	161
BVDV/NADL 5'UTR	120U.AU....GGGU...AAC....U...U..GU...A...CU...C...	179
BVDV/SD-1 5'UTR	120U.AU....GGGU...AAC....U...U..GU...A...CU...C...	179
		***** .. ***** .. ***** .. ***** .. ***** .. *****	

図2. ベスチウイルスの5'末端のアライメント。CSFVに新たに発見された9ntの塩基配列を太字で示した。CSFV/ALD株を基準配列として、等しい塩基は点(.)で、アライメントによって挿入されたギャップは、ハイフン(-)で示した。比較した6ウイルス株すべてで等しい塩基は、星印(*)でマークした。

ALD strain

$\Delta G = -39.93$



GPE(-) strain

$\Delta G = -40.12$

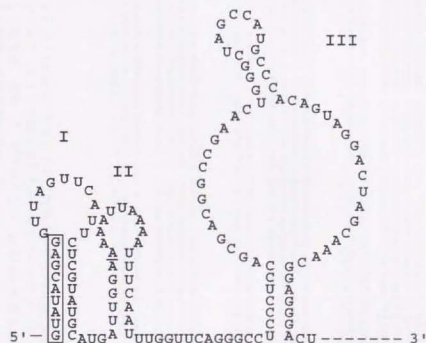
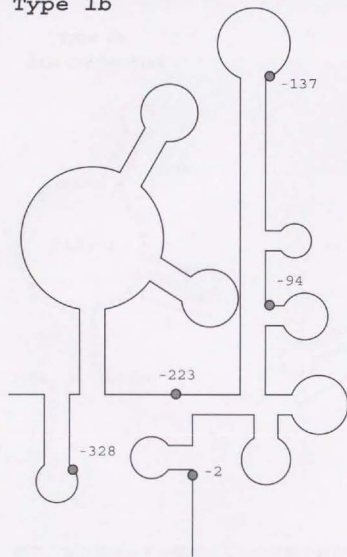


図3. コンピューター解析によって予測されたCSFV ALD、GPE (-)株の5'末端のステムループ構造。熱力学的安定性は、minimum stacking energy (ΔG ; kcal/mol) で示した。CSFVの5'末端に新たに発見された9塩基は、四角で囲んだ。2つのヘアピン構造およびその下流に位置するステムループ構造は5'側から、ドメイン I、II、IIIとした。

type 1a (HCV-1)	-259	CCAUGGCGUAGUAUGAGUGUCUGCAGCCUCCAGGACCCCCUCCCGGAGAGCCAUAGUGGUCUGCGAAACCGUUGAGUACACCGA	-170
type 1b 典型例	-259	CCAUGGCGUAGUAUGAGUGUCUGCAGCCUCCAGGACCCCCUCCCGGAGAGCCAUAGUGGUCUGCGAAACCGUUGAGUACACCGA	-170
type 1b 非典型例, 1	U.....	
type 1b 非典型例, 2	U.....	
type 1b 非典型例, 3	U.....	
type 1b 非典型例, 4	U.....	
type 1b 非典型例, 5	U.....	
type 1b 非典型例, 6	C.....	
type 1b 非典型例, 7	U.....	
type 1b 非典型例, 8	U.....	
type 2a 典型例	-259	CCAUGGCGUAGUAUGAGUGUCUACAGCCUCCAGGCCCCCCCCUCCCGGAGAGCCAUAGUGGUCUGCGAAACCGUUGAGUACACCGA	-170
type 2a 非典型例	U.....	
type 2b 典型例?	-259	CCAUGGCGUAGUAUGAGUGUCUACAGCCUCCAGGCCCCCCCCUCCCGGAGAGCCAUAGUGGUCUGCGAAACCGUUGAGUACACCGA	-170
type 2b 非典型例?	G.....	
type 1a (HCV-1)	-169	AUUGCCAGGACGACCGGUCUUUCUUGGACAAACCGUCUAAUGCCUGGAGAUUUGGCGUGCCCCGCAAGACUGCUAGCGAGUAGU	-80
type 1b 典型例	-169	AUUGCCAGGACGACCGGUCUUUCUUGGACAAACCGUCUAAUGCCUGGAGAUUUGGCGUGCCCCGCGAGACUGCUAGCGAGUAGU	-80
type 1b 非典型例, 1	U.....	
type 1b 非典型例, 2	U.....	
type 1b 非典型例, 3	U.....	
type 1b 非典型例, 4	U.....	
type 1b 非典型例, 5	C.....	
type 1b 非典型例, 6	U.....	
type 1b 非典型例, 7	U.....	
type 1b 非典型例, 8	U.....	
type 2a 典型例	-169	AUUGCCGGAAGACUGGUGCCUUUCUUGGACAAACCCACUCUUAUGCCCGGCCAUUUGGCGUGCCCCGCAAGACUGCUAGCGAGUAGC	-80
type 2a 非典型例	C.....	
type 2b 典型例?	-169	AUUAACCGAAGACUGGUGCCUUUCUUGGACAAACCCACUCUUAUGCCCGGCCAUUUGGCGUGCCCCGCAAGACUGCUAGCGAGUAGC	-80
type 2b 非典型例?	U.....	
type 1a (HCV-1)	-79	GUUGGUGCCGAAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGUGUCUUGCAGUGCCCCGGG	-22
type 1b 典型例	-79	GUUGGUGCCGAAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGUGUCUUGCAGUGCCCCGGG	-22
type 1b 非典型例, 1		
type 1b 非典型例, 2		
type 1b 非典型例, 3		
type 1b 非典型例, 4		
type 1b 非典型例, 5		
type 1b 非典型例, 6		
type 1b 非典型例, 7		
type 1b 非典型例, 8		
type 2a 典型例	-79	GUUGGUGCCGAAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGUGUCUUGCAGUGCCCCGGG	-22
type 2a 非典型例		
type 2b 典型例?	-79	GUUGGUGCCGAAAGGCCUUGUGGUACUGCCUGAUAGGUGUCUUGCAGUGCCCCGGG	-22
type 2b 非典型例?		

図5. HCVの5'NCRをgenotype別にアライメントした。各typeの典型例アイソレーートの塩基配列をそのtypeの基準配列として最上段に示し、基準配列に等しい塩基は点(.)で示した。ポジションは、single large ORFの翻訳開始コドンAUGのAを1として表示した。

Type 1b



Type 2a

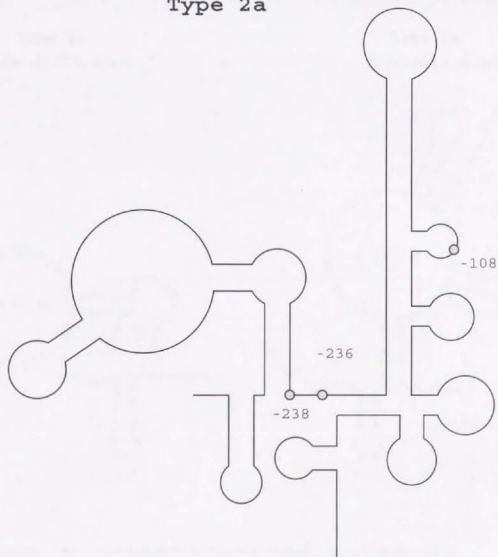


図6. IFN無効であったHCV type 1b 典型例アイソレートと、IFN著効であった非典型例アイソレート間で異なっていた塩基のポジションを、5'NCRに予測されるRNAのステムループ構造上に模式的に示した。Type 2aについては、典型例アイソレートと、非典型例アイソレート間で異なっていた塩基のポジションを同様に示した。

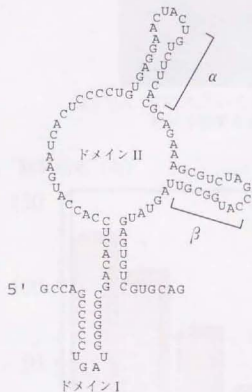
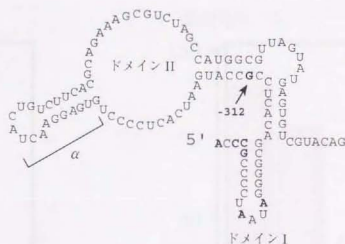
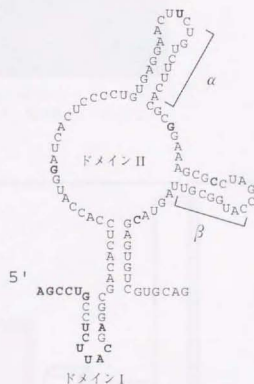
$$\Delta G = -398.8 \text{ kcal/mol}$$
 $\Delta G = -45.22 \text{ kcal/mol}$  $\Delta G = -36.1 \text{ kcal/mol}$ 

図7. コンピューター解析によって予測されたHCV type 1b、2a、3aの5'末端のステムループ構造。熱力学的安定性は、minimum stacking energy (ΔG : kcal/mol) で示した。5'末端のヘアピン構造をドメイン I、その下流に位置するステムループ構造をドメイン II とし、ドメイン II に存在する2つのヘアピン構造を β 側からそれぞれ α 、 β ブランチとした。Type 2a の β ブランチの消失をもたらしたポジション -312 の G 残基は矢印で示した。Type 1b の典型例アイソレートを基準配列とし、異なる塩基を太字で示した。

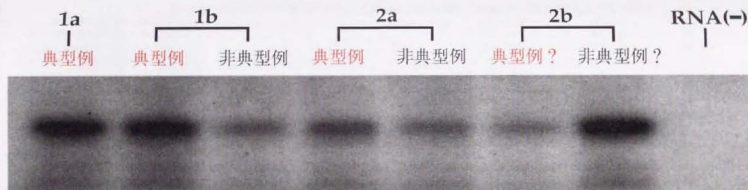


図8-A. RRLを用いたin vitro 翻訳により³⁵S 標識メチオニンでラベルされたコア蛋白質のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動像を示した。反応系にRNAを加えなかったネガティブコントロールは、RNA (-)で表した。

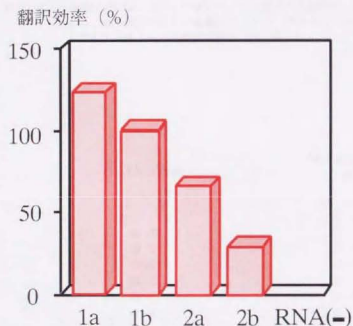


図8-B. 各typeにおける典型的な5'NCRの塩基配列を有するコンストラクトを互いに比較した。In vitro 翻訳によりラベルされた各コンストラクト由来のコアタンパク質量をBASシステムで測定し、典型的なtype 1bのコンストラクトによるタンパク質量を100%としてin vitro 翻訳効率を相対的に示した。

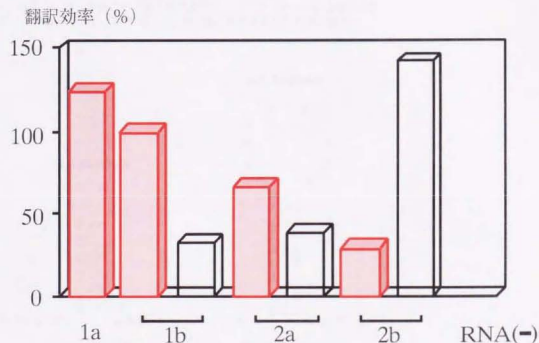


図8-C. 同様に、非典型的なアイソレートも加えて比較した。典型的なアイソレートを赤い柱、非典型的なアイソレートを白抜き柱で示した。

GBV-C/WA	1	CCCCCCCCCGGCACUGGUGCAAGCCCCAGAAACCGACGCCUA-CUGAAGU-AGACGUAUUGCCCCCGGC	70
HGV US-P1	1	ACGUGGGGAGUUGAUC.....CU,AGU.....C.....A,U,G....	87
K1668	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....U..UU,AAC.....U.....AA..G....	89
K1737	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....UU,AAC.....U.AA..G....	88
K1741	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....G.....UU,AAC.....U.AA..G....	88
K1775	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....UU,AAC.....U..AA..G....	88
K1789	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....G.....UU,AAC.....U.AA..G....	88
K2146	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....G.....UU,AAC.....U..AA..G....	88
K2141	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....G.....UU,AAC.....U.AA..G....	88
K3732	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....U..UU,AAC.....U..AA..G....	89
K606	1	GACGUGGGGGGUGAUC.....G.....UU,AAC.....U.AA..G....	88
HCV-H	1	GCCAGCCCCUGAUGGGGGGACACUCCACCAUGAAUCACUCCCCUGAGGAACUACUGUCUUCACGCAGAAAGCGUCUAGCCAUUGGC	90
HCV-J6	1	A.CCG.....A..A.....G.....C.....	89
CSFV/ALD	1	GUUACGAGGUUAGUUCUUGGUAUGAUGAUUGGACAAUUAUUUUUCAAUUUGGAUCAGGGCCUCCUCCAGCGACGGCCGAACU	90
CSFV/GPE(-)	1A.....U.....	90
CSFV/Alfort 1	1C..U.....A.GAU.....U..C..C.....U..CG.....UCU.....AC.....A.....	80

図9-A. GBV-CHGV, HCV, CSFV ゲノム5'末端の塩基配列をウイルス別にアライメントした。ウイルスごとに最上段に基準としたアイソレートの塩基配列を示し、基準配列に等しい塩基は点(.)で、アライメントによって挿入されたギャップはハイフン(-)で示した。5'末端に予測されたヘアピン構造のステムを構成する塩基配列は影をつけて表した。

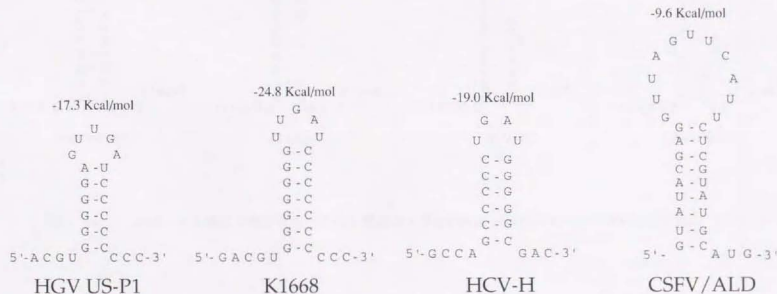


図9-B. GBV-CHGVアイソレートHGV/US-P1, K1668, HCVアイソレートHCV-H, CSFVアイソレートALDの5'末端に予測されたヘアピン構造を示した。それぞれの構造の熱力学的安定性は、minimum stacking energy (ΔG ; kcal/mol) で示した。

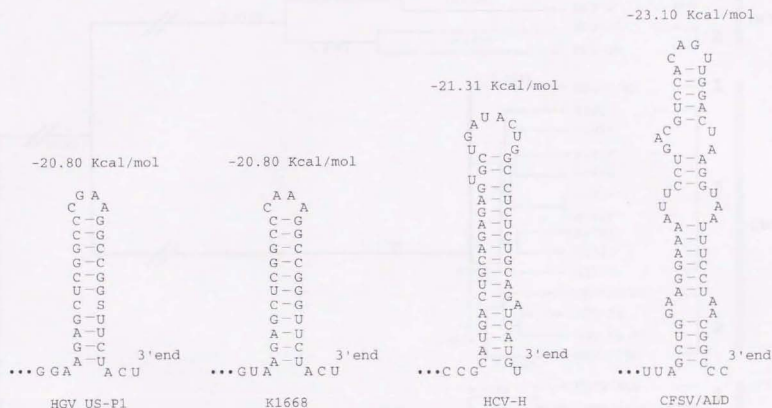


図9-C. 同様に3'末端に予測されたヘアピン構造およびminimum stacking energy (ΔG : kcal/mol)を示した。

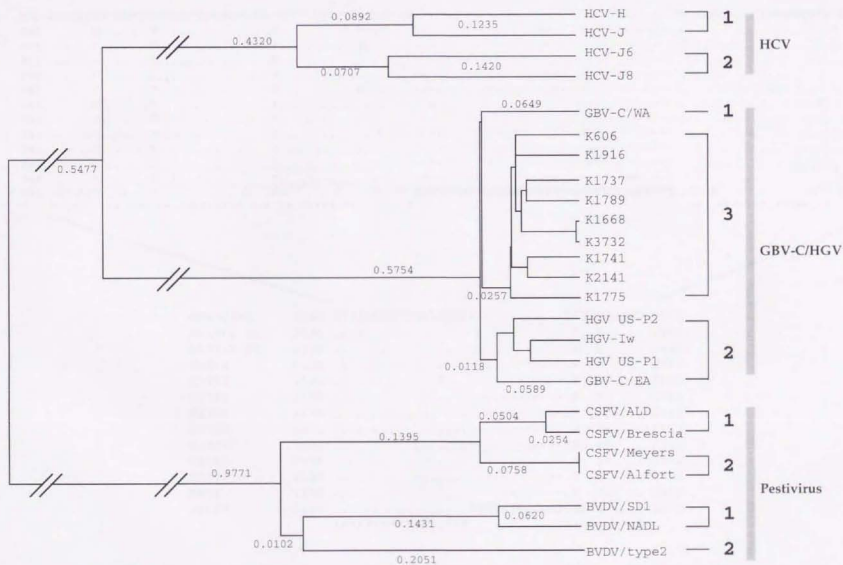


図10. UPGMA法によるフラビウイルス科のuncapped ウイルスの分子系統樹。各クラスター間のdistanceは、ブランチの上部に示した。各ウイルスのgenotypeに相当するクラスターには、タイプの番号を太字の数字で表した。

BV1-C/NA	859	AGACCCTGTCGGTGACCTCTCGCAGGAGGACACCCCGCTCTCAGACTCAT	TTGAAGTCATCCAAGAGTCGTACTGTCTG	924
HGV/US-P1	841	.C..T.....T.....T.....	.C..G..CATCCAAGAT..C..G..A..C..	924
HGV/US-P2	841	.C.....T.....T.....T.....	.C.....G..A.....	924
K1668	841	.C.....T.....T.....	.C.....G.....	924
K1737	841	.C.....T..C.....T.....	.C.....G.....	924
K1741	841	.C.....T.....T.....G.....	.C.....G.....	924
K1775	841	.CT.....T.....T.....	.C.....A.....	924
K3732	841	.C.....T.....T.....	.C.....G.....	924
K1789	841	.C.....T..C.....T.....	.C.....G.....	924
K1916	841	.C.....T..C.....T.....G.....	.C.....G.....	924
K2141	841	.C.....T.....T.....T.....	.C.....G.....	924
K606	841	.C.....T..C.....T.....	.C.....G.....	924
F1029	841	AC..ATC..A..T.....G...TG.T.....G..TCTGGTG..CTCCTCACAGGAGGACATTCATCGTCTGACTCCT...CA.....G...G.A..A..	960	

```

GBV-C/WA      2136  TSPFALISVTESSSDEK-----TLSTVSSQED 2162
HGV/US-P1     2136  .....P.S..... 2162
HGV/US-P2     2136  .....P.S..... 2162
K1668         2136  .....P.S..... 2162
K1737         2136  .....P.....P.SP... 2162
K1741         2136  .....P.S..... 2162
K1775         2136  .....P.S..... 2162
K3732         2136  .....P.S..... 2162
K1789         2136  .....P.SP... 2162
K1916         2136  .....P.SP... 2162
K2141         2136  .....P.S..... 2162
K606          2136  .....P.SP... 2162
F1029         2136  .....PSSVSSSQDAPSEL... 2175
*****

```

図11. アイスレートF1029で見たされたNSSa領域の36nt、12アミノ酸の挿入配列を、その前後の配列を含むアライメントによって示した。A)は核酸、B)はアミノ酸配列。どちらもプロトタイプGBV-C/HGVであるアイスレートGBV-C/WAを基準配列として示した。基準配列に等しい残基は点(.)で、アライメントによって挿入されたギャップはハイフン(-)で示した。ダイレクトリピートと思われる塩基配列は四角で囲み、挿入配列は核酸、アミノ酸ともに太字で示した。

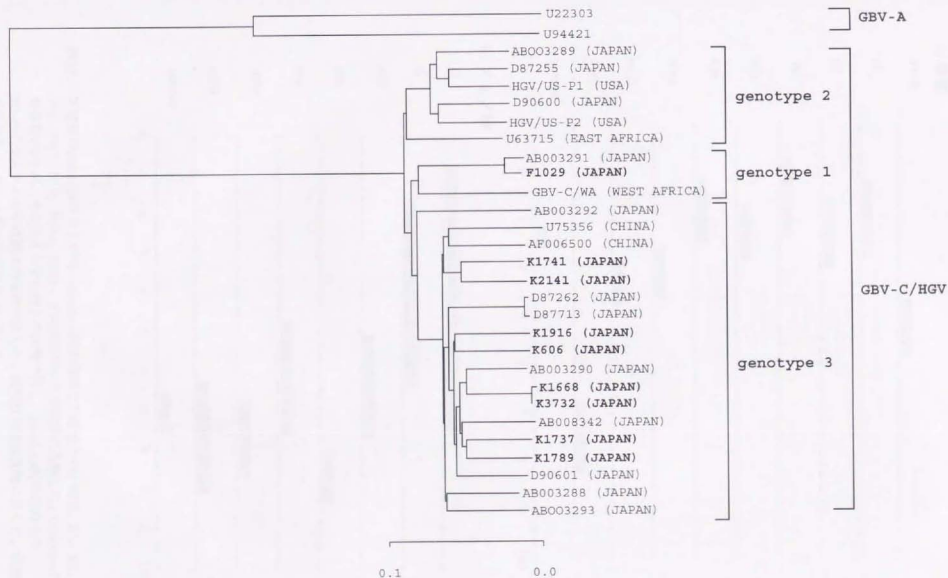
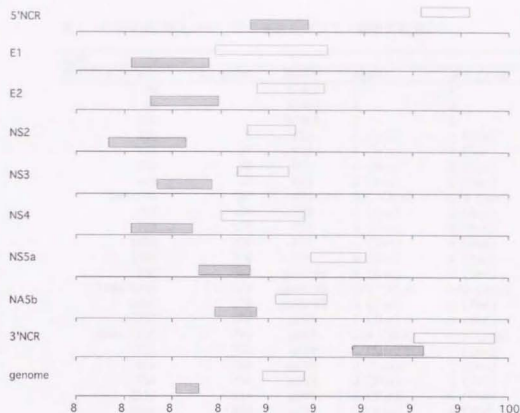


図12. NJ法によるGBV-C/HGVの分子系統樹。NJ法による分子系統樹は本来無根系統樹であるがGBV-C/HGVの系統樹の根を決定するため、GBV-Aの2アイソレートをアウトグループとして用い、有根系統樹として表した。Distance (nucleotide substitution/site/year)は、下方に目盛りを示した。

a) 核酸



b) アミノ酸

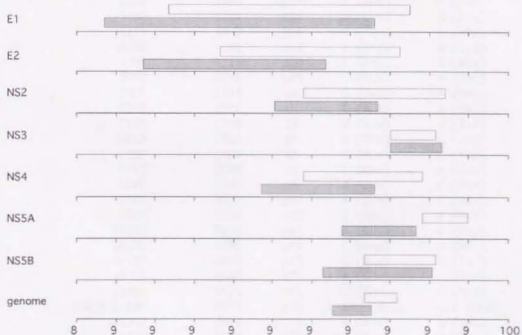


図13. 3種類のgenotype間および同一genotype内の相同性を推定上の5'NCR、E1、E2、NS2、NS3、NS4、NS5a、NS5b、3'NCRについて領域別に比較した。Genotype内の相同性の90パーセントイルを白抜き四角で表し、genotype間の相同性の90パーセントイルを網掛け四角で表した。相同性の値は横軸に示した。核酸の相同性をa)、アミノ酸の相同性をb)に示した。

表1. CSFVのALD株とGPE(-)株の塩基及びアミノ酸配列の違い*

変異				
ポジション(nt)	アミノ酸番号	領域**	ALD株	GPE (-)株
39		5'NCR	C	A
60		5'NCR	A	U
220		5'NCR	U	G
386	5	P23	C (His)	U (Tyr)
452	27	P23	G (Ala)	A (Thr)
462	30	P23	G (Arg)	A (Lys)
468	32	P23	U (Leu)	C (Ser)
693/694	107	P23	A/C (Asn)	G/U (Ser)
753	127	P23	A (Lys)	G (Arg)
779	136	P23	G (Asp)	A (Asn)
1056	228	P23	G (Ser)	A (Asn)
1361	330	P14	G (Gly)	A (Arg)
1458	362	gp44/48	A (Asn)	G (Ser)
1494/1495	374	gp44/48	C/C (Ala)	A/U (Asp)
2095	574	gp44/48	G (Leu)	U (Phe)
2352	660	gp25	C (Thr)	U (Met)
2654/2655	761	gp25	G/A (Glu)	A/G (Arg)
2661	763	gp55	C (Ser)	U (Leu)
2664	764	gp55	U (Leu)	C (Pro)
2754	794	gp55	U (Phe)	C (Ser)
2814	814	gp55	A (Tyr)	U (Phe)
2861	830	gp55	G (Ala)	A (Thr)
3191	940	gp55	G (Glu)	A (Lys)
3297	975	gp55	C (Ala)	A (Glu)
3656	1095	UK***	A (Met)	U (Leu)
3765	1131	p54	A (Lys)	G (Arg)
4371	1333	p54	A (Asn)	C (Thr)
4695	1441	p54	G (Arg)	A (Lys)
6704	2111	p80	C (Pro)	G (Ala)
7079	2236	p80	G (Ala)	A (Thr)
7415	2348	UK	G (Val)	A (Met)
7544	2391	UK	G (Ala)	A (Thr)
7565	2398	UK	U (Leu)	A (Ile)
7613	2414	UK	A (Ser)	U (Cys)
7797	2475	UK	C (Ala)	U (Val)
8743	2790	UK	C (Asp)	A (Glu)
8748	2792	UK	A (Lys)	C (Thr)
9767	3132	p58	A (Ile)	G (Val)
9923	3184	p58	G (Val)	A (Met)
10206	3278	p58	A (Glu)	G (Gly)
10256	3295	p58	C (Leu)	A (Met)
10736	3455	p75	G (Ala)	U (Ser)
10753	3460	p75	A (Glu)	C (Asp)
11086	3571	p75	U (Ser)	G (Arg)
11087/11089	3572	p75	G/U (Ala)	C/C (Pro)
11180	3603	p75	A (Ile)	G (Val)
11198	3609	p75	G (Ala)	A (Thr)
11825	3818	p75	G (Val)	A (Met)
11898	3842	p75	U (Ile)	C (Thr)
12078		3'NCR	U	C
12150		3'NCR	C	U
12192		3'NCR	U	C

*5'NCR、3'NCRの核酸変異とORFのアミノ酸置換を伴う核酸変異を表した。

**推定上の機能領域。

***機能が推定できてない領域をunknown: UKとした。

表 2. IFN 治療効果 の比較

Genotype	5'NCRの塩基配列	IFN 治療効果		IFN著効率
		CR*	PR** or NR***	CR/(PR & NR)
type 1a	典型	0	1	0
	非典型	0	0	0
type 1b	典型	5	22	18.50%
	非典型 (1nt)	0	8	0
	非典型 (>1nt)	7	11	38.80%
type 2a	典型	5	0	100%
	非典型	1	0	100%
type 2b	典型?	2	2	50%
	非典型?	0	1	0
type 3a	major?	N.D. #	N.D.	N.D.

* 著効 (Clear responder: CR)

** 有効 (Partial responder: PR)

*** 無効 (Non responder: NR)

データーなし (No data)

表 3. PCR及びSequence用プライマー

プライマー	塩基配列 (5' - 3')	方向	ウイルス
HCV14-3	ACT CCA CCA TAG ATC ACT CCC	sense	HCV
ENV02	ACC CGC A(GC)A C(GA)T CCC (CA) AC	antisense	HCV
HCV16-2	TCT TCA CGC AGA AAG CGT CT	sense	HCV
HCV15	GTT GAT CCA AGA AAG GAC CC	antisense	HCV
HCV71	GAG AGC CAT AGT GGT CTG CG	sense	HCV
HCV73	CTA TCA GGC AGT ACC ACA AG	antisense	HCV
HCV80-15	CGA CCG GGT CCT TTC TTG GA	sense	HCV
HCV75	GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT	antisense	HCV
Sindbis S-1	AAT CAA ACA GCC GAC CAA TT	sense	Sindbis virus
Sindbis AS-1	AGA TGC GAA AAT GCT CTG GC	antisense	Sindbis virus
Sindbis AS-2	ACC TGC TGT GCT ACT ACC TC	antisense	Sindbis virus

論文内容の要旨

論文題目 フラビウイルス科に属する uncapped ウイルスのゲノム構造と分子進化に関する研究

氏 名 片山和彦

フラビウイルス科は、黄熱病ウイルス (YFV)、デングウイルス、日本脳炎ウイルス (JEV) など 60 種類以上に上るウイルスから構成されるフラビウイルス属、牛下痢症ウイルス (BVDV)、豚コレラウイルス (CSFV)、ヒツジボーダー病ウイルス (BDV) から構成されるペスチウイルス属、および 1989 年に発見された C 型肝炎ウイルス (HCV) を含む名称未決定第 3 の新しい属 (この属に相当するウイルスは HCV のみである) の 3 種類のウイルス属から構成される。1995~1998 年に発見された GB ウイルス A (GBV-A)、GB ウイルス B (GBV-B)、および新たなヒトの肝炎ウイルス候補として発見された GB ウイルス C /G 型肝炎ウイルス (GBV-C/HGV) は、HCV に近縁なフラビウイルス科の第 4 の属ではないかとされているが、その性状には不明な点が多く、はっきりとした分類はなされていない。

フラビウイルス科の 3 つの属は、沈降係数 42~49S で外被膜を有する小型の球状ウイルスでポジティブセンス一本鎖 RNA をゲノムとすること、ゲノム RNA 上に single large open reading frame (ORF) を有し、ウイルス感染時にゲノムそのものが mRNA として機能するという共通点によって一つの科にまとめられている。しかし、分子生物学的手法を用いたゲノム RNA の構造および複製増殖機構に関する研究が進められた結果、ゲノム RNA の 5' 末端にキャップ構造を有し、キャップ構造依存的翻訳によりウイルスタンパク質合成を行うフラビウイルス属と、ゲノム RNA の 5' 末端にキャップ構造が無く、5' 非翻訳領域 (noncoding region : 5'NCR) の internal ribosome entry site (IRES) と呼ばれる RNA の高次構造によって、キャップ構造非依存的翻訳を行うと推定される HCV とペスチウイルス属の 2 つのグループに大別できることが明らかとな

った。フラビウイルス属のグループは、人獣共通感染症の原因ウイルスであり、蚊、ダニなどで媒介される節足動物媒介ウイルス(arthropod-borne vertebrate virus; アルボウイルス)であるのに対し、残る 2 つの属と GB ウイルスのグループは節足動物による媒介を行わないウイルスであるという違いがある。しかし両グループとも脊椎動物及びヒトに感染すると重篤な疾病を起こすものが多く、ウイルス感染防御、治療の側面からウイルスの宿主特異性(トロピズム)、ウイルス病原性発現のメカニズムの解析が待たれている。

本研究はこのような特徴を持つベスチウイルス属、HCV、GB ウイルス(これらをまとめて uncapped ウイルスと呼称する)のゲノム RNA の全塩基配列を決定し、ゲノムの構造を明らかにすることを旨とした。さらに、ゲノム全長の塩基配列を対象とした分子進化遺伝学的解析によって、ウイルスがどのように病原性を発現するのか、どのようにスピーシーズバリアー(species barrier: 種間の壁)を突破し分岐していったのかを探索した。

第 I 章では、ベスチウイルス属の CSFV を対象として、5'末端の構造、及び塩基配列を明らかにするとともに、野外流行分離株であり強毒株である ALD 株、ALD 株を実験室で継代することによって作られた弱毒化生ワクチン株 GPE (-)株のゲノムの全塩基配列を決定し、ウイルスの病原性発現のメカニズムについて検討した。

第 II 章では HCV の 6 種類の genotype のうち、抗ウイルス剤として肝炎治療に使用されるインターフェロン (IFN) に対する感受性、感染者の病態に顕著な差が報告されている HCV 強毒株 type 1b と弱毒株 type 2a の比較を中心に、IRES 機能を有する HCV 5'NCR の塩基配列の多様性と IFN 治療効果との関係を解析すると共に、未だゲノム 5'末端の塩基配列が明らかにされていない type 3a HCV の 5'NCR の全塩基配列を決定し、比較検討した。

第 III 章では、フラビウイルス科第 4 の属として報告された 3 種類の GB ウイルスのうち、ヒトの肝炎ウイルスとして報告された GBV-C/HGV に解析の対象を絞り、日本人から分離した 10 アイソレートの GBV-C/HGV ゲノム全長の塩基配列を決定し、その構造と機能について解析すると共に、フラビウイルス科の uncapped ウイルスの分子進化を解析した。

ゲノムの 5'末端及び 3'末端の塩基配列と構造、機能については以下のことが明らかとなった。

- 1) CSFV のゲノム RNA は 5'側が既報の塩基配列よりも 9 塩基長く、5'末端はリン酸基であり、キャップ構造やポリオウイルスに存在する VPg のようなウイルスタンパク質は付加していない。
- 2) この 9 塩基がステムとなり 5'末端にヘアピン構造が形作られることが明らかになった。
- 3) ゲノム RNA 3'末端には 5'末端よりも長いステムを持つヘアピン構造が認められた(第 I、III 章)。他方、4) HCV は 5'末端の塩基配列が homology 34% 未満であったにも拘わらず type 1b、2a、3a に共通した RNA のヘアピン構造が形作られることが明らかになった(第 II 章)。
- 5) GBV-C/HGV の 5'末端にも、HCV やベスチウイルス属と同様にキャップ構造や VPg は無く、リン酸基であること、5'末端だけでなく 3'末端にも熱力学的に安定したヘアピン構造が存在す

ることが明らかとなった(第 III 章)。フラビウイルス属ではすでに、ゲノム RNA 5'末端に存在するヘアピン構造がウイルスゲノムの複製に必須の構造であることが示されており、uncapped ウイルスに認められたゲノム両末端のヘアピン構造も含めて、フラビウイルス科のウイルスゲノムの複製に重要な役割を果たしていると考えられた。

Uncapped ウイルスに存在する IRES の塩基配列の多様性とウイルス病原性との関係については以下の結果が得られた。1) CSFV の強毒株である ALD 株と弱毒生ワクチン株である GPE (-) 株の比較で明らかになった 5'NCR のポジション 39、60、220 に位置する塩基の変異は、IRES の構造変化をもたらしていることが確認された(第 I 章)。2) HCV の type 1b、type 2a、新たに決定した type 3a の塩基配列を用いて、RNA のステムループ構造を比較したところ、type 1b、type 3a は同じステムループ構造を形作ったが、type 2a はポジション -313 に位置する 1 塩基の置換によって、構造が変化していた。3) 5'NCR の IRES 機能を比較するためにレポーターとして type 1b のコア遺伝子をつなぎ *in vitro* 翻訳を行って結果を比較したところ、type 1b は type 2a の約 1.6 倍の翻訳効率があった(第 II 章)。これらの結果から、CSFV や HCV の IRES の塩基配列変異が IRES 構造の変化をもたらし、それが翻訳開始に影響を与え、ウイルス毒性や IFN 感受性に関与する可能性があると考えられた。ポリオウイルスでは、IRES に存在する 1 塩基の変異によって *in vitro* 翻訳効率に 5 倍の差が生じ、それが弱毒生ワクチンの Sabin 株と強毒の Mahoney 株との神経毒性の違いをもたらしていると考えられている。また 1998 年、BVDV genotype II において、野外強毒株と弱毒株の全塩基配列の比較が行われ、弱毒化に関与する遺伝子変異が 5'NCR の 2 塩基であることが報告された。これらの報告は、著者の仮説を強く支持すると考えられた。しかし、CSFV の ALD 株、GPE (-) 株においては、いまだ感染性クローンを用いた実験系が確立していないため、5'NCR の変異とウイルス毒性の関係を証明するには至っていない。また HCV は現在に至っても、効率のよいウイルス培養系が構築されておらず、実際に IFN がどのようなメカニズムで抗 HCV 効果を示し、IRES とどのように関係するのか全く明らかにされていない。著者が発見したポジション-313 に位置する塩基以外の塩基置換が IFN 感受性に関与している可能性もある。CSFV や HCV の IRES が実際にどのような構造をとり、ウイルス毒性や IFN 感受性にどのように関与するのかを解析することは、今後の重要な研究課題である。

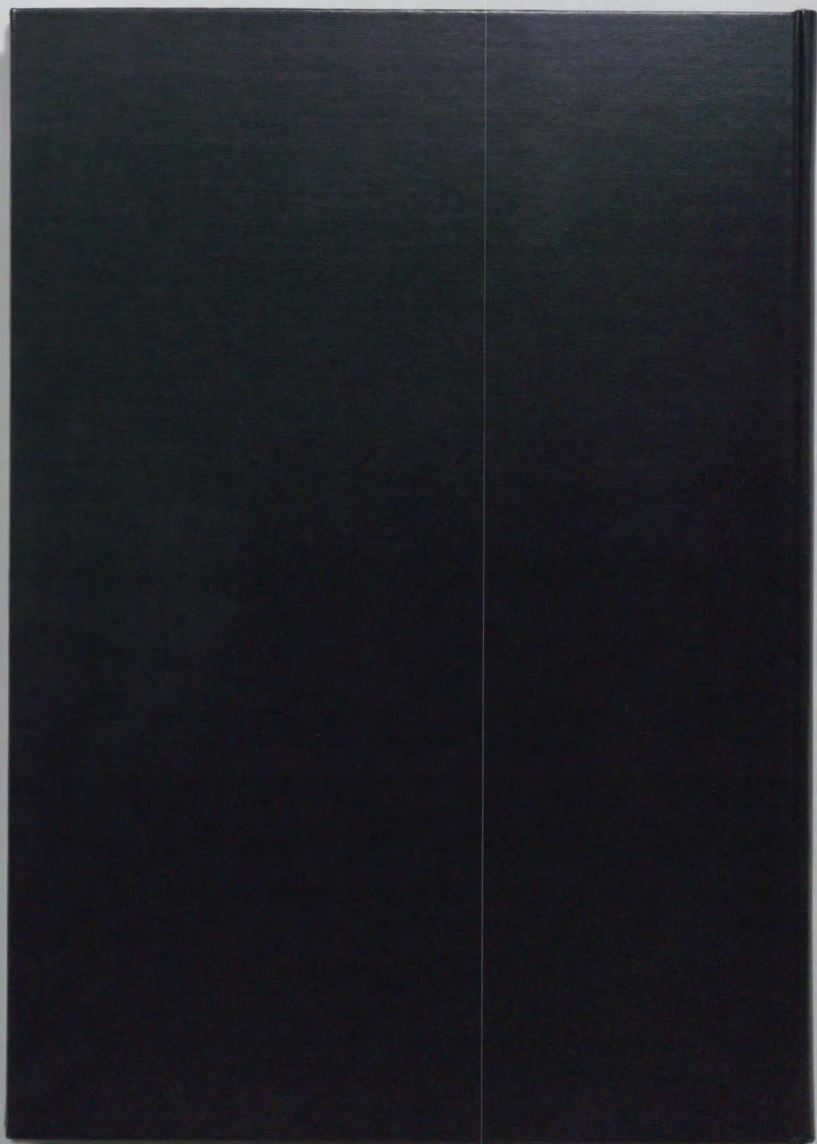
GBV-C/HGV の 5'NCR には、内部に複数の AUG コドンが存在していたが、single large ORF の開始コドンとして可能性のあるものは、すべてのアイソレートに共通して存在したポジション 553-555 に位置する AUG であると思われた。ここを開始コドンとした場合、GBV-C/HGV は複雑な RNA の高次構造が予測される 552 塩基の長い 5'NCR を持ち、HCV やベスチウイルス属の 5'NCR と同様の特徴を有していた(第 III 章)。また 1996 年、Simons らは GBV-A と GBV-C/HGV 5'NCR を用いた *in vitro* 翻訳、細胞への RNA の導入と翻訳実験を行い、GBV-C/HGV の 5'NCR が IRES として機能することを示唆した。以上のことから、GBV-C/HGV の本

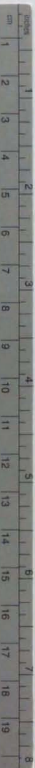
領域に IRES の機能が存在すると考えられた。

ウイルスゲノム全長を解析対象にしてフラビウイルス科の進化を分子進化遺伝学的に解析した結果、以下のことが明らかにされた。推定上の起源ウイルス（分子系統樹の根に相当する）は、最初に吸血節足昆虫により哺乳類や人に感染するフラビウイルス属と、哺乳類にのみ感染するペスチウイルス属、HCV および GB ウイルス（A-C）のクラスターに分歧した。すなわち、フラビウイルス科の最初の分歧は、蛋白質翻訳機構の違いと一致していた（第 III 章）。IRES が機能するためには、いくつかの宿主因子が IRES に結合することが必須であることが知られている。また、IRES を有するウイルスには、IRES に結合する宿主因子により、感染臓器、感染細胞が決定されるという IRES トロピズムの存在が報告されている。1997 年 HCV の 5'NCR から E1 領域までを昆虫細胞である SF9 細胞に導入し、IRES 活性を測定したところ、SF9 細胞では HCV の IRES が機能しないことが明らかにされた。IRES を有するグループは、昆虫をベクターとすることがない。昆虫という宿主ではフラビウイルス科の IRES が機能するために必要な宿主因子が欠落しており、このため IRES を有するウイルスを受け入れず、この分歧がおきた可能性がある。フラビウイルス科の IRES を有するグループにおける 5'NCR の塩基配列の著しい違いは、それぞれのウイルスが、それぞれの宿主因子を用いて IRES を機能させるためにスピーシーズバリアーを乗り越えて適応した結果といえるかもしれない。このように 5'NCR の塩基配列はウイルスにより著しく異なるが、それにも拘わらず RNA の高次構造には類似点が多いことを本研究で明らかにした。本領域の構造の類似は、IRES 機能を維持するという選択圧があり、RNA の高次構造依存的にかかっているために生じたものであると考えられた。

一般に、プラス鎖 RNA ウイルスのゲノムの複製には、ゲノム RNA のヘアピンあるいはステムループ構造のようなゲノム末端の高次構造とそこに結合する宿主因子が必要であるとされている。また複製に必要な宿主因子は、ウイルスによって異なることも示されている。フラビウイルス科の uncapped ウイルスは、細胞での培養に成功した例が特に少なく、いまだ解析が進んでいない。しかし、これらのプラス鎖 RNA ウイルスとの類似性から、今回明らかにしたフラビウイルス科の uncapped ウイルスの 5'末端および 3'末端に共通したヘアピン構造は、ウイルス RNA 複製酵素の複合体や、宿主因子が結合するウイルスの複製に必須な構造であると考えられる。さらに、この部分に結合する宿主因子によって、宿主域が制限されている可能性があり、本グループの分歧に関係すると考えられた。

現在、HCV やペスチウイルス属については IRES に結合する宿主因子の検索が進んでいる。本研究で明らかになったゲノムの構造とその特徴は、ウイルスの細胞特異性や臓器特異性解明の一助となり、将来、ウイルスのトロピズムを利用したウイルス特異的増殖制御への道を開く手がかりとなることが期待される。





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

