

# SARS-CoV に関する最新の研究と今後の展望

水谷 哲也

国立感染症研究所 ウイルス一部

2003-2004年の冬に猛威をふるった新型肺炎の重症急性呼吸器症候群 (SARS; Severe Acute Respiratory Syndrome) は、今冬には散発的な患者の発生にとどまった。しかし、感染源となる動物も特定されておらず再び大流行する恐れもある。SARS の流行から一年あまりたった現在、一日一報のペースで論文が掲載されている。SARS-CoV の研究には従来のコロナウイルスの研究者に加えて他のウイルスの研究者たちが参入し、彼らの技術を駆使して成果を挙げている例が多い。現在の SARS に関する研究の主流はワクチンの開発・治療薬の探索・検査法の確立である。本稿では、これらの研究について最新の情報を提供する。

## 1. はじめに

昨冬の SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) 大流行は、患者が発生しなかった国をも巻き込んで世界的な社会現象になったことは記憶に新しい。ヒトのコロナウイルスといえば229EやOC43のように冬季の風邪の原因ウイルスの例として挙げられ、ほとんどの人が重篤になることなく罹患するものだと思われていた。それゆえ、SARSの大流行は衝撃的であった。今冬も再流行が懸念されていたが散発的な患者の発生にとどまり、ひとりの死者を出してしまったが大流行にはいたっていない(4月26日現在)。日本の新聞では、鳥インフルエンザの感染拡大が大々的に報じられている片隅に、SARSの記事が小さく載っていたほど今冬のSARS現象は静まっていた。昨冬のSARS大流行の大惨事はもう繰り返されることはないのだろうか? ワクチンと治療薬が確立していない今、決して楽観視はできない。再びsuper spreaderにSARS-CoVが感染すると急速な感染の拡大が起きる可能性は十分にある。そのためにも一刻も早いワクチンの開発と抗ウイルス剤の発見が望まれている。SARS-CoVの研究は社会的ニーズが大きく、それだけに研究で得られた成果は社会的貢献に繋がりがやすい。また、科学的・社会的にもイン

パクトが大きいのがゆえに注目される研究にもなりやすい。そこでこの一年余りの間にコロナウイルスの研究者に加えて多くのウイルスの研究者がSARS-CoVの研究に参入し、それぞれの研究分野で培った技術を適用し成果をあげている。しかし、華々しい研究成果の根底には、マウス肝炎ウイルス(Mouse hepatitis virus: MHV)など動物のコロナウイルスでの研究成果の蓄積があることを忘れてはいけない(コロナウイルスの性状については「ウイルス」の他稿に詳しいので参照していただきたい<sup>1,2)</sup>)。たとえば、コロナウイルスではSpike(S)蛋白質の免疫原性やレセプターとの結合についてよく研究されているが、後述するようにSARS-CoVの抗ウイルス剤を開発する上で大いに参考になっている。また、動物のコロナウイルスは、特にウシ・ブタ・ニワトリ・イヌ・ネコなどの畜産・愛玩動物に少なからぬ被害を及ぼしてきたが、これらのウイルスに対するワクチン開発の歴史はSARS-CoVのワクチン開発の良い手本になっている。SARS-CoV研究の加速はこのようにコロナウイルス研究の蓄積なしには考えられないことである。

昨冬のSARS大流行後から一年あまりたった今は、SARS-CoVの研究成果が盛んに投稿されている時期と考えられる。2004年4月におけるPubMedに載ったSARS-CoVに関する論文数は1日付けで既に374報もあった。この中には総説の形式をとる論文が少なくないが、それにしても驚異的な数字である。これが20日後には399報に増えていたので、一日一報のペースで論文が世に出ている計算になる。この一年でいかに多くの研究者がSARS-CoVに関わってきたかを端的に表している数字といえよう。研究論文

## 連絡先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1  
TEL: 81-42-561-0771  
FAX: 81-42-565-3315  
E-mail: tmizutan@nih.go.jp

表1 SARS-CoV のウイルス学・分子生物学的性状

Enveloped positive stranded RNA virus
29,727 nucleotides genome length
Group 4 coronavirus
At least 9 mRNAs including genome (mRNA 1 ; polymerase, mRNA 2 ; S protein, mRNA 4 ; E protein, mRNA 5 ; M protein, mRNA 9 ; N protein)
3'-coterminal nested set subgenomic mRNA
Common 5'-leader sequence
Receptor ; Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2)

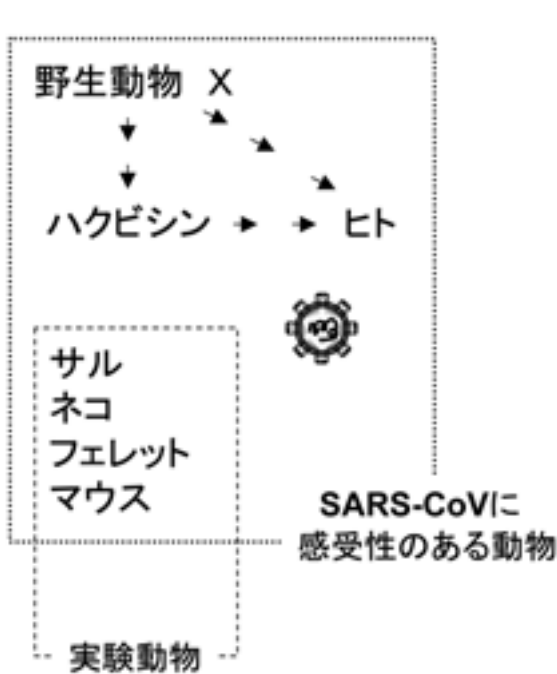


図1 SARS-CoV に感受性のある動物

ハクビシンに SARS-CoV が感染することは間違いなが、本来の宿主動物であるか否かについては議論の分かれるところである。ハクビシンに感染させた野生動物 (X) が存在するとの見方も強い。動物ではヒトが感染するほかに、サル・ネコ・マウス・フェレットも感染することが確認されている。ヘビからもウイルスが検出されたということであるが、その真偽は不明である。

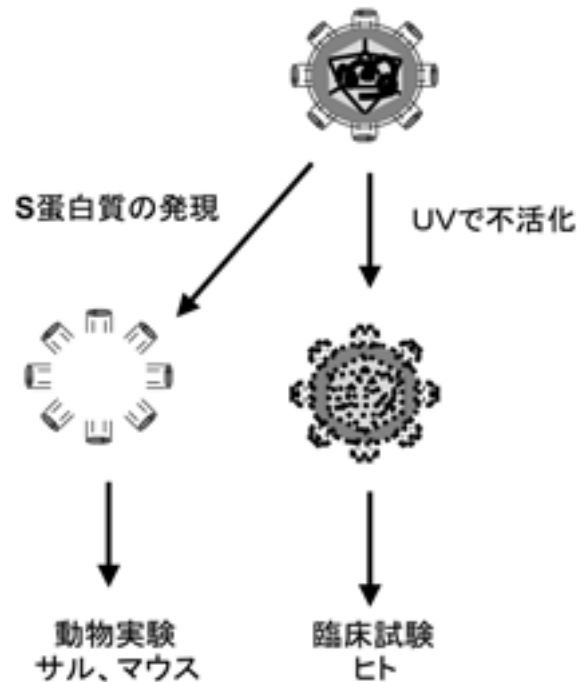


図2 SARS-CoV のワクチン開発

WHO などは不活化ワクチンを作成し臨床応用しようとしている一方で、実験動物を用いて S 蛋白質を中心としたワクチンについて研究が進んでいる。

を項目別に分けると、(1) 流行地における疫学的研究、(2) 検査方法の確立、(3) 治療薬の候補に関する研究、(4) ワクチンに関する研究、(5) 動物モデルの確立、(6) レセプターの発見と解析、(7) 分子生物学的研究、などに大きく分けられる。この中で本稿では特に、ワクチン・治療薬・検査方法・分子生物学的研究にスポットを当て最新の情報を紹介したい。さらに、SARS の大流行という現象が及ぼした世界的規模の経済的損失についても言及する。SARS-CoV の性状からレセプターの発見までの経緯については、田口文広博士の総説<sup>2)</sup>に詳しいの参照していただきたい (本稿では表 1 にまとめた)。

## 2. SARS-CoV のワクチン開発

報道によると世界保健機構 (WHO)、中国国家食品薬品监督管理局とカナダのグループが SARS-CoV の不活化ワクチンの臨床試験を準備・開始している、ということである。特に中国では30人のボランティアを募集して臨床試験を行なうと発表している。このように最も簡単で効果が期待できる不活化ワクチンの開発が先行している一方で、科学論文では S や Nucleocapsid (N) 蛋白質を免疫原とした動物実験による効果が報告されている。長年にわたる動物のコロナウイルスの研究から、S や N 蛋白質が免疫原と

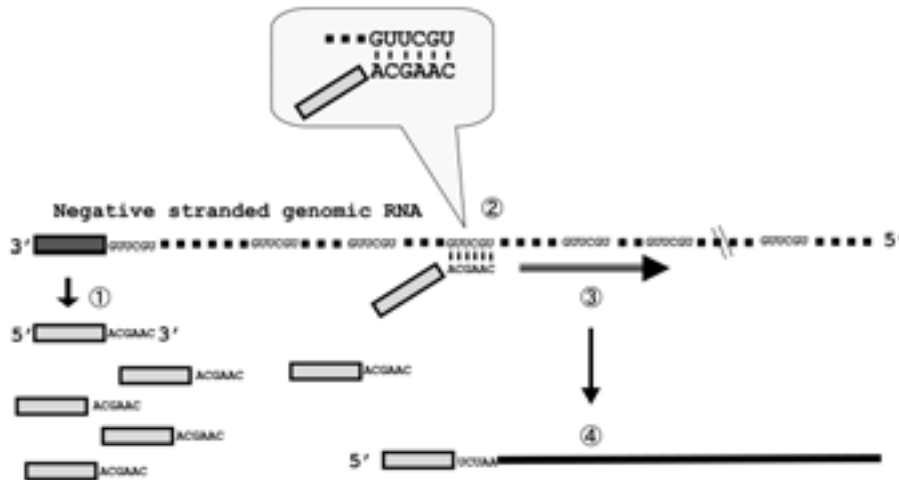


図3 SARS-CoVの転写メカニズム

MHVの研究から予想されるSARS-CoVの転写様式を図に表した<sup>33)</sup>。①マイナス鎖のゲノムRNAの3'末端からleader RNAが大量に転写される。②Transcription regulatory sequence (TRS)と呼ばれる領域にleader RNA中に存在するTRSに相補的な配列が結合する。③RNA-dependent RNA polymeraseにより転写が開始される。④この図では第4番目のTRSにleader RNAが結合したのでmRNA 4が完成する。短いleader RNAが合成されることなく、マイナス鎖のRNAがループをつくることによってmRNAを合成するモデルも考えられている。

して有効であることがわかってきたからである。ただし、ネコ伝染性腹膜炎ウイルスのようにS蛋白質が抗体産生を誘導する一方で、S蛋白質と抗体が複合体を形成してマクロファージ上のFc受容体に結合することにより、感染を増強するという現象がおこってしまう(antibody-dependent enhancement; ADE)ことも知られている。SARS-CoVでADEが起こるか否かはまだ不明であるが、このような危険性を孕んでいることも考慮に入れるべきである。また、ニワトリ伝染性気管支炎ウイルスでは弱毒生ワクチンが広く使われているが、ワクチンを使用してもこのウイルスが撲滅される見込みはない。このウイルスのS蛋白質には変異が入りやすく絶えず異なる変異株が出現することが主な原因である。皮肉なことに、ワクチン株と野生株の遺伝子組み換えがニワトリ体内でおこり、新しいウイルスが出現するという報告もある。では、SARS-CoVはS蛋白質に変異をおこしやすいウイルスなのであるか? 昨冬のアウトブレイクにおける台湾での発生のケースから、ゲノム当たり0.1の割合で変異が起こっているという報告があった<sup>3)</sup>。一般にRNAウイルスでは1万塩基に1の割合で変異が入るといわれているので、SARS-CoVのゲノムが3万塩基であることを考えるとこの頻度は非常に低いと考えられる。しかし、多数の被害者を出した中国における患者の報告を待たねば本当に変異の低いウイルスかどうかの結論は出せない。

ワクチン開発を考える上で、SARS-CoV感染患者の体内ではどのウイルス性蛋白質に対する免疫応答があるのか

を知ることは重要なことである。動物のコロナウイルスの研究からSARS-CoVのS蛋白質に抗原性があることは明白であるが、N蛋白質からも強い抗原性が得られたという興味深い報告がある<sup>4-6)</sup>。このようにSとN蛋白質に対する抗体を産生するような免疫方法を確立することがワクチン開発の近道になるようである。いくつかの実験動物を用いた論文を紹介しよう(図1, 2)。ネコやフェレットがSARS-CoVに感受性があることが示されているが<sup>7)</sup>、実験動物として最適なのはやはりマウスである。SubbaraoらがBALB/cマウスにSARS-CoVを経鼻感染させたところ、ウイルスの複製は1-2日をピークとして約1週間で消失したという結果を得た<sup>8)</sup>。病理組織学的には細気管支の上皮細胞からウイルス抗原と核酸が検出されている。このようにマウスもSARS-CoV感染のための実験動物として用いることができることが示された。さらにSARS-CoV感染マウスは中和抗体を産生していることがわかり、再感染を防御できている。受身免疫を施したマウスでも感染防御は成立した。同じ研究グループはDNAワクチンについての報告も行っている。S蛋白質を修飾したDNAワクチンをマウスに施すとCD4とCD8を介する免疫反応を誘導したが、特に膜貫通領域を含むDNAワクチンが中和抗体を産生することがわかった。このマウスはSARS-CoVの感染を液性免疫により効果的に阻害できた<sup>9)</sup>。S蛋白質の免疫誘導能に関しては中国のグループも確認している<sup>10)</sup>。一方、S蛋白質単独よりもN蛋白質などのコンビネーション免疫が有効であるという報告もある。3種類の

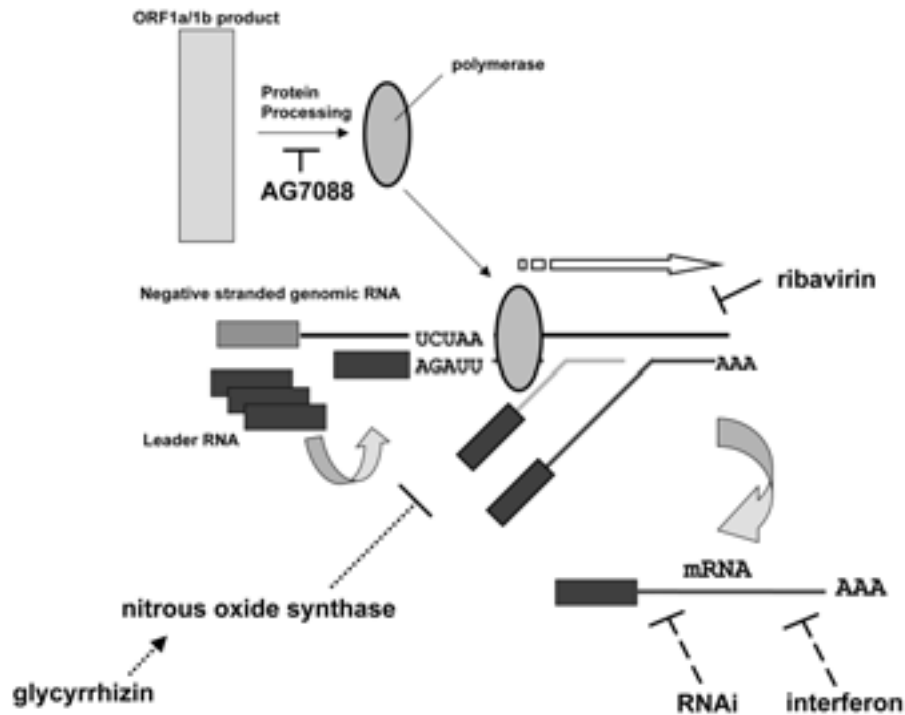


図4 細胞内で作用する抗 SARS-CoV 薬

SARS-CoV では ORF 1 a / 1 b からポリプロテインが合成され、polymerase を含む多数の蛋白質にプロセッシングされるが、AG7088 はここを標的としている。リバビリンは細胞内の GTP プール濃度を下げるなどの働きもあるが、直接 polymerase を標的としていると考えられている。グリチルリチン酸の SARS-CoV に対する効果はまだ不明であるが、NO と関係しているらしい。

SARS ウイルス蛋白質 (S, M, N) を発現するアデノウイルスベクターをアカゲザルに免疫すると、期待通りアカゲザルは S1 フラグメントに反応する抗体を産生し、N 蛋白質に対する T 細胞の免疫反応 (ガンマインターフェロンの産生) も得られた。さらに、これらの血清中に含まれる抗体は *in vitro* で SARS コロナウイルスに対する強い中和活性を示した<sup>11)</sup>。動物に免疫することなく早く抗体を得る方法として、一本鎖抗体の作成方法が近年盛んに改良されている。Sui らは S1 フラグメントに親和性をもつ一本鎖抗体 (single-chain variable fragment; scFv) をファージライブラリーからスクリーニングし、最終的に高い中和活性を有する scFv 80R という一本鎖抗体を得た。これを IgG 1 に変換したところ、S1 フラグメントへの親和性および中和活性は一本鎖抗体のときよりも 20 倍強いという結果が得られた<sup>12)</sup>。一方、動物のコロナウイルスの研究から N 蛋白質は変異し難いので、S 蛋白質に代わる免疫原として研究されている。Kim らのグループは Calreticulin (CRT) を結合した DNA ワクチンの効果を研究していたが、同じ手法で N 蛋白質に対する DNA ワクチンの効果をマウスで検討した。この DNA ワクチンを投与したマウスでは N 蛋白質に対する液性・細胞性免疫ともに上昇しており、N 蛋白質を発現するワクシニアウイルスの感染を防御できて

いる<sup>13)</sup>。このように、SARS-CoV に対するワクチン開発は不活化ワクチンがすでに臨床試験にはいっている一方で、次世代ワクチンの研究も着々と成果を挙げており、数年後にはワクチンの普及が実現するかもしれない。

### 3. 治療薬の候補に関する研究

SARS-CoV の増殖は非常に早いので、即効性のある強力な抗 SARS-CoV 薬を発見・開発することはそれほどたやすくはないと考えられる。図 3 にコロナウイルス (特に MHV) で明らかにされた転写機構を示した。異なるウイルスにおいてもポリメラーゼやプロテアーゼの活性部位などは共通した立体構造をとることが少なくないので、既知の薬剤、すなわち、すでに臨床で使用されている薬剤の SARS への転用が有効となる可能性が高い (図 4, 5)。たとえば、多くのウイルス性疾患に高い効果のあるインターフェロンや、C 型肝炎ウイルスでインターフェロンとの併用により効果を発揮するリバビリン、HIV にも効果のあるグリチルリチンなどはいずれも SARS-CoV の増殖を抑制できる<sup>14-16)</sup>。しかし、単独での効果は期待するよりも高くないために、今後併用による効果に関する研究がなされると考えられる。また、HIV などではプロテアーゼを標的とした化合物が臨床的にも使用されており、プロテア

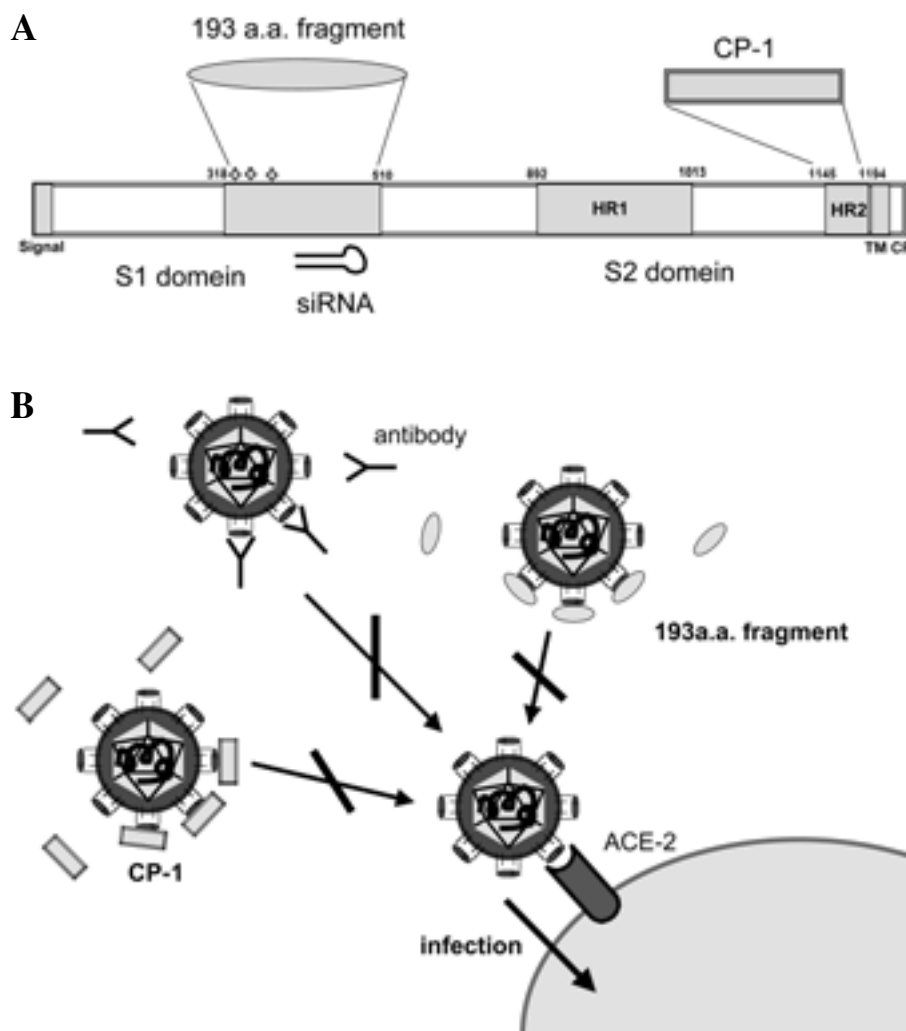


図5 ウイルス粒子に作用する抗 SARS-CoV 薬  
 A. 193アミノ酸フラグメントやCP-1のS蛋白質上の位置を示した。  
 B. これらの薬剤がウイルス粒子に作用するときの概念図。

ーゼがウイルスの複製にとっていかに重要であることを証明している。Rhinovirus では AG7088 という化合物が治療薬として使われているが、コンピュータシミュレーションから SARS-CoV の ORF 1 a にコードされているプロテアーゼ (3 Clpro) にも有効に働くことが推測されている<sup>17)</sup>。SARS-CoV の細胞への進入を阻害する薬剤の研究も盛んである。Liu らは、抗 HIV-1 剤を開発した技術を SARS-CoV にも応用し、SARS-CoV の S2 領域に存在する heptad repeat 2 (HR 2) 領域に対するペプチド (CP-1) がウイルスの感染を抑制することを示した<sup>18)</sup>。コロナウイルスの S 蛋白質は細胞に感染する際に構造変化を起こすが、CP-1 は HR-1 に結合することによりそれを阻害すると考えられる。同様の研究は MHV でも成功しているが、どのウイルスの場合でも HR-2 由来のペプチドが有効であるらしい。また、上述の一本鎖抗体を作成したグループは ACE 2 が SARS-CoV のレセプターであることも発見し

ている<sup>19)</sup>が、S1 領域の193アミノ酸フラグメント (318-510 aa) が ACE 2 に結合するという解析結果を得ている<sup>20)</sup>。このアミノ酸フラグメントの IC50 を測定すると 10nM 以下という低濃度であったことを報告しており、将来治療薬として用いられる可能性を示している。

アンチセンスやリボザイムといった RNA による遺伝子制御システムにより MHV の複製を阻害することが可能である<sup>21)</sup>。しかし、近年アンチセンスやリボザイムに代わる遺伝子抑制方法として RNAi 法が開発され、瞬間に一般的な手法として普及した。Zhang らは、S1 と S2 領域を標的にして U6 プロモーターの下流に二本鎖 RNA を発現するようなベクターを構築し、培養細胞のレベルであるがウイルスの複製を抑制している<sup>22)</sup>。線虫では RNAi 法により遺伝子発現の完全なノックダウンを期待できるが、哺乳類細胞では内在性遺伝子の発現量を 1/4 くらいまで抑制できるのが一般的知見と考えられるので、RNAi 法単独で

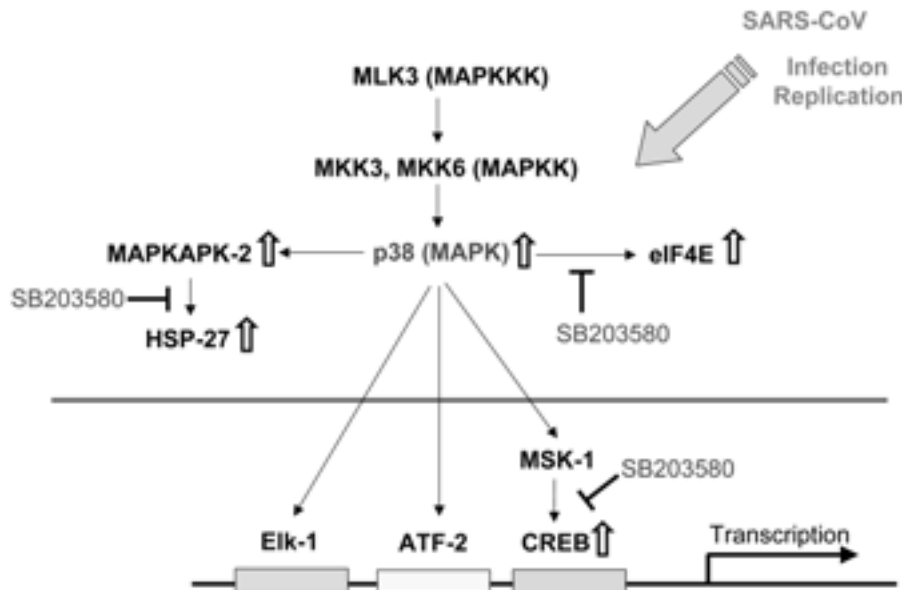


図6 SARS-CoVによるp38 MAPKシグナル伝達系の活性化<sup>27)</sup>

SARS-CoVがVero E6細胞に感染するとp38 MAPKとその下流のリン酸化が起こる。SB203580 (p38 MAPKの阻害剤)はこれらのリン酸化を阻害する。このシグナル伝達系を特異的に活性化しているSARS-CoVの蛋白質の同定は重要である。

はSARS-CoVの複製を完全に阻害することは現時点では不可能である。また、ウイルスゲノムを標的とした方が効果を期待できるかもしれない。

#### 4. 検査方法の開発

昨冬の流行時に、SARS感染患者の迅速な識別法として、成田空港への入国者に体温のモニターをしていたことは記憶に新しい。日本ではまだSARS患者が発生していないので、このように水際で感染を食い止めることは非常に重要・有益な方法である。このような観点から栄研化学は国立感染症研究所の協力のもと、ランプ法による迅速なSARS-CoV RNAの検出方法を開発した。「Loopamp SARSコロナウイルス検出試薬キット」の製造は昨年末すでに厚生労働省に承認を受けて、検出用の濁度測定装置とともに発売されている。RNAの抽出から増幅を経て判定まで約1時間、検出感度は約10コピーと、迅速かつ高感度の検出を実現している<sup>23)</sup>。今後、新しい感染症が流行した際にもランプ法の応用が期待される。リアルタイムPCR法も感度が良く、ウイルスの核酸量を定量できるのですでに一般的な方法として用いられている。SARS-CoVを検出するために改良型TaqManリアルタイム蛍光PCR法を開発した研究グループが120人の疑い例を含んだ患者血清を調べたところ、28人が陽性でそのうち3例からウイルスを分離できた<sup>24)</sup>。この方法は、普通に行われているPCR法よりも1千万倍、一般的リアルタイムPCR法よりも百倍感度が良いということである。同様に台湾のグループもリアルタイムPCR法の報告をしている<sup>25)</sup>。一方ELISA法では、

ShiらがN蛋白質をターゲットにしたAntigen-capture ELISA法を開発し、SARS疑い例で発症後6-10日の患者では68.4%、11-61日では89.6%の検出率を得ている<sup>26)</sup>。SARSではない患者の血清940例中、1例だけが弱い陽性を示しているという特異性の高さである。このような検査方法の改良は数多く報告されることが予想される。

#### 5. SARS-CoVの分子生物学

細胞内のシグナル伝達系の研究もSARS-CoVで報告されている。この分野はSARS-CoV感染による病原性の解明に繋がるので重要である。SARS-CoVが生体の細胞に感染したときにどのようなシグナル伝達系を活性化させるかについては、今後の研究を待たねばならないが、培養細胞のレベルではアポトーシスを誘導することがわかっている。では、最終的にDNAフラグメンテーションが起こるとしてその上流にはどのようなパスウェイが存在するのだろうか？活性化されるシグナル伝達系の解明はその第一歩となる。著者らは、SARS-CoVが培養細胞に感染するとp38 MAPKが活性化してくることを発見した。また、p38 MAPKシグナル伝達系の下流、MAPKAPK-2、CREB、HSP-27、eIF4Eなどもリン酸化され、これらのリン酸化はp38 MAPKの阻害剤で阻害された。このシグナル伝達系の活性化はSARS-CoVの細胞障害性に関与しているが、ウイルスの複製を阻害していない<sup>27)</sup> (図6)。Heらは、培養細胞にN蛋白質を発現させてシグナル伝達にどのように影響しているかをRathDetectというシステムを用いて検討した。転写因子のAP-1はFos, Jun, CREB,

ATF のホモダイマーかヘテロダイマーで構成されていることが知られており、N 蛋白質の発現は AP-1 を活性化していたが、NF- $\kappa$ B の経路は活性化していなかったという結果を得ている<sup>28)</sup>。このような発現系では、過剰な外来性蛋白質が小胞体ストレスを惹起することが知られているので、実際に SARS-CoV が細胞内で複製しているときに起こっている現象かどうかは不明である。この研究グループは N 蛋白質についてさらに研究を進め、N 蛋白質同士との結合についても報告している<sup>29)</sup>。酵母や哺乳類細胞を用いた two-hybrid 法などを用いて N 蛋白質同士が強く結合しており、セリン・アルギニンリッチ領域を削ることでこの結合はなくなったということであるが、N 蛋白質同士との結合の生物学的意義の解明が待たれる。DNA アレイ (DNA チップ) の技術も普及し、今や分子生物学の分野では欠かせない技術になってきている。Wong らは、SARS-CoV の 30kb ものゲノムをシーケンスしなくても変異箇所がわかるようにするシステム (oligonucleotide resequencing array) を考案し実用化を目指している<sup>30)</sup>。

## 6. 新しいヒトのコロナウイルスの発見

SARS-CoV は新たに発見されたコロナウイルスであり、ヒトのコロナウイルスとしては 3 番目に発見されたウイルスである (上述のように他に、OC43 と 229E がある)。今年になって、小児の呼吸器疾患例からヒトのコロナウイルスとして第 4 のウイルス (HCoV-NL63) が分離され Nature Medicine に発表された<sup>31)</sup>。HCoV-NL63 は新しいウイルスを分離するために開発された Virus-Discovery-cDNA-Amplified Restriction Fragment-Length Polymorphism Technique (VIDISCA) 法という方法を用いて同定された。このウイルスはコロナウイルスのグループ 1 に属し (SARS-CoV はグループ 4)、ヒトの冬季における風邪と密接な関係にあるようである。このウイルスによる疾病は SARS-CoV よりもむしろ従来のヒトコロナウイルスに近いと考えられる。ほとんどの哺乳動物・鳥類には固有のコロナウイルスが感染していても不思議ではないので、今後も様々な動物から新しいコロナウイルスが分離されるかもしれない。野生動物の持つコロナウイルスで、ヒトにも感染可能な SARS-CoV のような新しいウイルスが発見されたときは要注意である。

## 7. SARS という社会現象

ここで科学的見地から離れ、SARS の大流行を国際政治学・経済学の立場から論じることにより、もう一度 SARS という社会現象におけるウイルス学の果たす役割を認識してみたい。北海道大学大学院法学研究科で国際政治学を専門とする遠藤乾助教授によれば、「国家が旧来から抱えている相互依存やグローバル化といった問題群が、SARS や鳥インフルエンザなどの国境横断的な感染症を通じて、「安

全保障 (Security)」という国際政治の伝統的な問題群と接合された。そしてそのマネジメントのために、一国 (政府) のすべきことが無限にあったとしても、それだけでは不十分で、世界・地域的な協力的統治体制 (ガバナンス) が必要とされていることが明らかになった。その観点から見ると、今回の SARS 封じ込めにおいて、たとえば WHO が果たした役割とその意義について強い関心をよんでいるのは、不思議なことではない。」と、とらえている。ウイルス学におけるガバナンスは何かについても一度考え直してみたい。

次に、SARS の世界的流行が及ぼした経済的損失について触れてみる。昨年末に開催された「清華大学エイズ・SARS 国際シンポジウム」によると、SARS による世界全体の経済損失額は 590 億ドルに達し、そのうち中国大陸部の受けた損失は 179 億ドルで GDP の 1.3%、香港の損失は 120 億ドルで GDP の 7.6% に達した、と発表された。さらに国際航空運輸協会の発表によると、世界の航空会社の損失はアジアを中心に 100 億ドル規模に達するらしい。上記の数字を見る限りアジアの国々の経済的損失は多大なものである。また、この数字は新興ウイルスの流行の封じ込めを誤ると経済が破綻する国家が現れる可能性もあることを示しており、ウイルス学者もこのような社会的現象を踏まえつつ研究を推進しなければならないと思われる。

## 8. SARS-CoV 研究—今後の展望—

本稿でみてきたように、効果的なワクチン開発は順調に進んでいるようだ (文献<sup>32)</sup>も参照のこと)。一方で、抗ウイルス剤も既知の薬剤のスクリーニングから新規の薬剤の開発へと進んでいる。本稿では紹介できなかったが、疫学的調査により流行時のレトロスペクティブな解析に関する論文も出始めている。そして、2004 年 5 月にはドイツのリュベックにおいて第一回目の SARS に関する国際学会 International Conference on SARS one year after the (first) outbreak が開催された。このように再興に備えて、全世界的規模で SARS-CoV の研究は続けられている。

## 謝 辞

本稿作成にあたり国立感染症研究所ウイルス三部・田口文広博士、同ウイルス一部・福士秀悦博士、北海道大学大学院法学研究科・遠藤乾博士には大変お世話になりました。

## 参考文献

- 1) 水谷哲也 (2001) MHV の転写メカニズム. ウイルス 51, 225-236.
- 2) 田口文広 (2003) SARS コロナウイルス. ウイルス 53, 201-209.
- 3) Yeh, S. H., Wang, H. Y., Tsai, C. Y., Kao, C. L., Yang, J. Y., Liu, H. W., Su, I. J., Tsai, S. F., Chen, D. S., Chen, P. J.,

- and National Taiwan University SARS Research Team. (2004) Characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus genomes in Taiwan : molecular epidemiology and genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 2542–2547.
- 4) Wang, J., Wen, J., Li, J., Yin, J., Zhu, Q., Wang, H., Yang, Y., Qin, E., You, B., Li, W., Li, X., Huang, S., Yang, R., Zhang, X., Yang, L., Zhang, T., Yin, Y., Cui, X., Tang, X., Wang, L., He, B., Ma, L., Lei, T., Zeng, C., Fang, J., Yu, J., Wang, J., Yang, H., West, M. B., Bhatnagar, A., Lu, Y., Xu, N., and Liu, S. (2003) Assessment of immunoreactive synthetic peptides from the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Clin Chem*. **49**, 1989–1996.
  - 5) Lin, Y., Shen, X., Yang, R. F., Li, Y. X., Ji, Y. Y., He, Y. Y., Shi, M. D., Lu, W., Shi, T. L., Wang, J., Wang, H. X., Jiang, H. L., Shen, J. H., Xie, Y. H., Wang, Y., Pei, G., Shen, B. F., Wu, J. R., and Sun, B. (2003) Identification of an epitope of SARS-coronavirus nucleocapsid protein. *Cell Res*. **13**, 141–145.
  - 6) Wu, H. S., Hsieh, Y. C., Su, I. J., Lin, T. H., Chiu, S. C., Hsu, Y. F., Lin, J. H., Wang, M. C., Chen, J. Y., Hsiao, P. W., Chang, G. D., Wang, A. H., Ting, H. W., Chou, C. M., and Huang, C. J. (2004) Early detection of antibodies against various structural proteins of the SARS-associated coronavirus in SARS patients. *J Biomed Sci*. **11**, 117–126.
  - 7) Martina, B. E., Haagmans, B. L., Kuiken, T., Fouchier, R. A., Rimmelzwaan, G. F., Van Amerongen, G., Peiris, J. S., Lim, W., and Osterhaus, A. D. (2003) Virology : SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature*. **425**, 915.
  - 8) Subbarao, K., McAuliffe, J., Vogel, L., Fahle, G., Fischer S., Tatti, K., Packard, M., Shieh, W. J., Zaki, S., and Murphy, B. (2004) Prior infection and passive transfer of neutralizing antibody prevent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the respiratory tract of mice. *J Virol*. **78**, 3572–3577.
  - 9) Yang, Z. Y., Kong, W. P., Huang, Y., Roberts, A., Murphy, B. R., Subbarao, K., and Nabel, G. J. (2004) A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature*. **428**, 561–564.
  - 10) Zhao, P., Ke, J. S., Qin, Z. L., Ren, H., Zhao, L. J., Yu, J. G., Gao, J., Zhu, S. Y., and Qi, Z. T. (2004) DNA vaccine of SARS-Cov S gene induces antibody response in mice. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. **36**, 37–41.
  - 11) Gao, W., Tamin, A., Soloff, A., D' Aiuto, L., Nwanegbo, E., Robbins, P. D., Bellini, W. J., Barratt-Boyes, S., and Gambotto, A. (2003) Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet*. **362**, 1895–1896.
  - 12) Sui, J., Li, W., Murakami, A., Tamin, A., Matthews, L. J., Wong, S. K., Moore, M. J., Tallarico, A. S., Olurinde, M., Choe, H., Anderson, L. J., Bellini, W. J., Farzan, M., and Marasco, W. A. (2004) Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 2536–2541.
  - 13) Kim, T. W., Lee, J. H., Hung, C. F., Peng, S., Roden, R., Wang, M. C., Viscidi, R., Tsai, Y. C., He, L., Chen, P. J., Boyd, D. A., and Wu, T. C. (2004) Generation and Characterization of DNA Vaccines Targeting the Nucleocapsid Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol*. **78**, 4638–4645.
  - 14) Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., and Doerr, H. W. (2003) Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet*. **361**, 2045–2046.
  - 15) Haagmans, B. L., Kuiken, T., Martina, B. E., Fouchier, R. A., Rimmelzwaan, G. F., van Amerongen, G., van Riel, D., de Jong, T., Itamura, S., Chan, K. H., Tashiro, M., Osterhaus, A. D. (2004) Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nat Med*. **10**, 290–293.
  - 16) Stroher, U., DiCaro, A., Li, Y., Strong, J. E., Aoki, F., Plummer, F., Jones, S. M., and Feldmann, H. (2004) Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Is Inhibited by Interferon-alpha. *J Infect Dis*. **189**, 1164–1167.
  - 17) Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R., and Hilgenfeld, R. (2003) Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure : basis for design of anti-SARS drugs. *Science*. **300**, 1763–1767.
  - 18) Liu, S., Xiao, G., Chen, Y., He, Y., Niu, J., Escalante, C. R., Xiong, H., Farmar, J., Debnath, A. K., Tienm P., and Jiang, S. (2004) Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus : implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet*. **363**, 938–947.
  - 19) Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. **426**, 450–454.
  - 20) Wong, S. K., Li, W., Moore, M. J., Choe, H., and Farzan, M. (2004) A193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*. **279**, 3197–3201.
  - 21) Mizutani, T., Hayashi, M., Maeda, A., Sasaki, N., Yamashita, T., Kasai, N., and Namioka, S. (1993) Inhibition of mouse hepatitis virus multiplication by antisense oligonucleotide, antisense RNA, sense RNA and ribozyme. *Adv Exp Med Biol*. **342**, 129–135.
  - 22) Zhang, Y., Li, T., Fu, L., Yu, C., Li, Y., Xu, X., Wang, Y., Ning, H., Zhang, S., Chen, W., Babiuk, L. A., and Chang, Z. (2004) Silencing SARS-CoV Spike protein expression in cultured cells by RNA interference. *FEBS Lett*. **560**, 141–146.
  - 23) 栄研化学のホームページ中にある「ゲノムサイト SARS 検査製品」のウェブサイト <http://loopamp.eiken.co.jp/>
  - 24) Lau, L. T., Fung, Y. W., Wong, F. P., Lin, S. S., Wang, C. R., Li, H. L., Dillon, N., Collins, R. A., Tam, J. S., Chan, P. K., Wang, C. G., and Yu, A. C. (2003) A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification. *Biochem Biophys Res Commun*. **312**, 1290–1296.



- 25) Jiang, S. S., Chen, T. C., Yang, J. Y., Hsiung, C. A., Su, I. J., Liu, Y. L., Chen, P. C. and Juang, J. L. (2003) Sensitive and quantitative detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection by real-time nested polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* **38**, 293–296.
- 26) Shi, Y., Yi, Y., Li, P., Kuang, T., Li, L., Dong, M., Ma, Q., and Cao, C. (2003) Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) by detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* **41**, 5781–5782.
- 27) Mizutani, T., Fukushi, S., Kurane, I., Saijo, M., and Morikawa, S. Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 **319**, 1228–1234.
- 28) He, R., Leeson, A., Andonov, A., Li, Y., Bastien, N., Cao, J., Osiowy, C., Dobie, F., Cutts, T., Ballantine, M., and Li, X. (2003) Activation of AP-1 signal transduction pathway by SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**, 870–876.
- 29) He, R., Dobie, F., Ballantine, M., Leeson, A., Li, Y., Bastien, N., Cutts, T., Andonov, A., Cao, J., Booth, T. F., Plummer, F. A., Tyler, S., Baker, L., and Li, X. (2004) Analysis of multimerization of the SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **316**, 476–483.
- 30) Wong, C. W., Albert, T. J., Vega, V. B., Norton, J. E., Cutler, D. J., Richmond, T. A., Stanton, L. W., Liu, E. T., and Miller, L. D. (2004) Tracking the evolution of the SARS coronavirus using high-throughput, high-density resequencing arrays. *Genome Res.* **14**, 398–405.
- 31) Van Der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-Van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., and Berkhout, B. (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat Med.* **10**, 368–373.
- 32) 水谷哲也, 田口文広 (2004) SARS ウイルスのワクチン. 「からだの科学」増刊・新興再興感染症 SARS の教訓 (日本評論社) pp21–27.
- 33) Mizutani T, Repass JF, Makino S. (2000) Nascent synthesis of leader sequence-containing subgenomic mRNAs in coronavirus genome-length replicative intermediate RNA. *Virology.* **275**, 238–243.

## Current topics of SARS coronavirus

**Tetsuya Mizutani**

Virology 1

Gakuen 4-7-1, Musashimurayama-city, Tokyo 208-0011, Japan

E-mail : tmizutan@nih.go.jp

The serious respiratory disease, SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), outbreaking in winter of 2003 to 2004 remained in a sporadic patient's generating at this winter. However, there is also a possibility that wild animals as the source of infection may not be specified and that it may be much in fashion again. The paper regarding SARS and SARS-CoV is published at one per day now which has passed since fashion of SARS in one or so year. There are many papers which the researchers of other viruses enter into the research field of SARS-CoV using their own technology in addition to the researchers of coronavirus. Topics of the research on the present SARS-research field are development of vaccine, inspecting of medicine and establishment of diagnostic method. Here, the newest information is offered about these researches.