

## 4. トガウイルスのウイルス学

森 嘉生, 大槻 紀之, 坂田 真史, 岡本 貴世子

国立感染症研究所 ウイルス第三部

トガウイルス科は、アルファウイルス属とルビウイルス属が存在し、医学・獣医学・公衆衛生学的に重要なウイルスが多く属している。アルファウイルス属には29種のウイルスが報告されており、そのほとんどがアルボウイルスである。その一種であるチクングニアウイルスは2004年にケニアで流行が始まり、現在ではインド洋諸島、南～東南アジアおよびヨーロッパの一部にまで流行が拡大している。一方、ルビウイルス属の唯一のウイルスである風疹ウイルスは、風疹および先天性風疹症候群（CRS）の病原体である。風疹ウイルスの自然宿主はヒトのみであり、効果の高い弱毒生ワクチンが存在することから、全世界で麻疹とともに排除に向けた動きが進められている。

### <はじめに>

トガウイルス科 (Family *Togaviridae*) ウイルスは、直径約70nmのエンベロープを持つ正二十面体ウイルスであり、プラス一本鎖のRNAをゲノムとして保有する。このウイルス科はさらに、アルファウイルス属 (Genus *Alphavirus*) とルビウイルス属 (Genus *Rubivirus*) の二つのウイルス属に分類される。アルファウイルス属には少なくとも29種のウイルスが存在するが、ルビウイルス属には風疹ウイルスのみが分類されている。両者はゲノム構造等に共通性を持つもの (図1)、生活環や病原性などは全く異なっている。アルファウイルス属ウイルス (以降アルファウイルスと呼ぶ) の多くは節足動物媒介性のアルボウイルスであり、ヒトや動物に脳炎、関節炎、発疹、発熱等を引き起こす。一方、風疹ウイルスの自然宿主はヒトのみであり、飛沫感染によって伝播し、比較的軽度な発熱発疹性疾患を引き起こす。しかし、妊娠初期の女性に感染した場合、出生児に重大な先天性障害を引き起こす。

アルファウイルス属の代表的なウイルスであるシンドビ

スウイルス (SINV) やセムリキフォレストウイルス (SFV) は、培養細胞での増殖性が非常に高く、かつヒトに対しては病原性が高くないという点で、基礎研究を行うのに優れている。そのため、主にこれらのウイルスを用いたウイルス学的研究の進展がめざましい。一方、風疹ウイルスは培養細胞での増殖性の遅さ等からアルファウイルスと比べて取り扱いに難があり、基礎研究の進展は遅れている。ここではトガウイルスのウイルス学として、主にアルファウイルスの増殖サイクルに基づく知見と、近年のチクングニア熱の流行拡大について紹介する。加えて風疹ウイルスについてはアルファウイルスとの相違と、ワクチン株の性状について簡単に解説する。

### <アルファウイルス>

アルファウイルスの多くは哺乳類および鳥類が主な自然宿主であり、蚊によって媒介されることが多いことから、熱帯～亜熱帯を中心に分布している。一方でシラミを媒介動物とする南極のゾウアザラシのウイルス<sup>1)</sup>や、サケ科魚類を自然宿主とするウイルスも存在する<sup>2)</sup>。このように高い適応能力を持って様々な宿主や自然環境に適応進化してきたことが伺える。

アルファウイルスはその分布地域から「旧世界」アルファウイルスと「新世界」アルファウイルスに大別される。旧世界ウイルスにはSINV, SFV, チクングニアウイルス (CHIKV) などが存在し、発熱、関節炎、発疹などの症状を引き起こすことが多い。一方、新世界ウイルスには西部ウマ脳炎ウイルス (WEEV)、東部ウマ脳炎ウイルス (EEEV)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) 等が存

### 連絡先

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園4-7-1

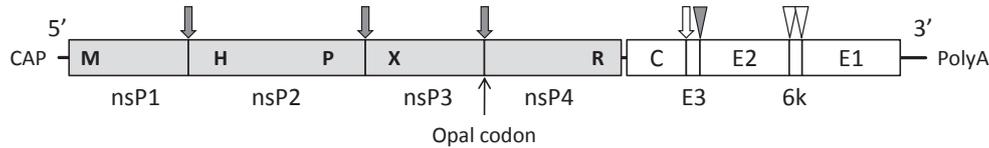
国立感染症研究所 ウイルス第三部

TEL: 042-561-0771

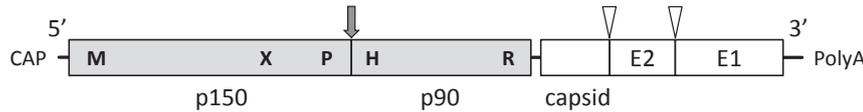
FAX: 042-561-1960

E-mail: yoshiom@nih.go.jp

## アルファウイルス属



## ルビウイルス属(風疹ウイルス)



<b>機能モチーフ</b> M:メチルトランスフェラーゼ H:ヘリカーゼ P:プロテアーゼ X:Macroドメイン(Xドメイン) R:RNA依存性RNAポリメラーゼ	<b>切断部位</b> ↓:ウイルスプロテアーゼ    ▽:Furin ↓:C蛋白質プロテアーゼ    ▽:シグナルペプチダーゼ
---	--

図1 アルファウイルスとルビウイルス(風疹ウイルス)のゲノム構造

在し、脳炎を引き起こすことが多いのが特徴である。他の分類方法として、血清群による分類があり、現在、SF, WEE, EEE, VEE, Barmah Forest, Middelburg および Ndumu 血清群の7つが認められている。WEE 血清群には「旧世界」アルファウイルスと「新世界」アルファウイルスの両方が存在しており、数千年前に両者の先祖ウイルスでゲノムの組換えが起きたことが示唆されている<sup>3)</sup>。

アルファウイルスのゲノムは、キャップ構造およびポリA構造をそれぞれ5'末端および3'末端に持つプラス一本鎖のRNAであり、SINVの場合ゲノム長は約11.7kbpである(図1)。ゲノムの5'側にはゲノム複製を司る非構造蛋白質が、3'側にはウイルス粒子を構成する構造蛋白質がそれぞれ前駆体蛋白質としてコードされている。ゲノムRNAからは非構造蛋白質が翻訳される。一方、構造蛋白質はジャンクションUTR(非構造蛋白質と構造蛋白質コード領域間)に存在するサブゲノムプロモーターより転写されたサブゲノムから翻訳される。非構造蛋白質の前駆体はnsP1～nsP4の順に並んでいるがnsP3の末端にはopal終止コドン(UGA)が存在する。しかし、5～20%の効率で終止コドンのリードスルーが起きることで、同一のコード領域からP123(nsP1～3のポリプロテイン)とP1234(nsP1～4のポリプロテイン)の二種類の前駆体が翻訳される。前駆体蛋白質はパパイン様セリンプロテアーゼ活性を持つnsP2によってプロセスされて個々の非構造蛋白質になる。nsP1はメチルトランスフェラーゼ活性があり、ゲノムのcap構造の付加に働くと考えられる。nsP2はプロテアーゼ活性の他にRNAヘリカーゼ活性がある。nsP3はADP-リボース結合能があるMacroドメインを保有してい

るがその生物学的な意義は十分に分かっていない。Macroドメインは細菌から脊椎動物まで広く保存されたドメイン構造であり<sup>4)</sup>、ウイルスではアルファウイルスの他、コロナウイルス、E型肝炎ウイルス、風疹ウイルス等のプラス鎖RNAウイルスで見ついている<sup>5,6)</sup>。nsP4はRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を持つ。nsP1～nsP4は複製複合体を形成してゲノム転写・複製に働く。

構造蛋白質はC-PE2-6K-E1の順に並んでいる。C蛋白質は自身のプロテアーゼ活性によりC-PE2間を切断する。フリーになったC蛋白質はゲノムRNAと結合し、ヌcleoキャプシドを形成する。PE2蛋白質およびE1蛋白質はシグナルペプチダーゼによってプロセスされてヘテロダイマーを形成する。PE2蛋白質はさらにfurinの切断を受けて、E2蛋白質へと成熟する。E2蛋白質はレセプター結合能を、E1蛋白質は膜融合能をそれぞれ保有し、ウイルスの細胞侵入に働く。E1蛋白質はフラビウイルスのE蛋白質と同じクラス2の融合蛋白質であり、立体構造上、両者は非常に良く類似している<sup>7,8)</sup>。

### <アルファウイルスの侵入>

アルファウイルスは脊椎動物と無脊椎動物のどちらにも感染できなくてはいけないため、用いるレセプター分子は広く保存された分子を用いるか、もしくは複数のレセプター分子を感染する細胞によって使い分けている(あるいはその両方)ものと考えられている。SINVではその両方が当てはまるようである。SINVのレセプターとしては多くの生物種に広く保存されたLaminin receptor<sup>9)</sup>やNatural resistance-associated macrophage protein

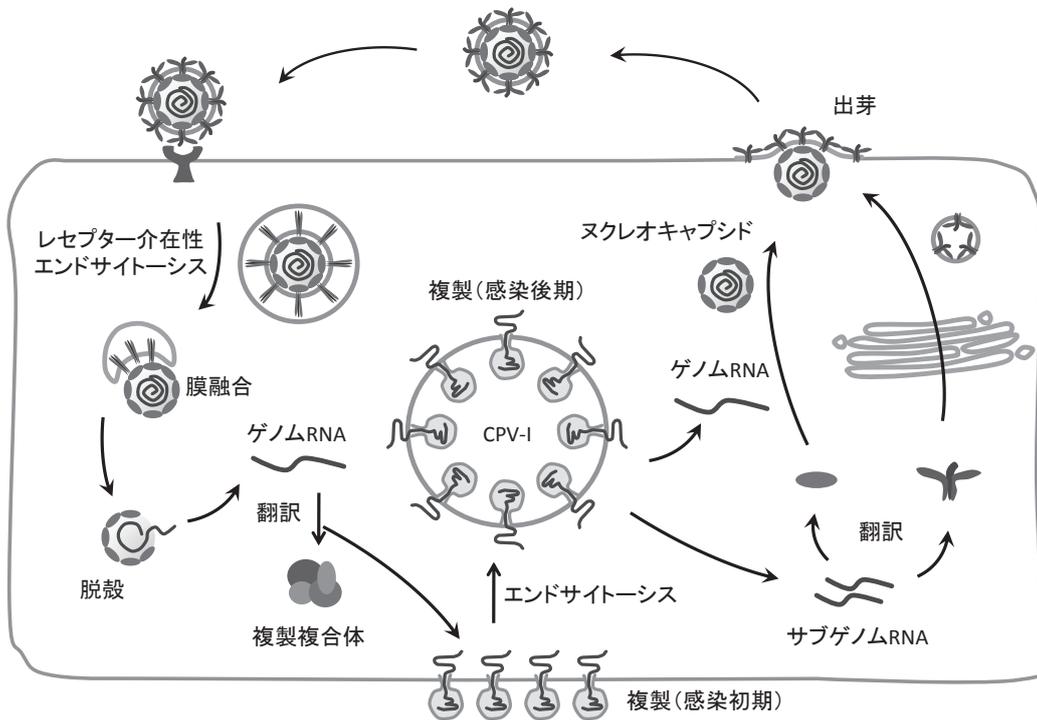


図2 アルファウイルスの増殖サイクル

(NRAMP)<sup>10</sup>が挙げられる。同じアルファウイルスであっても Ross River virus は NRAMP を利用することが出来ない。また, heparan sulfate (HS) も SINV の細胞表面への結合に重要であり<sup>11, 12</sup>, 培養細胞への馴化過程に E2 蛋白質に HS 結合性が高まる変異が導入されることが報告されている<sup>12</sup>。しかし, 高 HS 結合ウイルスは, 脳内接種をした場合に中枢神経系での増殖性は向上するが, 逆に末梢接種時には弱毒化する<sup>13</sup>。これは末梢接種時には HS 結合性の高いウイルスはクリアランスされやすいことに起因していると考えられる<sup>14</sup>。

細胞内への侵入はクラスリン依存性エンドサイトーシスを介して行われる<sup>15</sup>(図2)。エンドソーム内の低 pH により, E2-E1 ヘテロダイマーのリアレンジメントが起き, E1 蛋白質の fusion ペプチドが露出するようになって細胞膜との膜融合が起きると考えられている<sup>16, 17</sup>。細胞質に放出されたヌクレオキャプシドはリボゾームとの結合により粒子構造が緩み, 脱殻する<sup>18</sup>。

#### <アルファウイルスのゲノム複製>

アルファウイルス感染細胞では, プラス鎖ゲノム RNA, マイナス鎖相補 RNA およびプラス鎖サブゲノム RNA の三種の RNA が合成される。これら RNA 合成の順序は複製複合体を形成する非構造蛋白質の切断によって制御されていることが知られている。ゲノム複製はまずマイナス鎖 RNA の合成から始まるが, これには nsP3-nsP4 間切断

された P123 と nsP4 が必要とされる<sup>19</sup>。非構造蛋白質が蓄積されてくると, さらに nsP1-nsP2 および nsP2-nsP3 間切断される。これによりおそらく複製複合体の構造変化が起きてプラス鎖のゲノム RNA およびサブゲノム RNA の合成に転換すると考えられている<sup>20</sup>。しかし nsP1-nsP2 および nsP2-nsP3 間の切断は昆虫細胞での増殖に必須であるが哺乳動物細胞では必ずしも必須ではないことから, 宿主因子との相互作用が関係するのかもしれない<sup>21</sup>。

全てのプラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製は細胞内の脂質膜上で起き, 多くの場合, 膜の形態や構成の変化を伴う。アルファウイルスの場合, 細胞質側から内腔に向かって約 50nm の小球型の陥入が数多く存在する空胞型構造体でゲノム複製が行われている<sup>22</sup>(図2)。この構造体は cytopathic vacuole type-I (CPV-I) と呼ばれ, 後期エンドソームもしくはライソソームのマーカを保有することが示されている<sup>23</sup>。陥入した小胞は細胞質とつながる孔があり, 孔付近に複製複合体が局在する<sup>23</sup>。また, 小胞内にはゲノム複製の中間体である二本鎖 RNA が存在し, 宿主の二本鎖 RNA 認識機構から物理的に隔離されているものと考えられている。小胞で新規合成された RNA は細胞質に放出され蛋白質翻訳や子孫ウイルスのゲノムとして働く。近年までこの CPV-I がどのように形成されるのか(エンドソーム/ライソソームから直接形成されるのか?)は明らかでなかった。

SFV や SINV は培養細胞内での増殖性が非常に良く,

高 MOI で感染させた場合には感染 8 時間程度で子孫ウイルス産生がプラトーに達する。感染の初期 (2 時間後) にゲノム複製複合体を観察すると主に形質膜にその局在が認められることが明らかとなった<sup>24-26)</sup>。電子顕微鏡観察では細胞の外側に無数の小胞が飛び出している像が観察される<sup>25, 26)</sup>。しかし感染 4 時間後になると形質膜に存在する複製複合体や dsRNA はほとんど細胞内に取り込まれ、最終的に CPV-I が形成されるようになる。PI3K やアクチンのモーター蛋白質であるミオシン II の阻害剤により形質膜からのゲノム複製小胞の細胞内移行が抑えられることからエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていると考えられる<sup>25)</sup>。さらに CPV-I 形成には微小管を介したゲノム複製小胞の移動が重要であることも示唆されている<sup>25)</sup>。これまで CPV-I のみがゲノム複製の場であると考えられてきたのは、このような極めて感染初期にこのようなダイナミックな動きがあることを想定していなかったものと考えられる。また、我々は風疹ウイルスのゲノム複製も形質膜で起きることを明らかにしており (論文投稿準備中)、トガウイルス科ウイルスに共通した特徴であると考えている。

#### <アルファウイルスの出芽>

C 蛋白質の C 末端領域はプロテアーゼとして機能する他にもヌクレオキャプシドの殻の構築に働く<sup>27)</sup>。一方、N 末端領域は coiled-coil ドメインと RNA 結合部位が存在し、ヌクレオキャプシドの内腔で粒子の安定化と RNA パッケージングに機能すると考えられている<sup>28, 29)</sup>。ゲノム RNA のパッケージングシグナルは SIN<sub>V</sub>, VEEV, EEEV では nsP1 コード領域に存在するステムループのクラスターであるが、SFV 血清群のウイルスでは nsP2 コード領域に存在する<sup>30)</sup>。いずれの場合でもゲノム RNA のみに存在し、サブゲノム RNA には存在しないことから、ゲノム RNA に特異的なパッケージングが説明される。ヌクレオキャプシド粒子の形成は、細胞質内で C 蛋白質と RNA の会合後、速やかに行われると考えられる。ヌクレオキャプシド粒子は 240 コピーの C 蛋白質から構成され、T=4 の正二十面体構造を示す<sup>27)</sup>。

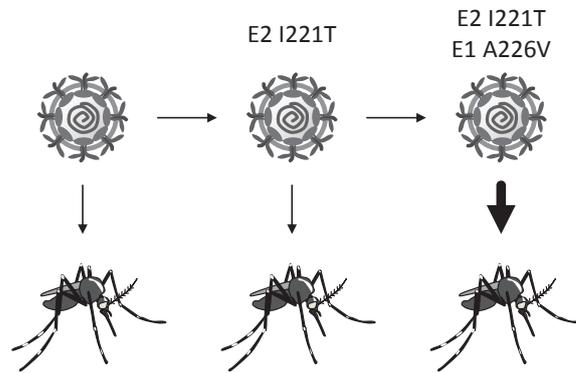
PE2 蛋白質 (E3-E2 ポリプロテイン) と E1 蛋白質はヘテロダイマーを形成し、細胞の分泌経路に沿って形質膜へ移行する<sup>31, 32)</sup>。E3 蛋白質の切断は E1 蛋白質が膜融合能を発揮するのに必須であり、形質膜に到達する前に宿主プロテアーゼ furin によって行われる<sup>33, 34)</sup>。E2E1 蛋白質のみでは出芽は起きず、形質膜で E2 蛋白質の細胞質部位が C 蛋白質と 1:1 の関係で結合することでウイルス粒子が出芽する<sup>35, 36)</sup>。E2-E1 ヘテロダイマーは規則正しく配置され、ヌクレオキャプシド粒子と同様に T=4 の正二十面体構造を形成する。ウイルス粒子上には E2-E1 ヘテロダイマーのトリマーによって 80 個のスパイクが形作られる<sup>37)</sup>。

#### <チクングニア熱の大流行はなぜ起こったのか?>

近年、チクングニア熱の流行が世界的な問題となっている。チクングニア熱の病原ウイルスである CHIKV は、SFV 血清群アルファウイルスのひとつであり、1953 年にタンザニアで始めて分離された。「チクングニア」とはアフリカのマコンデ語で“to become contorted” (体をゆがめる) という意味であり、患者は全身の激しい関節痛で体をゆがめてしまうことに由来する。チクングニア熱はアフリカ、インド洋諸国、南～東南アジアの地方病と考えられ世界的にはあまり重要視されてこなかった。しかし 2004 年にケニアで始まった流行はインド洋南西諸島を経由して、現在では東南アジア諸国まで流行が拡大してきており、再興感染症として一躍注目を浴びるようになった<sup>38)</sup>。特にインド洋のレユニオン島では、2005～2006 年の流行で総人口 78 万人のうち、約 30 万人の患者が発生し、237 人が死亡するという未曾有の大流行を引き起こした<sup>38, 39)</sup>。またインドでは 2006～2007 年の流行で 140 万人の患者が発生したとされている<sup>39)</sup>。さらにヨーロッパ諸国では 2007 年にはイタリア、2010 年にはフランスでチクングニア熱の国内流行が報告された<sup>40, 41)</sup>。日本においては流行国からの帰国者の感染症例が報告されている<sup>42)</sup>。ではなぜこのようにチクングニア熱が再興し、世界的な流行を引き起こしたのであろうか?

CHIKV はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) が主な媒介蚊であるとされてきたが、近年の流行拡大においては、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) が媒介の主体となったことが原因の一つにあげられる。ヒトスジシマカは元々東南アジア原産の蚊であったが、ネッタイシマカよりも亜熱帯～温帯に適応出来ることもあり、世界的な物流の移動に伴って現在ではヨーロッパやアメリカ合衆国まで分布が拡大してきている。日本においても 1946-1948 年には栃木県北部が分布北限であったが、現在では秋田県および岩手県まで生息域が拡大している<sup>43)</sup>。さらにいくつかの地域ではネッタイシマカからヒトスジシマカに置き換わっていることが報告されている。今回の流行では、増幅動物の介在無しにヒト-ヒトスジシマカ-ヒトによる感染環が成立していることが示されている<sup>44)</sup>。

また、ウイルス側にも流行の原因があるようである (図 3)。レユニオン島での流行初期と後期のウイルス株の遺伝子配列比較を行うと、流行の拡大とともに E1 蛋白質の Ala226 が Val へ変異したことが明らかとなっている<sup>45)</sup>。古典的な CHIKV ではこの変異は見つかっていないが、これ以降の各地での流行株ではこの変異が維持されている<sup>40, 41, 46)</sup>。この E1 蛋白質の A226V 変異は、ヒトスジシマカの中腸への感染性を向上させ、結果として唾液腺への移行および動物への伝播の効率を高める<sup>44, 47)</sup>。一方でネッタイシマカに対してはこのような効果は認められない。E1 蛋白質



- ・ ヒトスジシマカへの感染性向上
- ・ 感染のコレステロール依存性の変化
- ・ 膜融合の至適pHの変化

### 図3 2005年以降のCHIKV流行株に認められるヒトスジシマカへの適応変異

E1 A226V(および E2 I221T)変異が生じることで、ヒトスジシマカへの感染性が向上する。この変異は感染増殖のコレステロール依存性および膜融合の至適 pH 変化などの表現系に変化が認められるが、ヒトスジシマカへの感染性と関係があるかは明らかでない。

の立体構造上、226位のアミノ酸は fusion ループに近接したループの先端に局在しており<sup>45)</sup>、同じ SFV 血清群に属する SFV での研究においては、226位のアミノ酸変異が膜融合のコレステロール依存性を変化させることが報告されている<sup>48)</sup>。実際、CHIKV の E1 蛋白質 226A ウイルスはウイルス増殖のコレステロール依存性がほとんどないが、226V ウイルスはコレステロール依存性が非常に高いことが分かっている<sup>47, 49)</sup>。また A226V 変異は膜融合の至適 pH にも影響を及ぼす<sup>49)</sup>。しかし、これらのコレステロール依存性および膜融合至適 pH の変化は必ずしもヒトスジシマカへの感染性亢進と結びつかないことが示されており<sup>49)</sup>、ヒトスジシマカへの適応がどのようなメカニズムで生じているか不明である。

さらに E1 蛋白質 A226V 変異がヒトスジシマカへの感染性亢進を示すには E2 蛋白質 I211T 変異が同時に存在することが必須である<sup>50)</sup>。系統樹解析により今回の流行株にはあらかじめ E2 蛋白質 I211T 変異が入った後、さらに E1 蛋白質 A226V 変異が入ったことが示唆されている<sup>50)</sup>。立体構造上 E2 蛋白質 211 位のアミノ酸は、ウイルス粒子の最も外側に位置するドメイン B に存在する<sup>37)</sup>。様々なアルファウイルスで、ドメイン B への変異が起きることで中和抗体のエスケープ変異体が生じることが知られており<sup>51)</sup>、E2 蛋白質 I211T 変異は細胞侵入効率に影響する可能性が示唆される。

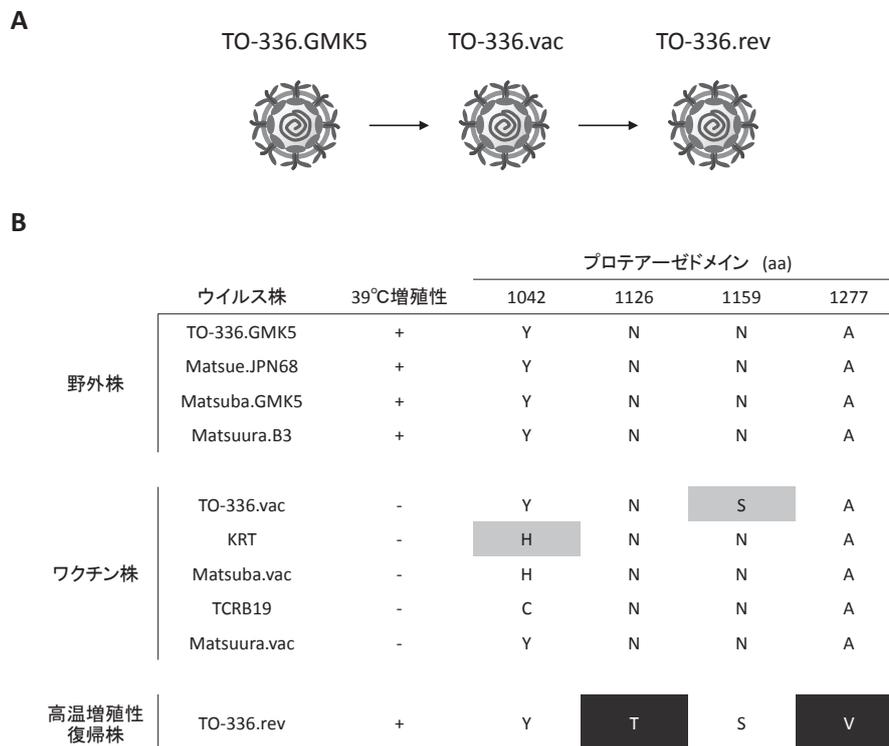
以上のことから、近年の CHIKV 流行株はエンベロップ蛋白質の変異によってヒトスジシマカにより良く適応できるようになり、世界的な流行を引き起こしたものと考えられる。

### <風疹ウイルス>

風疹ウイルスのゲノムは非構造蛋白質の機能モチーフを除いてほとんどアルファウイルスのゲノムとホモロジーがなく、加えてゲノムサイズも約 2kbp 短くなっている(図1)。また、SINV ゲノムの GC 含量は約 50% であるのに対し、風疹ウイルスゲノムのそれは約 70% と非常に高く、現在知られている RNA ウイルスでは最も高い値となっている。高 GC 含量は RNA 構造を安定化し、転写複製効率を低くすると考えられる。また、コドン出現頻度もヒトと異なっている。これらのことが、アルファウイルスとは対照的に、風疹ウイルスが培養細胞での増殖性が非常に緩やかで細胞傷害性も低いことの原因の一つとなっているのかもしれない。風疹ウイルスの細胞内での増殖サイクルの概要はアルファウイルスと同様である(図2)が、風疹ウイルスのエンベロップ蛋白質(E2 および E1) はゴルジ体に留まり、ここで出芽が行われる点が大きく異なる<sup>52)</sup>。

### <風疹ワクチンの性状>

風疹は小児を中心に罹患する発疹、発熱、頸部リンパ節腫脹を主徴とする比較的軽度な感染症であるが、成人が感染した場合には症状が重くなりやすく、関節炎を伴うことがある。風疹で深刻な問題となるのは、妊娠初期の女性に感染した場合、出生児に難聴、白内障、先天性心疾患等の先天性風疹症候群(CRS)を引き起こすことにある。風疹および CRS の特異的な治療法はなく、ワクチンによる予防が最も重要である。世界保健機関(WHO)では風疹および CRS の排除(elimination; 土着のウイルスによる流行がない状態)を目的に風疹含有ワクチンの接種導入するよ



**図4 風疹ウイルスワクチン株の温度感受性に関連するアミノ酸変異**

A. TO-336 ワクチン株 (TO-336.vac) および TO-336 高温増殖性復帰株 (TO-336.rev) の樹立暦. TO-336.rev は TO-336.vac を 39°C で馴化させることで得られた.

B. 温度感受性に関連したプロテアーゼドメインのアミノ酸変異

淡グレーで示したアミノ酸変異は、プロテアーゼドメインの熱安定性が失われるアミノ酸変異. 逆に濃グレーで示したアミノ酸変異は、熱安定性が復帰する.

うに各国に勧告している<sup>53)</sup>. WHO 汎アメリカ地域およびヨーロッパ地域はそれぞれ 2010 年および 2015 年を風疹および CRS 排除の目標年と定めている. 日本が属するアジア西太平洋地域では未だワクチンを導入していない国もあることから、まずは 2015 年までに風疹のコントロール (人口 100 万対 10 人未満) と CRS の予防 (出生数 100 万対 10 人未満) を目標としている.

風疹ワクチンは弱毒生ワクチンであり、患者分離株を様々な培養細胞で長期間継代することで得られた弱毒株が利用されている. 現在までに 9 つのワクチン株が樹立され、日本ではそのうち 5 株 (TO-336 株、松浦株、KRT 株、松葉株および TCRB19 株) が樹立され承認を受けている<sup>54)</sup>. 多くのワクチン株は開発過程において低温培養への馴化が行われており、温度感受性を持っている. 日本のワクチン株はいずれも 35°C での培養では良く増殖するが、39°C ではほとんど増殖できない<sup>55, 56)</sup> (図 4). 風疹ウイルスの自然宿主はヒトのみであり、病原性を再現できる実験動物が存在しないことから、培養細胞での増殖における温度感受性と弱毒化の関係は明らかでない. しかし、他のウイルス

ではその関係性が証明されており<sup>57)</sup>, 風疹ウイルスでも関係があるものと考えられている. 野外株と KRT ワクチン株の比較により、温度感受性は p150 のプロテアーゼドメインに存在する Y1042H の単独のアミノ酸変異によって決定されることが明らかとなっている<sup>55)</sup> (図 4). 同一部位のアミノ酸変異は、松葉株 (His) および TCRB19 株 (Cys) でも見つかっており同様のメカニズムで温度感受性を獲得したことが示唆される<sup>56)</sup>. しかし、TO-336 株および松浦株では同一の部位に親株との変異は認められない. KRT 株および TO-336 株のプロテアーゼドメインをそれぞれ培養細胞内で発現させたとき、いずれも 39°C では非常に安定性が低い<sup>56)</sup>. KRT 株プロテアーゼドメインの熱安定性に関与するのは His1042 でありウイルス増殖の温度感受性と相関性が認められる. TO-336 株プロテアーゼドメインにおいては Ser1159 が決定基であり<sup>56)</sup>, この変異を野外株に導入すると温度感受性を獲得する<sup>58)</sup>. また TO-336 株を高温で培養して生じた高温増殖性復帰株は Ser1159 に復帰変異は認められなかったが、プロテアーゼドメインの別の部位に 2 カ所の変異が入ることで熱安定性を獲得してい

た<sup>56)</sup>。これらのことから、ワクチン株の温度感受性獲得機構の一つには、プロテアーゼドメインの熱安定性の減少(不安定化)があるものと考えられる。

#### <おわりに>

アルファウイルスに対する動物用不活化ワクチンはいくつかのウイルスに対して実用化されており効果を上げているが、ヒト用ワクチンは海外の特殊な例を除き、現在のところ実用化されていない<sup>59)</sup>。日本においてもチクングニア熱が侵入してくる可能性が否定できないため、早急な対策が必要であると考えられる。一方で風疹ウイルスは非常に安全で効果の高いワクチンがあるものの、病原性発現機構などまだまだ不明なことが多い。特にCRSがいかにして引き起こされるかを明らかにすることは重要な課題の一つであると考えられる。

#### <参考文献>

- 1) La Linn M, Gardner J, Warrilow D, Darnell GA, McMahon CR, Field I, Hyatt AD, Slade RW and Suhrbier A. Arbovirus of marine mammals: a new alphavirus isolated from the elephant seal louse, *Lepidophthirus macrorhini*. *J Virol* 75: 4103-4109, 2001.
- 2) Weston JH, Welsh MD, McLoughlin MF and Todd D. Salmon pancreas disease virus, an alphavirus infecting farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Virology* 256: 188-195, 1999.
- 3) Weaver SC, Kang W, Shirako Y, Rumenapf T, Strauss EG and Strauss JH. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J Virol* 71: 613-623, 1997.
- 4) Karras GI, Kustatscher G, Buhecha HR, Allen MD, Pugieux C, Sait F, Bycroft M and Ladurner AG. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *Embo J* 24: 1911-1920, 2005.
- 5) Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR and Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8259-8263, 1992.
- 6) Egloff MP, Malet H, Putics A, Heinonen M, Dutartre H, Frangeul A, Guez A, Campanacci V, Cambillau C, Ziebuhr J, Ahola T and Canard B. Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J Virol* 80: 8493-8502, 2006.
- 7) Lescar J, Roussel A, Wien MW, Navaza J, Fuller SD, Wengler G, Wengler G and Rey FA. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105: 137-148, 2001.
- 8) Pletnev SV, Zhang W, Mukhopadhyay S, Fisher BR, Hernandez R, Brown DT, Baker TS, Rossmann MG and Kuhn RJ. Locations of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that E1 forms an icosahedral scaffold. *Cell* 105: 127-136, 2001.
- 9) Wang KS, Kuhn RJ, Strauss EG, Ou S and Strauss JH. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J Virol* 66: 4992-5001, 1992.
- 10) Rose PP, Hanna SL, Spiridigliozzi A, Wannissorn N, Beiting DP, Ross SR, Hardy RW, Bambina SA, Heise MT and Cherry S. Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for sindbis virus in both insect and mammalian hosts. *Cell Host Microbe* 10: 97-104, 2011.
- 11) Byrnes AP and Griffin DE. Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72: 7349-7356, 1998.
- 12) Klimstra WB, Ryman KD and Johnston RE. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J Virol* 72: 7357-7366, 1998.
- 13) Ryman KD, Gardner CL, Burke CW, Meier KC, Thompson JM and Klimstra WB. Heparan sulfate binding can contribute to the neurovirulence of neuroadapted and nonneuroadapted Sindbis viruses. *J Virol* 81: 3563-3573, 2007.
- 14) Byrnes AP and Griffin DE. Large-plaque mutants of Sindbis virus show reduced binding to heparan sulfate, heightened viremia, and slower clearance from the circulation. *J Virol* 74: 644-651, 2000.
- 15) DeTulleo L and Kirchhausen T. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *Embo J* 17: 4585-4593, 1998.
- 16) Wahlberg JM and Garoff H. Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *J Cell Biol* 116: 339-348, 1992.
- 17) Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ and Rossmann MG. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature* 468: 705-708, 2010.
- 18) Singh I and Helenius A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J Virol* 66: 7049-7058, 1992.
- 19) Shirako Y and Strauss JH. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J Virol* 68: 1874-1885, 1994.
- 20) Lemm JA, Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH and Rice CM. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *Embo J* 13: 2925-2934, 1994.
- 21) Gorchakov R, Frolova E, Sawicki S, Atasheva S, Sawicki D and Frolov I. A new role for ns polyprotein cleavage in Sindbis virus replication. *J Virol* 82: 6218-6231, 2008.
- 22) Grimley PM, Berezesky IK and Friedman RM. Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection: loci of viral ribonucleic acid synthesis. *J Virol* 2: 1326-1338, 1968.
- 23) Froshauer S, Kartenbeck J and Helenius A. Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic sur-

- face of endosomes and lysosomes. *J Cell Biol* 107: 2075-2086, 1988.
- 24) Gorchakov R, Garmashova N, Frolova E and Frolov I. Different types of nsP3-containing protein complexes in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* 82: 10088-10101, 2008.
  - 25) Spuul P, Balistreri G, Kaariainen L and Ahola T. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol* 84: 7543-7557, 2010.
  - 26) Frolova EI, Gorchakov R, Pereboeva L, Atasheva S and Frolov I. Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol* 84: 11679-11695, 2010.
  - 27) Choi HK, Tong L, Minor W, Dumas P, Boege U, Rossmann MG and Wengler G. Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature* 354: 37-43, 1991.
  - 28) Perera R, Owen KE, Tellinghuisen TL, Gorbalenya AE and Kuhn RJ. Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alpha-helix important for core assembly. *J Virol* 75: 1-10, 2001.
  - 29) Warriar R, Linger BR, Golden BL and Kuhn RJ. Role of sindbis virus capsid protein region II in nucleocapsid core assembly and encapsidation of genomic RNA. *J Virol* 82: 4461-4470, 2008.
  - 30) Kim DY, Firth AE, Atasheva S, Frolova EI and Frolov I. Conservation of a packaging signal and the viral genome RNA packaging mechanism in alphavirus evolution. *J Virol* 85: 8022-8036, 2011.
  - 31) Rice CM and Strauss JH. Association of sindbis virion glycoproteins and their precursors. *J Mol Biol* 154: 325-348, 1982.
  - 32) Garoff H, Kondor-Koch C, Pettersson R and Burke B. Expression of Semliki Forest virus proteins from cloned complementary DNA. II. The membrane-spanning glycoprotein E2 is transported to the cell surface without its normal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 97: 652-658, 1983.
  - 33) Lobigs M and Garoff H. Fusion function of the Semliki Forest virus spike is activated by proteolytic cleavage of the envelope glycoprotein precursor p62. *J Virol* 64: 1233-1240, 1990.
  - 34) de Curtis I and Simons K. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8052-8056, 1988.
  - 35) Lee S, Owen KE, Choi HK, Lee H, Lu G, Wengler G, Brown DT, Rossmann MG and Kuhn RJ. Identification of a protein binding site on the surface of the alphavirus nucleocapsid and its implication in virus assembly. *Structure* 4: 531-541, 1996.
  - 36) Owen KE and Kuhn RJ. Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein. *Virology* 230: 187-196, 1997.
  - 37) Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonnrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, Thompson A, Bricogne G and Rey FA. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468: 709-712, 2010.
  - 38) Schwartz O and Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol* 8: 491-500, 2010.
  - 39) WHO. Outbreak and spread of chikungunya. *Wkly Epidemiol Rec* 82: 409-415, 2007.
  - 40) Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC and Cassone A. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840-1846, 2007.
  - 41) Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souares Y, Failloux AB, Tolou HJ, Budelot M, Cosserat D, Leparç-Goffart I and Despres P. Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* 17: 910-913, 2011.
  - 42) Lim CK, Nishibori T, Watanabe K, Ito M, Kotaki A, Tanaka K, Kurane I and Takasaki T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am J Trop Med Hyg* 81: 865-868, 2009.
  - 43) 小林睦生, 二瓶直子, 修駒, 沢辺京子, 津田良夫, 吉田政弘, 司馬英博, 卓佐, 松本文雄 and 安部隆司. ヒトスジシマカの生態と東北地方における分布域の拡大. *病原微生物検出情報月報* 32: 167-168, 2011.
  - 44) Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq JS, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P and Failloux AB. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2: e1168, 2007.
  - 45) Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Franzeul L, Vaney MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Brehin AC, Cubito N, Despres P, Kunst F, Rey FA, Zeller H and Brisse S. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* 3: e263, 2006.
  - 46) Sam IC, Chan YF, Chan SY, Loong SK, Chin HK, Hooi PS, Ganeswari R and Abubakar S. Chikungunya virus of Asian and Central/East African genotypes in Malaysia. *J Clin Virol* 46: 180-183, 2009.
  - 47) Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE and Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 3: e201, 2007.
  - 48) Chatterjee PK, Eng CH and Kielian M. Novel mutations that control the sphingolipid and cholesterol dependence of the Semliki Forest virus fusion protein. *J Virol* 76: 12712-12722, 2002.
  - 49) Tsetsarkin KA, McGee CE and Higgs S. Chikungunya virus adaptation to *Aedes albopictus* mosquitoes does

- not correlate with acquisition of cholesterol dependence or decreased pH threshold for fusion reaction. *Virology* 8: 376, 2011.
- 50) Tsetsarkin KA, McGee CE, Volk SM, Vanlandingham DL, Weaver SC and Higgs S. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaptation of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PLoS One* 4: e6835, 2009.
  - 51) Strauss EG, Stec DS, Schmaljohn AL and Strauss JH. Identification of antigenically important domains in the glycoproteins of Sindbis virus by analysis of antibody escape variants. *J Virol* 65: 4654-4664, 1991.
  - 52) Hobman TC. Targeting of viral glycoproteins to the Golgi complex. *Trends Microbiol* 1: 124-130, 1993.
  - 53) WHO. Rubella vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 86: 301-316, 2011.
  - 54) Shishido A and Ohtawara M. Development of attenuated rubella virus vaccines in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 29: 227-253, 1976.
  - 55) Sakata M, Komase K and Nakayama T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. *Vaccine* 27: 234-242, 2009.
  - 56) Otsuki N, Abo H, Kubota T, Mori Y, Umino Y, Okamoto K, Takeda M and Komase K. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine virus phenotypes. *Vaccine* 29: 1863-1873, 2011.
  - 57) Skiadopoulos MH, Durbin AP, Tatem JM, Wu SL, Paschalis M, Tao T, Collins PL and Murphy BR. Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *J Virol* 72: 1762-1768, 1998.
  - 58) Sakata M and Nakayama T. Protease and helicase domains are related to the temperature sensitivity of wild-type rubella viruses. *Vaccine* 29: 1107-1113, 2011.
  - 59) Paessler S and Weaver SC. Vaccines for Venezuelan equine encephalitis. *Vaccine* 27 Suppl 4: D80-85, 2009.

## **Virology of the Family *Togaviridae***

**Yoshio MORI, Noriyuki OTSUKI, Masafumi SAKATA and Kiyoko OKAMOTO**

Affiliation: Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases.

Address: 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan

E-mail: yoshiom@nih.go.jp

Many pathogens important for medicine, veterinary medicine or public health belong to the genera *alphavirus* and *rubivirus* within the family *Togaviridae*. 29 species of alphaviruses have been reported, and most of them are arboviruses. Chikungunya virus re-emerged in Kenya in 2004 and the epidemics spread to the Indian Ocean islands and many countries in South Asia, South-East Asia and Europe. On the other hand, rubella virus, a sole member of the genus *rubivirus*, is the causative agent of rubella and congenital rubella syndrome (CRS). Because human is only a natural host of the virus and effective live attenuated vaccines are available, immunization activities are strengthened globally to eliminate rubella and CRS, together with measles.

