

『就実論叢』第44号 抜刷

就実大学・就実短期大学 2015年2月28日 発行

ノロウイルス複製の分子機構

Molecular mechanism of Norovirus replication

森 宏 樹

ノロウイルス複製の分子機構

Molecular mechanism of Norovirus replication

森 宏 樹

はじめに

ノロウイルスは、1968年にアメリカ合衆国オハイオ州ノーウォークの小学校で発生した急性胃腸炎の病原体として最初に認知された。現在、ノロウイルスはロタウイルスと共にウイルス性胃腸炎の主要な病原体として知られている。ノロウイルスはカリシウイルス科に属し、カリシウイルス科はさらにラゴウイルス属、ネボウイルス属、ノロウイルス属、サボウイルス属、ベシウイルス属に分類される。いわゆるノロウイルスは種名ではなく、属名であり、正式な名称すわなち種名はノーウォークウイルス *Norwalk virus* である。ここでは、一般的な名称であるノロウイルスを使用する。

ノロウイルス感染によるウイルス性胃腸炎（食中毒）は、感染から24～48時間の潜伏期間後に、突発的に吐き気、嘔吐で発症し、吐き気、嘔吐下痢、腹痛を主症状とし、軽度の発熱も伴う。通常、主症状が約2日間続いた後、治癒する。感染経路は主に食品媒介感染であり、接触感染、飛沫感染、塵埃感染の場合もある。ノロウイルス感染により壊死性腸炎まで進行してしまうこともある。平成21年度から平成25年度までのノロウイルス感染によるウイルス性胃腸炎（食中毒）の報告事件数は288～416件、患者数は8,619～17,632名である。近年、ノロウイルスによる食中毒の報告数はノロウイルスによる食中毒自体の増加や検出方法の簡便化により増加傾向にある。食中毒の病因物質別にみると、平成25年度にノロウイルスが事件数、患者数ともに第1位となっている。世界的には、発展途上国を中心に毎年2億人以上の感染者、20万人以上の死者を出していると概算されており（1, 2）、感染性胃腸炎の中でも重点的な対策が必要な胃腸炎でもある。

ノロウイルスの分類

ノロウイルスはカプシドタンパク質 VP1 の塩基配列相同性により Genogroup (G) I～V の5つの遺伝子型に分類される（3）。ヒトに感染するのは G I, G II, G IV 亜株である。G II 亜株はブタにも感染する。G III 亜株および G V 亜株はそれぞれウシとマウスに感染する。各 Genogroup はさらに複数の遺伝子型に細分類化される。2006年以降世界的に大流行しているノロウイルスは G II.4 亜株である。また、近年多くのノロウイルス株においてその RNA ゲノムの塩基配列が決定され、VP1 塩基配列相同性による分類法だけではノロウイル

スの遺伝子型を分類するには不十分であることが分かってきた。そのため、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ RdRp とカプシドタンパク質 VP1 の二領域を使った遺伝子型分類方法が提案されており、今後使用されることになるだろう (4)。

ノロウイルスの形態と構造

ノロウイルスは宿主細胞の膜成分に由来するエンベロープを持たず、直径27-30nm の正二十面体構造を持つウイルスである。カプシドタンパク質 VP1 が180個集合し、T = 3 の正二十面体対称構造を持つカプシドを構成している (5)。また、ウイルスカプシドタンパク質 VP2 がウイルス粒子1個あたり1~2個カプシドに存在している (6)。カプシド内にノロウイルス RNA ゲノムが封入され、感染性ノロウイルスを構成する。

ノロウイルスのゲノム構造

ノロウイルスのゲノムは約7.6kb の一本鎖のプラス鎖 RNA である (図1)。その5' 末端には、ノロウイルスゲノムにコードされている VPg タンパク質が共有結合し、3' 末端はポリ A が付加されている。ノロウイルスゲノム自体はプラス鎖 RNA であるため、ノロウイルス感染後宿主細胞内では mRNA としての機能し、タンパク質合成の鋳型となる。ノロウイルスゲノム

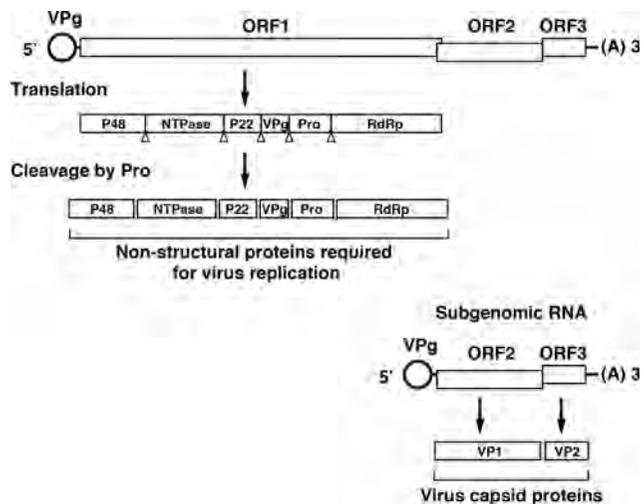


図1 ノロウイルス RNA ゲノムの構造

ムには三つの ORF (ORF1~3) が含まれる。ORF1 の3' 末端部分と ORF2 の5' 末端部分はフレームをずらして20nt 重複している。また、ORF2 の3' 末端部分と ORF3 の5' 末端部分は1nt 重複している。また、5' 末端および3' 末端 UTR はそれぞれ4nt、30~40nt しかない。このようにノロウイルス RNA ゲノム内にウイルス複製に必要な非構造タンパク質とカプシドタンパク質が高密度にコードされている。マウスノロウイルス RNA ゲノムには4番目の ORF (ORF4) が ORF2 内にフレームをずらして存在している。

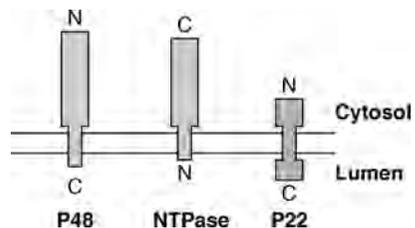


図2 ノロウイルス膜タンパク質の予測膜配向

ORF1 は約200kDa ポリタンパク質をコードしており、このポリタンパク質の翻訳後また

は翻訳中にプロテアーゼ Pro によりノロウイルス複製に必要な6種の非構造タンパク質 P48, NTPase, P22, VPg, Pro, RdRp に切断される。前者3種のタンパク質は膜内在性タンパク質である。膜貫通部位予測プログラム TMpred 等の解析により3種類の膜内在性タンパク質の膜配向は P48のN末端側ドメイン, NTPaseのC末端側ドメイン, P22のN末端側ドメインを細胞質側に配置すると予測された(図2)。

ORF2とORF3はそれぞれカプシドタンパク質VP1とVP2をコードしている。ノロウイルス感染後、宿主細胞内でRNAゲノム複製中間体を鋳型にして、全長ノロウイルスRNAゲノムと共に約2.4kbのサブゲノムRNAも複製される(7)。サブゲノムRNAの配列はノロウイルスRNAゲノム3'側の約2.4kb部分の配列と一致し、ORF2とORF3を含む。サブゲノムRNAの5'末端もVPgタンパク質が共有結合している。全長ノロウイルスRNAゲノムとサブゲノムRNAの両5'末端26塩基の配列は23塩基(88%)一致するため(8)、この配列がVPgタンパク質の結合に関与していると考えられる。

ノロウイルスの複製

ノロウイルスの複製は、他のウイルス同様に定着・侵入、脱核、RNAゲノムの翻訳、RNAゲノムの複製、ウイルス粒子の形成、放出という過程をたどる(図3)。他の一本鎖のプラス鎖RNAウイルスと同様に、ノロウイルスは感染後細胞内に形成される小胞上で複製される(9, 10)。この小胞はノロウイルスp22タンパク質などが宿主細胞の分泌系を阻害し、小胞体やトランスゴルジネットワークを崩壊させ形成される。この小胞上には、ノロウイルスRNAゲノム複製中間体やノロウイルス非構造タンパク質が共局在しており(10)、ノロウイルス非構造タンパ

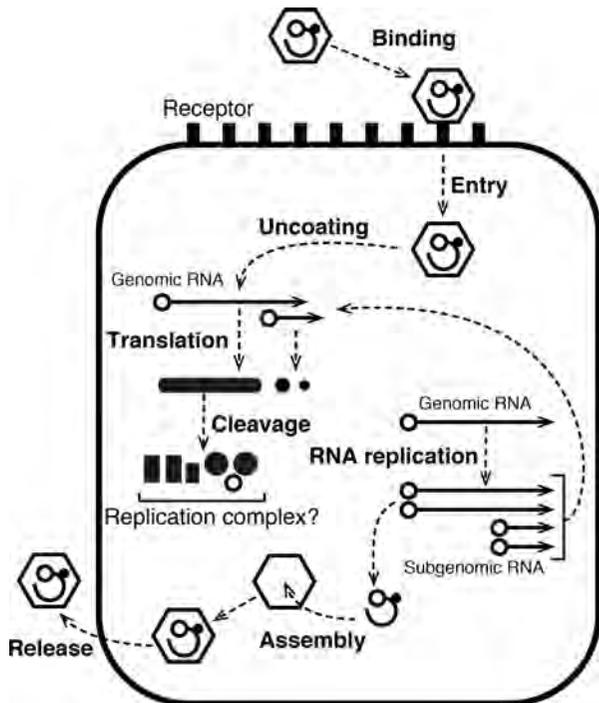


図3 ノロウイルスの複製過程

ク質がウイルス複製複合体を形成していることが推測される。しかし、ノロウイルスにおけるウイルス複製複合体の構成成分やその機能についての生化学的研究は進んでいない。

定着と侵入

ノロウイルスは宿主細胞表面の血液型抗原すなわち糖鎖構造を認識し結合する (11). ノロウイルスの宿主細胞内への侵入には、ダイナミンやコレステロールが必要であるということが知られているが (12), 侵入の機構の詳細は不明である.

ノロウイルスゲノムの翻訳

ノロウイルスゲノムが宿主細胞質に放出されると, ノロウイルスゲノムは宿主細胞内で mRNA として機能し, 宿主細胞内のタンパク質合成系が用いられて ORF1ポリタンパク質が合成される. ノロウイルスゲノムの5'末端には VPg タンパク質が共有結合しており, VPg がノロウイルスゲノムの複製や翻訳に重要な機能を持つ (7). 他の多くのウイルスは, ウイルスゲノムの5'末端はタンパク質により修飾されてはいない. 例外はアストロウイルス (13) と植物細胞ウイルスであるプラムポックスウイルス (14) であり, いずれも第IV群ウイルスに属する. 真核細胞において mRNA の5'末端には CAP 構造が付加され, mRNA の効率的な翻訳が開始されるが, ノロウイルスゲノムでは VPg タンパク質が CAP 構造の代わりに機能し, ノロウイルスゲノムの効率的な翻訳開始に担っている. すなわち, VPg タンパク質がまず CAP 結合タンパク質である eIF4E と結合する (15). その後, 翻訳開始因子 eIF4G, eIF4A をリクルートすることにより, ノロウイルス RNA ゲノムを43S 翻訳開始前複合体に結合させ翻訳を開始させる. このようにして, ウイルス複製に必要なノロウイルス非構造タンパク質が合成されることになる.

カプシドタンパク質 VP1はノロウイルス粒子1個あたり180分子含まれており (5), ウイルス粒子形成には VP1タンパク質の大量発現が必要である. これを保証するため, ノロウイルスゲノム複製の際, ORF1~3からなる全長のノロウイルスゲノム RNA に加えて, ORF2および ORF3からなるサブゲノム RNA が大量に合成される (16). このサブゲノム RNA の5'末端にも VPg タンパク質が共有結合し, CAP 構造の機能を代替している (7). サブゲノム RNA は ORF2および ORF3をコードするバイシストロニック RNA であるが, ORF2のストップコドン UAA と ORF3のスタートコドン AUG が1塩基オーバーラップしており, また ORF3の翻訳開始のための IRES などは存在していない. 通常リボソームは翻訳終結後 mRNA より解離する. しかし, ノロウイルスサブゲノム RNA の場合, ORF2の翻訳終結後, リボソームはサブゲノム RNA に結合した状態を維持し, 翻訳を再開することになる. ORF3の開始コドンの上流にある配列が18S rRNA と相互塩基対を形成することにより, リボソームの解離を抑制し, ORF3の翻訳を開始させている (17).

ORF1ポリタンパク質の切断

プロテアーゼ Pro はキモトリプシンに相似した構造を持つシステインプロテアーゼである (18). 二つの β バレルドメインが近接して折り畳まれ, その境目に基質ペプチドの結合

部位と活性中心である触媒三残基（システイン、ヒスチジン、グルタミン酸またはアスパラギン酸）が位置する（19）。ORF1ポリタンパク質がプロテアーゼ Pro により切断され、6種の非構造タンパク質が生成される。それら非構造タンパク質のC末端アミノ酸残基（-1の位置）はグルタミンまたはグルタミン酸である。非構造タンパク質のC末端から2番目のアミノ酸残基（-2の位置）はフェニルアラニン、ロイシン、トリプトファンまたはセリンである。また、同様に-4の位置のアミノ酸残基はフェニルアラニン、グルタミン、ロイシン、イソロイシンなどが多く、プロテアーゼ Pro は、切断部位から-1、-2、-4のアミノ酸残基を識別していると考えられている（20）。非構造タンパク質のN末端側のアミノ酸配列の認識について不明である。

ウイルスゲノムの複製

ノロウイルスはボルティモア分類で第IV群ウイルスに分類され、ノロウイルスゲノムの複製過程においてDNAの合成は起こらない。ノロウイルスゲノムの複製はノロウイルスゲノムの一本鎖のプラス鎖RNA自体がゲノム複製時における鋳型となり、ウイルスゲノムにコードされているRNA依存RNAポリメラーゼRdRpによりマイナス鎖RNAがゲノム複製中間体として合成され、ノロウイルスゲノム二本鎖RNAが形成される。このゲノム複製中間体が鋳型となり同じRNA依存RNAポリメラーゼRdRpによりプラス鎖RNA、すなわちノロウイルスゲノムが複製される（図4）。また、この時ORF2およびORF3を含む2.4kbのサブゲノムRNAもゲノム複製中間体を鋳型として複製される。複製されたノロウイルスゲノムおよびサブゲノムRNAは、宿主細胞内においてmRNAと同等であり、タンパク質翻訳の鋳型として使用される。

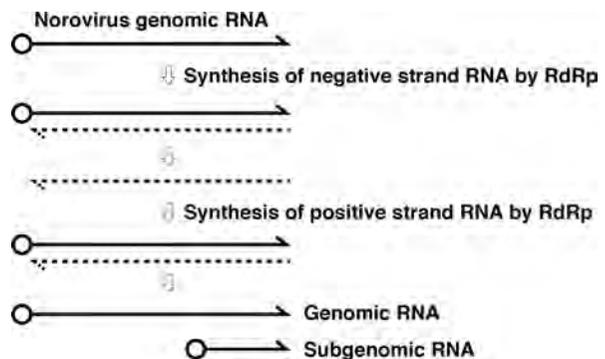


図4 ノロウイルスゲノムの複製過程

ノロウイルスゲノムからマイナス鎖RNAすなわちゲノム複製中間体が複製される時、RNA依存RNAポリメラーゼRdRpはノロウイルスゲノムと宿主細胞内の多くのRNAを識別する必要がある。しかし、この識別機構については不明である。Vashistらは、ノロウイルスゲノムの5'末端側および3'末端側250ntのRNAをプローブにして、その領域に結合するタンパク質を132種類（5'末端側RNA結合99種類、3'末端側RNA結合33種類）同定した（21）。これらノロウイルスゲノムRNA結合タンパク質のなかに宿主細胞RNAとノロウイルスRNAゲノムの識別に働く因子があるのかもしれない。

マイナス鎖RNAすなわちゲノム複製中間体合成後、これを鋳型にしてプラス鎖RNAが

複製されるが、このとき RdRp が VPg の保存されたチロシンにグアニンを付加し、VPg を RNA 合成のタンパク質プライマーとして使いプラス鎖 RNA すなわちノロウイルスゲノムを合成する (22, 23).

ウイルス粒子の組み立てと放出

宿主細胞内で複製されたウイルスゲノムがカプシド内に封入され、ウイルス粒子が形成されると、ウイルス複製は完了する。細胞内で VP1 のみを発現させると、ウイルス様粒子が形成されるため (24)、カプシド形成は VP1 の自己集合により起こり、他のウイルスタンパク質は不要である。一方、VP2 は強い塩基性タンパク質であること、そして VP2 がカプシドの内部表面に結合することから (25)、VP2 がノロウイルスゲノムに結合し、ウイルスゲノムのカプシドへの封入に機能していると考えられている。しかし、宿主細胞内には多くの RNA が存在するため、どのようにノロウイルスゲノムだけが特異的にカプシドに封入されるかは、不明である。ただ、ノロウイルスゲノムの 5' 末端には VPg が共有結合しているため、VPg がウイルスゲノムと宿主細胞 RNA の識別に機能しているのかもしれない。この場合、ウイルスゲノムが複製される時、大量の VPg を 5' 末端に有するサブゲノム RNA も複製されるため、全長ウイルスゲノムとサブゲノム RNA が識別される必要がある。

最終的に、ノロウイルス粒子が宿主細胞から放出されることにより、ノロウイルスのライフサイクルは完了する。このとき、他のウイルスと同様に細胞にアポトーシスを誘導することによりウイルス粒子を宿主細胞から放出させているのかもしれない。

おわりに

ノロウイルスゲノムには 8 種類のタンパク質しかコードされておらず、ウイルス複製には宿主細胞因子も必要であると考えられる。ウイルスが宿主細胞を巧みに操り子孫を作り出す仕組みは非常に興味深い。ウイルス複製の分子機構が明らかになれば、よりウイルスと細胞との関係が明らかになっていこう。また、現在までのところ、ヒトノロウイルスを人工的に複製可能な細胞株や培養条件は発見されていない。そのため、ノロウイルス複製の分子機構の解析は主にマウスノロウイルスや近縁のネコカリシウイルスが用いられてきた。今後、ヒトノロウイルスを人工的に複製可能な培養条件等が発見されれば、ヒトノロウイルス複製過程の理解がより一層深まると考えられる。

参考文献

1. Patel, M. M., Widdowson, M.-A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinjé, J., and Parashar, U. D. (2008) Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic

- gastroenteritis. *Emerging Infect. Dis.* 14, 1224-1231
2. Debbink, K., Lindesmith, L. C., Donaldson, E. F., and Baric, R. S. (2012) Norovirus immunity and the great escape. *PLoS pathogens* 8, e1002921
 3. Zheng, D.-P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., and Monroe, S. S. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312-323
 4. Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P. A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., and Koopmans, M. (2013) Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158, 2059-2068
 5. Prasad, B. V., Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G., and Estes, M. K. (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science (New York, N.Y.)* 286, 287-290
 6. Glass, P. J., White, L. J., Ball, J. M., Leparco-Goffart, I., Hardy, M. E., and Estes, M. K. (2000) Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *Journal of virology* 74, 6581-6591
 7. Herbert, T. P., Brierley, I., and Brown, T. D. (1997) Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *The Journal of general virology* 78 (Pt 5), 1033-1040
 8. Hardy, M. E., and Estes, M. K. (1996) Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes* 12, 287-290
 9. Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y., and Virgin, H. W. (2004) Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS biology* 2, e432
 10. Hyde, J. L., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., Wobus, C., Virgin, H. W., and Mackenzie, J. M. (2009) Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *Journal of virology* 83, 9709-9719
 11. Donaldson, E. F., Lindesmith, L. C., Lobue, A. D., and Baric, R. S. (2008) Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological reviews* 225, 190-211
 12. Gerondopoulos, A., Jackson, T., Monaghan, P., Doyle, N., and Roberts, L. O. (2010) Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *The Journal of general virology* 91, 1428-1438

13. Fuentes, C., Bosch, A., Pinto, R. M., and Guix, S. (2012) Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity. *Journal of virology* 86, 10070-10078
14. Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberté, J. F. (2000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of virology* 74, 7730-7737
15. Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J.-F. C. O., and Roberts, L. (2005) Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO reports* 6, 968-972
16. Herbert, T. P., Brierley, I., and Brown, T. D. (1996) Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *The Journal of general virology* 77 (Pt 1), 123-127
17. Naphthine, S., Lever, R. A., Powell, M. L., Jackson, R. J., Brown, T. D. K., and Brierley, I. (2009) Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *PloS one* 4, e8390
18. Nakamura, K., Someya, Y., Kumasaka, T., Ueno, G., Yamamoto, M., Sato, T., Takeda, N., Miyamura, T., and Tanaka, N. (2005) A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *Journal of virology* 79, 13685-13693
19. Zeitler, C. E., Estes, M. K., and Venkataram Prasad, B. V. (2006) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus protease at 1.5-Å resolution. *Journal of virology* 80, 5050-5058
20. Leen, E. N., Baeza, G., and Curry, S. (2012) Structure of a murine norovirus NS6 protease-product complex revealed by adventitious crystallisation. *PloS one* 7, e38723
21. Vashist, S., Urena, L., Chaudhry, Y., and Goodfellow, I. (2012) Identification of RNA-protein interaction networks involved in the norovirus life cycle. *Journal of virology* 86, 11977-11990
22. Rohayem, J., Robel, I., Jäger, K., Scheffler, U., and Rudolph, W. (2006) Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *Journal of virology* 80, 7060-7069
23. Subba-Reddy, C. V., Goodfellow, I., and Kao, C. C. (2011) VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-

- based assay. *Journal of virology* 85, 13027-13037
24. Bertolotti-Ciarlet, A., White, L. J., Chen, R., Prasad, B. V. V., and Estes, M. K. (2002) Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *Journal of virology* 76, 4044-4055
 25. Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B. V., and Estes, M. K. (2013) Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *Journal of virology* 87, 4818-4825