

Fig. 8. Histopathology and immunohistochemistry. Lung specimen of mice immunized with rDIs expressing structural proteins of SARS-CoV and challenged with SARS-CoV. Mice were immunized i.n. or s.c. with DIs, rDIsSARS-N, rDIsSARS-E/M/S, rDIsSARS-E/M/N/S or saline. Mice were challenged with SARS-CoV 2 weeks after the final vaccination. Lungs were harvested 3 days after the challenge. The section was stained with hematoxylin and eosin (H&E) or immunohistochemically stained with anti-SARS-CoV antibody or anti-CD3 antibody.

recombinant MVA expressing SARS-CoV S protein elicited serum antibodies to SARS-CoV S protein and protective immunity against SARS-CoV infection. Previous studies demonstrated passive transfer of serum from immunized mice conferred protection against SARS-CoV in the respiratory tract following inoculation with either SARS CoV or recombinant MVA expressing S protein (Bisht et al., 2004; Subbarao et al., 2004). These results suggest that S protein is a crucial antigen in generating protective immunity. We observed that intranasal or subcutaneous inoculation of BALB/c mice with rDIs expressing S protein (rDIsSARS-S, rDIsSARS-E/M/S or rDIsSARS-E/M/N/S) produced serum antibodies capable of recognizing the

SARS-CoV virion by ELISA, also capable of neutralizing SARS-CoV in vitro. The subcutaneous route appears to elicit stronger immunity than intranasal immunization with respect to the level of anti-SARS-CoV IgG antibody produced. Important finding here is that although the mucosal IgA antibody response was induced only in mice intranasally immunized with rDIsSARS-E/M/N/S, the mice administered with rDIsSARS-E/M/N/S by either route elicited strong protective immunity. Therefore, the protection was achieved in the absence of a mucosal IgA response in mice subcutaneously immunized with rDIsSARS-E/M/N/S. Thus, our results clearly show that mucosal infection might be prevented in the presence of a

high level of neutralizing serum IgG antibody. Control mice vaccinated with DIs not expressing envelope proteins were not protected, indicating that the effect was specific for the expressed envelope proteins of SARS-CoV and was not due to enhanced nonspecific immunity.

A recent report suggests that a combination of three adenovirus vector expressing SARS-S, -M and -N protein is capable of eliciting neutralizing antibodies in serum and N-specific T cell responses in rhesus macaques (Gao et al., 2003). However, in this report, the relationship between these immune responses and actual protection was not presented. In another study, the importance of SARS-CoV structural proteins in generating protective immunity was investigated by expressing them individually and in combination using a recombinant parainfluenza virus (PIV) type 3 vector. The expression of S with the two other putative virion envelope proteins, M and E protein, did not augment the neutralizing antibody response. In the absence of S, expression of M and E, or the nucleocapsid protein N, did not induce a detectable serum SARS-CoV-neutralizing antibody response (Buchholz et al., 2004). Our results were consistent with this in that expression of M or N proteins by administration of DIs harboring SARS-CoV M or N gene singly did not induce a neutralizing antibody response, although anti-SARS-CoV antibodies were detected by ELISA.

Recent studies have shown that vaccination with a plasmid expressing N protein can elicit SARS-CoV nucleocapsid-specific humoral and cellular immune responses (Kim et al., 2004; Zhu et al., 2004; Zhao et al., 2005). They showed that linkage of N protein to calreticulin, Ca²⁺-binding protein known to enhance immune response, in a DNA vaccine resulted in the significant enhancement of the humoral and cellular immune responses to N protein in vaccinated mice. They also showed that the N protein-specific DNA vaccine elicited partial protection against N protein expressing vaccinia virus challenge, however, the efficacy of N-specific cellular immune responses in protection of SARS-CoV infection is not clear. Although we here showed that N protein expression by rDIs was capable of eliciting N-specific humoral and cellular immunity, vaccination with rDIsSARS-N failed to elicit a neutralizing antibody response against SARS-CoV infection *in vitro*, and failed to confer full protection in vaccinated mice against SARS-CoV challenge, suggesting that SARS-CoV N protein-specific antibodies and CTLs were not sufficient to provide full protection against SARS-CoV infection.

Histopathological analysis of lung tissues in the present study revealed a marked lymphocytic infiltration in peribronchial sites in mice immunized intranasally or subcutaneously with recombinant vaccinia virus DIs expressing E/M/S or E/M/N/S. Almost no SARS-CoV antigens were detected in these areas upon immunohistochemical analysis. The infiltrating lymphocytes were shown to be CD3 positive T-cells. This is the first evidence of induction of protective immunity against SARS-CoV associated with marked infiltration of T cells at a SARS-CoV infection site. We were able to detect SARS-CoV S-specific CD8⁺ T cells in the spleen of these immunized mice by INF- γ ELISPOT. Thus, these results suggest that T

cell induction in mice immunized with rDIsSARS-E/M/S and rDIsSARS-E/M/N/S might provide additional help to completely eliminate SARS-CoV in the lung. Of note, Weingartl et al. (2004) reported a low level of neutralizing antibody response in ferrets (*Mustela putorius furo*) immunized with a recombinant MVA expressing SARS-CoV S protein. They also showed that there are more rapid and vigorous neutralizing antibody responses in immunized ferrets, compared to control animals after challenge with SARS-CoV. However, SARS-CoV infection and spreading in the immunized ferrets is not prevented. Moreover, upon infection with SARS-CoV, strong inflammatory responses were noted in ferrets immunized with either recombinant MVA expressing SARS-CoV S or N protein, suggesting that vaccination with the recombinant MVA expressing SARS-CoV S or N protein may, in some case, lead to enhanced pathology during SARS-CoV infection (Czub et al., 2005; Weingartl et al., 2004). It was also reported that antibodies that neutralized most human SARS-CoV S enhanced entry mediated by the civet virus S, suggesting the possibility that such kind of vaccines might enhance viral infection (Yang et al., 2005). Although we observed no such pathology in rDIs-immunized mice after virus challenge, the potential for widespread tissue damage following administration of SARS-CoV proteins should be carefully investigated. In addition, further studies are required to clarify whether the recruited T-cells indeed play an important role in clearance of SARS-CoV from sites of infection.

In this study, we constructed rDIs containing genes encoding four structural proteins of SARS-CoV that were individually or simultaneously expressed. Intranasal or subcutaneous inoculation of BALB/c 3T3 mice with rDIs expressing S protein with or without other structural proteins elicited a high level of neutralizing antibodies against SARS-CoV and protective immunity, in the lungs of mice after intranasal challenge. Furthermore, both cellular and mucosal immunity against SARS-CoV structural proteins were also induced following administration of the rDIs. Therefore, the replication-deficient DIs strain is a feasible, safe and effective SARS vaccine vector.

Materials and methods

Cells

CEF cells and Vero E6 cells were grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS), 1% penicillin-streptomycin and L-glutamine (GIBCO BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD). A20.2J murine B cells were maintained in RPMI1640 supplemented with 10% FCS, 50 μ M β -mercaptoethanol, L-glutamine and antibiotics.

Plasmid DNA constructs and DNA preparation

cDNA encoding SARS-CoV structural proteins were generated by reverse transcription of SARS-CoV HKU39849

(Accession No. AY278491) using superscriptIII (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), followed by amplification using expand high fidelity PCR system (Roche diagnostics), as described previously (Ohnishi et al., 2005). These DNA fragments encoding E, M, N and S proteins were cloned into the vaccinia virus transfer vector pDIs_{gptmH5}, which also harbored *E. coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase, under control of a vaccinia virus p7.5 promoter in the cloning site of pUc/DIs (Ishii et al., 2002), to generate pDIsSARS-E, pDIsSARS-M, pDIsSARS-N, and pDIsSARS-S, respectively. To construct transfer vectors to generate rDIs expressing E/M, E/M/S, or E/M/N/S, DNA fragments encoding M, N and S proteins controlled by the mH5 promoter of the vaccinia virus (Wyatt et al., 1996) were inserted into pDIsSARS-E *Sma*I, *Not*I and *Sac*I sites, respectively, thus generating pDIsSARS-E/M, pDIsSARS-E/M/S and pDIsSARS-E/M/N/S (Fig. 1). A plasmid expressing S driven by the EF-1 α promoter was constructed using pEF-BOS-bst (Yoshizawa et al., 2001), and designated pEF-S-bst.

Generation of recombinant vaccinia virus

Recombinant forms of DIs were obtained by hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase selection (Falkner and Moss, 1988). Monolayers of CEF cells in 6-well plates were pre-incubated with DMEM containing 10% FCS, 25 μ g/ml of micophenoic acid (MPA), 250 μ g/ml of xanthine and 15 μ g/ml of hypoxanthine. Infection was performed onto CEF cells grown in 8 cm dishes with DIs at a multiplicity of infection (moi) of 1.0. Transfection was performed using 20 μ g of each DI transfer vector and Lipofectamine (GIBCO BRL/Life Technologies). rDIs expressing SARS-CoV structural proteins were selected following four consecutive rounds of plaque purification of CEF cells in 6-well plates pre-incubated with DMEM containing 10% FCS, 25 μ g/ml of MPA, 250 μ g/ml of xanthine, and 15 μ g/ml of hypoxanthine. Resultant rDIs expressing SARS-CoV structural proteins were designated as rDIsSARS-E, rDIsSARS-M, rDIsSARS-N, rDIsSARS-S, rDIsSARS-E/M, rDIsSARS-E/M/S and rDIsSARS-E/M/N/S, respectively, and subsequently maintained in CEF cells for use in further studies.

Western blot analysis

CEF cells infected with rDIs constructs harboring ORFs of SARS-CoV structural proteins were fractionated by SDS-PAGE under reduced conditions. Purified SARS-CoV virion (0.5 μ g) was used as a positive control. The proteins were then transferred to an Immobilon-P PVDF membrane (MILLIPORE, Bedford, MA) and incubated with monoclonal antibodies against N or S proteins (Ohnishi et al., 2005) or polyclonal antibody against M protein (Mizutani et al., 2004). After washing, the membrane was reacted with HRP-conjugated Fab fragment of anti-mouse or rabbit IgG (H + L) (1:20,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by visualization of the bands using chemiluminescent reagents (Pierce, Rockford, IL).

Indirect immunofluorescence analysis

CEF cells were infected with rDIs expressing SARS-CoV structural proteins. After 48 h of incubation, the cells were washed with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. The fixed cells were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 3 min at room temperature, and then blocked with a non-fat milk solution, Block Ace (Yukijirushi Co., Tokyo, Japan). The cells were incubated with polyclonal antibodies against M, N or S proteins (Mizutani et al., 2004) for 60 min at 37 °C. The cells were further incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (TAGO, Burlingame, CA) diluted to 1:500 in PBS to detect SARS-CoV M, N or S proteins. To analyze the subcellular localization of SARS structural proteins, anti-GM-130 monoclonal antibody (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG (TAGO) were used to stain the Golgi apparatus.

Vaccination

Animal studies were carried out under a protocol approved by the Animal Care and Use Committee of the National Institute of Infectious Diseases, Japan. Five- to 6-week-old female BALB/c mice were purchased from Japan SLC (Hamamatsu, Japan) and immunized with 10⁶ pfu of rDIs, either subcutaneously (s.c.) or intranasally (i.n.). After 2 and 6 weeks, identical titers of recombinant virus were re-administered. One week later, the mice were intranasally challenged with 10⁴ TCID₅₀ of SARS-CoV in 20 μ l of saline as previously described (Subbarao et al., 2004). Three days later, serum, nasal wash fluid and bronchoalveolar wash fluid were collected to measure viral titers and antibodies against SARS-CoV from mice that were sacrificed under anesthesia with chloroform.

Detection of SARS-CoV specific IgA and IgG antibodies

IgA and IgG titers against SARS-CoV were determined by ELISA, as previously described (Takasuka et al., 2004). Briefly, microtiter plates (Dynatech, Chantilly, VA) were coated overnight at 4 °C with SARS-CoV-infected or mock-infected Vero E6 cell lysate samples previously treated with 1% NP40, followed by UV-inactivation. The plates were blocked with 1% OVA in PBS–0.05% Tween 20, and then incubated with serially diluted sera (1:10–1:25⁵) for 1 h at room temperature. The plates were then incubated with either peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:2000, Zymed, South San Francisco, CA) or IgA (1:2000, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) antibody. The plates were washed three times with PBS-Tween at each step. The substrate mixture (o-phenylenediamine (Zymed) and hydrogen peroxide) was added to each well, and the absorbance of each well was read at 490 nm using a model 680 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA). To provide a standard for IgG detection, serum was obtained from a hyper-immunized mouse and the OD_{490nm} value of 100 ELISA units/ml of standard serum was around three in every assay.

Each SARS-CoV-specific IgG titer was calculated by subtracting the optical density of wells coated with non-infected cell lysate from the optical density of wells coated with virus-infected cell lysate. As a positive control to induce SARS-CoV-specific IgA, mice were immunized intranasally with UV-inactivated purified SARS-CoV together with 3 µg of poly(I:C) (Ichinohe et al., 2005).

SARS-CoV neutralizing assay

Sera collected from vaccinated mice were inactivated by incubation at 56 °C for 30 min. The serially diluted mice sera (up to five-fold) were incubated with 100 TCID₅₀ of SARS-CoV for 1 h, then the mixtures were added to a Vero E6 cell culture grown to confluence in 96-well microtiter plates. After 48 h, the cells were fixed with 10% formaldehyde and stained with crystal violet to visualize the cytopathic effects of the virus (Storch, 2001). Neutralization antibody titers were expressed as the minimal dilution of sera capable of inhibiting viral cytopathic effects.

Analysis of the SARS-CoV-specific T-cell response

CLN, ALN and spleens were obtained from mice 1 week after their third vaccination. Following preparation of a single cell suspension, T cells were purified using a Pan T cell isolation kit and a magnetic cell sort system (MACS: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). To prepare APC, normal BALB/c mouse splenocytes were depleted of Thy-1⁺ T cells by MACS and irradiated at 2000 cGy. Purified T cells (1×10^6) were cultured with APC (5×10^6) in the presence or absence of UV-irradiated, purified SARS-CoV virion at 10 µg/ml. Four days after cultivation, cytokine concentrations within culture supernatant were measured by flow cytometry using a mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array kit (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Generation of a stable S-transfectant

A20.2J murine B cells were transfected with either pEF-S-bst or pEF-BOS-bst by electroporation at 960 µF and 310 V using a GenePulser (BioRad Laboratories, Hercules, CA). After selection using blasticidine S (Invitrogen), followed by limiting dilution cloning, S6.2 and BOS-5 clones were obtained. To detect S protein expression in S6.2 cells, the cells were stained with biotinylated anti-S monoclonal antibody (Ohnishi et al., 2005) or control antibody, followed by the incubation with APC-streptavidin (e-Bioscience Inc., San Diego, CA), after which they were analyzed by FACScalibur (BD Bioscience) using the Cell Quest II program. Propidium Iodide was used to exclude dead cells. The data were re-analyzed and depicted using Flowjo software (Tree Star Inc., San Carlos, CA).

ELISPOT assay

Spleen T cells of mice immunized with rDisSARS-N or rDisSARS-E/M/N/S were separated using a MACS system

(Miltenyi Biotec, Auburn, CA). To enrich CD4⁺ T cells in the T cell fraction, CD8⁺ T cells were partially removed using anti-CD8 mAb-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec). This procedure reduced the number of CD8⁺ T cells to less than one third. Overlapping 20-mer peptides covering the whole N sequences of SARS-CoV were obtained from Sigma-Aldrich Japan. S peptides S44 (S331–350), S45 (S381–400), S46 (S431–450), and S47 (S481–500) corresponding to the ACE2 binding region of the S protein were selectively produced based on a web-site program by SYFPEITHI (<http://syfpeithi.de/>). A20.2J murine B cells irradiated at 2000 cGy were used as APCs with peptides corresponding to either S or N proteins. In some experiments, A20.2J cells stably transfected with pEF-S or the empty vector pEF-BOS were used.

ELISPOT assays were performed according to the methods outlined by DIACLONE research (Besancon, France). In brief, 96-well flat-bottom plates (Maxisoap Nunc plates, Nunc, Rochester, NY) were coated with anti-IFN-γ capture antibody for one h at 37 °C. The plates were then washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST), and blocked with PBS containing 2% bovine serum albumin overnight at 4 °C. Freshly isolated splenic T cells (5×10^5) and APCs (1×10^4) were added to the plates in the presence or absence of 5 µM of N or S peptides and incubated for 16 h at 37 °C in 5% CO₂ on the anti-IFN-γ-coated plates, followed by a lysis with ice-cold deionized water. After the plates were washed, biotinylated detection antibody was added, then the plates were further incubated for 1 h at 37 °C. The plates were washed three times with PBST, then 50 µl/well of Streptavidin-alkaline phosphatase-conjugated anti-biotin immunoglobulin G solution was added, followed by incubation for 1 h at 37 °C. After washing with PBST, substrate mix (50 µl/well) was added, and the plates were allowed to develop over 4 h at 37 °C. The wells were imaged and the number of spot-forming cells SFC counted using a KS ELISPOT compact system (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Histopathology and immunohistochemistry

Lung tissue from the mice was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin block sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). SARS-CoV antigens were immunohistochemically detected using a labeled-streptavidin–biotin complex staining system (DakoCytomation Co. Japan, Kyoto, Japan). Rabbit polyclonal antibodies raised against UV-inactivated, purified SARS-CoV were used as a primary antibody. A catalyzed signal amplification method (Dako) was also used to detect SARS-CoV antigens with enhanced sensitivity. Lung sections from mice vaccinated with rDisSARS-E/M/N/S and infected with SARS Co-V were stained with anti-CD3 antibody. (Santa Cruz Biotechnology)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Michinori Kohara for kindly providing us anti-SARS-CoV polyclonal antibodies. We would

also like to thank Ms. Mami Matsuda, Ms. Makiko Yahata, Ms. Sayaka Yoshizaki, Ms. Chikako Sato, Mr. Masayuki Ishige, Ms. Yuko Sato and Ms. Aya Harashima for their excellent technical support. This work was supported by a Heath and Labour Science Research Grant from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan, and from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) of Japan.

References

- Anton, I.M., Gonzalez, S., Bullido, M.J., Corsin, M., Risco, C., Langeveld, J.P., Enjuanes, L., 1996. Cooperation between transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) structural proteins in the in vitro induction of virus-specific antibodies. *Virus Res.* 46 (1–2), 111–124.
- Belyakov, I.M., Wyatt, L.S., Ahlers, J.D., Earl, P., Pendleton, C.D., Kelsall, B.L., Strober, W., Moss, B., Berzofsky, J.A., 1998. Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein. *J. Virol.* 72, 8264–8272.
- Bisht, H., Roberts, A., Vogel, L., Bukreyev, A., Collins, P.L., Murphy, B.R., Subbarao, K., Moss, B., 2004. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (17), 6641–6646.
- Buchholz, U.J., Bukreyev, A., Yang, L., Lamirande, E.W., Murphy, B.R., Subbarao, K., Collins, P.L., 2004. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (26), 9804–9809.
- Bukreyev, A., Lamirande, E.W., Buchholz, U.J., Vogel, L.N., Elkins, W.R., St Claire, M., Murphy, B.R., Subbarao, K., Collins, P.L., 2004. Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *Lancet* 363 (9427), 2122–2127.
- Collins, A.R., Knobler, R.L., Powell, H., Buchmeier, M.J., 1982. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell–cell fusion. *Virology* 119 (2), 358–371.
- Collisson, E.W., Pei, J., Dzielawa, J., Seo, S.H., 2000. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev. Comp. Immunol.* 24 (2–3), 187–200.
- Czub, M., Weingartl, H., Czub, S., He, R., Cao, J., 2005. Evaluation of modified vaccinia virus Ankara based recombinant SARS vaccine in ferrets. *Vaccine* 23 (17–18), 2273–2279.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Stummer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348 (20), 1967–1976.
- Faber, M., Lamirande, E.W., Roberts, A., Rice, A.B., Koprowski, H., Dietzschold, B., Schnell, M.J., 2005. A single immunization with a rhabdovirus-based vector expressing severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S protein results in the production of high levels of SARS-CoV-neutralizing antibodies. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt. 5), 1435–1440.
- Falkner, F.G., Moss, B., 1988. *Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J. Virol.* 62 (6), 1849–1854.
- Fouchier, R.A., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G.J., van den Hoogen, B.G., Peiris, M., Lim, W., Stohr, K., Osterhaus, A.D., 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 423 (6937), 240.
- Gao, W., Tamin, A., Soloff, A., D'Aiuto, L., Nwanegbo, E., Robbins, P.D., Bellini, W.J., Barratt-Boyes, S., Gambotto, A., 2003. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet* 362 (9399), 1895–1896.
- Groneberg, D.A., Poutanen, S.M., Low, D.E., Lode, H., Welte, T., Zabel, P., 2005. Treatment and vaccines for severe acute respiratory syndrome. *Lancet, Infect. Dis.* 5 (3), 147–155.
- Holmes, K.V., 2003. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J. Clin. Invest.* 111 (11), 1605–1609.
- Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H., 2005. Synthetic double-stranded RNA poly (I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J. Virol.* 79 (5), 2910–2919.
- Ishii, K., Ueda, Y., Matsuo, K., Matsuura, Y., Kitamura, T., Kato, K., Izumi, Y., Someya, K., Ohsu, T., Honda, M., Miyamura, T., 2002. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 302 (2), 433–444.
- Jackwood, M.W., Hilt, D.A., 1995. Production and immunogenicity of multiple antigenic peptide (MAP) constructs derived from the S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus (IBV). *Adv. Exp. Med. Biol.* 380, 213–219.
- Kapadia, S.U., Rose, J.K., Lamirande, E., Vogel, L., Subbarao, K., Roberts, A., 2005. Long-term protection from SARS coronavirus infection conferred by a single immunization with an attenuated VSV-based vaccine. *Virology* 340, 174–182.
- 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., Wu, T.C., 2004. Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 78 (9), 4638–4645.
- Kitamura, T., Kitamura, T., Tagaya, I., 1967. Immunogenicity of an attenuated strain of vaccinia virus on rabbits and monkeys. *Nature* 215, 1187–1188.
- Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.J., Guamer, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J., Anderson, L.J., 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348 (20), 1953–1966.
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., Farzan, M., 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426 (6965), 450–454.
- Marra, M.A., Jones, S.J., Astell, C.R., Holt, R.A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y.S., Khattraj, J., Asano, J.K., Barber, S.A., Chan, S.Y., Cloutier, A., Coughlin, S.M., Freeman, D., Girm, N., Griffith, O.L., Leach, S.R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S.B., Pandoh, P.K., Petrescu, A.S., Robertson, A.G., Schein, J.E., Siddiqui, A., Smailus, D.E., Stott, J.M., Yang, G.S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T.F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G.A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R.C., Kraiden, M., Petric, M., Skowronski, D.M., Upton, C., Roper, R.L., 2003. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300 (5624), 1399–1404.
- Meeusen, E.N., Scheerlinck, J.P., Wattedegedera, S., Entrican, G., 2004. Advances in mucosal vaccination. *Anim. Health Res. Rev.* 5 (2), 209–217.
- Mizutani, T., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., 2004. Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (4), 1228–1234.
- Nal, B., Chan, C., Kien, F., Siu, L., Tse, J., Chu, K., Kam, J., Staropoli, I., Crescenzo-Chaigne, B., Escriou, N., van der Werf, S., Yuen, K.Y., Altmeyer, R., 2005. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt. 5), 1423–1434.
- Nam, J.H., Wyatt, L.S., Chae, S.L., Cho, H.W., Park, Y.K., Moss, B., 1999. Protection against lethal Japanese encephalitis virus infection of mice by immunization with the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus expressing JEV p3M and E genes. *Vaccine* 17 (3), 261–268.
- Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Oshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H., Takemori, T., 2005. Immunological

- detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58 (2), 88–94.
- Peiris, J.S., Lai, S.T., Poon, L.L., Guan, Y., Yam, L.Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C., Chan, K.H., Tsang, D.N., Yung, R.W., Ng, T.K., Yuen, K.Y., 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361 (9366), 1319–1325.
- Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.D., Peret, T.C., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., Bellini, W.J., 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300 (5624), 1394–1399.
- Ruan, Y.J., Wei, C.L., Ee, A.L., Vega, V.B., Thoreau, H., Su, S.T., Chia, J.M., Ng, P., Chiu, K.P., Lim, L., Zhang, T., Peng, C.K., Lin, E.O., Lee, N.M., Yee, S.L., Ng, L.F., Chee, R.E., Stanton, L.W., Long, P.M., Liu, E.T., 2003. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet* 361 (9371), 1779–1785.
- Seo, S.H., Wang, L., Smith, R., Collisson, E.W., 1997. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *J. Virol.* 71 (10), 7889–7894.
- Someya, K., Xin, K.Q., Matsuo, K., Okuda, K., Yamamoto, N., Honda, M., 2004. A consecutive priming-boosting vaccination of mice with simian immunodeficiency virus (SIV) gag/pol DNA and recombinant vaccinia virus strain DIs elicits effective anti-SIV immunity. *J. Virol.* 78 (18), 9842–9853.
- Stittelaar, K.J., Wyatt, L.S., de Swart, R.L., Vos, H.W., Groen, J., van Amerongen, G., van Binnendijk, R.S., Rozenblatt, S., Moss, B., Osterhaus, A.D., 2000. Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies. *J. Virol.* 74, 4236–4243.
- Storch, G.A., 2001. Diagnostic virology. In: David, P.M.H., Knipe, M. (Eds.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 493–531.
- Subbarao, K., McAuliffe, J., Vogel, L., Fahle, G., Fischer, S., Tatti, K., Packard, M., Shieh, W.J., Zaki, S., 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 (7), 3572–3577.
- Sutter, G., Moss, B., 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10847–10851.
- Sutter, G., Wyatt, L.S., Foley, P.L., Bennink, J.R., Moss, B., 1994. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12, 1032–1040.
- Tagaya, I., Kitamura, T., Sano, Y., 1961. A new mutant of dermiovaccinia virus. *Nature* 192, 381–382.
- Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., 2004. A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int. Immunol.* 16 (10), 1423–1430.
- Weingartl, H., Czub, M., Czub, S., Neufeld, J., Marszal, P., Gren, J., Smith, G., Jones, S., Proulx, R., Deschambault, Y., Grudeski, E., Andonov, A., He, R., Li, Y., Copps, J., Grolla, A., Dick, D., Berry, J., Ganske, S., Manning, L., Cao, J., 2004. Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. *J. Virol.* 78 (22), 12672–12676.
- Weisz, O.A., Swift, A.M., Machamer, C.E., 1993. Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 122 (6), 1185–1196.
- Wyatt, L.S., Shors, S.T., Murphy, B.R., Moss, B., 1996. Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* 14 (15), 1451–1458.
- Xiao, X., Chakraborti, S., Dimitrov, A.S., Gramatikoff, K., Dimitrov, D.S., 2003. The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (4), 1159–11564.
- Yang, Z.Y., Kong, W.P., Huang, Y., Roberts, A., Murphy, B.R., Subbarao, K., Nabel, G.J., 2004. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 428 (6982), 561–564.
- Yang, Z.Y., Werner, H.C., Kong, W.P., Leung, K., Traggiai, E., Lanzavecchia, A., Nabel, G.J., 2005. Evasion of antibody neutralization in emerging severe acute respiratory syndrome coronaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (3), 797–801.
- Yoshizawa, I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T.A., Takemori, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., 2001. Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. *Vaccine* 19 (20–22), 2995–3003.
- You, J., Dove, B.K., Enjuanes, L., DeDiego, M.L., Alvarez, E., Howell, G., Heinen, P., Zambon, M., Hiscox, J.A., 2005. Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt. 12), 3303–3310.
- Zakhartchouk, A.N., Viswanathan, S., Mahony, J.B., Gauldie, J., Babiuk, L.A., 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein expressed by an adenovirus vector is phosphorylated and immunogenic in mice. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt. 1), 211–215.
- Zhao, P., Cao, J., Zhao, L.J., Qin, Z.L., Ke, J.S., Pan, W., Ren, H., Yu, J.G., Qi, Z.T., 2005. Immune responses against SARS-coronavirus nucleocapsid protein induced by DNA vaccine. *Virology* 331 (1), 128–135.
- Zhi, Y., Kobinger, G.P., Jordan, H., Suchma, K., Weiss, S.R., Shen, H., Schumer, G., Gao, G., Boyer, J.L., Crystal, R.G., Wilson, J.M., 2005. Identification of murine CD8 T cell epitopes in codon-optimized SARS-associated coronavirus spike protein. *Virology* 335 (1), 34–45.
- Zhu, M.S., Pan, Y., Chen, H.Q., Shen, Y., Wang, X.C., Sun, Y.J., Tao, K.H., 2004. Induction of SARS-nucleoprotein-specific immune response by use of DNA vaccine. *Immunol. Lett.* 92 (3), 237–243.

SARSコロナウイルス研究の最前線

Advances in SARS-coronavirus research



石井孝司(写真) 水谷哲也

Koji Ishii¹ and Tetsuya Mizutani²

国立感染症研究所ウイルス第二部¹, 同ウイルス第一部²

◎2002年の冬、アジアを中心に SARS (severe acute respiratory syndrome) が大流行した。SARS ウイルスは驚くべき速さで全ゲノム配列が決定され、コロナウイルス (CoV) に属することがわかった。2003年6月に流行は収束し、その後は実験室での管理が不十分であったための感染がほとんどで、幸いにも感染の広がりは見られていない。しかし、SARS-CoV の自然宿主はいまだにはっきりせず、今後ふたたび SARS の流行が起こる可能性が消えたわけではない。最近になって、このウイルスのどの遺伝子が病原性にかかわっているのかについて明らかになりつつあり、サルやマウスを使ったワクチン効果に関する論文もあいついで発表され、SARS の研究は基礎から応用まで幅広く展開している。本稿ではとくに分子生物学的手法を用いた病原性の解明とワクチン開発を中心に、最新の情報を提供したい。



Key word : SARS (重症急性呼吸器症候群), コロナウイルス, 病原性, アポトーシス, ワクチン

2002年11月に、中国広東省で発熱と呼吸器症状を主訴とする原因不明の新型肺炎が出現し、近年の飛行機を利用した旅行を介して世界各国に広まった。この感染症は重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome : SARS) とよばれ、症状の重篤さと致死率の高さから、人類に対する深刻なあらたな脅威となった。この世界的な SARS の大流行に対し WHO を中心とする全世界的な協力体制が敷かれ、原因ウイルスが新種のコロナウイルス (SARS-coronavirus : SARS-CoV) であることが明らかにされた^{1,2)}。さらに、SARS-CoV の完全な遺伝子配列が決定された結果、SARS-CoV は既知のコロナウイルスとは異なるグループに分類されている。2003年6月に流行が収束した後、中国、台湾、シンガポールで少数の患者発生は報告されたが、そのほとんどは実験室での管理が不十分であったための感染であり、幸いにも感染の広がりは見られていない。しかし、SARS-CoV の自然宿主はいまだにはっきりせず、今後ふたたび SARS の流行が起こる可能性が消えたわけではない。

現在までに、ELISA や PCR 法などによる診断

法は確立され、レトロスペクティブな病原性の解析も行われている。最近になって、このウイルスのどの遺伝子が病原性にかかわっているのかについても明らかになりつつあり、SARS の研究は基礎から応用まで幅広く展開している。

● SARS-CoV のウイルス学的特徴

SARS-CoV はコロナウイルスに属する直径約 100~200 nm のウイルスである。表面には約 20 nm のスパイクをもち、粒子内には約 30 kb のプラス鎖 RNA ゲノムに nucleocapsid (N) 蛋白質が結合して螺旋状のヌクレオキャプシドを形成している (図 1)。エンベロープには M (membrane) 蛋白と E (envelope) 蛋白が存在しており、粒子表面の特徴的な 20 nm ほどのスパイクは S (spike) 蛋白からなっている。ウイルス中和エпитオプの多くは S 蛋白質に存在することがわかっている。

ウイルス感染の際には膜融合によりウイルスが細胞内に侵入するが、SARS-CoV では S 蛋白が膜融合に重要な役割を果たしている。S 蛋白の細胞外ドメインは SARS-CoV が endosomal pathway で

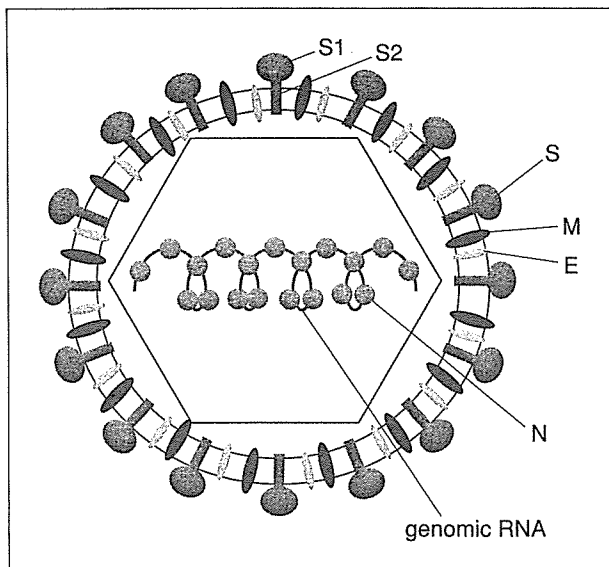


図1 SARS-CoVの粒子構造

細胞内に侵入した後に、酸性環境中で trypsin-like protease の作用を受けて S1 と S2 の 2 つのサブユニットに開裂し、融合活性を發揮するものと考えられている。松山らは、細胞外に存在するプロテアーゼが SARS-CoV 粒子の S 蛋白を細胞外でサブユニットに開裂させると感染効率が劇的に上

昇することを示し、たとえば肺の炎症の際に出現するエラスターゼが S 蛋白に作用して感染効率を上昇させ、感染時の肺損傷に重要な役割を果たしている可能性を示唆している³⁾。SARS コロナウイルスのレセプターはアンジオテンシン変換酵素の ACE-2 であることが明らかになった⁴⁾。

ACE はアンジオテンシン I を II に変換することにより活性化させる酵素として知られているが、ACE-2 によって変換されたアンジオテンシンは活性を失っていると考えられている。ACE-2 はレニン-アンジオテンシン系を負に調節することにより血管透過性を抑制し、肺保護作用をもつことが明らかにされている。SARS-CoV は、ACE-2 の発現を抑制することによりアンジオテンシン II のレベルを上昇させ、急性肺傷害を増悪させるという興味深い知見が 2005 年に久場らによって示された⁵⁾。最近、SARS-CoV のもうひとつのレセプターとして CD209L(L-SIGN) が同定され、注目されている⁶⁾。

SARS-CoV 感染培養細胞で起こる現象
SARS-CoV レセプターの ACE-2 は多くの組織

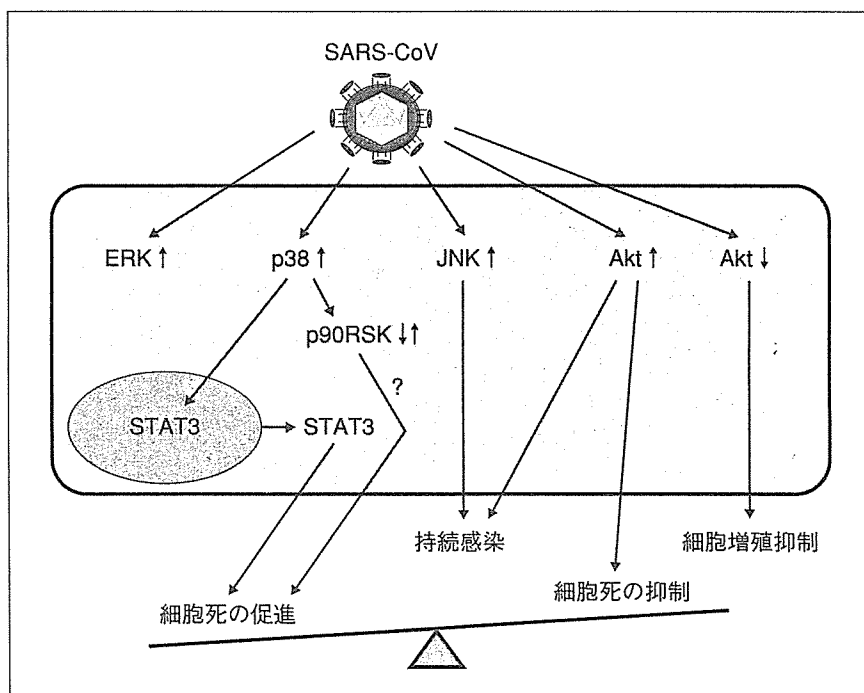


図2 SARS-CoV 感染細胞内のシグナル伝達

Vero E6 細胞に SARS-CoV が感染したときに活性化あるいは不活性化されるシグナル伝達をあらわした。Akt は細胞死を抑制する方向に働くが最終的には p38 MAPK などの活性化により 48 時間までにはほとんどの細胞は死滅する。Akt と JNK の活性化により生き残ったわずかの細胞が持続感染に移行する。Akt の急激な脱リン酸化は細胞増殖の抑制の原因のひとつである。

に分布していることが知られているが、肺・心臓・小腸・腎などでは高発現している。SARS-CoV はじめて分離された細胞(サル腎細胞: Vero)ではこの ACE-2 が発現している。また、著者らが研究に用いている Vero 細胞のクローンである Vero E6 細胞ではさらに高い発現がみられる。ウイルスがこれら培養細胞に感染すると、細胞の増殖阻害(細胞周期の停止)、約 24 時間後にアポトーシス、さらに培養を続けると持続感染細胞の増殖といった現象が観察される。これらの現象について細胞内シグナル伝達経路という観点から解明した(図 2)。

● アポトーシスのメカニズム

SARS-CoV が感染した Vero E6 細胞では、すくなくとも 18 時間後に活性型 caspase-6, -7, -3 が検出され、24 時間後には DNA ラダーが検出される⁷⁾。感染細胞がプレートから剥がれるという細胞障害の現象も 24 時間後に観察される。一般にアポトーシスはミトコンドリアの障害を介して進行することが多いので、caspase-9, Bad などの活性化が重要であるが、いまのところ SARS-CoV に感染した Vero E6 細胞ではこれらの蛋白質の活性化は顕著ではなく、ミトコンドリアを介さないアポトーシスのメカニズムがメインであると考えられる。また、フラビウイルスでは感染細胞中で小胞体ストレスによりアポトーシスが起ることが知られているが、著者らが調べるかぎりでは SARS-CoV 感染細胞では小胞体ストレスは関与していない。

では、Vero E6 細胞中ではどのようなメカニズムでアポトーシスが進行するのであろうか。この鍵となるシグナル伝達経路をみつけるために、著者らはウイルス感染細胞と非感染細胞から 18 時間後に蛋白質を抽出し、約 200 種類の抗体を用いて Western blot 解析を行った。そして感染細胞で特徴的なバンドが得られた蛋白質についてさらに詳細な解析を行った。その結果、まず ERK, JNK, p38 といった MAPK がリン酸化・活性化していることが明らかとなった^{7,8)}。そこで、ウイルス感染 1 時間後にそれぞれの阻害剤を添加すると、p38 の阻害剤が顕著に細胞障害を抑制した。高濃度の p38 阻害剤では顕著にアポトーシスも抑制したことが

ら、p38 はアポトーシス促進の鍵であると予想された。

では、p38 の活性化と caspase-6, -7, -3 とはどのようにつながっているのであろうか。いまのところ明らかではないが、著者らはこの問題を解く鍵としてウイルス感染細胞における STAT3 と p90RSK に注目した。これらの蛋白質は抗アポトーシスの働きをすることが知られているが、SARS-CoV 感染 Vero E6 細胞では p38 の活性化がこれらの蛋白質のリン酸化を制御していることを明らかにした。Vero E6 細胞で STAT3 は核内に存在し転写因子として働いていると考えられるが、ウイルス感染後の p38 活性化に伴い脱リン酸化を受けて細胞質へ移行することがわかった⁹⁾。これで STAT3 は抗アポトーシス蛋白質をコードする mRNA を転写できなくなるのである。一方、p90RSK も p38 の活性化に伴いリン酸化の制御を受けるが、結果的にアポトーシスを進行させているのか防御しているのかは明らかではない⁹⁾。

一般論としてウイルス感染細胞では、アポトーシスを進行させるシグナル伝達経路とこれを抑制しようとする経路の両方が活性化して微妙なバランスを保っていると考えられる。そして前者の経路が優位になると、結果的にアポトーシスによる細胞死という結末を迎える。SARS-CoV が Vero E6 細胞に感染すると p38 のシグナル伝達経路を中心として細胞死を進行させていくが、これを抑制するように働く経路は存在するのであろうか。著者らは PI3K/Akt のシグナル伝達経路に着目して解析を行った。Akt は抗アポトーシスや細胞増殖(周期)を促進させる蛋白質として有名である。Vero E6 細胞(いわゆるコンフルエントの状態)では Akt は脱リン酸化された状態であるが、ここに SARS-CoV を感染させると 8 時間後から 18 時間後くらいまでリン酸化され、その後 24 時間までにはふたたび脱リン酸化状態になる¹⁰⁾。すなわち、活性型 caspase が検出される 18 時間後までは抗アポトーシスの働きをする Akt が活性化され、抗アポトーシスの状態を維持しているが、24 時間後までに脱リン酸化を受けることによりアポトーシスが促進されていると解釈できる。

ウイルスによる細胞増殖の阻害

Vero E6 細胞の密度を薄くして培養し SARS-CoV を感染させると、細胞は増殖を停止して細胞死に至る。ある種のウイルスでは細胞周期を停止することが報告されている。SARS ウイルスが細胞の増殖を抑制するメカニズムを解明すると、Akt が重要な役割を果たしていることがわかった。Akt は増殖に関与する蛋白質なので、細胞密度が薄い場合には高度にリン酸化され、活性化している。このような細胞状態に SARS-CoV を感染させると Akt は速やかに脱リン酸化を受ける¹¹⁾。

面白いことに、細胞密度が高い場合にはウイルス感染により Akt がリン酸化され、脱リン酸化されるという一過性のリン酸化が観察されるのに対して、細胞密度が低い場合にはあらたにリン酸化されることなく脱リン酸化されていく。ここには複雑な Akt のリン酸化制御システムの関与が考えられるが、Akt のリン酸化は細胞側の主導であり、脱リン酸化はウイルス側の主導であることが示唆される。よって、SARS-CoV は Vero E6 細胞において積極的に細胞増殖の抑制とアポトーシスの進行を行っていると考えられる。

転写因子 STAT3 の脱リン酸化による細胞質移行が起こることを述べたが、実際に感染後に転写される mRNA の多くは減少している¹¹⁾。たとえば、p53 は転写抑制され、蛋白質としての半減期もきわめて短いので、速やかに消失していく。細胞の標準蛋白質としてよく使われる GAPDH の mRNA もウイルス感染により減少する。逆に転写量が増加する遺伝子は少ないが、転写量の変わらない遺伝子は少なからずある。著者らは、ヒストンのメチル化などの制御が関与しているのではないかと考えて検討している。ウイルス蛋白質のうちヌクレオキャプシド(N)や 7a が細胞周期を停止させているという報告があるが^{12,13)}、いずれもウイルスが感染しない細胞への過剰発現の実験系である。

ウイルス持続感染細胞の確立

持続感染が疑われる SARS 患者が存在するという報告がある。いまのところ、この患者からの再発や感染についての情報はないので、SARS という疾患全体からながめた場合にどれくらい重要な

のかは不明である。しかし、著者らも含めて4つの研究室から独立して培養細胞における持続感染の報告があり¹⁴⁻¹⁷⁾、SARS-CoV はすくなくとも条件がそろえば持続感染を起こしうるウイルスであることは間違いないといえる。

持続感染細胞では興味ある現象がみられる。まず、細胞集団の最大5%の細胞がアポトーシスによる死を逃れて生き残る。生き残った細胞はウイルスの複製やウイルス粒子の産生を許しながら増殖する。このとき、欠損干渉ウイルスを産生しないが、変異のあるウイルスは存在しているようである。細胞表面にウイルスレセプターは検出されないで、ウイルスの重感染は成立しにくいと考えられている。よって細胞分裂に伴いウイルス遺伝子量や粒子の産生量は減っていく。

では、持続感染成立の要因はウイルス側にあるのであろうか、細胞側であろうか。著者らは Vero E6 細胞から100近くのクローン細胞を樹立しウイルス感染による持続感染細胞の出来具合を観察した¹⁴⁾。すると持続感染しやすい細胞とできない細胞があることがわかった。さらに、抗アポトーシスの重要な因子として Akt のリン酸化について述べたが、持続感染しやすい細胞で Akt は18時間でリン酸化を受け、持続感染できない細胞ではリン酸化されていなかった。このことは、すくなくとも Akt のリン酸化が持続感染の成立には必要であることを示している。さらに、ウイルス感染細胞に Akt や JNK の阻害剤を添加すると持続感染が成立しなくなることも明らかとなり、Akt に加えて JNK も重要な役割を果たしていることがわかった。

また、持続感染細胞を7回継代したものを解析すると、抗アポトーシスの働きをする Bcl-xL のバンドパターンに変化が生じた(投稿中)。これはおそらく活性型にリン酸化した Bcl-xL と考えられ、細胞死から免れるために Bcl-xL が関与していることを示唆している。

シグナル伝達にかかわるウイルスの蛋白質

われわれの興味はどのウイルス蛋白質が細胞のシグナル伝達を活性化しているか、ということにある。SARS ウイルスの N 蛋白質はマルチファンクショナルな働きがあり、COS-1 細胞で JNK, p38,

Aktなどのシグナル伝達を活性化しているという報告がある¹⁸⁾。しかし、COS-1細胞にはSARS-CoVは感染できないので、本当にN蛋白質がこれらのシグナル伝達に関与しているかどうか不明である。そこで著者らは、Vero E6細胞にNを発現するようなワクチニアウイルスを感染させた系¹⁹⁾を用いて解析を行った。18時間後のN蛋白質発現細胞ではAktやJNKのリン酸化が検出されたが、p38はほとんどリン酸化されず、COS-1細胞を用いた場合と結果が異なった(投稿中)。

ワクチン開発の現況

2004年、2005年にはSARSの発生は報告されておらず、脅威は去ったかのように思われているが、野生の宿主は完全に同定されておらず、今後ふたたび流行が起こる可能性は否定できない。SARSの予防あるいは治療用ワクチンの開発はいまなお重要な課題である。

不活化したSARS-CoV粒子をワクチンとして用いる実験は、中国ですでにヒトでの臨床試験まで進んでいる。ただ、SARS-CoVの場合は不活化ウイルスワクチン生産のためにはこのような危険なウイルスを大量に培養しなければならず、安全性の点で疑問が投げかけられている。したがって、SARSワクチンとしては、組換え蛋白、ウイルスベクター、DNAワクチンなど安全性の高い技術を用いたワクチン開発が望まれているといえる。S蛋白はウイルスの感染、細胞への侵入に主要な役割を果たす構造蛋白であり、S蛋白に対する抗体が中和活性を示すということからも、ワクチン開発の主要なターゲットと考えられている。S蛋白がレセプター(ACE-2)に結合する、193アミノ酸からなる領域を標的とする抗体は中和活性を有することが示されており²⁰⁾、この領域に相当する蛋白や、この領域を認識する抗体はSARS-CoVの宿主細胞への感染を阻止するワクチンとして有望である。また、構造蛋白のいくつかを組換えバキュロウイルスや哺乳類細胞で発現させ、SARS-CoVのvirus-like particles (VLPs)の作成に成功したという複数の報告がある²¹⁻²³⁾。このVLPは本来のウイルス粒子と同様の構造をもっており、ゲノムが存在しないために感染性はないが、トロピズムは

同等と考えられ、ワクチン開発にきわめて有用であると考えられる。

一方、ウイルスベクターを用いた組換え生ワクチンの開発研究も複数の研究室で進められている。S蛋白のS1フラグメント、M蛋白、N蛋白を発現する3種の組換えアデノウイルスを混合して筋注すると、カニクイザルでSに対する液性免疫とNに対する細胞性免疫が強く誘導された²⁴⁾。ワクチニアウイルスは組換え生ワクチンの有力な候補であり、副作用軽減のために弱毒化された株を用いた研究が進められている。

Bishtらは弱毒株であるMVA株にS蛋白全長を組み込んだ組換えウイルスを作成し、マウスに接種した後にSARS-CoVを感染させたところ、呼吸器でのウイルス増殖が抑制させることを見出した²⁵⁾。著者らのグループも弱毒株DIsにSARS-CoVの構造蛋白遺伝子の全部または一部を組み込んだ組換えウイルスを作成し、マウスに皮下接種または経鼻接種した後にSARS-CoVを経鼻感染させた。その結果、S蛋白を発現する組換えDIsを接種した群では肺でのウイルス増殖が完全に抑えられること、また、その抑制効果は局所での抗SARS-CoV IgGによるもので、IgAによるものではないことが示された¹⁹⁾。

以上の結果から、弱毒化ワクチニアウイルスは組換え生ワクチンの有力な候補である。ただ、S蛋白を発現する組換えMVAをフェレットに接種した場合に肝炎症状が誘導されるという報告があり²⁶⁾、副作用に注意が必要である。他の組換え生ワクチンとしてはパラインフルエンザウイルス²⁷⁾や狂犬病ウイルス²⁸⁾を用いたものもあり、それぞれ動物実験での有効性が示されている。

微生物の抗原情報をコードしたDNAをワクチンとして接種するDNAワクチンはそれ自体には感染性がなく、また設計方法が従来のワクチンに比べて簡便であるという利点がある。この技術を用いたSARSワクチンの研究も進んでいる。S蛋白を発現するプラスミドをマウスに投与することで、SARS-CoVに対する中和抗体や細胞性免疫が誘導でき、肺でのウイルス増殖を強く抑制できるという報告がある²⁹⁾。一方、N蛋白を発現するプラスミドをDNAワクチンとして用いた実験も報

告されている。

Kimらは calreticulin を結合させた抗原は CD8T 細胞への抗原提示能が劇的に上昇することを見出し、この技術を用いて calreticulin と N の融合蛋白を発現するプラスミドを DNA ワクチンとして用いる実験を行った。このプラスミドをマウスに投与すると SARS-CoV 感染後のウイルス価は大きく減少した³⁰⁾。同様の報告は複数あり、N 蛋白を発現するプラスミドを用いた DNA ワクチンも有望と考えられる。岡田らは M 蛋白を発現するプラスミドと N 蛋白を発現するプラスミドの組合せが SARS-CoV に対する細胞性免疫を強く誘導することをマウスの系で示しており、M 蛋白もワクチン開発のターゲットとなりうると考えられる³¹⁾。

おわりに

本稿ではとくに分子生物学的手法を用いた病原性の解明とワクチン開発を中心にして、SARS 研究の最前線についてまとめてきた。2004 年、2005 年には SARS の発生は報告されていないが、もはやふたたび大流行が起こる可能性はないのであろうか。SARS 患者の発生地である広東省での検査では、とくに野生動物を取り扱う業者で SARS-CoV に対する抗体保有率が非常に高いことが知られており³²⁾、このことから、野生動物のなかに自然宿主がいる可能性と、ヒトのなかに病原性の弱い SARS-CoV が存在しており、何らかの理由で強毒化してアウトブレイクを引き起こした可能性が考えられる。現在までにハクビシンやタヌキをはじめいくつかの野生動物からヒトに感染した SARS-CoV に非常に類似したウイルスが検出され、宿主候補として報告されているが、自然宿主であるのか、感染にどのような役割を果たしているのかを含め、現時点ではまだ科学的に確認されていない。今後の SARS の流行に対する対策を考えるうえで宿主の問題は非常に重要であり、この問題が解明

されないかぎり SARS 再燃の可能性は消えないであろう。

文献

- 1) Rota, P. A. et al. : *Science*, **300** : 1394-1399, 2003.
- 2) Marra, M. A. et al. : *Science*, **300** : 1399-1404, 2003.
- 3) Matsuyama, S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 12543-12547, 2005.
- 4) Li, W. et al. : *Nature*, **426** : 450-454, 2003.
- 5) Kuba, K. et al. : *Nat. Med.*, **11** : 875-879, 2005.
- 6) Jeffers, S. A. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 15748-15753, 2004.
- 7) Mizutani, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319** : 1228-1234, 2004.
- 8) Mizutani, T. et al. : *FEBS Lett.*, **577** : 187-192, 2004.
- 9) Mizutani, T. et al. : *FEBS Lett.*, **580** : 1417-1424, 2006.
- 10) Mizutani, T. et al. : *Virology*, **327** : 169-174, 2004.
- 11) Mizutani, T. et al. : *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **46** : 236-243, 2006.
- 12) Surjit, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **281** : 10669-10681, 2006.
- 13) Yuan, X. et al. : *Virology*, **346** : 74-85, 2006.
- 14) Mizutani, T. et al. : *Biochem. Biophys. Acta*, **1741** : 4-10, 2005.
- 15) Chan, P. K. et al. : *J. Med. Virol.*, **74** : 1-7, 2004.
- 16) Palacios, G. et al. : *Chin. Med. J. (Engl)*, **118** : 451-459, 2005.
- 17) Yamate, M. et al. : *Microbes. Infect.*, **7** : 1530-1540, 2005.
- 18) Surjit, M. et al. : *Biochem. J.*, **383** : 13-18, 2004.
- 19) Ishii, K. et al. : *Virology*. (in press)
- 20) He, Y. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325** : 445-452, 2004.
- 21) Ho, Y. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **318** : 833-838, 2004.
- 22) Mortola, E. and Roy, P. : *FEBS Lett.*, **576** : 174-178, 2004.
- 23) Huang, Y. et al. : *J. Virol.*, **78** : 12557-12565, 2004.
- 24) Gao, W. et al. : *Lancet*, **362** : 1895-1896, 2003.
- 25) Bisht, H. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 6641-6646, 2004.
- 26) Weingartl, H. et al. : *J. Virol.*, **78** : 12672-12676, 2004.
- 27) Buchholz, U. J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 9804-9809, 2004.
- 28) Faber, M. et al. : *J. Gen. Virol.*, **86** : 1435-1440, 2005.
- 29) Yang, Z. Y. et al. : *Nature*, **428** : 561-564, 2004.
- 30) Kim, T. et al. : *J. Virol.*, **78** : 4638-4645, 2004.
- 31) Okada, M. et al. : *Vaccine*, **23** : 2269-2272, 2005.
- 32) Guan, Y. et al. : *Science*, **302** : 276-278, 2003.

* * *

肝炎ウイルスVLPの作製と応用

* 国立感染症研究所ウイルス第2部
石井孝司
李 天成

多くのウイルスで、主要な構造蛋白を発現させることでウイルス様粒子(virus-like particles ; VLP)が形成されることが知られている。このVLPは、本来のウイルス粒子と同様の構造を持っており、ゲノムが存在しないために感染性はないがトロピズムは同等と考えられる。したがって感染細胞への取り込み、細胞内輸送もネイティブなウイルスとほぼ同じであり、ウイルスの吸着、侵入機構の解析や、ウイルス

測定系やワクチン開発に極めて有用である。本稿では、C型およびE型肝炎ウイルスのVLP作成と応用の現状についてまとめた。

1. C型肝炎ウイルス(HCV)

HCVは輸血後肝炎を起こす小型のエンベロープウイルスである。ゲノムは約9.6kbのプラス一本鎖RNAであり、約3,000アミノ酸からなるポリプロテインをコードする1つのopen reading frame (ORF)を

有している。この前駆体蛋白質がプロセッシングを受けることにより、ウイルス粒子を形成する構造蛋白質(core, E1, E2)とウイルス粒子に含まれない非構造蛋白質(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)が産生される¹⁾。ゲノムの5'末端側には341塩基からなる非翻訳領域が存在し、この領域にはリボゾームが直接結合しHCV蛋白質の翻訳を開始するためのIRESが存在する。ゲノムの3'末端側に

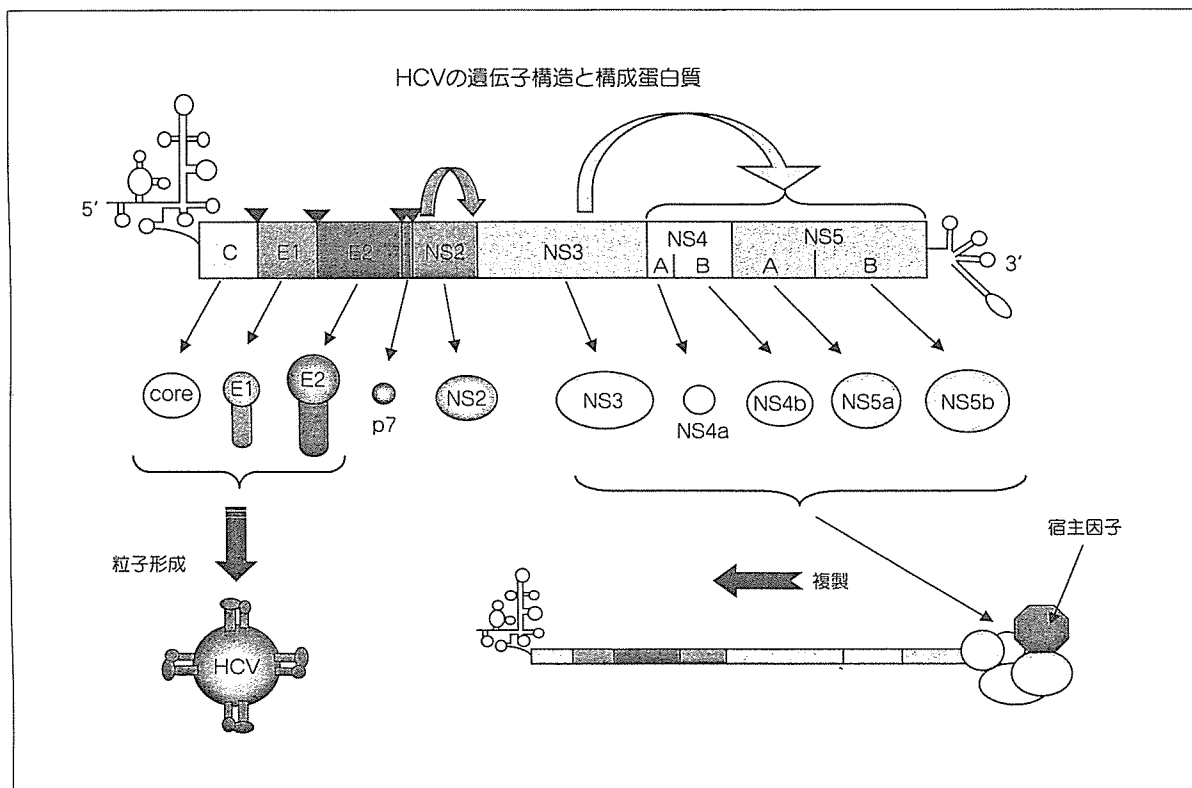


図1 HCVのウイルスゲノム構造
1本のポリプロテインがプロセッシングを受けて3つの構造蛋白と6つの非構造蛋白に開裂する。VLPは3つの構造蛋白を発現させることで形成される。

* 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
E-mail kishii@nih.gov.jp

存在する非翻訳領域は、可変領域、poly(U/UC) stretchおよび3' X領域からなり、その長さは200～500塩基と多様である(図1)。

HCVは最近までウイルスを効率よく増殖させる培養細胞系が存在しなかったため、粒子形成機構や細胞への吸着、侵入機構の解析にはVLPの作成が強く望まれていたが、1998年にNIHのBaumertらによって初めて形成が報告された²⁾。彼らは組換えバキュロウイルスを用いてHCVの構造蛋白(core, E1, E2)を昆虫細胞Sf9で発現させ、感染細胞内に直径約40～60nmのウイルス粒子様構造物が形成されること、この構造物が抗HCV抗体により認識されることを示した²⁾。同グループはこのHCV VLPの応用研究を活発に進めており、精製したVLPをマウスに投与するとHCVに対する液性、細胞性免疫が誘導され³⁾、HCV蛋白を発現する組換えワクチニアウイルスの感染から防御されることを示している⁴⁾。また、最近では霊長類モデルとしてヒヒを用いたワクチン実験を行い、やはりこのVLPの投与によって液性および細胞性免疫が強く誘導できることを示した⁵⁾。このVLPはC型肝炎ワクチンの有望な候補と考えられる。

昆虫と哺乳動物では翻訳後修飾

に違いがあるため、哺乳動物に感染するエンベロープウイルスのVLPは、哺乳動物細胞を用いて作成した方がよりネイティブなウイルスに近い構造を取ると考えられる。哺乳動物細胞を使用したHCVのVLP作成の報告としては、水泡性口内炎ウイルス⁶⁾やセムリキ森林ウイルス⁷⁾を用いたものがある。一方松尾らは、バキュロウイルスが哺乳動物細胞に一過性に感染する性質を利用し、種々の哺乳動物細胞でのVLP作成を報告している⁸⁾(図2)。

ヒト肝癌由来細胞株FLC4から生成したVLPは、昆虫細胞で作成されたVLPと異なり、HCVのレセプターの1つとして知られるCD81に対する抗体を添加すると肝細胞への結合が阻止された。このことは、VLPのトロピズムが発現に用いた細胞に依存することを示している。ウイルスのトロピズムの研究や、検出系やワクチン開発への応用の際に、発現系選択の重要性は留意する必要があると考えられる。

2. E型肝炎ウイルス(HEV)

HEVは、経口伝播型肝炎を起こすエンベロープを持たない小型球形ウイルスである。ゲノムは約7.2Kbのプラス一本鎖RNAで、5'末端にはcap構造が、3'末端には

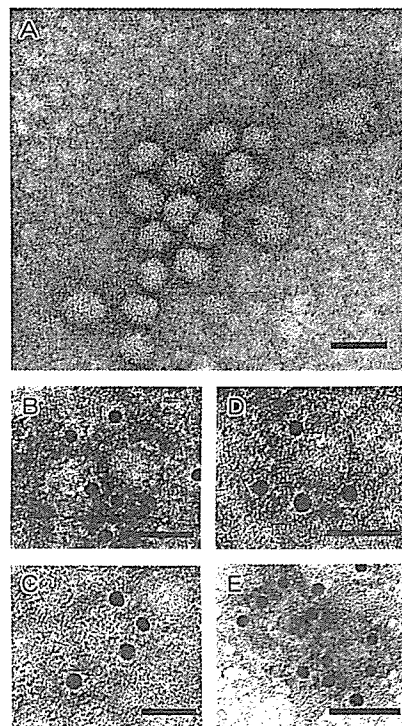


図2

A ; ヒト肝癌由来細胞FLC4から得られたHCVのVLPの電子顕微鏡写真。

B, C ; HCVの抗E1抗体を用いた金コロイド免疫電顕写真。

D, E ; 同様に抗E2抗体を用いた金コロイド免疫電顕写真。バーは50nm。

大阪大学、松浦善治教授のご好意による。

ポリアデニル酸が付加されている。HEVの遺伝子上には、3つのORFが一部重複しながら存在する⁹⁾。ORF1は非構造蛋白をコードし、ORF2は72 kDaの構造蛋白をコードする領域である。ORF3はORF1とORF2の間に位置し、蛋白としての機能は不明である(図3)。

HEVはいまだ増殖可能な細胞培養系が存在しない。信頼性の高い診断法の樹立およびワクチン開発のため、ネイティブなウイルスと非常に近い構造、免疫原性を持ち、かつ、大量産生、簡単に精製できる構造蛋白の発現が強く求められ

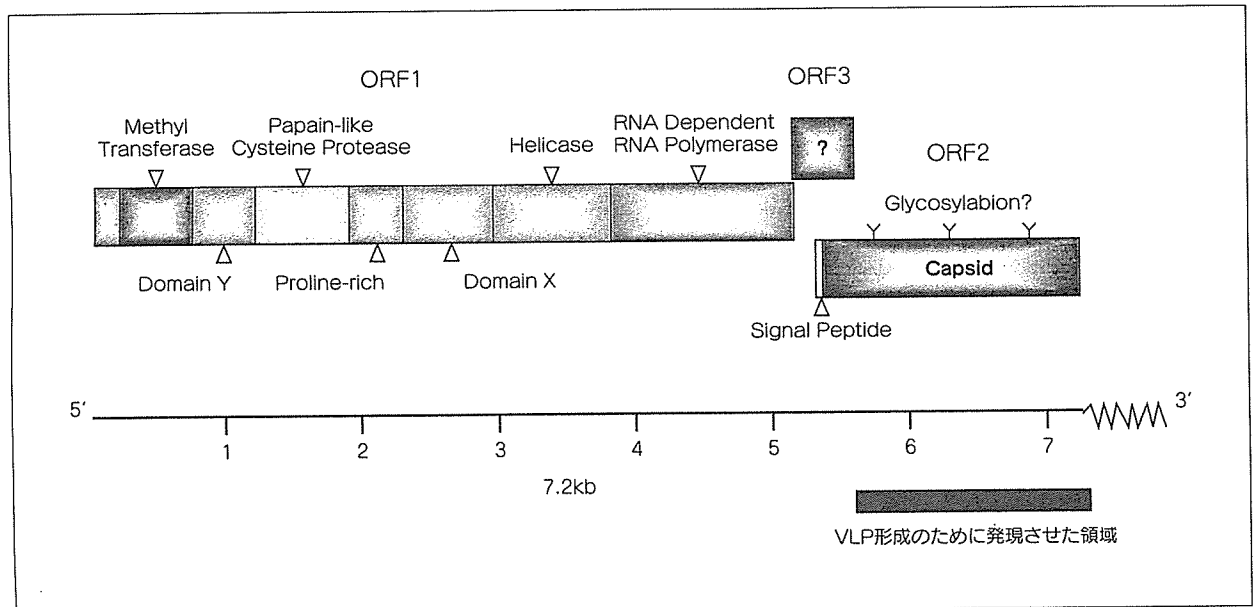


図3 HEVのウイルスゲノム構造

ORF2のN端から111アミノ酸を欠失させたフラグメントを昆虫細胞で発現させることでVLPが効率よく形成された。

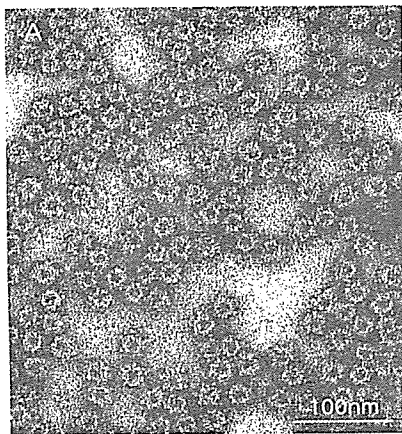
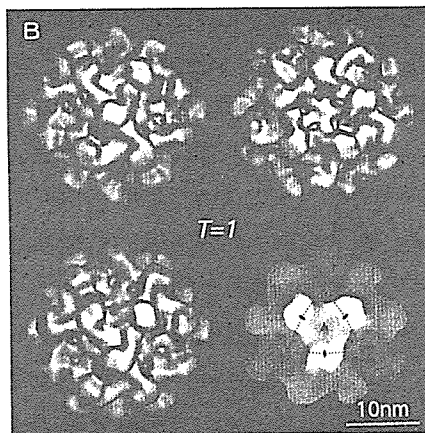


図4A HEVのVLPの電子顕微鏡写真：直径は約23～24nm

図4B クリオ電子顕微鏡とコンピュータ画像解析で作成した中空粒子の3D構造



ている。我々は、ヒト由来HEVミヤンマー株のORF2のN末端から111アミノ酸を欠失させたフラグメントを発現する組換えバキュロウイルスを作成し、昆虫細胞Tn5に感染させたところ、平均密度は 1.285g/cm^3 、直径約23～24nmのVLPが大量に得られた(図4A)。

この粒子の生産量は高く($1\text{mg}/10^7$ cells)、ショ糖密度勾配および塩化セシウム密度勾配遠心によって簡単に高純度の抗原を精製することができた¹⁰⁾。クリオ電子顕微鏡撮影と画像解析によって三次構造解析を行った結果、この粒子は $T=1$ であり、60のサブユニットが集合

して形成され、ネイティブなウイルス粒子に近い構造を保持していた¹¹⁾(図4B)。

このVLPを用いた抗体ELISAは、E型肝炎患者血清中、ならびに感染サル血清中に誘導されるHEV特異的IgM、IgAおよびIgG抗体を容易に、迅速、かつ高感度検出することができ、臨床診断や感染状況の調査などに非常に有用である。この方法を用いて日本における健常人の抗体保有率を調査した結果、地域間で差がみられるものの、1993年時点の平均抗体保有率は5.4%で、特に30歳以下ではほとんど抗体を保有していないことが明らかになった¹²⁾。

E型肝炎は主に発展途上国で多発するといわれているが、近年、我が国でも輸入感染例としてしばしば見られ、ワクチンの開発は発展

途上国だけの問題でなく、日本を始め先進各国にとっても必要になりつつある。マウスにこのVLPを経口あるいは腹腔投与したところ、投与ルートに関わらず特異的にHEVに対する免疫反応を誘導した。特筆すべきは、経口投与において腹腔投与では認められなかった腸管IgAの産生が誘導されたことである。腸管IgA抗体は粘膜免疫に重要な役割を果たしていることが知られているので、HEVの感染防御にも効果が期待される¹³⁾。

さらに、HEVに感受性を示すカニクイザルにVLPを経口投与したところ、血中IgG抗体が誘導され、ネイティブなウイルスによるチャレンジに対しても感染防御効果が認められた¹⁴⁾。ワクチンの開発はまだ初期の段階にあるが、HEVをVLPとして発現することに成功したことをきっかけにして、ワクチン研究が飛躍的に発展することが期待される。

参 考 文 献

- 1) Matsuura Y, and Miyamura T. The molecular biology of hepatitis C virus. *Semin Virol* 1993; 4: 297-304.
- 2) Baumert TF, Ito S, Wong DT, and Liang TJ. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 1998; 72 (5): 3827-36.
- 3) Lechmann M, Murata K, Sato J, Vergalla J, Baumert TF, and Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 2001; 34(2): 417-23.
- 4) Murata K, Lechmann M, Qiao M, Gunji T, Alter HJ, and Liang TJ. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(11): 6753-8.
- 5) Jeong SH, Qiao M, Nascimbeni M, Hu Z, Rehmann B, Murthy K, and Liang TJ. Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates. *J Virol* 2004; 78 (13): 6995-7003.
- 6) Ezelle HJ, Markovic D, and Barber GN. Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector. *J Virol* 2002; 76(23): 12325-34.
- 7) Blanchard E, Brand D, Trassard S, Goudeau A, and Roingard P. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol* 2002; 76(8): 4073-9.
- 8) Matsuo E, Tani H, Lim C, Komoda Y, Okamoto T, Miyamoto H, Moriishi K, Yagi S, Patel AH, Miyamura T, and Matsuura Y. Characterization of HCV-like particles produced in a human hepatoma cell line by a recombinant baculovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340(1): 200-8.
- 9) Reyes GR, Huang CC, Tam AW, and Purdy MA. Molecular organization and replication of hepatitis E virus (HEV). *Arch Virol* 1993; Suppl 7: 15-25.
- 10) Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsu-mi M, Razak MA, Uchida T, Takeda N, and Miyamura T. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 1997; 71(10): 7207-13.
- 11) Xing L, Kato K, Li T, Takeda N, Miyamura T, Hammar L, and Cheng RH. Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T=1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* 1999; 265 (1): 35-45.
- 12) Li TC, Zhang J, Shinzawa H, Ishibashi M, Sata M, Mast EE, Kim K, Miyamura T, and Takeda N. Empty virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to hepatitis E virus. *J Med Virol* 2000; 62(3): 327-33.
- 13) Li T, Takeda N, and Miyamura T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine* 2001; 19(25-26): 3476-84.
- 14) Li TC, Suzuki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, and Takeda N. Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine* 2004; 22(3-4): 370-7.