

(様式4)

学位論文の内容の要旨

上野 葉 印

(学位論文のタイトル)

Eight-amino-acid sequence at the N-terminus of SARS-CoV-2 nsp1 is involved in stabilizing viral genome replication

(SARS-CoV-2のnsp1のN末端にある8アミノ酸配列はウイルスゲノム複製の安定化に関与する)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

コロナウイルス (CoV) は、コロナウイルス亜科コロナウイルス科に属するエンベロープを持つウイルスであり、そのゲノムは1本鎖のRNAである。Severe acute respiratory syndrome (SARS)-CoV-2は、新興感染症であるCoronavirus disease-19 (COVID-19)の原因病原体であり、世界中に拡大しパンデミックを引き起こした。コロナウイルスは宿主細胞に感染すると、オープンリーディングフレーム (ORF) 1abから、非構造タンパク質 (nsp) を16個産生する。コロナウイルスのnsp1はORF1abの5'末端にコードされており、細胞質に局在する。nsp1の機能は、リボソームを介した宿主タンパク質抑制と宿主mRNA分解であることが知られている。今回、日本で分離されたSARS-CoV-2 I004株由来の8アミノ酸 (GDSVEEVL) 残基が欠損していたnsp1に着目して、そのタンパク質抑制機能、ウイルス複製と病原性に及ぼす影響を解析した。さらに、GDSVEEVL残基がウイルスの5' UTRの欠損に関与することを見いだした。

まず、nsp1のGDSVEEVLのアミノ酸領域が、nsp1によるタンパク質抑制機能に影響を及ぼすか検討するために、pCAGGS哺乳動物細胞発現ベクターを用いて、nsp1-delta8発現プラスミドを作製した。293T細胞に、nsp1-delta8発現プラスミドとルシフェラーゼ発現プラスミドを共発現させた後、nsp1によるタンパク質抑制能を細胞内のルシフェラーゼ活性値を指標に評価した。その結果、nsp1-delta8は、wtと同様に顕著にタンパク質の合成を抑制した。次に、nsp1が引き起こすRNA分解機能にGDSVEEVLのアミノ酸領域が及ぼす影響を解析するために、293T細胞に合成nsp1-delta8 RNAをルシフェラーゼ発現プラスミドと共に細胞内に導入した。その後、プラスミドDNAからの転写を停止させるためにアクチノマイシンDを処理し、8時間後にルシフェラーゼRNAの量をノーザンブロットにて解析した。wt存在下におけるルシフェラーゼRNAの量はコントロールに比べて減少していた。nsp1-delta8存在下でもwtと同様にルシフェラーゼ RNA量が減少していた。このことから、nsp1-delta8は、wtと同程度にタンパク質阻害能とRNA分解能の両方を保持していると考えられた。

次に、GDSVEEVLのアミノ酸領域がウイルスの複製および病原性に及ぼす影響を解析するために、WK521株を用いて野生型の組換えウイルス (r-wt) とGDSVEEVL欠損ウイルス (r-delta8) の作製を行い、組換えウイルスの回収に成功した。

そこで、4週齢雄のシリアンハムスターに1,000 TCID₅₀/headのr-wtウイルスまたはr-

delta8ウイルスを経鼻接種した。4日後に肺組織中のウイルス遺伝子量をリアルタイムPCRにて、感染性ウイルス量をTCID50法にて解析した。また、組織学的解析にて炎症細胞の浸潤とウイルス感染細胞数を調べた。r-delta8ウイルス感染肺組織内におけるN遺伝子量と感染性ウイルス量は、r-wtウイルス感染肺組織内に比べて減少していた。さらに、r-delta8ウイルス感染肺組織における炎症像は軽度であり、ウイルスのNタンパク質陽性細胞数はr-wtウイルス感染肺組織の陽性細胞数より少なかった。このことから、GDSVEEVLのアミノ酸領域は、ハムスター肺における病原性に関わっている可能性が示唆された。

GDSVEEVLがどのように病原性に関与しているか調べるため、感染肺組織の宿主遺伝子発現をRNA-seqで解析した。r-wtウイルスとr-delta8ウイルス感染肺組織で宿主遺伝子の発現量をヒートマップで示した。この解析から、特に遺伝子発現に差が認められたCXCL10に関して、IL-6、TNF- α と共にリアルタイムPCRにてその発現を確認した。その結果、CXCL10のmRNAの発現は、r-wtウイルス感染肺組織と比較して、r-delta8ウイルス感染肺組織では顕著に低下していた。CXCL10の高発現は病態重症化に関与することが知られており、今回の結果は、r-delta8ウイルス感染における病態が軽度であることと一致している。

さらに、r-delta8ウイルスの肺組織内のウイルス増殖が低い原因を調べるために、ウイルスゲノムのUTR領域に着目した。コロナウイルスのUTRの配列と構造は、ウイルスRNAの複製に重要であることが知られている。そこで、感染細胞上清中のウイルスと感染肺組織からRNAを抽出し、RACE法によりウイルスの5' UTR領域の塩基配列を解析した。その結果、r-delta8ウイルスでは、r-wtウイルスに比べて、ウイルスゲノムの5' UTR塩基欠損が多く認められた。

今回解析したGDSVEEVLのアミノ酸領域は、タンパク質合成阻害に関わる164と165番目のアミノ酸およびRNA分解に関わる124と125番目のアミノ酸部位とは異なる領域である。もちろん、構造的にGDSVEEVLが上記のアミノ酸部位の機能に影響を与えることは考えられるが、今回の解析では、nsp1-delta8は、wtと同程度のタンパク質合成阻害能とRNA分解能を有することが示された。また、GDSVEEVL領域は肺におけるウイルスの増殖と病原性に関与しており、重症化の因子であるCXCL10の発現に関与している可能性が示唆された。さらに、GDSVEEVL領域は、ウイルスゲノムの5' UTRの欠損に深く関与していることから、ゲノムの安定性に寄与している可能性が考えられた。