

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07039

研究課題名（和文）SARS-CoV-2増殖におけるマイクロRNAの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of microRNAs in SARS-CoV-2 propagation

研究代表者

小野 慎子（Ono, Chikako）

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・特任准教授（常勤）

研究者番号：30626437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究にて、SARS-CoV-2の5' UTRに存在するステムループ（SL）構造のうちSL1、SL2、SL3、SL5を標的部位とする3つのsiRNAにウイルス増殖抑制効果があることを見出した。その抑制メカニズムはウイルスゲノムRNA分解によるものと示唆され、さまざまな流行株およびSARS-CoVに対しても抑制効果が認められた。また、ウイルス感染後でのsiRNA処理でも抑制効果が認められた。一方、siRNA存在化でSARS-CoV-2を継代すると耐性変異株が得られたが、いずれもウイルス産生効率が低下しており、導入変異はウイルス増殖において優位な変異ではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた3つのsiRNAは、標的部位がSARS-CoV-2のみならずSARS-CoVを含めたサルベコウイルス属でも保存されており、いずれに対しても抑制効果が認められたため、今後出現しうるサルベコウイルス属から派生した新興・再興ウイルスに対しても有効であることが期待される。またこのようなウイルス増殖にとって重要な保存性の高い領域を標的とすることは、有効なウイルス治療戦略となると考えられる。またウイルス感染後にsiRNAを導入しても抑制効果が認められたことから、ウイルスゲノムを直接標的とする新規SARS-CoV-2治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that three siRNAs targeting SL1, SL2, SL3, and SL5 of the stem-loop (SL) structures in the 5'UTR of SARS-CoV-2 have an inhibitory effect on viral propagation. The inhibitory mechanism is suggested to be viral genome RNA degradation, and the inhibitory effect was observed against various epidemic strains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. In addition, the inhibitory effect was also observed when treated with siRNA at post-infection. On the other hand, during serial passages of SARS-CoV-2 in the presence of each siRNA, resistant mutants were obtained, respectively, but all of them had reduced virus production efficiency, and the introduced mutations were detected in small amounts in the public database but were not maintained, suggesting that they are not advantageous mutations for viral propagation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：SARS-CoV-2 siRNA 5' UTR

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は 21-25 塩基の小さな一本鎖 RNA で、mRNA の転写後発現調節を行う機能性分子であるが、組織や細胞により発現パターンが異なるもの、細胞を問わず全体的に発現がみられるものなど、発現特異性は様々である。申請者はこれまでに、プラス鎖一本鎖 RNA をゲノムに持つ C 型肝炎ウイルス (HCV) の肝臓特異的な増殖に、肝臓で高発現している miR-122 が寄与していることを明らかにしてきた (Kambara et al., 2012; Fukuhara et al., 2012; Ono et al., 2017)。miR-122 は HCV ゲノムの 5' 非翻訳領域 (5' UTR) に 2 ヶ所直接結合し、翻訳に必要な IRES の高次構造形成を促す。申請者は HCV ゲノムの 5' UTR 上の 2 種類のマイクロ RNA 結合モチーフを同定し、活性は劣るものの、miR-122 以外の肝臓非特異的なマイクロ RNA にも同様にウイルス複製促進効果があることを示した (Ono et al., 2020, PLOS Pathog.)。このことは、C 型肝炎患者で高率に観察される肝外病変が、本来の感染許容組織である肝臓以外の組織での HCV の持続感染に起因する可能性を示唆している。その一方で、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のゲノムもプラス鎖一本鎖 RNA だが、それに結合しうるマイクロ RNA とその機能解析 (ウイルス-マイクロ RNA の直接的相互作用) については未だ報告されていない。また同じ コロナウイルスに属する中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-CoV) では、その 5' UTR の二次構造がウイルスタンパク質との相互作用およびゲノム複製に影響を及ぼすことが報告されており (Terada et al., 2017) SARS-CoV-2 においてもウイルスゲノム RNA の二次構造形成がウイルスの感染環において重要な役割を担っている可能性がある。

また、宿主由来のマイクロ RNA の大部分がウイルスゲノム RNA に結合することで、その本来の標的である宿主 mRNA の発現制御ができなくなる sponge effect が生じることが知られている (Luna et al., 2015) (ウイルス-マイクロ RNA の間接的相互作用)。マイクロ RNA がウイルス RNA に結合する可能性は SARS-CoV-2 でも *in silico* 解析で示唆されているが (Bartoszewski et al., 2020; Liu et al., 2020) 実際にそれらのマイクロ RNA がウイルス感染細胞内の環境にどう影響しているのかは実験的に証明されていない。よって、SARS-CoV-2 増殖におけるマイクロ RNA の役割を明らかにすることは、未だ不明な点も多い SARS-CoV-2 の感染環や病態の解明に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

SARS-CoV-2 増殖に直接的あるいは間接的に関与するマイクロ RNA を同定し、それらがどのようなメカニズムでウイルス増殖を制御しているのかを解明することで、これまで知られていなかった SARS-CoV-2 とマイクロ RNA に関する新たなウイルス学的知見を得る。さらに、同定されたマイクロ RNA が標的とする宿主 mRNA の機能およびパスウェイ解析を通して、新たな創薬ターゲット分子の探索やマイクロ RNA 阻害剤による新規 SARS-CoV-2 治療薬の開発などへの応用を目指す。

3. 研究の方法

SARS-CoV-2 はゲノムサイズが約 3 万塩基と非常に大きく変異も多く挿入されているため、ウイルスが合成する mRNA の 5' 末端に存在する保存性の高い 5' UTR を標的部位とし、*in silico* 解析および siRNA スクリーニングにより SARS-CoV-2 の増殖に影響を与えるマイクロ RNA および siRNA を探索・同定した。また効率良く評価するために、当研究室にて樹立した、簡便・迅速に組換え SARS-CoV-2 を作製できる CPER 法を用いて、逆遺伝学的にレポーター遺伝子発現 SARS-CoV-2 を作製した。また低分子 RNA 存在下での耐性変異体の出現とその性状解析、そして流行株や SARS-CoV に対する低分子 RNA の増殖阻害効果について検討した。

4. 研究成果

マイクロ RNA の SARS-CoV-2 増殖への影響

SARS-CoV-2 の 5' UTR を標的とした siRNA スクリーニングの結果、5' UTR に存在する 8 つのステムループ (SL) 構造のうち、SL1、SL2、SL3、SL5 を標的部位とする 3 つの siRNA にウイルス増殖抑制効果が認められた。それらの標的領域にシード配列を持つマイクロ RNA を *in silico* 解析により選抜したところ 9 個の候補マイクロ RNA が得られたが、合成マイクロ RNA を導入した細胞にウイルスを感染させても増殖抑制効果は認められなかった。

LNA で構成された一本鎖アンチセンス核酸の SARS-CoV-2 増殖への影響

本研究の当初の計画とは異なり、の結果より、5' UTR を標的としたマイクロ RNA による RNA サイレncing では、siRNA と同様の阻害効果が得られないことが示唆された。そこで次に、siRNA が標的とする高次構造の重要性に着目し、大阪大学薬学部小比賀聡先生との共同研究により、RNA よりも強い結合親和性を持つ LNA を用いた一本鎖アンチセンス核酸を用いて、構造形成阻害によるウイルス複製・増殖阻害が生じるかを検討したが、阻害効果は認められなかった。以上の結果より、siRNA による阻害効果は SL 構造形成阻害ではなく、ウイルスゲノム RNA に対する 21 塩基の完全一致による RNA 分解が主な作用機序であることが明らかとなった。

siRNA に対する耐性変異体の出現とその性状解析

siRNA 存在化で培養細胞を用いて SARS-CoV-2 を継代したところ、一度低下したウイルス力価が徐々に回復した。その継代ウイルスのゲノム解析を行ったところ、いずれもその標的部位に 1 塩基置換が生じていた。そこで、CPEP 法により逆遺伝学的にそれぞれの耐性変異株を作製したところ、すべてウイルス産生効率が低下していた。さらに、北海道大学農学部佐藤昌直先生との共同研究により、データベースに登録・公開されている SARS-CoV-2 ゲノム配列より 5' UTR 領域の配列を解析したところ、今回得られた耐性変異と同じ塩基変異がわずかに検出されたが、その変異はその後の流行株等では維持されていなかったため、ウイルス増殖において優位な変異ではないことが示唆された。

SARS-CoV-2 流行株および SARS-CoV に対する siRNA の増殖阻害効果

本研究で得られた 3 つの siRNA は、武漢株からオミクロン株に至るまでのさまざまな SARS-CoV-2 流行株に対して、細胞内ウイルス RNA 複製量および感染性粒子産生量を 1/10 以下に抑制した。3 つの siRNA の標的部位は、SARS-CoV-2 のみならず SARS-CoV を含めたサルベコウイルス属でも保存されているため、siRNA の SARS-CoV に対する抑制効果を調べたところ、SARS-CoV-2 と同様にウイルス増殖を 1/10 以下に抑制した。よって本研究で得られた 3 つの siRNA は、今後出現しうる、サルベコウイルス属から派生した新興・再興ウイルスに対しても利用可能であることが期待される。

ウイルス感染後に siRNA を処理した場合の増殖阻害効果

これまではあらかじめ細胞に siRNA 導入後ウイルス感染を実施していたが、治療への応用を想定し、SARS-CoV-2 感染後に siRNA を導入しても抑制効果が認められるかを検討した。感染後 12 時間に siRNA を処理した場合でも、同様にウイルス増殖を 1/10 以下に抑制する増殖抑制効果が認められたため、現在 SARS-CoV-2 感染マウスモデルを用いて、3 つの siRNA による *in vivo* での治療効果を見るために準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小野慎子
2. 発表標題 新型コロナウイルスの進化と変異株
3. 学会等名 第94回 日本遺伝学会公開市民講座「次々と現れる新型コロナウイルス変異株の進化遺伝学」（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野慎子, 上村健太郎, 田鍬修平, 森寛行, 小比賀聡, 松浦善治
2. 発表標題 SARS-CoV-2 5' UTRのstem-loop構造を標的としたsiRNAによるウイルス増殖抑制
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chikako Ono, Shiho Torii, Rahmi Deanty, Shuhei Taguwa, Yoshiaru Matsuura
2. 発表標題 SARS-CoV-2 の増殖における5' UTRのstem-loop構造の役割
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Shiho Torii, Itsuki Anzai, Rigel Suzuki, Yuzy Fauzyah, Yuhei Morioka, Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Suppression of SARS-CoV-2 propagation by siRNA targeting the stem-loop structures in the 5'UTR
3. 学会等名 The 21st Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chikako Ono, Masanao Sato, Kentaro Uemura, Junki Hirano, Shuhei Taguwa, Yoshiharu Matsuura
2. 発表標題 Suppression of SARS-CoV-2 propagation by siRNA targeting the stem-loop structures in the 5'UTR
3. 学会等名 ASV2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関