

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15042

研究課題名（和文）RNA複製複合体に着目した新型コロナウイルスの病原性の分子基盤解明

研究課題名（英文）A molecular basis of virus pathogenicity focusing on RNA replication

研究代表者

安齋 樹（Anzai, Itsuki）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：40868824

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ここ数年、新型コロナウイルス感染症や鳥インフルエンザといった新興感染症が、人類社会に多大な影響を及ぼしている。新型コロナウイルスや鳥インフルエンザウイルスといったRNAウイルスは、宿主の細胞で増殖するために、自身のゲノムにコードされたRNA複製複合体（RdRp）関連タンパク質に加えて、宿主のタンパク質あるいは細胞機構を利用する必要がある。つまり、RdRpを中心としたウイルスと宿主の相互作用を明らかにすることは、ウイルスの増殖メカニズム解明につながる。本研究では、新型コロナウイルスのRNA転写に關与する宿主因子を同定し、その機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染症を完全に制御するためには、予防法のみならず治療法の開発が重要である。これまで開発されてきたウイルス感染症に対する治療薬は、ウイルスに対して作用するものが多いが、治療薬に対抗するようにウイルスタンパク質が変異し、耐性ウイルスが出現する可能性もある。一方、ウイルス増殖に関わる宿主因子は、ウイルスに対する選択圧を持たないため、耐性ウイルス出現の可能性も低く、有効な創薬標的となりうる。本研究で同定した、SARS-CoV-2の増殖に関わる宿主因子は、ウイルス増殖機構の解明の糸口になると同時に、新たな治療薬開発の分子戦略構築の起点となる可能性も考えられる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, emerging infectious diseases caused by RNA viruses, such as SARS-CoV-2 and avian influenza virus, have significantly impacted human society. For the replication of RNA viruses in host cells, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) complexes and host proteins are essential. Therefore, understanding virus-host interactions centered on RdRp will provide important information on the mechanism of virus replication. In this study, we identified host factors involved in RNA replication of SARS-CoV-2 and evaluated their function.

研究分野：ウイルス学

キーワード：宿主因子 ウイルス 宿主相互作用

1. 研究開始当初の背景

ここ数十年、新型コロナウイルスや鳥インフルエンザウイルスといった RNA ウイルスが原因となる新興感染症が、人類社会に多大な影響を及ぼしている。ウイルスは、宿主の細胞に感染し、増殖するために、自身のゲノムにコードされたウイルスタンパク質だけでなく、宿主のタンパク質あるいは細胞機構を利用する必要がある。つまり、ウイルスの増殖メカニズムを理解するためには、ウイルスタンパク質の機能だけでなく、ウイルスと宿主の相互作用を詳細に解析する必要がある。

2. 研究の目的

RNA ウイルスが宿主細胞内で増殖するためには、ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) が、宿主のタンパク質 (宿主因子) あるいは細胞機構を利用しながら、自身のゲノムを複製し増幅する必要がある。つまり、RdRp を中心とした宿主との相互作用を詳細に解析することで、ウイルスの増殖メカニズムを理解できると同時に、感染症制御に向けた治療薬開発の標的を明らかにすることができると考えた。そこで本研究では、新型コロナウイルス感染症の原因ウイルスである SARS-CoV-2 について、細胞内での増殖に関わるウイルスタンパク質および宿主因子の物性・機能を明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

(1) 質量分析法によるウイルス粒子に取り込まれる宿主タンパク質の同定

ウイルスは細胞内で自身のゲノムおよびタンパク質を合成し、子孫粒子を組み立てた後、細胞外へと出芽する。この際、宿主のタンパク質がウイルス粒子に取り込まれることが知られている。そこで、カラムクロマトグラフィーによる SARS-CoV-2 粒子の精製手法を確立し、質量分析法を用いたショットガン解析により、ウイルス粒子に取り込まれた宿主タンパク質を同定した。

(2) RNAi 法によるウイルス増殖に関わる宿主因子の同定

ウイルス粒子に取り込まれた宿主タンパク質について、ウイルス増殖に関与する宿主因子を同定するために、siRNA を用いて各宿主因子をノックダウンした培養細胞における、SARS-CoV-2 増殖を評価した。

(3) ウイルス 宿主間タンパク質相互作用の評価

同定した宿主因子について、ウイルス 宿主タンパク質間の相互作用を、共免疫沈降法により評価する。

(4) 同定した宿主因子がウイルス増殖に及ぼす影響の評価

同定した宿主因子について、ウイルスゲノムの複製・転写に及ぼす影響を qPCR 法により評価する。

4. 研究成果

まず、SARS-CoV-2 の細胞侵入に関与する ACE2 および TMPRSS2 を発現する 293 細胞 (293-AT 細胞) に、武漢株 SARS-CoV-2 (Hu/DP/Kng/19-020) を感染させ、培養上清を回収した。CaptoCore700 (Cytiva 社) を用いたカラムクロマトグラフィーにより、ウイルス粒子を精製した後、質量分析により、感染細胞に特異的な宿主因子を同定した。感染細胞の培養上清 (10⁷ PFU/ml) を CaptoCore700 カラムにアプライしたところ、SARS-CoV-2 の全ての構造タンパク質 (S, M, E, N) が含まれ、かつ、感染性を保った (10⁷ PFU/ml) 精製画分を得ることができた。質量分析により同定した 732 種類の宿主因子のうち一部について、siRNA を用いて SARS-CoV-2 の増殖効率の変化を評価したところ、ノックダウンによりウイルス増殖が抑制される宿主因子を 5 種類同定することができた。

同定した宿主因子のうち、宿主因子 A について、詳細な解析を進めた。まず、siRNA により宿

主因子 A をノックダウンした 293-AT 細胞に、異なるウイルス量 (Multiplicity of Infection: MOI) SARS-CoV-2 を感染させ、培養上清中のウイルス量を経時的に評価した。その結果、マルチサイクルでの感染 (MOI = 0.02) およびシングルサイクルでの感染 (MOI = 2) どちらの場合においても、宿主因子 A のノックダウンにより、ウイルス力価が低下することを確認した。

さらに、シングルサイクル感染における、細胞内での SARS-CoV-2 ゲノムおよび mRNA の複製・転写を、qPCR により経時的に評価した。その結果、宿主因子 A のノックダウンにより SARS-CoV-2 のゲノムおよび mRNA 量が低下することがわかった。つまり、宿主因子 A は、SARS-CoV-2 のゲノム複製・転写ステップにおいて重要な因子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Anzai Itsuki, Fujita Junso, Ono Chikako, Kosaka Yoichiro, Miyamoto Yuki, Shichinohe Shintaro, Takada Kosuke, Torii Shiho, Tagawa Shuhei, Suzuki Koichiro, Makino Fumiaki, Kajita Tadahiro, Inoue Tsuyoshi, Namba Keiichi, Watanabe Tokiko, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of a neutralizing antibody that recognizes a loop region adjacent to the receptor-binding interface of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0365523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.03655-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Junso, Makino Fumiaki, Asahara Haruyasu, Moriguchi Maiko, Kumano Shota, Anzai Itsuki, Kishikawa Jun-ichi, Matsuura Yoshiharu, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Epoxidized graphene grid for highly efficient high-resolution cryoEM structural analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29396-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Keishi, Anzai Itsuki, Maeda Ryota, Moriguchi Maiko, Watanabe Tokiko, Imura Akihiro, Takaori-Kondo Akifumi, Inoue Tsuyoshi	4. 巻 173
2. 論文標題 Structural insights into the rational design of a nanobody that binds with high affinity to the SARS-CoV-2 spike variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Isaka Yoshitaka, Yoshiya Taku, Ono Chikako, Uchiyama Akinori, Hirata Haruhiko, Hamaguchi Shigeto, Kutsuna Satoshi, Takabatake Yoshitsugu, Saita Ryotaro, Yamada Tomomi, Takahashi Atsushi, Yamato Masaya, Nohara Yukie, Tsuda Shugo, Anzai Itsuki, Kimura Tomonori, Takeda Yoshito, Tomono Kazunori, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 27
2. 論文標題 Establishment and clinical application of SARS-CoV-2 catch column	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 279 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-022-02296-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsubo Ryota, Minamitani Takeharu, Kobiyama Kouji, Fujita Junso, Ito Toshihiro, Ueno Shiori, Anzai Itsuki, Tanino Hiroki, Aoyama Hiroshi, Matsuura Yoshiharu, Namba Keiichi, Imadome Ken-ichi, Ishii Ken J., Tsumoto Kouhei, Kamitani Wataru, Yasui Teruhito	4. 巻 12
2. 論文標題 Human antibody recognition and neutralization mode on the NTD and RBD domains of SARS-CoV-2 spike protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24730-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Ryota, Fujita Junso, Konishi Yoshinobu, Kazuma Yasuhiro, Yamazaki Hiroyuki, Anzai Itsuki, Yamaguchi Keishi, Kasai Kazuki, Nagata Kayoko, Yamaoka Yutaro, Miyakawa Kei, Ryo Akihide, Shirakawa Kotaro, Makino Fumiaki, Matsuura Yoshiharu, Inoue Tsuyoshi, Imura Akihiro, Namba Keiichi, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications biology	6. 最初と最後の頁 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.10.25.465714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamura Tomokazu, Torii Shiho, Kajiwara Kentaro, Anzai Itsuki, Fujioka Yoichiro, Noda Kisho, Tagawa Shuhei, Morioka Yuhei, Suzuki Rigel, Fauzyah Yuzy, Ono Chikako, Ohba Yusuke, Okada Masato, Fukuhara Takasuke, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 18
2. 論文標題 Secretory glycoprotein NS1 plays a crucial role in the particle formation of flaviviruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1010593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koike Tatsuki, Sugimoto Aoi, Kosono Shuhei, Komaba Sumika, Kanno Yuko, Kitamura Takashi, Anzai Itsuki, Watanabe Tokiko, Takahashi Daisuke, Toshima Kazunobu	4. 巻 12
2. 論文標題 Synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their binding abilities to SARS-CoV-2 spike proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 2016 ~ 2021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1MD00264C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Torii Shiho, Ono Chikako, Suzuki Rigel, Morioka Yuhei, Anzai Itsuki, Fauzyah Yuzy, Maeda Yusuke, Kamitani Wataru, Fukuhara Takasuke, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 35
2. 論文標題 Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109014 ~ 109014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fauzyah Yuzy, Ono Chikako, Torii Shiho, Anzai Itsuki, Suzuki Rigel, Izumi Takuma, Morioka Yuhei, Maeda Yusuke, Okamoto Toru, Fukuhara Takasuke, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 186
2. 論文標題 Ponesimod suppresses hepatitis B virus infection by inhibiting endosome maturation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 104999 ~ 104999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2020.104999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安齋 樹、足達 俊吾、笠原 勇矢、小比賀 聡、河岡 義裕、渡辺 登喜子
2. 発表標題 SARS-CoV-2増殖を制御する宿主因子の同定と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 安齋 樹、足達 俊吾、河岡 義裕、渡辺 登喜子
2. 発表標題 SARS-CoV-2粒子に取り込まれる宿主因子の同定と機能解析
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安齋 樹、岩崎 有紘、小野 慎子、鳥居 志保、松浦 善治、末永 聖武、渡辺 登喜子
2. 発表標題 SARS-CoV-2に対する抗ウイルス活性を有する海洋天然物の探索と作用機序解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安齋 樹、足達 俊吾、河岡 義裕、渡辺 登喜子
2. 発表標題 SARS-CoV-2の増殖に関わる宿主因子の同定と機能解析
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 安齋 樹、藤田 純三、小野 慎子、小坂 洋一郎、宮本 由紀、七戸 新太郎、高田 光輔、梶田 忠宏、井上 豪、難波 啓一、渡辺 登喜子、松浦 善治
2. 発表標題 SARS-CoV-2抗体医薬開発に資する中和抗体の作用機序の分子基盤
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安齋 樹、小野 慎子、小坂 洋一郎、宮本 由紀、七戸 新太郎、高田 光輔、梶田 忠宏、松浦 善治、渡辺 登喜子
2. 発表標題 中和抗体の性状解析を通じて理解するSARS-CoV-2の受容体認識の分子メカニズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安齋 樹、小野 慎子、小坂 洋一郎、宮本 由紀、七戸 新太郎、高田 光輔、梶田 忠宏、松浦 善治、渡辺 登喜子
2. 発表標題 SARS-CoV-2に対する中和抗体の作製とその作用機序の解明
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021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