

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15452

研究課題名(和文)オートファジーを介した新型コロナウイルスの新しい病原性機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenic mechanism of SARS-CoV-2 via autophagy

研究代表者

鈴木 理滋 (Suzuki, Rigel)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：60870532

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)：新型コロナウイルス感染症の症状は多岐に渡り、無症状感染者もいれば重篤な急性呼吸器症状を呈する感染者も存在する。最近、無症状患者と重症患者から単離された新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のゲノム解析が行われ、重症患者ではオートファジーの誘導に関わるnsp6に変異があることが明らかになった。そこで本研究ではSARS-CoV-2のリバースジェネティクス法を駆使して、nsp6変異株を作出し、培養細胞及びハムスターを用いて増殖性及び病原性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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は今もなお世界中で大流行しており、その治療薬の開発が期待される。本研究では病原性に関わる変異としてnsp6の変異を見つけ出し、この変異によってウイルスの増殖能に変化が生じることを培養細胞及びハムスターを用いた動物実験により明らかにした。更なるnsp6の機能解析をすることにより、SARS-CoV-2の病原性機構の解明と治療薬開発の端緒になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Symptoms of SARS-CoV-2 infection vary widely. Some infected patients are asymptomatic, and others develop severe acute respiratory symptoms. Recently, genome analysis of SARS-CoV-2 isolated from asymptomatic and severely infected patients revealed that severely infected patients have mutations in nsp6, which is involved in induction of autophagy. In this study, we generated nsp6 mutant strains of SARS-CoV-2 by reverse genetics and examined their proliferative and pathogenic properties using cultured cells and hamsters.

研究分野：ウイルス学

キーワード：SARS-CoV-2 nsp6

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は世界で大流行しており、死亡者数は約 600 万人以上に及ぶ。COVID-19 の主な症状としては高熱、咳、全身の倦怠感などがあり、重症化すると肺炎などの致死的な急性呼吸器症状を呈する。この様に命に関わるほど重症化する感染者がいる一方で、COVID-19 を発症しても全く無症状でいる感染者も多く存在する。COVID-19 の症状に差が生じる原因の一つとして、感染した SARS-CoV-2 の株が異なることが挙げられる。事実、これまで報告された SARS-CoV-2 のゲノム RNA を比較した所、多種多様な変異株が存在することが明らかになった。しかしながら、どのゲノム RNA の変異が病原性と密接に関与するのかは謎に包まれていた。2020 年の 6 月、COVID-19 の無症状患者と重症患者から単離された SARS-CoV-2 のゲノム解析が行われた所、11083 番目の塩基が異なることが報告された。11083 番目の塩基はウイルスタンパク質の nsp6 をコードしている領域であり、申請者はこの報告から SARS-CoV-2 の nsp6 が病原性と深く関与するのではないかという仮説を立て研究を開始した。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では同定された nsp6 タンパク質の変異に着目して、その変異により、ウイルスの増殖能や病原性がどの様に変化するのか、またその詳細な分子機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) SARS-CoV-2 変異株の作製

まず nsp6 の機能解析を行うため、無症状患者から単離された SARS-CoV-2 (11083T 株) と重症患者から単離された SARS-CoV-2 (11083G 株) を当研究室で確立されたリバーシジェネティクス法を用いて作製する。

### (2) SARS-CoV-2 変異株の培養細胞を用いた増殖能の比較検討

(1) で作製した 11083T 株と 11083G 株を 3 種類の培養細胞 (TMPRSS2 発現 VeroE6 細胞、ACE2 及び TMPRSS2 発現 HEK293 細胞または Calu3 細胞) に MOI=0.005 となる様に感染させ、TMPRSS2 発現 VeroE6 細胞及び Calu3 細胞では感染させてから 12、24、36、48 時間後に細胞の上清液を回収し、ACE2 及び TMPRSS2 発現細胞はウイルスを感染させてから 24、48、72 時間後に上清液を回収した。その後、それぞれの上清液でウイルスの感染力価を求めた。

### (3) SARS-CoV-2 の 11083T 株と 11083G 株による病原性の検討

SARS-CoV-2 の 11083T 株と 11083G 株の病原性に変化が生じることを動物実験で検討する。SARS-CoV-2 が感染できるハムスターに両ウイルスを感染させ、ハムスターの生存率、咽頭内でのウイルス複製量及び体重減少の変化について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 当研究室で確立したリバーシジェネティクス法は SARS-CoV-2 のゲノム RNA をそれぞれのフラグメントが少しオーバーラップする様に 9 つのフラグメント断片にし、それと CMV プロモーターやリボザイム配列が搭載されたリンカー配列を加えて再度 PCR をかけることに環状プラスミドが作製できる (図 1)。それを細胞にトランスフェクションすることで組換え SARS-CoV-2 を作製できる。今回同定された 11083 番目の塩基は 4 番目のフラグメントに存在するため、PCR を行い 4 番目のフラグメントにある 11083 番目の T を G に変異させ、それを用いることで 11083G 株の作製を行った。組換えウイルスを製作した後はゲノム RNA を抽出し、逆転写反応を行い cDNA 合成後にシーケンサーを用いて目的の変異以外に変異が入っていないことを確認した。

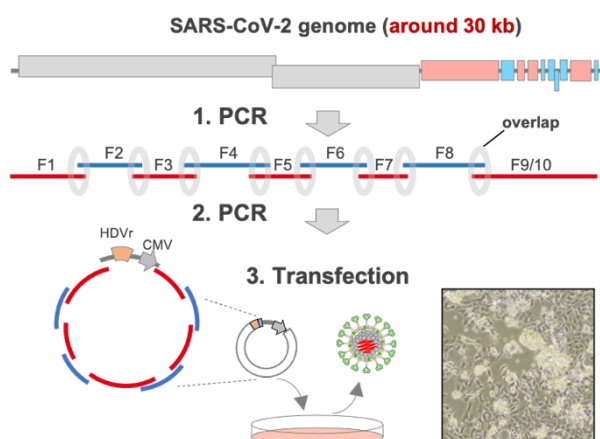


図1：CPER概略図

(2) (1) で作製した 11083T 株と 11083G 株を用いて培養細胞での増殖能を比較検討した。使用した細胞は SARS-CoV-2 が効率的に感染するのに必要な TMPRSS2 を安定的に発現する TMPRSS2 発現 VeroE6 細胞、SARS-CoV-2 の受容体である ACE2 及び TMPRSS2 を安定的に発現する HEK293 細胞 (HEK293 A/T) 及びヒト肺上皮腺ガン細胞である Calu3 細胞を用いた。その結果、TMPRSS2 発現 VeroE6 細胞及び HEK293 A/T 細胞では重症患者で同定された 11083G 株は 11083T 株に比べて増殖能が高いことが明らかになった (図 2)。また興味深いことに Calu3 細胞では 11083G 株と 11083T

株でウイルスの増殖能に変化がないことが明らかになった。細胞の種類によって自然免疫の機構が異なるため、nsp6 の変異は自然免疫の機構に関与している可能性が示唆された。

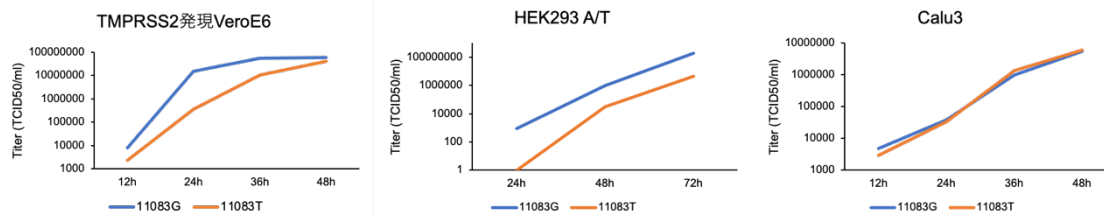


図2：増殖能の変化

(3) 11083T 株と 11083G 株をハムスターに感染させ、体重変化と咽頭内ウイルス RNA を測定した。その結果、11083G 株は 11083T 株に比べてハムスターの体重を著しく低下させたことから (図 3)、11083 番目の塩基は病原性に関与することが明らかになった。

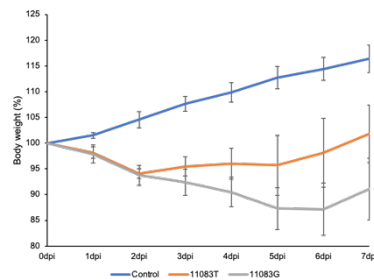


図3：感染ハムスターの体重変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------