

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15469

研究課題名（和文）RNAウイルスのゲノム変異機構と生存戦略の解明

研究課題名（英文）Genomic diversity and survival strategies of RNA viruses.

研究代表者

高田 光輔（Takada, Kosuke）

大阪大学・微生物病研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：40881701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：コロナウイルスは、校正機能を担う酵素（nsp14）を備えているため、RNAウイルスの中ではゲノム突然変異が起こりにくい。しかし、SARS-CoV-2は短期間の間に、多様な変異株が出現している。本研究では、SARS-CoV-2のゲノム多様化機構を明らかにし、“ゲノム多様性を増加しやすいウイルス株”が出現する意味を提案することを目的とした。データ解析とウイルス実験より、nsp14における幾つかのアミノ酸置換がSARS-CoV-2のゲノム多様性を増加し、ウイルス進化に寄与していることが示唆された。一方、“ゲノム多様性を増加しやすいウイルス株”が出現する意味については、追加検証の必要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、“ゲノム多様性を増加しやすいウイルス株”は、パンデミック中に幾度と出現していたが、同ウイルス種集団内では少数派ウイルス株として存在していることが明らかとなった。これまでのウイルス学では、ウイルスが感染拡大する上で有利な性質を獲得し、同ウイルス種集団内で多数派となったウイルス株が着目されてきた。そこで本研究で着目した、集団サイズが小さいながらも“ゲノム多様性を増加しやすいウイルス株”が、幾度と出現する生物学的意義（例えば、抗原変異株の出現に寄与しているなど）が示されれば、RNAウイルスの制御に新たな視点をもたらすと期待されたが、その点については未解決であり、今後の研究に期待される。

研究成果の概要（英文）：Coronaviruses, including SARS-CoV-2, encode a proofreading exonuclease nsp14, that helps ensure replication competence at a low evolutionary rate than other RNA viruses. During the COVID-19 pandemic, SARS-CoV-2 accumulated diverse genomic mutations including in nsp14. In this study we found that viruses carrying a proline-to-leucine change at position 203 (P203L) have a high evolutionary rate. The nsp14-P203L mutant grew as efficiently as the wild-type virus in hamster lungs, and by six days after infection, the nsp14-P203L mutant grown in the lungs of hamsters had acquired significantly more diverse genomic mutations than the wild-type virus. Our findings suggest that substitutions, such as P203L, in nsp14 may accelerate the genomic diversity of SARS-CoV-2, contributing to virus evolution during the pandemic.

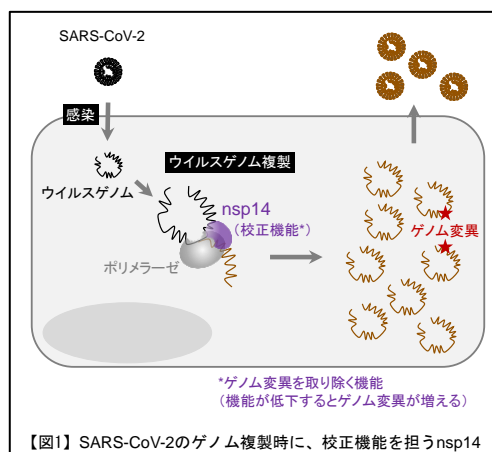
研究分野：ウイルス学

キーワード：RNAウイルス ゲノム進化 SARS-CoV-2 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

近年、新たにその存在が発見された感染症（新興感染症）が問題になっている。2019 年に出現し、世界的に大きな影響を及ぼしている新型コロナウイルス感染症も、新種のコロナウイルスによって引き起こされた新興感染症である。ウイルス感染症に対する予防・診断・治療法を開発するためには、原因ウイルスの基本的性状を理解することが重要である。ウイルスは、ゲノムとして DNA か RNA どちらか一方の核酸をもつ。RNA をゲノムとしてもつ RNA ウイルスは、そのゲノムに突然変異（置換・挿入・欠失・重複・逆位）が高い頻度で起こる。突然変異を獲得した RNA ウイルスは、時にウイルスの免疫感受性、薬剤感受性、宿主域の変化を引き起こし、ウイルス予防治療効果の減弱や新興再興感染症の原因とならう。しかしながら、RNA ウイルスのゲノム変異機構とその意義について、いまだ不明な点が多い。

ウイルスのゲノム突然変異率には、ウイルスが持つ RNA 依存 RNA ポリメラーゼの忠実性や、校正機能などが影響する。RNA ウイルスの一種であるコロナウイルスは、校正機能を担う酵素（nsp14）を備えているため、RNA ウイルスの中ではゲノム突然変異が起こりにくいことが知られている（Eckerle et al. PLoS Pathog. 2010）（図 1）。しかしながら、2019 年に出現した新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、短期間の間に、ゲノム突然変異が起こり、多様な変異株が出現している。そこで、nsp14 の校正機能が低下した SARS-CoV-2 の変異株が検出できると考え本研究の着想に至った。



2. 研究の目的

本研究の目的は、自然界に存在する“ゲノム突然変異を起こしやすいウイルス株”を検出し、その存在意義を提案することである。そこで本研究では、1) 公共データベースのウイルスゲノム配列を解析することによって、ゲノム突然変異を起こしやすいウイルス株を検出し、実験的にそのウイルス株がゲノム突然変異を起こしやすいことを確かめる。次に、2) ゲノム突然変異を起こしやすいウイルス株によって、ウイルスの新たな環境への適応進化が加速されるかを検証する。

3. 研究の方法

本研究では特に、校正機能を担う酵素（nsp14）を備えている SARS-CoV-2 に着目する。公共データベースの多様なコロナウイルスゲノム配列を解析することで、ゲノム突然変異を起こしやすい性質に関与する（つまり校正機能の低下が予想される）変異型 nsp14 を同定し、実験的に、変異型 nsp14 によってウイルスがゲノム突然変異を起こしやすくなるかを明らかにする。さらに、ゲノム突然変異を引き起こしやすい nsp14 変異ウイルスが、新たな環境への適応進化（例えば、抗原変異株の出現）を加速しうるかを検証する。

【研究項目 1】 ゲノム突然変異を起こしやすい SARS-CoV-2 の変異株の探索と性状解析
nsp14 の機能に重要なアミノ酸を調べるために、コロナウイルス科に属する多様なコロナウイルスの nsp14 のアミノ酸配列をアライメントし、系統推定や正の淘汰解析を行う。さらに、公共データベース（GISAID や GenBank）より取得した SARS-CoV-2 ゲノム配列を、nsp14 の配列でクラスタリングし、ゲノム突然変異速度（単位時間あたりのゲノム塩基置換数）やゲノム多様性を解析する。次に、同定した変異型 nsp14 を持つウイルス（変異型 nsp14 ウイルス）の性状を解析する。SARS-CoV-2 感染モデル（シリアンハムスター）を用い、野生型ウイルスまたは変異型 nsp14 ウイルスを感染させ、ウイルス増殖性・病原性ならびに、ウイ

ルスのゲノム変異率を比較する。

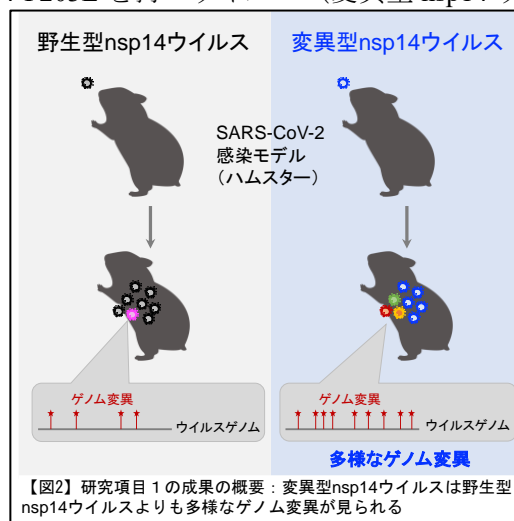
【研究項目 2】変異型 nsp14 ウイルスの出現意義

ゲノム突然変異を起こしやすいウイルス株の存在意義を明らかにするため、変異型 nsp14 ウイルスが新たな環境への適応に関与するかを検証する。具体的には、一度 SARS-CoV-2 の感染を経験したシリアンハムスターに、野生型ウイルスまたは、変異型 nsp14 ウイルスを感染させ、生体内で抗原変異株が出現するかを調べる。

4. 研究成果

まず、nsp14 の機能に重要なアミノ酸を調べるために、コロナウイルス科に属する 62 種類のコロナウイルスの nsp14 のアミノ酸配列をアライメントし、系統推定や正の淘汰解析を行った。その結果、コロナウイルスの nsp14 は進化的によく保存されており、強い選択圧を受けていることが明らかとなった。次に、新型コロナウイルスの大規模ゲノムデータ解析を行い、懸念すべき変異株（アルファ株、デルタ株、オミクロン株など）の出現前までには、92% 以上のウイルス株で同じアミノ酸配列の nsp14（野生型 nsp14）を持ち、アミノ酸置換を持つ nsp14（変異型 nsp14）の出現は稀であることがわかった。また、コウモリ由来の多様なコロナウイルスで検出されていない nsp14 のアミノ酸置換に着目しゲノム進化速度を解析したところ、いくつかの変異型 nsp14 によってウイルスゲノム進化速度が加速される可能性があることが示された。特に、nsp14-P203L を持つウイルス株はゲノム進化速度が大きい傾向があることが明らかとなった。そこで、nsp14-P203L がウイルス性状に及ぼす影響を調べるために、リバースジェネティクスを用い、nsp14-P203L を持つウイルス（変異型 nsp14 ウイルス）または野生型 nsp14 を持つウイルス（野生型 nsp14 ウイルス）を作出した。作出したウイルスをハムスターに感染させ、肺で増殖したウイルスのゲノム変異を解析したところ、変異型 nsp14 ウイルスは野生型 nsp14 ウイルスよりも多様なゲノム変異が検出された（図 2）。以上の結果より、変異型 nsp14（例えば nsp14-P203L など）によって新型コロナウイルスのゲノム多様性を増加させうることが分かり、同時に、そのような校正機能が低下した変異型 nsp14（例えば nsp14-P203L など）を持つウイルスの出現は稀であることも明らかとなった。

本研究成果は国際雑誌 *iScience* に掲載された (Takada et al. *iScience*. 2023)。



次に、自然界において、“ゲノム突然変異を起こしやすいウイルス株”が出現する意味を提案するため、変異型 nsp14 ウイルスが抗原変異株の出現を加速させる可能性を検証した。一度 SARS-CoV-2 の感染を経験したハムスターに、野生型ウイルスまたは、変異型 nsp14 ウイルスを再感染させ、鼻甲介と肺におけるウイルスを検出した。その結果、いずれのハムスターからもウイルスは検出されず、抗原変異株の出現は認められなかった。今回の検証では、初感染から比較的短期間（3 週間）での再感染実験であったため、再感染までの期間をのばす等の追加検証が必要と思われる。

本研究を通して、自然界において SARS-CoV-2 は、変異型 nsp14（例えば nsp14-P203L など）によって“ゲノム突然変異を起こしやすいウイルス株”が稀に出現していることが明らかとなった。しかし、“ゲノム突然変異を起こしやすいウイルス株”が新たな環境への適応に寄与しうることについては、更なる追加検証が必要であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takada Kosuke, Ueda Mahoko Takahashi, Shichinohe Shintaro, Kida Yurie, Ono Chikako, Matsuura Yoshiharu, Watanabe Tokiko, Nakagawa So	4. 巻 26
2. 論文標題 Genomic diversity of SARS-CoV-2 can be accelerated by mutations in the nsp14 gene	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106210 ~ 106210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106210	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 Takada Kosuke, Orba Yasuko, Kida Yurie, Wu Jiaqi, Ono Chikako, Matsuura Yoshiharu, Nakagawa So, Sawa Hirofumi, Watanabe Tokiko	4. 巻 98
2. 論文標題 Genes involved in the limited spread of SARS-CoV-2 in the lower respiratory airways of hamsters may be associated with adaptive evolution	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01784-23	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 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 -
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 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kosuke Takada, Mahoko Takahashi Ueda, Shintaro Shichinohe, Tokiko Watanabe and So Nakagawa
2. 発表標題 Genomic diversity of SARS-CoV-2 can be accelerated by an amino acid substitution in the non-structural protein 14
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of the RNA Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Takada, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Tokiko Watanabe
2. 発表標題 Establishment of a low-volume SARS-CoV-2 infection system in the hamster model
3. 学会等名 The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Takada, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Tokiko Watanabe
2. 発表標題 Establishment of a low-volume SARS-CoV-2 infection system in the hamster model
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 Kosuke Takada and Tokiko Watanabe
2. 発表標題 Temperature susceptibility of seasonal influenza viruses.
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田光輔、大場靖子、澤洋文、渡辺登喜子
2. 発表標題 ハムスターモデルにおける 新型コロナウイルスの少量感染系の確立
3. 学会等名 第6回獣医微生物学フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kosuke Takada, Mahoko Takahashi Ueda, Shintaro Shichinohe, Yurie Kida, Chikako Ono, Yoshiharu Matsuura, Tokiko Watanabe and So Nakagawa.
2. 発表標題 Genomic diversity of SARS-CoV-2 can be accelerated by mutations in the nsp14 gene
3. 学会等名 The XXIII International Congress of Genetics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高田光輔、大場靖子、木田裕里恵、呉佳齊、小野慎子、松浦善治、中川草、澤洋文、渡辺登喜子
2. 発表標題 SARS-CoV-2の下気道への広がる性質に関する遺伝子と適応進化
3. 学会等名 日本進化学会第25回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高田光輔、大場靖子、木田裕里恵、呉佳齊、小野慎子、松浦善治、中川草、澤洋文、渡辺登喜子
2. 発表標題 Genes downstream of ORF3a determine the replicative ability of SARS-CoV-2 in the lower respiratory airways of hamsters
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

〔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
---------	---------