

指導教授氏名	指導役割
(自署)	全般的な指導
(自署)	
(自署)	

学位論文要旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野	歯周病態学分野	身分	大学院生	氏名	清水 由梨香
論文題名		<p>An RNA-immunoprecipitation via CRISPR/dCas13 reveals an interaction between the SARS-CoV-2 5'UTR RNA and the process of human lipid metabolism</p> <p>CRISPR/dCas13を介したRNA免疫沈降によりSARS-CoV-2 5'UTR RNAとヒト脂質代謝経路との相互作用が明らかとなる</p>			
論文内容の要旨 (2000字程度)					
<p>【緒言】</p> <p>COVID-19は、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) による感染症であり、世界的なパンデミックを引き起こした疾患である。SARS-CoV-2のRNAゲノムは、約30 kbの直鎖状、非分節であり、14個のopen reading frameを持つ。ウイルスは、自身での増殖機能はもたず、宿主の持つタンパク質産生の機構を乗っ取ることで増殖する。SARS-CoV-2を含む多くのRNAウイルスの5'非翻訳領域 (UTR) は独特のstem loop構造を持ち、タンパク質やRNAなどの宿主由来翻訳調節因子をリクルートすることが知られているが、宿主由来因子との物理的な相互作用については解明が不十分である。ウイルス由来RNA因子と宿主由来因子との間の相互作用を解析することにより、ウイルスが引き起こす疾患に対する効果的な治療標的の開発につながると思われる。本研究では、CRISPR/dCas13システムを用いた免疫沈降法 (Trans RNA Immunoprecipitation : TRIP) を応用して、SARS-CoV-2 5'UTRに結合する宿主由来RNAを解析し、ヒト細胞においてSARS-CoV-2 RNAゲノムを制御し、宿主細胞の代謝に及ぼす可能性のあるRNA群を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> SARS-CoV-2の感染の広がりが高い配列の選択 SARS-CoV-2のRNAゲノム変異と系統発生に関する既存の報告を統合し、5'UTRのうち感染症起因株において頻度の高い配列を調べた。 SARS-CoV-2由来5'UTR RNAによる翻訳に与える影響の解析 SARS-CoV-2 RNAゲノム配列 (NC_045512) の5'UTR配列を抽出し、ルシフェラーゼレポーターpGL3-Promoter Vector (E1761) のSV40 promoter配列とルシフェラーゼ遺伝子配列との間にクローニングし、解析用ベクター (pGL3-5'UTR) を作製した。これをヒト肺上皮細胞株A549およびヒト腎芽細胞株HEK293Tに導入した。5'UTRによる遺伝子発現に対する変化を、ルシフェラーゼアッセイ法およびリアルタイム定量PCR法を用いて解析した。 TRIPによる宿主由来RNAの抽出と解析 ルシフェラーゼ遺伝子配列を標的としたcrRNAとdead Cas13 (dCas13) を発現するA549およびHEK293T細胞株を作製し、各細胞株に対してpGL3-5'UTRベクターまたはコントロールベクターを導入した。細胞を固定したのち、dCas13を標的としたTRIPを実施し、抽出したRNAをシーケンズ解析することで、5'UTRに結合する宿主由来RNA因子を同定した。 					

4. SARS-CoV-2 5'UTRと相互作用する因子と翻訳調節との関連

pGL3-5'UTRおよびコントロールベクターをA549およびHEK293T細胞株に導入し、脂質代謝関連因子の発現量をリアルタイム定量PCR法で比較した。その結果を踏まえ、脂質異常症治療薬であるスタチン系薬剤がCOVID-19におけるウイルス増殖を抑制する治療薬になる可能性があると考え、ルシフェラーゼアッセイ法を用いて5'UTR下流遺伝子の翻訳効率への影響を比較した。

【結果】

1. 感染症起因株に広がりが高い特徴的な配列

上記探索の結果、SARS-CoV-2からWuhan-Hu-1株（NC_045512.2）の5'UTRを選択して、以降の解析に用いた。

2. 得られた5'UTR配列が翻訳に与える影響

5'UTR-ルシフェラーゼRNA発現ベクターを用いた場合、コントロールと比較してmRNA量は大きく変化しないものの、ルシフェラーゼタンパク質の翻訳量が増加した。

3. 得られた5'UTR配列に結合する宿主由来RNA因子

得られた5'UTRに結合した宿主由来RNAについて、Gene Ontology (GO) 解析を実施した結果、上位には脂質代謝に関連するGO termが集中していた。

4. SARS-CoV-2 5'UTRと相互作用する因子と翻訳調節との関連

SARS-CoV-2 5'UTRの存在により、細胞内のacetyl-CoA acyltransferase 2 (ACAA2)、3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase (HMGCS2)、そしてfatty acid desaturase (FADS) 1/2遺伝子のmRNA発現レベルが変化することがわかった。アトルバスタチンおよびロスバスタチンが、5'UTRによって増加したタンパク質翻訳を抑制する傾向を示すことがわかった。加えて、各種細胞株においてACAA2およびHMGCS2遺伝子をsiRNAによってノックダウンすると、5'UTRによって増加したタンパク質翻訳が抑制される傾向が見られた。

【考察・結論】

本研究より、SARS-CoV-2 5'UTRは、ヒト細胞内において下流の遺伝子の翻訳効率を高める働きを有することがわかった。さらに同領域は宿主由来因子のうち脂質代謝に関与する因子のmRNAと特異的に相互作用しており、脂質代謝関連因子を阻害することにより5'UTRの元で亢進する翻訳効率を下げるができることがわかった。このことはウイルスの増殖に対し、5'UTRが促進的な働きを担っていること、さらにその過程において宿主由来の脂質代謝関連因子を利用していることを示唆している。この結果を受けて、スタチン系薬剤を治療薬候補とし調べたところ、アトルバスタチンおよびロスバスタチンが5'UTRによって生じた翻訳増強を抑制することがわかった。また、脂質代謝関連因子として、ACAA2とHMGCS2がこの翻訳増強過程に関与していることも示唆された。

さらに、本研究で用いたCRISPR/dCas13を応用した遺伝子工学的手法は、ウイルスゲノムの宿主細胞内における宿主由来因子との特徴的な相互作用を抽出し、細胞代謝に関わるターゲットを指し示す解析系を構築することにつながると考えられる。