

氏 名	清水 由梨香
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第7004号
学位授与の日付	令和6年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	An RNA-immunoprecipitation via CRISPR/dCas13 reveals an interaction between the SARS-CoV-2 5'UTR RNA and the process of human lipid metabolism (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)
論文審査委員	江國 大輔 教授 久保田 聡 教授 中山 真彰 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

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考えられる。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。

【方法】

1. 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。
2. 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。これをヒト肺胞上皮細胞株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。
3. 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 をシーケンス解析することで、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 (HMGCS), 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ことでることがわかった。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。

論文審査結果の要旨

【緒言】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を含む多くのRNAウイルスの5'非翻訳領域（UTR）は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、物理的な相互作用については解明が不十分である。本研究では、CRISPR/dCas13を用いた免疫沈降法を用いて、SARS-CoV-2 5'UTRに結合する宿主由来RNAを解析し、ヒト細胞においてウイルスRNAゲノムの制御の可能性と、宿主細胞の代謝に及ぼす影響を調べるモデルの構築を試みた。

【方法】SARS-CoV-2 5'UTR配列の3'末端側にLuciferase遺伝子が融合したRNAを発現させる plasmid vectorを作成し、ヒト細胞株（A549およびHEK293T）にトランスフェクトすることで、宿主であるヒトの細胞内において、SARS-CoV-2 5'UTR RNAを発現させた解析用モデルを作製した。本モデルを用い、SARS-CoV-2 5'UTR-Luciferase RNAを標的とした、CRISPR/dCas13を用いた免疫沈降法（TRIP）を実施し、抽出されたRNAを分析した。さらに、分析によって得られたRNA因子の特徴を元に、5'UTR配列の役割と宿主細胞に及ぼす影響を検討した。

【結果】作製したベクターをtransfectした細胞をルシフェラーゼアッセイ法で解析した結果、SARS-CoV-2 5'UTRは下流の遺伝子の翻訳効率を上昇させた。また、TRIPにより5'UTRに結合する宿主由来RNAに対してGene Ontology (GO) 解析を実施した結果、脂質代謝に関連するGO termが濃縮していた。さらにリアルタイム定量PCR解析により、脂質代謝関連タンパク質のmRNAレベルが、SARS-CoV-2 5'UTRの存在により変化すること、一部のスタチン系薬剤が5'UTRによってもたらされた翻訳増強を抑制することが明らかになった。さらに、acetyl-CoA acyltransferase 2および3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase遺伝子をknockdownすることにより、5'UTRによる翻訳増強が抑制された。

【考察】SARS-CoV-2 5'UTRは宿主細胞において下流の遺伝子の翻訳効率を高める働きを担っており、その働きには宿主由来の脂質代謝関連因子が関与していることが示唆された。

本研究ではSARS-CoV-2 5'UTRに着目し、RNAゲノムと相互作用する宿主由来因子を解析することで、5'UTRが翻訳を促進させる役割を担っており、その作用に脂質代謝関連因子が関与しているという新しい知見を得た。得られた成果は新規性に富んでおり、またウイルスと宿主因子との相互作用を標的とした新規治療法を開発するうえでの礎となるものである。今後、更なる詳細な現象の解明と、特異性の高い治療標的の発見が期待される。

本論文はすでにScientific Reports 2023 Jun 27;13(1):10413に掲載されており、国際的にも評価されている。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。