

Title	Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication
Author(s)	河内, 健吾
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/76459">https://hdl.handle.net/11094/76459</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

氏名 Name	河内 健吾
論文題名 Title	Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication (SARSコロナウイルスnsp4の2アミノ酸変異がウイルス複製を阻害する)
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>プラス鎖一本鎖RNAウイルスに分類されるコロナウイルスは感染後、細胞内に放出されるゲノミックRNAを鋳型に複製が開始される。しかし転写・増幅されたRNAはRIG-IやMDA、TLR3などによって検出され、種々の自然免疫応答を誘導する。これを回避するため細胞内の宿主オルガネラを改変し、ウイルス複製を行う場として複製装置を誘導することが知られている。重症呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの複製装置はDouble Membrane Vesicles とConvolved Membrane で構成され、それぞれnsp6、nsp3およびnsp4により誘導される。これまでにnsp4が細胞膜内腔側の領域でnsp3と相互作用することが知られている。しかし、コロナウイルスの複製装置の形成過程や機能については未知な部分が多い。本研究ではSARSコロナウイルスのnsp3およびnsp4の相互作用を詳細に分析し、これらの相互作用がウイルス複製に与える影響について検討した。</p> <p>〔方法および成績(Methods/Results)〕</p> <p>Nsp4の膜改変に必要な領域を検討するため、野生型または変異型nsp4とnsp3を293T細胞に共発現させ、免疫染色法を行ったところ野生型nsp4では各周辺部に凝集が認められたのに対し、<math>\Delta 112-164</math>変異体および<math>\Delta 220-234</math>変異体では認められなかった。一方でnsp4とnsp3の相互作用を検証するため行った免疫沈降反応では野生型及び<math>\Delta 220-234</math>変異体でnsp3の共沈が認められたのに対し、<math>\Delta 112-164</math>変異体では認められなかった。そこで<math>\beta</math>コロナウイルス種間でnsp4のアミノ酸比較を行ったところ121番目及び122番目のヒスチジン及びフェニルアラニンがよく保存されていた。これらのアミノ酸をアスパラギン及びロイシン置換したH121NF122L変異体を作製し、同様の検討を行ったが、<math>\Delta 112-164</math>変異体と同様に各周辺部の凝集もnsp3の共沈も認められなかった。また、透過型電子顕微鏡下で細胞内オルガネラの観察を行ったところ野生型では膜改変が認められたが、H121NF122L変異体では認められなかった。最後にH121NF122L変異体のウイルス複製における影響をSARSコロナウイルスのReverse genetics系を用いて評価した。Bacterial Artificial Chromosome上のCMVプロモーター下流に5'及び3'末端のUTRを含むSARS cDNAを導入し、3'末端にpolyA配列、HDV-Ribozyme配列、BGHターミネーター配列を付加した感染性cDNAを作製した。H121NF122L変異を相同組み換えでcDNAに導入し、Huh7細胞にトランスフェクション後72時間で上清及び細胞内RNAを回収し、TCID<sub>50</sub>及び定量RT-PCRによって感染価とウイルス由来RNA量をそれぞれ求めた。結果、野生型では感染価とウイルス由来RNA量の上昇が認められたが、H121NF122L変異体では認められなかった。さらに変異による影響の有無をウイルスの複製時点に限定し検討するため、ウイルスの構造タンパク質をコードする領域を除いたレプリコン系を用いてウイルス複製を評価したが、同様にH121NF122L変異体では野生型と比較して複製効率が著しく低下した。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>本研究によりnsp4とnsp3の結合が膜改変に必須であり、nsp4のH121NF122Lがnsp3への結合に重要であることが明らかになった。また<math>\Delta 220-234</math>変異体ではnsp3との共沈を認めたことからnsp3とnsp4の相互作用は膜改変を誘導するには不十分であると示唆された。このことから、膜改変におけるその他のウイルス由来もしくは宿主由来タンパク質の介在も予期される。さらに、SARSコロナウイルスの感染性cDNA及びレプリコンの実験系を用いて、nsp3とnsp4の相互作用の喪失がウイルス複製を著しく低下することを確認した。これらのことは、nsp3およびnsp4の相互作用が膜改変を通して複製装置形成の基盤となることでウイルス複製に深く関与しており、コロナウイルス感染症に対する新たな治療標的となることを示唆している。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		河内 健吾	
		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	松浦善流
	副 査	大阪大学教授	埴田 達也
	副 査	大阪大学教授	上田 啓次
論文審査の結果の要旨			
<p>コロナウイルスを含むRNAウイルスは宿主細胞内で効率的に自己複製を行うため、宿主オルガネラを改変し、複製装置を構築する。その形態や形成機構はウイルスによって様々である。重症呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスの複製装置はDouble Membrane Vesicles (DMVs) とConvolutd Membrane (CM) で構成されることは知られているが、複製装置の誘導機構は不明なままであった。</p> <p>申請論文ではCMの形成に必要なnsp4とnsp3の相互作用領域を、nsp4欠損変異体を作製し、詳細に分析している。これにより、nsp4とnsp3の結合が膜改変に必須であることを明らかとし、相互作用に必要なnsp4のアミノ酸領域を同定した。また、同定したアミノ酸を置換したウイルスを逆遺伝学的手法で作製することで、当該領域がウイルス複製で重要な役割を担うことが示唆された。さらにnsp3との相互作用には関与しないが、膜改変に重要な領域を同定しており、nsp3以外の蛋白質も複製装置形成に介在する可能性を示した。</p> <p>これらの成績はコロナウイルスの複製装置形成機構におけるnsp4とnsp3の相互作用がウイルス複製に重要であることを明らかにし、nsp4を介した他の蛋白質の関与する可能性を示していることから博士（医学）の学位に値するものと認める。</p>			