

2023年2月14日

学校法人甲南学園

新型コロナウイルスの複製を抑制できるRNAが ヒトの細胞内に存在している可能性が示されました

このたび、標記につきまして別紙の通り、お知らせいたします。

つきましては、取材ならびに紙面掲載についてご検討いただけますようお願い申し上げます。

《本件に関するお問い合わせ先》

[研究内容について]

甲南大学先端生命工学研究所 所長・教授 杉本直己

E-mail : sugimoto@konan-u.ac.jp

[プレスリリース全体について]

甲南学園広報部

兵庫県神戸市東灘区岡本 8-9-1

電話 : 078-435-2314 (直通) Email : kouhou@adm.konan-u.ac.jp

プレスリリース配信先 : 兵庫県教育委員会記者クラブ、神戸市政記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブ

新型コロナウイルスの複製を抑制できる RNA が

ヒトの細胞内に存在している可能性が示されました

甲南大学先端生命工学研究所 (FIBER) の遠藤玉樹准教授、高橋俊太郎准教授、杉本直己所長・教授らの研究グループは、ヒトの細胞中に存在する RNA の中から、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の複製を担うタンパク質 (RNA-dependent RNA polymerase (RdRp))¹⁾ の働きを抑える RNA を発見しました。

この研究成果は、抗ウイルス活性を示す核酸医薬品への研究展開が期待され、英国王立化学会 (Royal Society of Chemistry) が発行する「Chemical Communications 誌」に掲載されると共に、掲載号の中表紙に選出されました (2023 年 1 月 21 日掲載)。

【本研究の概要】

- ヒトの細胞に存在する RNA の中から、SARS-CoV-2 の RdRp に強く結合する RNA を独自に開発した技術を用いて選別しました。
- 選別された RNA の中に、RdRp による RNA 合成反応 (ウイルス RNA の複製反応) を抑制できる RNA が存在していることを発見しました。
- 選別された RNA がグアニン四重らせん構造²⁾という特徴的な形を作ることで抑制効果を発揮していることを見出しました。

本研究で見つけた RNA は、もともと細胞の中に存在している RNA です。そのため、ヒトに由来する RNA を基に、新型コロナウイルスに対する新たな核酸医薬品を開発する研究への発展が期待されます。

【研究背景】

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を引き起こすウイルスである SARS-CoV-2 の感染が拡大し始めてから 3 年以上経過しますが、未だに世界的な感染拡大はおさまっていません。また、COVID-19 に限らず、人類が未知のウイルス感染症によって健康被害や経済損失を受ける危険性は常に存在しています。mRNA ワクチンを始めとしたワクチンの開発は、ウイルスの感染と感染症の発症を予防するための強力な手段となります。しかしながら、未知なるウイルスに対して効果的なワクチンを開発するには時間と労力を要します。また、ウイルスの変異によるワクチン効果の低下も起こり得ます。そのため、ワクチンが開発されるまでの対応、あるいはワクチン開発後も、ウイルス感染症の重篤化を抑えるための手段として、ウイルスの増殖を抑制できる薬剤を開発することが望まれます。

【研究内容】

FIBER では、核酸分子である DNA や RNA が形成する特徴的な構造や機能を物理化学的に解析する研究を進めてきました。特に DNA から転写反応を経て合成される RNA は、独特の立体構造を形成することで様々な機能を発揮できます。そのうちの 1 つとして、タンパク質などの特定の分子を認識して特異的に結合する機能が知られています。FIBER の研究グループは、SARS-CoV-2 の RdRp に、ウイルス自身の RNA よりも強く結合できる RNA を獲得できれば、ウイルスの複製を抑制できるのではないかと仮説を立てました。そして、獲得した RNA を薬剤開発に展開することを念頭に、もともとヒトの中に存在する RNA から RdRp の働きを抑制できる RNA を獲得することを目指しました。

【研究成果】

FIBER では、RNA キャプチャー微粒子群 (R-CAMPs) と呼ばれる、個別の配列を持つ RNA が固定化された何百万種類もの微粒子を作製する技術 (図 1) を構築してきました (特開 2019-146516、発明者：遠藤玉樹、杉本直己)。本研究では、SARS-CoV-2 が感染すると重症化を引き起こす可能性のある肺組織に由来する細胞株から精製した RNA を基に R-CAMPs を調整しました。そして、R-CAMPs と蛍光分子で標識した SARS-CoV-2 のタンパク質を混合し、タンパク質と RNA との結合により強い蛍光シグナルを示している微粒子を FACS (Fluorescence Activated Cells Sorting) ³⁾ を用いて回収しました (図 2)。

FACS を用いて 1 粒子ずつ回収した微粒子から DNA を増幅し、DNA から RNA を転写合成することで選別された RNA の再合成を行いました。そして、再合成された RNA が、RdRp による RNA の合成反応を抑制できるか否かの検討を行いました (図 3A)。結果として、RdRp による RNA の合成反応を抑制できる RNA を複数種類獲得することに成功しました (図 3B)。さらに、抑制効果を示した RNA の配列を解析したところ、グアニン塩基が豊富な配列を有していることが確認されました。このような配列は、グアニン四重らせん構造という特徴的な立体構造を形成する可能性があります。そこで、最も強い抑制効果を示した RNA を用いて検討を行った結果、グアニン四重らせん構造を形成することで RdRp の働きを抑えていることが明らかとなりました (図 4A)。また、この RNA は、ラミニンタンパク質 ⁴⁾ を構成する β1 サブユニットをコードする遺伝子 (LAMB1) から転写された産物のイントロン ⁵⁾ 領域に存在していることも分かりました (図 4B)。

イントロンは、タンパク質をコードする mRNA の一次転写産物が合成された後に切り出される領域であり、ノンコーディングで不要な領域であると考えられてきました。しかしながら近年、ヒトの遺伝情報に多量に存在するノンコーディングな RNA 領域に、何かしらの生物学的な意味合いがあるのではなかと注目が集まりつつあります。今回の研究成果により、これまで不要と思われていたノンコーディングな RNA 領域が、新型コロナウイルスの複製を抑制できる可

能性を有していることが示されました。また、もともとヒトの中に存在する RNA であり、この RNA を基に抗ウイルス効果を示す核酸医薬品の研究開発への展開が期待されます。

先端生命工学研究所 (FIBER) は、今後も生命化学分野における研究開発を通じて、科学技術の振興と研究成果を通じた社会還元に寄与してまいります。

【用語説明】

1) RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)

RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり、RNA ウイルスの遺伝情報 (RNA) を鋳型として新たにウイルス RNA を合成するために必要なタンパク質。SARS-CoV-2 の RdRp は、ウイルス自身の遺伝情報にコードされており、ヒトには存在しないことから薬剤開発の標的となり得る。レムデシビル、モルヌピラビルといった新型コロナウイルス感染症に対する承認薬は、RdRp に作用する。

2) グアニン四重らせん構造

4 つのグアニン塩基が平面上で円を描くように配置された G-カルテットと呼ばれる塩基対様式を基本として、G-カルテットが積み重なって形成される構造。カリウムイオンの存在下で安定化される。近年、細胞の内部でも DNA や RNA にグアニン四重らせん構造が形成されることが確認され、遺伝子の発現を調節する役割など、その生物学的意味合いに注目が集まっている。

3) FACS (Fluorescence Activated Cells Sorting)

細く制御された水流中を流れてくる大量の粒子 (主に細胞) の蛍光シグナル強度を解析しつつ、任意の蛍光シグナルを示す粒子を 1 つずつ選別して回収する手法。

4) ラミニンタンパク質

細胞が集まって組織を形成していくための足場となる細胞外マトリクスを構成するタンパク質の一種。様々な組織に普遍的に存在している。 α 、 β 、 γ の 3 種類のサブユニットが 3 量体となって形成される。それぞれのサブユニットにも複数種類が存在していることが知られている。

5) イントロン

真核生物の遺伝子が転写された産物 (一次転写産物) からスプライシング反応を経て取り除かれる領域。タンパク質をコードする mRNA の場合、イントロン領域は翻訳されないため、ノンコーディングな RNA 領域として位置づけられる。

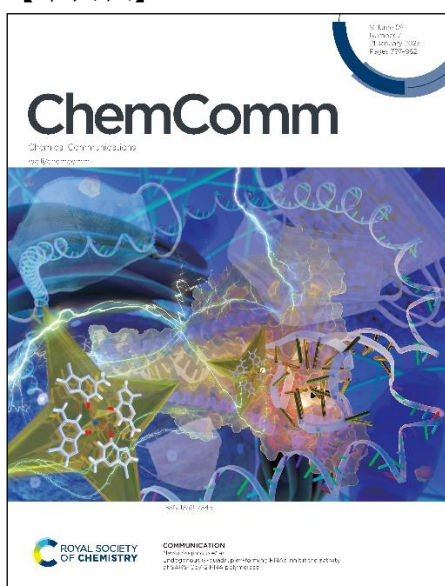
【掲載論文】

Endogenous G-quadruplex-forming RNAs inhibit the activity of SARS-CoV-2 RNA polymerase

Tamaki Endoh, Shuntaro Takahashi, and Naoki Sugimoto

Chem. Commun., 59, 872-875 (2023)

【中表紙】



【研究支援】

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) 科研費 22H04975 (基盤研究(S)、研究代表者：杉本直己)、21H05108 (学術変革領域研究(B)、研究代表者：遠藤玉樹)、18KK0164 (国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化(B))、研究代表者：杉本直己)、JSPS 研究拠点形成事業 JPJSCCA20220005 (研究代表者：杉本直己)、甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金 (研究代表者：杉本直己)、伊藤忠兵衛基金 (研究代表者：杉本直己)、木下基礎科学研究基金助成 (研究代表者：遠藤玉樹) の支援を受けました。

【内容に関するお問い合わせ】

甲南大学

先端生命工学研究所

所長・教授

杉本 直己

E-mail: sugimoto@konan-u.ac.jp

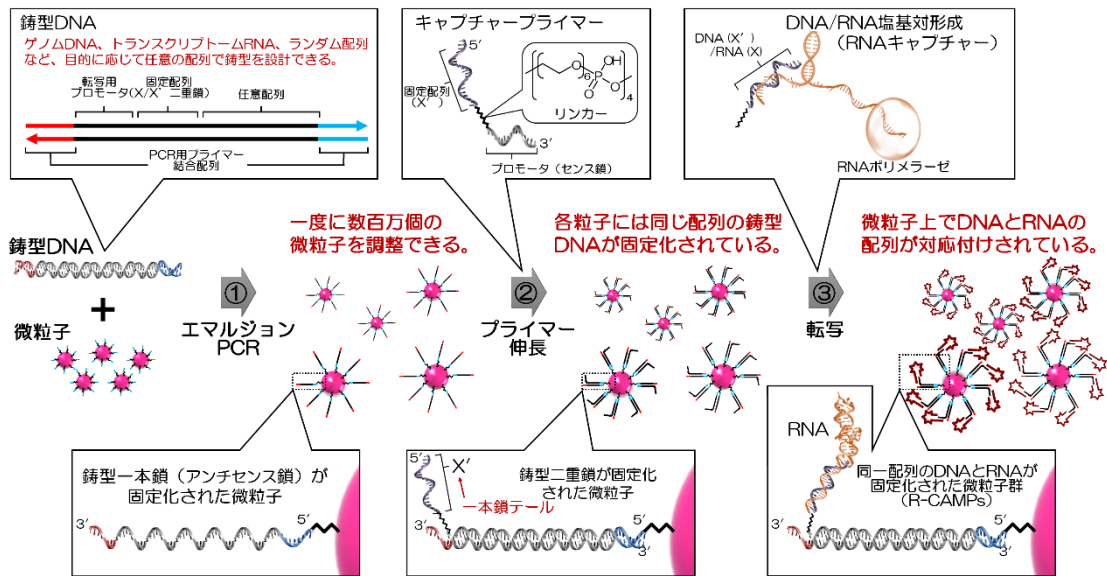


図1 RNA キャプチャー微粒子群 (R-CAMPs) の調製過程

様々な配列を有する鋳型 DNA をもとにして、①1つの微粒子に数十万コピーの DNA と RNA が固定化されている、②同じ微粒子には同じ配列の DNA と RNA が固定化されている、③異なる微粒子には異なる配列の DNA と RNA が固定化されている、といった特徴を有する微粒子群を一度に数百万種類得ることができる。

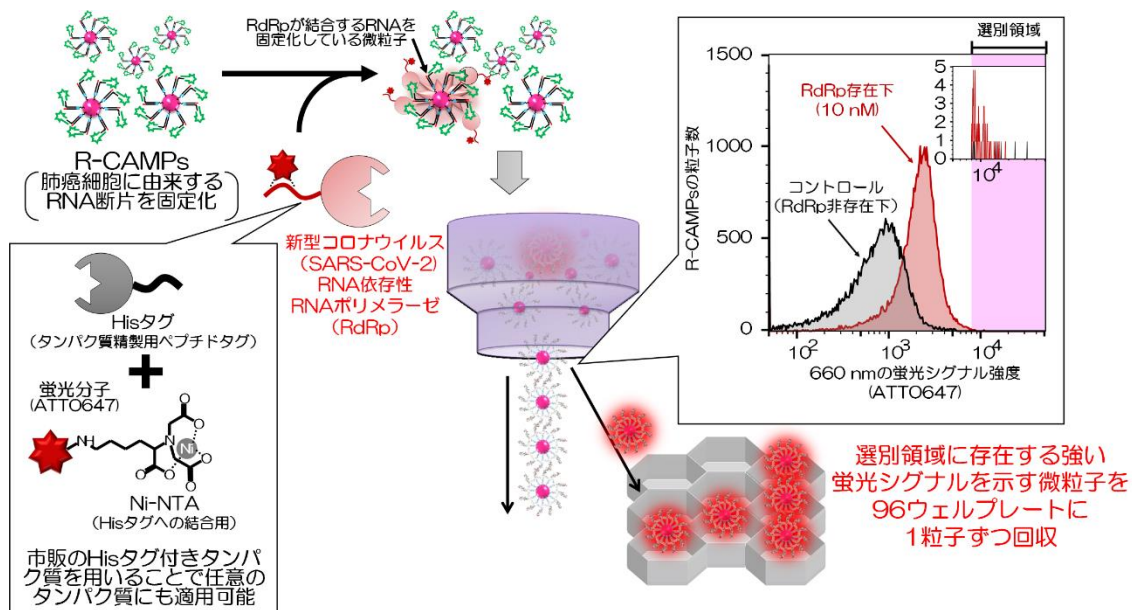


図2 RdRpに結合するRNAの選別過程

肺癌細胞に由来するRNA断片を固定化したR-CAMPsを調整し、蛍光色素であるATTO647で標識したRdRpと混合する。RdRpと結合するRNAを固定化している微粒子はATTO647の蛍光シグナルを示す。セルソーターを用いて、R-CAMPsの蛍光シグナルを解析しつつ、選別領域として設定した強い蛍光シグナルを示す微粒子を1粒子ずつマルチウェルプレート(96ウェルプレート)に回収する。

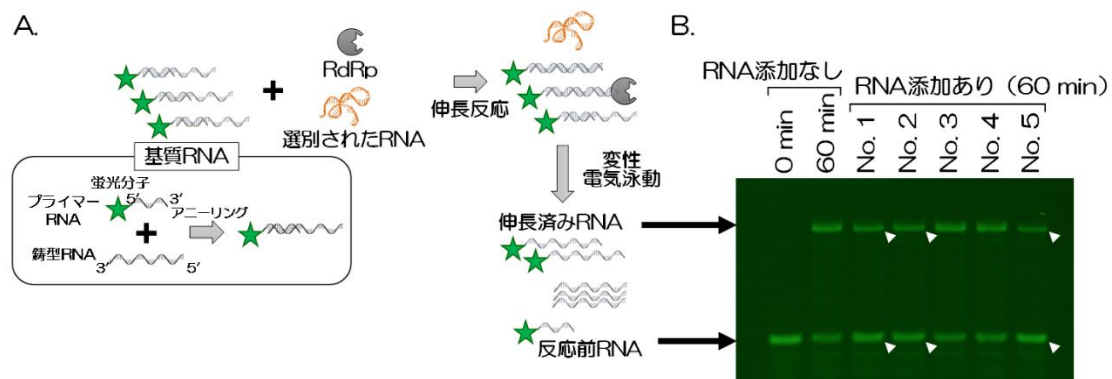


図3 選別された RNA による RdRp の抑制効果

A) 鋳型 RNA に蛍光標識されたプライマー RNA が塩基対を形成した基質 RNA を用意し、選別された RNA の存在下で RdRp による RNA の合成反応（伸長反応）を行う。その後、変性電気泳動を行い、合成反応が進んだ RNA（伸長済み RNA）と進まなかった RNA（反応前 RNA）をその長さの違いで分離して存在量を解析する。B) 変性電気泳動後のゲル中に存在する蛍光標識された RNA をイメージングした結果。RNA の合成反応が進んだ場合は伸長済み RNA が多く確認され、合成反応が抑制された場合は反応前 RNA のシグナルが多く確認される。RdRp による RNA 合成反応が抑制され、コントロールとなる「RNA 添加なし」のサンプルと比較して反応前 RNA の量が増えているサンプルの位置を白矢頭で示した。

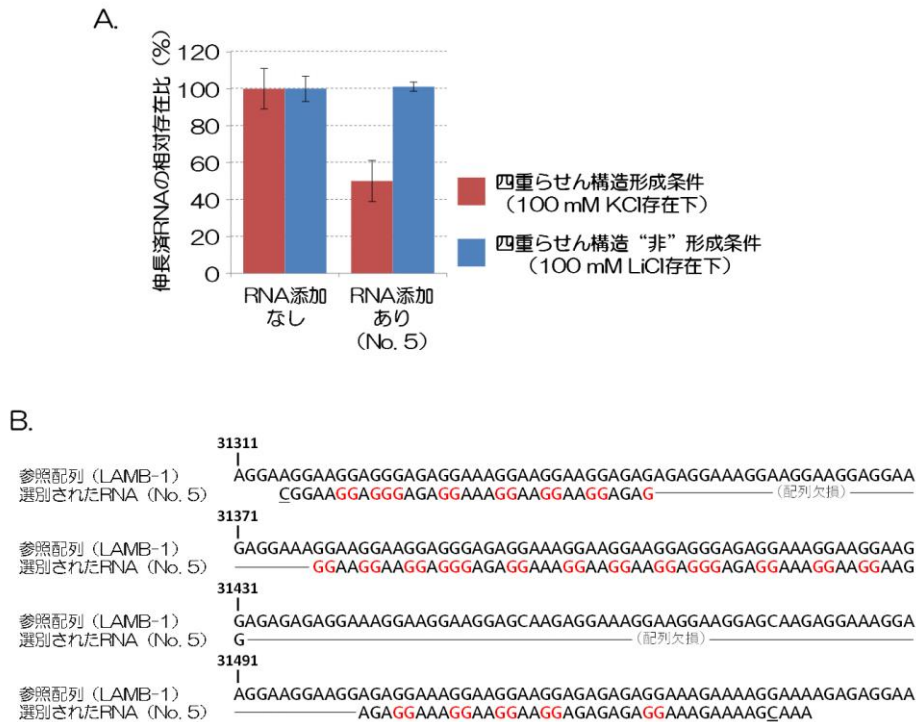


図4 グアニン四重らせん構造の形成に依存した RNA 合成反応の抑制効果

A) 図 3A で示した RNA 合成反応を、グアニン四重らせん構造を安定化する条件 (100 mM KCl 存在下)、および不安定化する条件 (100 mM LiCl 存在下) で行った。図 3B で最も強い抑制効果を示した No. 5 の RNA の存在下、非存在下での伸長済み RNA の相対的な存在量を定量してその抑制効果を評価した。No. 5 の RNA は、四重らせん構造が不安定化される 100 mM LiCl を含む溶液条件では RdRp による RNA 合成反応を抑制できないことが示された。B) No. 5 の RNA 配列をヒトのゲノム配列を参照配列として当てはまる配列を検索した結果、laminin subunit beta 1 (LAMB1) の一次転写産物のイントロン領域に一致することが確認された。代表的な参照配列との比較を示しているため、部分的に配列欠損が存在する。グアニン四重らせん構造の形成に関与し得る連続したグアニンを赤字で示してある。