

博士論文

新型コロナウイルスの免疫逃避機構の解析

(Investigation of immune evasion mechanism of SARS-CoV-2)

木村 出海

目次

要旨	2
略語一覧	4
序論	6
目的	10
実験方法と材料	11
結果	19
考察	26
引用文献	32
図表の部	38
謝辞	75

要旨

新型コロナウイルス (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2) を原因とする新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019; COVID-19) は、2021 年 12 月現在も世界中で流行拡大を広げている、喫緊の課題である¹。しかし、約 2 年前に突如として出現したこのウイルスについては十分に理解が進んでいない点が多く、その感染病態の原理についても未だ不明な点が多い。

この感染症の特徴のひとつとして、ウイルス感染に対するインターフェロン (interferon; IFN) の産生が、インフルエンザや重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome; SARS) などの他の呼吸器感染症に比べて顕著に抑制されていることが知られている²。また、ウイルス感染実験により、SARS コロनावirus (SARS-CoV) の感染時に比べ、SARS-CoV-2 の感染時に産生される IFN の量が少ないこと、すなわち、SARS-CoV-2 が、SARS-CoV より強力な IFN 応答阻害能を有することが示唆されている³。しかし、SARS-CoV-2 がどのような分子メカニズムで IFN 応答を阻害するのか、また、なぜ SARS-CoV-2 は SARS-CoV に比べて強い IFN 応答阻害活性を示すのか、その原理は明らかとなっていなかった。

SARS-CoV-2 は、流行拡大に伴う変異の蓄積によって、「懸念すべき変異株 (variant of concern; VOC)」および「注目すべき変異株 (variant of interest; VOI)」という、従来の SARS-CoV-2 に比べて強い感染力を持つとされる変異株が出現してきている。VOC および VOI は、SARS-CoV-2 のスパイク (spike; S) タンパク質に複数の変異を有しており、これらの変異によって、中和抗体に対する抵抗性の獲得や感染力の上昇といった、ウイルスの感染拡大に有利な形質を獲得していることが示唆されている⁴。その中でも、南米を中心に感染拡大し、2021 年 6 月に新たに VOI に指定されたラムダ株 (Lambda variant; C.37 lineage) については、十分な解析が進んでいない。

そこで本研究では、SARS-CoV-2 がどのようにして IFN 応答を阻害しているのか、また、

なぜ SARS-CoV-2 が SARS-CoV に比べて強い IFN 阻害活性を有するのか、その理由を明らかにすることを目的とした。さらに、流行拡大の中で出現したラムダ株には、その S タンパク質にどのような変異が蓄積しており、それによってどのような形質を獲得しているのかを明らかにすることを目的とした。

本研究により、SARS-CoV-2 の ORF3b タンパク質が SARS-CoV の ORF3b タンパク質よりも強い IFN 阻害活性を有すること⁵、また、サルベコウイルスの ORF6 タンパク質が IFN 阻害活性を有し、SARS-CoV-2 の ORF6 タンパク質は SARS-CoV の ORF6 タンパク質よりも強い IFN 阻害活性を有すること⁶をそれぞれ明らかにし、それらの分子メカニズムと進化動態を解明した。さらに、SARS-CoV-2 ラムダ株が、S タンパク質の変異によって感染価および中和抗体抵抗性を獲得していること⁷を解明した。以上の結果より、SARS-CoV-2 の流行拡大に伴って、様々なウイルス遺伝子に変異が蓄積し、その形質を変化させながら感染を広げていることが示唆された。

略語一覽

ACE2	angiotensin converting enzyme 2
COVID-19	coronavirus disease 2019
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	fetal calf serum
GISAID	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data
GFP	green fluorescent protein
HA	hemagglutinin
HCl	hydrogen chloride
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IFN-I	type I interferon
IRF3	interferon regulatory factor 3
IRFBS	interferon regulatory factor binding site
IgG	immunoglobulin G
LMNA	lamin a/c
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger ribonucleic acid
NLS	nuclear localization signal
NPC	nuclear pore complex
NTD	N-terminal domain
NUP98	nucleoporin 98
NaCl	sodium chloride
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEI	polyethylenimine
PRRs	pattern recognition receptors
PVDF	poly vinylidene difluoride

RAE1	ribonucleic acid export 1
RBD	receptor binding domain
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
SARS	severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDS	sodium dodecyl sulfate
SeV	sendai virus
TBS	tris buffered saline
TMPRSS2	transmembrane protease serine 2
TUBA	alpha tubulin
VOC	variants of concern
VOI	variants of interest
VSV	vesicular stomatitis virus
WT	wild type

序論

1. 新型コロナウイルスの流行拡大

新型コロナウイルス（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2）を原因とする新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、2021年11月10日現在、全世界において2億5000万人以上が感染し、500万人以上を死に至らしめている、喫緊の課題である¹。現在、世界中でワクチンの接種や抗ウイルス薬の開発が進められており、日本においてもワクチンの接種が進行している。しかし、約2年前に突如として出現したこのウイルスについては十分に解析が進んでいない点が多く、感染病態の原理についても未だ不明な点が多い。

2. SARS-CoV-2 の遺伝子構造

SARS-CoV-2 は、約30000塩基のRNAで構成されるRNAウイルスである⁸。SARS-CoV-2のゲノムRNAの5'側には非構造タンパク質をコードする *ORF1ab* が、3'側には構造タンパク質をコードする *S* (spike; *ORF2*)、*E* (envelope; *ORF4*)、*M* (membrane; *ORF5*)、*N* (nucleocapsid; *ORF9a*) が存在している。また、構造タンパク質をコードする3'側の領域には、*ORF3a*、*ORF3b*、*ORF6*、*ORF7a*、*ORF7b*、*ORF8*、*ORF9b*、*ORF9c*、*ORF10* というアクセサリタンパク質をコードする遺伝子が存在している⁹ (図1)。

3. SARS-CoV-2 および近縁のウイルスの系統分類

SARS-CoV-2 は、重症急性呼吸器症候群（severe acute respiratory syndrome; SARS）の原因ウイルスである SARS コロナウイルス（SARS-CoV）と遺伝的に近縁なウイルスであることが知られており、いずれのウイルスもベータコロナウイルス属サルベコウイルス亜属に属する¹⁰。SARS-CoV と近縁のウイルス（SARS-CoV 関連コロナウイルス; SARS-CoV related virus）がコウモリ^{11,12} およびジャコウネコ¹³ から検出されている。同様に、SARS-CoV-2 と

近縁のウイルス（SARS-CoV-2 関連コロナウイルス; SARS-CoV-2 related virus）がコウモリ¹⁴ およびセンザンコウ¹⁵ から検出されている。

4. ウイルス感染に対する免疫応答

ヒトがウイルスに感染した際にはたらく初期免疫応答として、自然免疫応答が知られている。自然免疫応答は、パターン認識受容体によるウイルス由来の物質（異物）の認識に始まる。パターン認識受容体が異物を認識すると、インターフェロン（IFN）制御因子のひとつである IRF3 がリン酸化を受け、二量体化し、細胞質から核へと移行する。核内に移行した IRF3 は、強いウイルス複製阻害作用を持つ物質である I 型 IFN の産生を引き起こす（図 2）。産生された I 型 IFN は、IFN 受容体に結合することで、さらに下流にシグナル伝達を引き起こし、最終的には、ウイルス複製阻害作用を持つ様々な IFN 誘導性遺伝子の発現を誘導する¹⁶。また、自然免疫応答に引き続く獲得免疫応答のひとつとして、液性免疫応答が知られている。ウイルス感染に対する液性免疫応答は、ウイルスの感染力を失活させる作用を持つ抗体（中和抗体）によって担われている¹⁷。

5. タンパク質 NUP98 と RAE1 の機能およびウイルス感染との関連

ウイルス複製を阻害するような宿主の応答に対するウイルスの戦略として、ウイルスタンパク質による宿主の mRNA 輸送を阻害する機構が知られている^{18,19}。ヒトの mRNA 輸送には、核の内外をつなぐ核膜孔複合体（nuclear pore complex; NPC）を介した物質輸送が関わっている²⁰。NPC は複数のタンパク質が集合することによって形成されており、これを構成するタンパク質として、RAE1 および NUP98 が知られている^{21,22}。これらの RAE1 と NUP98 は、複合体を形成し、この複合体が RNA 輸送に関わることが報告されている²³。一方で、水泡口炎ウイルス（vesicular stomatitis virus; VSV）のマトリックスタンパク質（VSV-M）が、RAE1 および RAE1-NUP98 複合体を介してこれらの機能を阻害することで、宿主の mRNA の輸送を阻害することが報告されている²⁴。さらに、VSV-M の配列における RAE1-

NUP98 複合体との結合に重要なモチーフが決定されており²⁵、それに似たモチーフが SARS-CoV-2 のタンパク質 ORF6 に存在することが推定されている⁹。

6. SARS-CoV-2 による IFN 応答阻害

COVID-19 患者を解析した過去の研究によって、この感染症の特徴のひとつとして、ウイルス感染に対する IFN の産生が、インフルエンザや SARS などの他の呼吸器感染症に比べ、顕著に抑制されていることが明らかとなっている²。また、*in vitro* および *ex vivo* のウイルス感染実験により、SARS コロナウイルス (SARS-CoV) の感染時に比べ、SARS-CoV-2 の感染時に産生される IFN の量が少ないことが報告されている^{2,3}。

7. SARS-CoV-2 感染におけるスパイクタンパク質の機能

SARS-CoV-2 のウイルス粒子を形成する構造タンパク質の 1 つである S タンパク質は、受容体を介した細胞への侵入を担うタンパク質である²⁶。SARS-CoV-2 の S タンパク質は、1273 残基のアミノ酸からなり、その領域ごとに複数のドメインに分類されている²⁷。S タンパク質のうち、特に、受容体結合ドメイン (receptor binding domain; RBD) を介して受容体である宿主細胞表面の ACE2 と結合し、宿主のプロテアーゼである TMPRSS2 によるタンパク質切断を受けることで細胞内へと侵入する^{27,28}。また、RBD は、中和抗体によって認識されやすい領域であることも知られており、この領域に変異が挿入されることで、中和抗体に対する抵抗性を獲得することが報告されている²⁹。同様に、N 末端ドメイン (N-terminal domain; NTD) 上にも、supersite と呼ばれる中和抗体によって認識されやすい領域が存在し、この領域に変異が挿入されることで、中和抗体に対する抵抗性を獲得することが報告されている³⁰。

8. SARS-CoV-2 の変異株の出現

SARS-CoV-2 のパンデミック (全世界での流行拡大) に伴って、様々な変異が SARS-CoV-

2に蓄積している。特に、Sタンパク質上の614位のアミノ酸については、出現当初のSARS-CoV-2ではアスパラギン酸がコードされていたが、現在流行しているSARS-CoV-2については、そのほぼ全てがグリシンに置換された株(D614G株)であり、この変異によってACE2との結合が増強し、感染に有利に働くことが報告されている^{31,32}。さらに、この流行拡大に伴う変異の蓄積によって、「懸念すべき変異株(variant of concern; VOC)」および「注目すべき変異株(variant of interest; VOI)」という、従来のSARS-CoV-2に比べて強い感染力を持つとされる変異株が出現している。VOCおよびVOIは、SARS-CoV-2のSタンパク質に、D614G変異を含む複数の変異を有しており、これらの変異によって、中和抗体に対する抵抗性や感染力の上昇などの、ウイルスの感染拡大に有利な形質を獲得していることが示唆されている⁴。

目的

感染実験により、SARS-CoV-2 の感染時に産生される IFN の量が、SARS-CoV の感染時に産生される IFN の量に比べて少ないことが報告されている^{2,3}。このことから、SARS-CoV-2 が SARS-CoV より強い IFN 阻害活性を有することが示唆されていた。しかし、SARS-CoV-2 がどのような分子メカニズムで IFN 応答を阻害するのか、および、なぜ SARS-CoV-2 は SARS-CoV に比べて強い IFN 応答阻害活性を示すのかについては明らかとなっていなかった。また、SARS-CoV-2 の感染拡大の中で出現してきた様々な VOC および VOI について、S タンパク質に蓄積している変異と、その形質の関連が調べられてきている。しかし、2021 年 6 月に新たに VOI に指定されたラムダ株 (Lambda variant; C.37 lineage) については、十分に解析が進んでいなかった。

そこで、本研究では、SARS-CoV-2 がどのようにして IFN 応答を阻害しているのか、また、なぜ SARS-CoV-2 が SARS-CoV に比べて強い IFN 阻害活性を有するのか、その理由を明らかにすることを目的とした。さらに、流行拡大の中で出現したラムダ株には、その S タンパク質にどのような変異が蓄積しており、それによってどのような形質を獲得しているのかを明らかにすることを目的とした。

実験方法と材料

細胞株と培養方法

HEK293 細胞、HEK293T 細胞および HeLa 細胞は、いずれも ATCC 社から購入し、10% Fatal Calf Serum (FCS) (ニチレイ) および 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (Sigma #P4333-100ML) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose 培地 (Sigma #D6046-500ML) で培養した。ヒト ACE2 およびヒト TMPRSS2 定常発現 HOS (HOS-A/T) 細胞は、国立感染症研究所の徳永研三先生より分与いただき、10% FCS および 1% P/S を含む DMEM High Glucose 培地 (Sigma #D6429-500ML) で培養した。

遺伝子配列の取得および解析

本研究で使用したウイルス遺伝子の配列は、公共データベース Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) および GISAID (<https://www.gisaid.org>) より取得した。サルベコウイルスの各遺伝子配列の比較に使用したウイルス配列の Accession Number は表 1 に記載した。また、ベータコロナウイルスの遺伝子構造比較に使用したウイルス配列の Accession Number は表 2 に記載した。

ORF3b 伸長型変異体の出現は、CoV-GLUE (<http://cov-glue.cvr.gla.ac.uk>) を用いて検出した。*ORF6* 欠損変異体の出現の解析には、GISAID (2020 年 7 月 16 日時点) に登録されたウイルス配列を使用した。*ORF6* 領域の配列を得るために、SARS-CoV-2 ゲノムのマルチプルアラインメントを実施し、フレームシフトあるいはナンセンス変異によって、*ORF6* が欠損した配列を含む変異体を同定した。ラムダ株の配列解析には、GISAID (2021 年 6 月 29 日時点) に登録されたウイルス配列を使用した。PANGO 系統 C.37 (ラムダ株) と分類された 1908 個のシーケンスデータを解析することで、ラムダ株の S タンパク質に特徴的な変異を同定した。

ウイルス遺伝子発現ベクターの作製

ウイルス遺伝子発現ベクターのバックボーンには、pCAGGS³³を使用した。*ORF3b* 遺伝子および *ORF6* 遺伝子について、HA タグつきの遺伝子を、Fasmac 社の遺伝子人工合成サービスによって合成した。合成したウイルス遺伝子の配列データの Accession number については表 2 のものと同じものを使用した。各ウイルス遺伝子より作製した変異体は、表 3 に記載したプライマーを用いて、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara #R050A) を用いた PCR によって作製した。作製したベクターの配列は、Fasmac 社の DNA 解析サービスおよび Sequencher version 5.1 software (Gene Codes Corporation) により解析した。S タンパク質発現ベクターについては、国立感染症研究所の徳永研三先生より分与いただいた、pC-SARS-CoV-2 D614G ベクター³²を鋳型に、表 4 に記載したプライマーを用いて、PrimeSTAR GXL DNA polymerase を用いた PCR によって作製した。作製したベクターの配列は、Fasmac 社と Eurofins 社の DNA 解析サービスおよび Sequencher version 5.1 software (Gene Codes Corporation) により解析した。

ウイルス遺伝子の IFN 応答阻害活性検討実験 (トランスフェクション、SeV 感染、レポーターアッセイ)

HEK293 細胞を 96 well plate (nunc) に 1×10^4 /well で播種し、その 24 時間後に PEI MAX (Polysciences #24765-100) を用いて、p125-Luc ベクターおよびウイルス遺伝子発現ベクターをそれぞれ 500 ng ずつトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に、広島大学の入江崇先生から分与いただいたセンダイウイルス (SeV)³⁴ を MOI 10 で感染させ、IFN 応答を誘導した。SeV 感染から 24 時間後に、培養上清を除き、120 μ L の 2%FCS 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) (ナカライテスク #07269-84) で細胞を懸濁した。懸濁した細胞液のうち 50 μ L と、ピッカジーン BrilliantStar-LT 試薬 (東洋ビーネット #BLT1000) 50 μ L を 96 well white plate (Nunc) 上で混合した。また、細胞数の補正を行うため、細胞液 50 μ L と CellTiter-Glo 2.0 assay kit (Promega #G9241) 50 μ L を 96 well white plate 上で混合し

た。これらの 96 well white plate について、2030 ARVO X multilabel counter instrument (PerkinElmer) あるいは GloMax Explorer Multimode Microplate Reader 3500 (Promega) を用いて発光強度を計測した。

細胞分画とウエスタンブロッティング

Nuclear/Cytosol Fractionation protocol using fractionation Kit (BioVision #K266-25)を用いて、以下のように実施した。HEK293T 細胞を 12 well plate (nunc) に 1×10^5 /well で播種し、その 24 時間後に PEI MAX を用いて 1 μ g の ORF3b 発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に培地を交換し、トランスフェクションから 48 時間後に細胞をエッペンチューブに回収した。4°C、6200 rpm で 5 分間遠心し、上清を除いて 200 μ L の CEB-A mix を tube に加え、15 秒間ボルテックスし、細胞を完全に溶解させた。細胞溶解液を氷上で 10 分間インキュベートし、CEB-B mix を 11 μ L 加えた。この溶液を 5 秒間ボルテックスし、氷上で 1 分間インキュベートした。氷上反応後、再度 5 秒間ボルテックスし、4°C、13500 rpm で 5 分間遠心した。上清を 200 μ L 別のチューブにとり、200 μ L の 2x SDS sample buffer (125mM Tris-HCl buffer [pH 6.8], 4% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.005% Bromophenolblue) と混合、99°Cで 10 分間煮沸し、これを細胞質画分とした。遠心後の沈殿物を NEB mix 100 μ L に懸濁した。この沈殿懸濁液を 15 秒間ボルテックスし、氷上で 10 分間インキュベートの操作を 4 度繰り返した後、4°C、13500 rpm で 10 分間遠心した。上清を 80 μ L 別のチューブにとり、80 μ L の 2x SDS sample buffer と混合、99°Cで 10 分間煮沸し、これを核画分とした。細胞質画分および核画分について、18%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行なった。SDS-PAGE 後、PVDF 膜 (Immobilon-P; Millipore #IPVH00010) に転写し、Block Ace (KAC #UKB80) を用いて 1 時間室温でブロッキングした。ブロッキング後の PVDF 膜に一次抗体を反応させた。一次抗体には、HRP-conjugated anti-HA 抗体 (Roche #12013819001)、Anti-alpha-Tubulin (TUBA) 抗体 (Sigma #T9026)、Anti-lamin A/C (LMNA) 抗体 (Cell Signaling Technology #2032S) を用いた。HRP-

conjugated anti-HA 抗体を反応させた PVDF 膜については、抗体反応後 10 分おきに 3 回 TBS-T で PVDF 膜を洗浄した後に、Western Lightning Plus ECL (Perkinelmer #NEL104001EA) に PVDF 膜を浸し、ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) で発光を検出した。TUBA 抗体および LMNA 抗体を反応させた PVDF 膜については、10 分おきに 3 回 TBS-T で PVDF 膜を洗浄し、その後 1 時間、二次抗体を反応させた。二次抗体は HRP-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology #7076)、HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology #7074S) を用いた。二次抗体反応後、10 分おきに 3 回 TBS-T で PVDF 膜を洗浄した後に、Western Lightning Plus ECL に PVDF 膜を浸し、ChemiDoc Touch Imaging System で発光を検出した。

ウエスタンブロッティングによるウイルスタンパク質の検出

HEK293T 細胞を 12 well plate に 1×10^5 /well で播種し、その 24 時間後に、PEI MAX を用いてウイルスの ORF3b 発現ベクターあるいは ORF6 発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に培地を交換し、トランスフェクションから 48 時間後に細胞をエッペンチューブに回収した。4°C、6200 rpm で 5 分間遠心し、上清を除き、細胞の沈殿物に 80 μ L の RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 1% NP-40) を加え、ピペッティングで溶解した。細胞溶解液を氷上で 30 分間静置し、4°C、13500 rpm で 10 分間遠心し、50 μ L の上清をとり、50 μ L の 2x SDS sample buffer と混合し、99°C で 10 分間煮沸した。このサンプルについて、18% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行なった。SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、Block Ace で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後の PVDF 膜に一次抗体を反応させた。一次抗体には、HRP-conjugated anti-HA 抗体、TUBA 抗体を用いた。HRP-conjugated anti-HA 抗体を反応させた PVDF 膜については、抗体反応後 10 分おきに 3 回 TBS-T で PVDF 膜を洗浄した後に、Western Lightning Plus ECL に PVDF 膜を浸し、ChemiDoc Touch Imaging System で発光を検出した。TUBA 抗体を反応させた PVDF 膜については、10 分おきに 3 回 TBS-T

で PVDF 膜を洗浄し、その後 1 時間、二次抗体を反応させた。二次抗体は HRP-conjugated anti-mouse IgG を用いた。二次抗体反応後、10 分おきに 3 回 TBS-T で PVDF 膜を洗浄した後に、Western Lightning Plus ECL に PVDF 膜を浸し、ChemiDoc Touch Imaging System で発光を検出した。

免疫染色

ORF3b 発現細胞の免疫染色については以下のように行なった。Hera 細胞を 12 well plate に 1×10^5 /well で播種し、その 24 時間後に、PEI MAX を用いて $1 \mu\text{g}$ の ORF3b 発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に SeV を MOI 5 で感染させ、感染から 24 時間後に培養上清を除き、 $500 \mu\text{L}$ の Formaldehyde solution (FUJIFILM Wako Chemicals #061-00416) を加え、室温で 20 分間インキュベートして細胞を固定した。固定後、PBS (-) で 3 回洗浄し、 $500 \mu\text{L}$ の 0.1% Triton X-100 を加え、室温で 20 分間インキュベートして細胞を透過処理した。透過処理後、PBS (-) で 3 回洗浄し、 $500 \mu\text{L}$ の 2% FCS 含有 PBS を加え、室温で 30 分間インキュベートしてブロッキングした。ブロッキング後、PBS (-) で 3 回洗浄し、一次抗体を暗所、室温で 1 時間反応させた。一次抗体には FITC-conjugated anti-HA antibody (Roche #11988506001)、Anti-IRF3 (Abcam #ab68481) を使用した。一次抗体反応後、PBS (-) で 3 回洗浄し、二次抗体を暗所、室温で 1 時間反応させた。二次抗体には Alexa Fluor 546-conjugated anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific #A-11010) を使用した。二次抗体反応後、PBS (-) で 3 回洗浄し、ProLong diamond antifade mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific #P36971) で封入し、FV-1000D confocal microscope (Olympus) で観察した。

ORF6 発現細胞の免疫染色については以下のように行なった。HEK293T 細胞を 24 well plate (nunc) に 5.0×10^4 /well で播種し、その 24 時間後に PEI MAX を用いて 250 ng の ORF6 発現ベクターと 250 ng の GFP 発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に SeV を MOI 10 で感染させ、感染から 24 時間後に培養上清を除き、

500 μ L の 4% paraformaldehyde を加え、室温で 20 分間インキュベートして細胞を固定した。固定後、PBS (-) で 3 回洗浄し、500 μ L の 0.5% Triton X-100, 5% FCS in PBS を加え、室温で 20 分間インキュベートして細胞を透過処理した。透過処理後、PBS (-) で 3 回洗浄し、500 μ L の 2% FCS 含有 PBS を加え、室温で 30 分間インキュベートしてブロッキングした。ブロッキング後、PBS (-) で 3 回洗浄し、一次抗体を暗所、室温で 1 時間反応させた。一次抗体には Anti-IRF3 (Cell Signaling Technology #11904T) を使用した。一次抗体反応後、PBS (-) で 3 回洗浄し、二次抗体を暗所、室温で 1 時間反応させた。二次抗体には Alexa Flour 647-conjugated anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific #21244) を使用し、核の染色には DAPI (Sigma Aldrich #D9542-1MG) を使用した。二次抗体反応後、PBS (-) で 3 回洗浄し、Mowiol mounting medium (Cold Spring Harbor Protocols) で封入し、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 710) で観察した。

共免疫沈降

HEK293T 細胞を 10 cm dish (nunc) に 2.0×10^6 /dish で播種し、その 24 時間後に PEI MAX を用いて 10 μ g の ORF6 発現ベクターと 10 μ g の pCAGGS 空ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから 12 時間後に培養上清を除き、10 mL の DMEM (Low Glucose) 培地に交換した。トランスフェクションから 48 時間後に、細胞を PBS (-) で 3 回洗浄後全量回収し、1.2 mL の Lysis Buffer (0.1% Triton X-100, 10 mM Tris [pH7.5], 0.25% Sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) で溶解した。細胞溶解液を 10 分間氷上で静置し、16500 G, 4°C で 5 分間遠心し、遠心後の上清を 50 μ L 取り、50 μ L の 2x SDS sample buffer と加えて 99°C で 10 分間煮沸した。残りの上清のうち 450 μ L に Anti-HA magnetic beads (MBL #M132-11) を 50 μ L 加え、4°C で 1 時間緩やかに回転させながらインキュベートした。1 時間後、マグネットラックを用いて上清を除いた。ビーズを 1 mL の Wash Buffer (0.1% Triton X-100, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris [pH7.5]) で 3 回洗浄し、50 μ L の 1x SDS sample buffer (62.5mM Tris-HCl buffer [pH 6.8], 2% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.0025%

Bromophenolblue) でビーズを懸濁し、99°Cで10分間煮沸した。煮沸後、マグネットトラックを用いて上清を回収した。この上清について、8%ポリアクリルアミドゲルおよび18%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、Block Ace で1時間ブロッキングした。ブロッキング後の PVDF 膜に一次抗体を 4°Cで12時間反応させた。一次抗体には、Anti-RAE1 抗体 (Abcam #ab124783)、Anti-NUP98 抗体 (Cell Signaling Technology #2598)、HRP-conjugated anti-HA 抗体、Anti-alpha-Tubulin (TUBA)抗体を用いた。HRP-conjugated anti-HA 抗体を反応させた PVDF 膜については、抗体反応後10分おきに3回 TBS-T で PVDF 膜を洗浄した後に、Western Lightning Plus ECL に PVDF 膜を浸し、ChemiDoc Touch Imaging System で発光を検出した。その他の PVDF 膜については、10分おきに3回 TBS-T で PVDF 膜を洗浄し、その後1時間、二次抗体を反応させた。二次抗体は HRP-conjugated anti-mouse IgG、HRP-conjugated anti-rabbit IgG を用いた。二次抗体反応後、10分おきに3回 TBS-T で PVDF 膜を洗浄した後に、Western Lightning Plus ECL に PVDF 膜を浸し、ChemiDoc Touch Imaging System で発光を検出した。

S シュードウイルスの作製および感染価測定

HEK293T 細胞を 12 well plate に 1×10^5 /well で播種し、その24時間後に、PEI MAX を用いて 400 ng の psPAX2-IN/HiBiT と、400 ng の pWPI-Luc2 と、200 ng の S タンパク質発現ベクター (pCAGGS-S) をトランスフェクションした。トランスフェクションから12時間後、培養上清を除き、1 mL の DMEM (High Glucose) 培地を加えた。トランスフェクションから48時間後、培養上清を回収し、4°C、6200 rpm で2分遠心した。この上清を-80°Cで分注保存した (S シュードウイルス)。分注した S シュードウイルスを用いて、先行研究³²に則り HiBiT アッセイを行い、上清中の抗原量を定量した。感染価の測定には、HOS-A/T 細胞を用いた。96 well white plate に 1×10^4 /well で播種し、その24時間後に、HiBiT アッセイで抗原量を定量した S シュードウイルスを、抗原量を 1000 ng に揃えて感染させた。感染から48時間後、培養上清を除き、PBS (-) で2倍希釈したピッカジーン BrilliantStar-LT 試薬を

50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で各ウェルに添加し、GloMax Explorer Multimode Microplate Reader 3500 を用いて発光強度を計測した。

中和アッセイ

血清は、京都大学の高折晃史先生より分与いただいた、BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) 2 回接種後 4 週間経過者の血清を使用した。96 well white plate に HOS-A/T 細胞を $1 \times 10^4/\text{well}$ で播種した。その 24 時間後に、血清を 40 倍から 29160 倍まで 3 倍ずつ段階希釈し、50 μL の血清と 50 μL の S シュードウイルスを混合し、1 時間インキュベートした混合溶液を 80 $\mu\text{L}/\text{well}$ で細胞に接種し感染させた。感染から 48 時間後、培養上清を除き、PBS (-) で 2 倍希釈したピッカジーン BrilliantStar-LT 試薬を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で各ウェルに添加し、GloMax Explorer Multimode Microplate Reader 3500 を用いて発光強度を計測した。

結果

1. SARS-CoV-2 の ORF3b は IFN 応答を阻害する⁵

1-1. SARS-CoV-2 の *ORF3b* は SARS-CoV の *ORF3b* より遺伝子長が短い

SARS-CoV-2 および SARS-CoV の属するサルベコウイルス亜属の様々なウイルスについて、各遺伝子の長さを比較した。多くの遺伝子について、その長さはサルベコウイルスの中で高度に保存されていたが、SARS-CoV-2 の *ORF3b* は、SARS-CoV の *ORF3b* に比べて大幅に短くなっていた。また、サルベコウイルス亜属の中でも遺伝子の長さが異なっていることを見出した (図 3)。SARS-CoV の *ORF3b* 遺伝子には、IFN 阻害活性があることが知られていた³⁵ ため、*ORF3b* の遺伝子の長さの違いが、SARS-CoV-2 と SARS-CoV の IFN 阻害活性の違いに影響しているのではないかという仮説のもと、機能解析を行うこととした。

1-2. SARS-CoV-2 の ORF3b タンパク質は SARS-CoV の ORF3b タンパク質より強い IFN 阻害活性を示す

HEK293 細胞に各ウイルスの ORF3b 発現ベクターと、IFN 応答によってルシフェラーゼを発現するベクターを共導入し、同時強制発現させた。導入から 24 時間後に、SeV を感染させることで、細胞の IFN 応答を誘導した。SeV 感染からさらに 24 時間後に、細胞中に発現するルシフェラーゼをレポーターアッセイにより定量することで、それぞれの ORF3b による IFN 阻害活性を検討した (図 4A)。その結果、SARS-CoV-2 の ORF3b タンパク質は、SARS-CoV の ORF3b タンパク質よりも強い IFN 阻害活性を示した (図 4B)。

1-3. SARS-CoV の ORF3b は C 末端領域の核移行シグナル (NLS) の存在によって IFN 阻害活性が低下する

SARS-CoV の ORF3b の C 末端領域には NLS が存在することが推定されていた³⁶。そこで、この NLS が、ORF3b の IFN 阻害活性に影響を与えるのではないかと考えた。これを検討するため、SARS-CoV の野生型 ORF3b (SARS-CoV WT) を元に、NLS と推定される領域

を削った変異体 (SARS-CoV Δ NLS) と、その変異体に c-myc NLS を付加した変異体 (SARS-CoV +NLS) を作製した (図 5A)。レポーターアッセイにより、これらの変異体の IFN 阻害活性を評価したところ、SARS-CoV Δ NLS は、SARS-CoV WT に比べて IFN 阻害活性が向上し、SARS-CoV +NLS では SARS-CoV WT と同程度の IFN 阻害活性を示した (図 5B)。さらに、これらの変異体の細胞内局在を細胞分画後、細胞質画分と核画分についてウエスタンブロッティングを行うことで、細胞内での局在を確認した結果、SARS-CoV WT および SARS-CoV +NLS は核と細胞質に均等に存在したが、SARS-CoV Δ NLS では、そのほとんどが細胞質に局在していた (図 5C)。以上の結果から、SARS-CoV の ORF3b は、NLS の存在によって核に移行することで、IFN 阻害活性が低下することが示唆された。

1-4. SARS-CoV-2 および SARS-CoV の ORF3b は IRF3 の核移行を阻害する

SARS-CoV WT、SARS-CoV +NLS、SARS-CoV Δ NLS、SARS-CoV-2 ORF3b をそれぞれ細胞に導入し、免疫染色を行った。このとき、IFN 応答に重要な因子である IRF3 の局在についても同時に確認した (図 6)。その結果、SARS-CoV-2 ORF3b および SARS-CoV Δ NLS は、細胞質に局在しており、ORF3b が発現している細胞においては IRF3 の核内での発現が大きく減弱していた。一方で、SARS-CoV WT および SARS-CoV +NLS は、核にも存在しており、発現細胞における IRF3 の核内での発現減少は確認されなかった。この結果から、ORF3b が細胞質に強く局在している時、IRF3 の核移行を阻害することが示された。

1-5. SARS-CoV-2 ORF3b のタンパク質長と IFN 阻害活性の強さには関連がある

SARS-CoV の C 末端の領域が IFN 阻害活性の強さに重要であることが明らかとなった。そこで、SARS-CoV-2 の ORF3b が長くなるような変異体が出現した時に、IFN 阻害活性がどう変化するのかについて検討した。まず、SARS-CoV-2 の ORF3b について、SARS-CoV の ORF3b と同じ領域までのウイルスの塩基配列を確認すると、4 箇所を終止コドンが挿入されていた。そこで、これらの終止コドンを 1 つ 1 つ SARS-CoV 型に戻した変異体を作製し

た(図 7A)。これらの伸長型変異体について、レポーターアッセイにより機能評価を行った。その結果、いずれの変異体も IFN 阻害活性を示し、遺伝子の長さが長くなるとともに IFN 阻害活性が強くなる一方で、SARS-CoV と同じ長さにまで戻すと、IFN 阻害活性が低下するという結果が示された(図 7B)。この結果より、SARS-CoV-2 の ORF3b の IFN 阻害活性の強さには、遺伝子配列の長さが重要であるということが示された。

1-6. 実際の流行において出現した ORF3b 部分伸長型変異体は、SARS-CoV-2 の野生型 ORF3b よりも強い IFN 阻害活性を示す

公共データベース GISAID に登録されたウイルスゲノムの解析により、エクアドルで SARS-CoV-2 の ORF3b が伸長した変異体が 2 例見つかった。エクアドルで出現した部分伸長型 ORF3b を作製し(図 8A)、レポーターアッセイを行った。その結果、エクアドルで出現した部分伸長型 ORF3b は、従来の ORF3b よりも強い IFN 阻害活性を有することが示された(図 8B)。この結果より、ORF3b の IFN 阻害活性の強さには、遺伝子配列の長さが重要であるということが強く示唆され、実際の流行において、IFN 阻害活性が変化した変異体が出現しうることが明らかとなった。

2. SARS-CoV-2 の ORF6 は IFN 応答を阻害する⁶

2-1. ORF6 はサルベコウイルス亜属に特有の遺伝子である

次に、ORF3b と同様に、SARS-CoV において IFN 阻害活性を有することが報告されている³⁵ 遺伝子 ORF6 についての IFN 阻害活性を検討することとした。系統解析の結果、この遺伝子 ORF6 は、ベータコロナウイルス属のうち、サルベコウイルス亜属にのみ保存されていることが明らかとなった(図 9)。

2-2. SARS-CoV-2 系統の ORF6 は、SARS-CoV 系統の ORF6 よりも強い IFN 阻害活性を示す

レポーターアッセイにより、様々なサルベコウイルスの ORF6 について IFN 阻害活性を

評価したところ、SARS-CoV-2 および SARS-CoV-2 関連ウイルスの ORF6 は、SARS-CoV および SARS-CoV 関連ウイルスの ORF6 よりも強い IFN 阻害活性を示した (図 10)。

2-3. ORF6 の IFN 阻害活性の違いは、46 位のアミノ酸の違いによって規定される

SARS-CoV-2 の ORF6 と SARS-CoV の ORF6 が異なる IFN 阻害活性を示す責任領域を同定するため、SARS-CoV-2 と SARS-CoV の ORF6 の間で化学的性質の異なるアミノ酸を探索した。その結果、10 アミノ酸の性質の違いおよび 2 アミノ酸の長さの違いが見出された (図 11A 上)。この結果を元に、SARS-CoV-2 の ORF6 を鋳型に、性質の異なっていた各残基を SARS-CoV 型に置換した変異体シリーズを作製し (図 11A 下)、レポーターアッセイにより各変異体の IFN 阻害活性を評価した。その結果、46 位のアミノ酸を SARS-CoV 型に置換することで、IFN 阻害活性が SARS-CoV 型のもの程度まで減弱した (図 11B)。同様に、SARS-CoV の 46 位のアミノ酸を SARS-CoV-2 型に置換した変異体を作製して IFN 阻害活性を検討したところ、この変異体の IFN 阻害活性が SARS-CoV-2 型のもの程度まで増強した (図 11C)。この結果から、SARS-CoV-2 と SARS-CoV の ORF6 の IFN 阻害活性の違いは、46 位のアミノ酸によって規定されていることが明らかとなった。

2-4. サルベコウイルスの ORF6 の IFN 阻害活性には、C 末端領域の配列が重要である

SARS-CoV-2 の ORF6 は、C 末端領域を介して宿主膜タンパク NUP98 および RAE1 と相互作用することが推定されていた⁹。これらの膜タンパクは、核膜複合体を形成し、物質の核輸送に関連する機能を持つことが知られている^{22, 23}。そこで、この C 末端領域が NUP98 および RAE1 と相互作用することが、ORF6 の IFN 阻害活性に重要なのではないかという仮説を立てた。これを検証するため、SARS-CoV-2、SARS-CoV、およびこれらのウイルスと遺伝的に離れたサルベコウイルスの ORF6 について、C 末端領域変異体を作製した (図 12A)。レポーターアッセイの結果、いずれの C 末端領域変異体についても、それぞれの野生型 ORF6 と比較して IFN 阻害活性が減弱していた (図 12B)。この結果から、ORF6 の IFN 阻

害活性には C 末端領域が重要であることが示唆された。

2-5. サルベコウイルスの ORF6 は C 末端領域を介して宿主の膜タンパク質 NUP98 および RAE1 と相互作用する

ORF6 の IFN 阻害活性には C 末端領域が重要であることが示唆されたため、ORF6 が C 末端を介して、実際に RAE1 および NUP98 と相互作用するかどうかを共免疫沈降法により検討した。その結果、いずれの野生型 ORF6 も、RAE1 および NUP98 と相互作用するが、C 末端領域欠損型の ORF6 では、RAE1 および NUP98 との相互作用が失われていることが示された (図 13)。すなわち、サルベコウイルスの ORF6 は、C 末端領域を介して宿主の RAE1 および NUP98 と相互作用し、この相互作用が IFN 阻害活性に重要であることが示唆された。

2-6. SARS-CoV-2 の ORF6 は IRF3 の核移行を阻害する

ORF6 が物質の核輸送に関わる NUP98 および RAE1 と相互作用することが明らかとなったため、IRF3 の核移行を阻害しているのではないかと考え、これを検証した。その結果、センダイウイルスの感染による IFN 応答の誘導により、IRF3 が核へと移行するが、ORF6 の存在により、その核移行の程度が減少することが示された (図 14)。この結果から、SARS-CoV-2 の ORF6 は、IRF3 の核移行を阻害し、これによって IFN 応答を阻害していることが示唆された。

2-7. ORF6 の C 末端領域が欠損した変異株が散発的に出現している

公共データベース GISAID に登録されたウイルスゲノムの解析により、ORF6 の IFN 阻害活性に重要な C 末端領域にフレームシフト変異が挿入された株 (ORF6 欠損株) が散発的に出現していることを見出した (図 15)。また、分子系統学解析により、2020 年 4 月頃に、英国のウェールズにおいて、ORF6 欠損株が散発的に流行していたことも明らかにした。この結果より、ORF6 の欠損により、弱毒化したウイルスが出現し、ウェールズにおいて散発流行していたことが示唆された。

3. SARS-CoV-2 ラムダ株は高い感染価および中和抗体抵抗性を有する⁷

3-1. ラムダ株は、S タンパク質に複数の変異が蓄積している

公共データベース GISAID に登録された 1908 個のラムダ株の配列を解析し、祖先株の S タンパク質のアミノ酸配列と比較した。その結果、ラムダ株では、D614G 以外に、G75V、T76I、RSYLTPGD246-253N、L452Q、F490S、T859N という 6 種類の変異が蓄積していた (図 16)。

3-2. ラムダ株は、D614G 株に比べて高い感染価を有する

先行研究³⁷の手法に則り、レポーター遺伝子発現タンパク質を組み込み、SARS-CoV-2 の S タンパクでシュードしたレンチウイルスベクター (S シュードウイルス) を作製した (図 17A)。この手法により、D614G 株の S タンパク質、ラムダ株の S タンパク質、および、ラムダ株の 246-253 位の欠損変異を修復した S タンパク質を有する S シュードウイルスを作製し、これらの S シュードウイルスの感染力価をレポーターアッセイにより測定した。その結果、ラムダ株の S シュードウイルスは、従来株の S シュードウイルスに比べ、約 1.5 倍の感染価を示した (図 17B)。また、欠損変異を修復した S シュードウイルスについても、ラムダ株の S シュードウイルスと同等の感染価を示した (図 17B)。この結果から、ラムダ株は D614G 株に比べて高い感染価を有することが示され、ラムダ株の 246-253 位の欠損変異は、感染価には影響を与えないことが示唆された。

3-3. ラムダ株の有している、S タンパク質の 76 位および 452 位のアミノ酸変異によって感染価が上昇する

ラムダ株の S タンパク質のいずれの変異が高い感染価に寄与しているかを検討するため、ラムダ株に蓄積しているそれぞれの点変異を D614G 株に導入した S シュードウイルスを作製し、これらの S シュードウイルスの感染価を測定した。その結果、T76I および L452Q の変異を有するシュードウイルスにおいて、感染価の上昇が確認された (図 18)。また、この

実験においても、246-253 位の欠損変異による感染価への影響は見られなかったため、ラムダ株の 246-253 位の欠損変異は、感染価には影響しないことが強く示唆された。

3-4. ラムダ株は、D614G 株に比べ、ワクチン接種者の血清中に含まれる中和抗体に高い抵抗性を示す

ラムダ株の S タンパク質に蓄積した変異によって、中和抗体に対する抵抗性が変化しているか検討するため、S シュードウイルスとワクチン接種者の血清を用い、中和アッセイを行なった (図 19A)。S シュードウイルスには、D614G 株とラムダ株、ラムダ株の 246-253 位の欠損変異を修復したものを用いた。ワクチン接種者の血清には、ファイザー社のワクチンの 2 回目接種から 4 週間後に採血した血清を用いた。その結果、ラムダ株は、D614G 株に比べ、ワクチン接種者の血清中に含まれる中和抗体に対し、約 1.5 倍高い抵抗性を示した (図 19B)。また、欠損変異修復株の中和抗体抵抗性は、D614 株と同等程度まで減弱していることから、ラムダ株においては、この領域が免疫優性な領域となっていることが示唆された。

3-5. ラムダ株の有している、S タンパク質の 246-253 位、452 位および 490 位のアミノ酸変異によって中和抗体抵抗性が上昇する

ラムダ株の S タンパク質のいずれの変異が高い中和抗体抵抗性に寄与しているかを検討するため、ラムダ株に蓄積しているそれぞれの点変異体を D614G 株に導入した S シュードウイルスと、ワクチン接種者の血清を用いて、中和アッセイを行なった。その結果、RSYLTPGD246-253N、L452Q、F490S の変異を有する S シュードウイルスにおいて、中和抗体抵抗性の有意な上昇が確認され (図 20)、これらの変異が中和抗体に対する抵抗性に寄与していることが示唆された。

考察

これまで、SARS-CoV-2 が SARS-CoV よりも強い IFN 阻害活性を有することが示唆されていたが、SARS-CoV-2 がどのようなメカニズムで IFN 阻害活性を示すのか、なぜ SARS-CoV よりも強い IFN 阻害活性を示すのかについては明らかとなっていなかった。また、SARS-CoV-2 の流行拡大に伴い、より強い感染力を持った VOC および VOI といった変異株が出現しており、これらの変異株は S タンパク質に変異を蓄積しており、S タンパク質への変異の蓄積によって形質が変化していることが明らかとなっていたが、ラムダ株について詳細な解析は行われていなかった。

本研究では、(1) SARS-CoV-2 の ORF3b が SARS-CoV の ORF3b よりも強い IFN 阻害活性を有すること、(2) SARS-CoV-2 の ORF6 が SARS-CoV の ORF6 よりも強い IFN 阻害活性を有すること、(3) ラムダ株の S タンパク質には特徴的な 6 種類の変異が蓄積しており、これらの変異によって感染価が上昇し、また中和抗体に対する抵抗性が上昇していることを明らかにした。

(1) SARS-CoV-2 の ORF3b が SARS-CoV の ORF3b よりも強い IFN 阻害活性を有する⁵

SARS-CoV-2 の遺伝子 *ORF3b* は、その遺伝子長が SARS-CoV の *ORF3b* に比べて短くなっており、より強い IFN 阻害活性を有することを明らかにした。SARS-CoV の *ORF3b* の C 末端領域には NLS の存在が推測されているが、SARS-CoV-2 の *ORF3b* は、遺伝子長が短くなっているため、SARS-CoV において NLS と推測される領域を失っている。免疫染色の結果から、SARS-CoV-2 の *ORF3b* タンパク質は細胞質に局在している一方で、SARS-CoV の *ORF3b* タンパク質は細胞質と核の両方に局在していることが示された。また、NLS と推測された領域を削った SARS-CoV Δ NLS は細胞質にのみ局在しており、SARS-CoV WT に比べて強い IFN 阻害活性を示すとともに、IRF3 の核移行を阻害していた。この結果から、SARS-

CoV-2 の ORF3b は、NLS 領域を持っていないため、SARS-CoV の ORF3b より強く細胞質に局在し、効率的に IRF3 の核移行を阻害し、これによってより強い IFN 阻害活性を示すことが考えられた。一方で、本研究においては、IRF3 の核移行におけるどのステップを阻害しているのかについては明らかとならなかった。そのため、非修飾 IRF3、リン酸化 IRF3、二量体化 IRF3 のいずれかの状態の IRF3 と直接的に相互作用するのか、あるいは IRF3 のリン酸化および核移行に関わる他の因子と相互作用することで、間接的に IRF3 の核移行を阻害するのかについては検討の余地が残されている。

また、SARS-CoV-2 の ORF3b の終止コドン を SARS-CoV 型に戻し、その遺伝子長を伸ばしていくと、その遺伝子長が長くなると共に IFN 阻害活性が上昇したが、SARS-CoV と同じ長さまで長くした変異体 (ORF3b 155*) については、IFN 阻害活性が減弱した。また、ウエスタンブロッティングの結果より、ORF3b 155* については、その発現量が他の ORF3b と比べて低下していた。この結果から、ORF3b 155* はタンパク質として不安定になること、あるいは SARS-CoV と同様に、C 末端領域に NLS が存在しており、細胞質への局在が他の変異体に比べ減弱していることが考えられ、これらの理由によって IFN 阻害活性が低下している可能性が考えられた。

さらに、現在の流行拡大において、エクアドルにて ORF3b の伸長型変異体 (Ecuador variant) が 2 例出現していることを見出した。この Ecuador variant を再構築した ORF3b は、SARS-CoV-2 の野生型 ORF3b に比べて強い IFN 阻害活性を有していた。これらの Ecuador variant に感染していた患者は、2 例とも重症患者であり、その内の 1 例は死亡していた。このことから、ORF3b の IFN 阻害活性の強さが COVID19 の病態と関連している可能性が示唆された。しかし、実際のウイルス複製において、ORF3b による IFN 応答の抑制がどの程度重要であるのかは明らかとなっていないため、この点については ORF3b 欠損ウイルスを作製し、培養細胞および実験動物への感染実験を行うことでより詳細な解析を行う必要がある。

(2) SARS-CoV-2 の ORF6 が SARS-CoV の ORF6 よりも強い IFN 阻害活性を有する⁶

本研究により、*ORF6* 遺伝子がサルベコウイルス亜属に特有の遺伝子であることを明らかにし、SARS-CoV-2 および SARS-CoV-2 系統の *ORF6* が SARS-CoV および SARS-CoV の *ORF6* よりも強い IFN 阻害活性を有することを明らかにした。また、*ORF6* のアミノ酸のうち、46 位のアミノ酸が SARS-CoV-2 の強い IFN 阻害活性を示すために重要であることを明らかにした。しかし、46 位のアミノ酸が異なることによって、どのようなメカニズムで IFN 阻害活性が変化するかは明らかとなっていないため、さらなる検証が必要である。

サルベコウイルスの *ORF6* が IFN 阻害活性を示すには、その C 末端領域が重要であること、また、この C 末端領域を介して宿主タンパク質である NUP98 および RAE1 と相互作用することを明らかにした。さらに、*ORF6* の発現によって IRF3 の核移行が阻害されることを明らかにした。以上の結果から、*ORF6* は、その C 末端領域を介して物質の核輸送に関わる宿主タンパク質 NUP98 および RAE1 と相互作用することで、IRF3 の核移行を阻害することが示唆された。本研究においては、宿主タンパク質 NUP98 および RAE1 とウイルスタンパク質 *ORF6* の相互作用にのみ着目して研究を行なった。一方で、宿主タンパク質 NUP98 は、Gle2-binding sequence モチーフを介して 1 本鎖 RNA と結合することが可能であることが報告されている²³。このことから、NUP98 が SARS-CoV-2 のウイルス RNA と結合することでウイルスの複製阻害に関与しており、それを *ORF6* の働きによって克服している可能性も考えられるため、このタンパク質-RNA 相互作用については検討の余地が残っている。また、*ORF3b* と同様に、*ORF6* についても、実際のウイルス複製における、*ORF6* による IFN 応答の抑制がどの程度重要であるのかは明らかとなっていないため、この点については *ORF6* 欠損ウイルスを作製し、培養細胞および実験動物への感染実験を行うことでより詳細な解析を行う必要がある。

本研究では、また、公共データベース GISAID に登録された約 60,000 の SARS-CoV-2 流行株のゲノム配列を解析し、約 0.2%の流行株には、*ORF6* 遺伝子の C 末端が欠損する変異

が挿入されていることを見出した。上述の通り、ORF6 の IFN 応答阻害活性は C 末端依存的事であることから、この欠損変異ウイルスは、ORF6 による IFN 応答阻害活性を欠失している可能性が示唆される。また、詳細な分子系統学解析の結果、2020 年 4 月頃に、英国のウェールズにおいて、ORF6 欠損株が散発的に流行していたことも明らかにした。以上の結果から、ORF6 の欠損により、IFN 応答阻害活性が減弱することで弱毒化したウイルスが出現し、ウェールズにおいて散発的に流行したことが示唆された。

(3) ラムダ株の S タンパク質には特徴的な 6 種類の変異が蓄積しており、これらによって感染価が上昇し、中和抗体に対する抵抗性が上昇している⁷

本研究により、ラムダ株の S タンパク質には特徴的な 6 種類の変異 (G75V、T76I、RSYLTPGD246-253N、L452Q、F490S、T859N) が蓄積していることを明らかにした。これらの変異のうち T76I、L452Q が感染価の上昇に寄与していることを明らかにした。特に、L452Q は受容体との結合に重要な領域である RBD 領域に存在している変異であり、同じ残基の異なるアミノ酸変異である L452R という変異が感染価の上昇に寄与するという報告³⁸もあることから、この変異によって感染価が上昇したことが強く示唆される。このことから、一方で、T76I という変異は NTD 領域に位置する変異であり、受容体と直接相互作用する領域ではない。そのため、この変異による感染価上昇の理由として、構造が変化することにより、間接的に受容体との親和性、あるいはプロテアーゼによる被切断活性が上昇したという理由が考えられる。NTD 領域の変異と中和抗体抵抗性の関連についてはすでに多くの報告^{4,30,39}があるものの、感染価との関連およびそのメカニズムについては検討が進んでいない。NTD 領域への抗体の結合により、スパイクタンパク質の全体的な構造変化を引き起こさせることで、間接的にスパイクと受容体との相互作用を減少させている可能性や、プロテアーゼによる被切断活性が低下したという可能性が考えられるが、実験的には検証されていない。そのため、今後は RBD 以外の領域がウイルスの感染価に与える影響を、実験的

検証によるメカニズム解析を含めて検討していく必要がある。

また、D614G 株において、RSYLTPGD246-253N、L452Q、F490S が中和抗体に対する抵抗性に寄与していることを明らかにした。このうち、246-253 位は受容体との相互作用に重要な RBD 領域の外にあることから、この領域の変異による中和抗体に対する抵抗性の獲得は、中和抗体のエピトープ領域を変異させ、抗体から認識されなくなることに起因すると考えられる。また、452 位および 490 位は RBD 領域に位置しており、これらのアミノ酸変異により、受容体である ACE2 との親和性が上昇すると報告されている^{38,40}。このことから、抗体のエピトープを直接変異させるだけではなく、抗体による中和効果に打ち勝つような受容体との強い結合親和性の獲得も、中和抗体からの逃避に寄与していることが考えられた。特に、246-253 位の欠損変異を修復し、RSYLTPGD246-253N を除く変異をすべて有したラムダ株は、L452Q、F490S の変異を有しているにも関わらず、D614G 株と同等程度の中和抗体抵抗性を示した。このことは、D614G 株とラムダ株の間で中和抗体抵抗性を規定する領域が変化していることを示唆している。このような、異なる株間における、領域ごとの中和抗体抵抗性への貢献度の違いを生み出す要因については明らかとなっていないため、今後のワクチン戦略を考える上でも、より詳細な解析が必要と考える。

(4) 結語

(1)(2)より、「SARS-CoV-2 は、複数の強力な IFN 阻害タンパク質をウイルスゲノムにコードしており、それらの作用機序は多岐にわたる」ことが明らかになった。この SARS-CoV-2 の IFN 阻害タンパク質については、他のウイルスタンパク質も関与することが、複数の研究で報告されている⁴¹⁻⁴⁶。SARS-CoV-2 の主たる標的組織である肺の細胞である肺胞上皮細胞、および、そこにたどり着くまでの鼻腔、気道の細胞である鼻粘膜上皮細胞や気道上皮細胞において、ウイルス感染に対する IFN 応答が誘導されることが知られている⁴⁷⁻⁴⁹。そのため、ORF3b や ORF6 による IFN 応答の抑制が、SARS-CoV-2 の感染成立に有利に働いてい

る可能性が示唆された。また、GISAID に登録されたゲノム配列の解析により、流行拡大の中で ORF3b の伸長型変異体や ORF6 欠損変異体が出現していることが明らかとなった。この結果から、ORF3b の伸長によるウイルスの強毒化、ORF6 の欠損によるウイルスの弱毒化が実際の流行拡大中に起こったことが示唆される。実際に、ORF3b 伸長型変異体を有するウイルスに感染していた患者が重症患者であったが、症例の少なさゆえに関連があると強く主張することは難しい。同様に、ORF6 の欠損変異体の感染者についても、臨床情報との紐付けが少ないため、この遺伝子の変異と患者の病態が実際に関連のあるものかどうかは不明である。また、(3)の結果から、S タンパク質への変異の蓄積によってウイルスの形質が変化することを明らかにした。

これらすべてを踏まえ、本研究から言えることとして、SARS-CoV-2 の流行拡大に伴い、SARS-CoV-2 の遺伝子にはさまざまな機能的な変異が蓄積するということが挙げられる。また、その変異の蓄積によって、ウイルスの形質が変化していることが強く示唆される。しかし、前述した通り、現在はウイルス配列情報と臨床症状の情報がほとんど紐づけられていないため、ウイルスの遺伝子に蓄積した変異が、実際の COVID-19 の病態にどのような影響を与えたかはほとんど不明のままである。そのため、今後は、「どの変異株に感染していたのか」という情報のみならず、臨床情報が紐づいたウイルスの全長配列を取得する必要性、そして、新型コロナウイルスの感染病態と関連のある可能性がある変異（たとえば、「無症候・軽症と関連のある変異＝弱毒化変異」や「重症化と関連のある変異＝強毒化変異」）を捕捉し、それを実験的に検証していく必要があると考える。

引用文献

1. WHO (2021). Coronavirus disease 2019. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
2. Blanco-Melo D. et al., Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 2020 May 28;181(5):1036-1045.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.
3. Chu H. et al., Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clin. Infect. Dis.*, 2020 Sep 12;71(6):1400-1409. doi: 10.1093/cid/ciaa410.
4. Harvey WT et al., SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021 Jul;19(7):409-424. doi: 10.1038/s41579-021-00573-0.
5. Konno Y. et al., SARS-CoV-2 ORF3b Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Rep.*, 2020 Sep 22;32(12):108185. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108185.
6. Kimura I. et al., Sarbecovirus ORF6 proteins hamper induction of interferon signaling. *Cell Rep.*, 2021 Mar 30;34(13):108916. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108916.
7. Kimura I. et al., SARS-CoV-2 Lambda variant exhibits higher infectivity and immune resistance. *bioRxiv*, 2021.07.28.454085; doi: 10.1101/2021.07.28.454085
8. Chan JF. et al, Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020 Jan 28;9(1):221-236. doi: 10.1080/22221751.2020.1719902.
9. Gordon DE. et al., A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.*, 2020 Jul;583(7816):459-468. doi: 10.1038/s41586-020-2286-9.
10. Lam TT. et al., Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature.*,

2020 Jul;583(7815):282-285. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0.

11. Lau SK. et al., Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2005 Sep 27;102(39):14040-5. doi: 10.1073/pnas.0506735102.
12. Ge XY. et al., Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.*, 2013 Nov 28;503(7477):535-8. doi: 10.1038/nature12711.
13. Wang M. et al., SARS-CoV infection in a restaurant from palm civet. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005 Dec;11(12):1860-5. doi: 10.3201/eid1112.041293.
14. Zhou P. et al., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.*, 2020 Mar;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
15. Xiao K. et al., Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature.*, 2020 Jul;583(7815):286-289. doi: 10.1038/s41586-020-2313-x.
16. Akira S, Uematsu S and Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.*, 2006 Feb 24;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
17. Murin CD, Wilson IA and Ward AB. Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses. *Nat. Microbiol.*, 2019 May;4(5):734-747. doi: 10.1038/s41564-019-0392-y.
18. Yarbrough ML. et al., Viral subversion of nucleocytoplasmic trafficking. *Traffic.*, 2014 Feb;15(2):127-40. doi: 10.1111/tra.12137.
19. Gong D. et al., A Herpesvirus Protein Selectively Inhibits Cellular mRNA Nuclear Export. *Cell Host Microbe.*, 2016 Nov 9;20(5):642-653. doi: 10.1016/j.chom.2016.10.004.
20. Strambio-De-Castillia C, Niepel M and Rout MP. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010 Jul;11(7):490-501. doi: 10.1038/nrm2928.
21. Radu A, Moore MS and Blobel G. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as

- a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell.*, 1995 Apr 21;81(2):215-22. doi: 10.1016/0092-8674(95)90331-3.
22. Pritchard CE. et al., RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J. Cell Biol.*, 1999 Apr 19;145(2):237-54. doi: 10.1083/jcb.145.2.237.
 23. Ren Y. et al., Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup98 and the mRNA export factor Rae1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2010 Jun 8;107(23):10406-11. doi: 10.1073/pnas.1005389107.
 24. Rajani KR. et al., Complexes of vesicular stomatitis virus matrix protein with host Rae1 and Nup98 involved in inhibition of host transcription. *PLoS Pathog.*, 2012 Sep;8(9):e1002929. doi: 10.1371/journal.ppat.1002929.
 25. Quan B. et al., Vesiculoviral matrix (M) protein occupies nucleic acid binding site at nucleoporin pair (Rae1 • Nup98). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2014 Jun 24;111(25):9127-32. doi: 10.1073/pnas.1409076111.
 26. V'kovski P. et al., Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021 Mar;19(3):155-170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
 27. Wrapp D. et al., Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.*, 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
 28. Hoffmann M. et al., SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.*, 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
 29. Piccoli L. et al., Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell.*, 2020 Nov 12;183(4):1024-1042.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.037.

30. McCallum M. et al., N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell.*, 2021 Apr 29;184(9):2332-2347.e16. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.028.
31. Korber B. et al., Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell.*, 2020 Aug 20;182(4):812-827.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
32. Ozono S. et al., SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nat. Commun.*, 2021 Feb 8;12(1):848. doi: 10.1038/s41467-021-21118-2.
33. Niwa H, Yamamura K and Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 1991 Dec 15;108(2):193-9. doi: 10.1016/0378-1119(91)90434-d.
34. Yoshida A. et al., A Single Amino Acid Substitution within the Paramyxovirus Sendai Virus Nucleoprotein Is a Critical Determinant for Production of Interferon-Beta-Inducing Copyback-Type Defective Interfering Genomes. *J. Virol.*, 2018 Feb 12;92(5):e02094-17. doi: 10.1128/JVI.02094-17.
35. Kopecky-Bromberg SA. et al., Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol.*, 2007 Jan;81(2):548-57. doi: 10.1128/JVI.01782-06.
36. Yuan J. et al., Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. *J. Gen. Virol.*, 2010 Apr;91(Pt 4):1058-62. doi: 10.1099/vir.0.016378-0.
37. Ozono S. et al., Super-rapid quantitation of the production of HIV-1 harboring a luminescent peptide tag. *J. Biol. Chem.*, 2020 Sep 11;295(37):13023-13030. doi: 10.1074/jbc.RA120.013887.
38. Motozono C. et al., SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases

- infectivity. *Cell Host Microbe*, 2021 Jul 14;29(7):1124-1136.e11. doi: 10.1016/j.chom.2021.06.006.
39. Singh Y. et al., N-terminal domain of SARS CoV-2 spike protein mutation associated reduction in effectivity of neutralizing antibody with vaccinated individuals. *J. Med. Virol.*, 2021 Oct;93(10):5726-5728. doi: 10.1002/jmv.27181.
 40. Yi C. et al., Comprehensive mapping of binding hot spots of SARS-CoV-2 RBD-specific neutralizing antibodies for tracking immune escape variants. *Genome Med.*, 2021 Oct 14;13(1):164. doi: 10.1186/s13073-021-00985-w.
 41. Wu J. et al., SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO. *Cell Rep.*, 2021 Feb 16;34(7):108761. doi: 10.1016/j.celrep.
 42. Li JY. et al., The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus. Res.*, 2020 Sep;286:198074. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198074.
 43. Miorin L. et al., SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2020 Nov 10;117(45):28344-28354. doi: 10.1073/pnas.2016650117.
 44. Xia H and Shi PY. Antagonism of Type I Interferon by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2020 Dec;40(12):543-548. doi: 10.1089/jir.2020.0214.
 45. Park A and Iwasaki A. Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe*, 2020 Jun 10;27(6):870-878. doi: 10.1016/j.chom.2020.05.008.
 46. Xia H. et al., Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep.*, 2020 Oct 6;33(1):108234. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108234.
 47. Yoneyama M. et al., The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-

- induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*, 2004 Jul;5(7):730-7. doi: 10.1038/ni1087.
48. Ank N. et al., An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J. Immunol.*, 2008 Feb 15;180(4):2474-85. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2474.
 49. Spann KM. et al., Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *J. Virol.*, 2005 Jun;78(12):6705. [corrected] doi: 10.1128/jvi.78.8.4363-4369.2004.
 50. Horton P and Nakai K. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, 1997;5:147-52.

図表の部

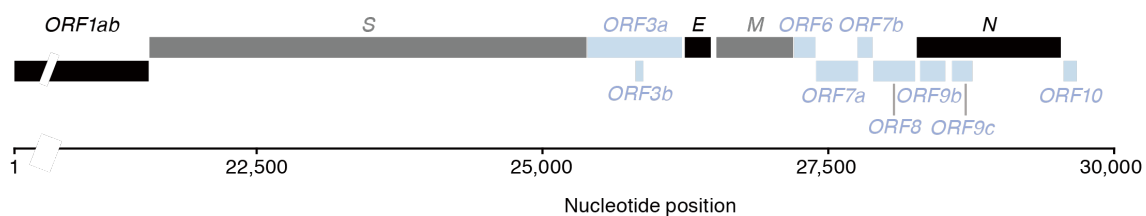


図 1. SARS-CoV-2 の遺伝子構造

SARS-CoV-2 のゲノム RNA の遺伝子構造を示した。SARS-CoV-2 のゲノム RNA は、黒色および灰色で示した、5つのコアタンパクをコードする遺伝子 (*ORF1ab*、*S*、*E*、*M*、*N*) および水色で示した、9つのアクセサリータンパクをコードする遺伝子 (*ORF3a*、*ORF3b*、*ORF6*、*ORF7a*、*ORF7b*、*ORF8*、*ORF9b*、*ORF9c*、*ORF10*) によって構成される⁹。

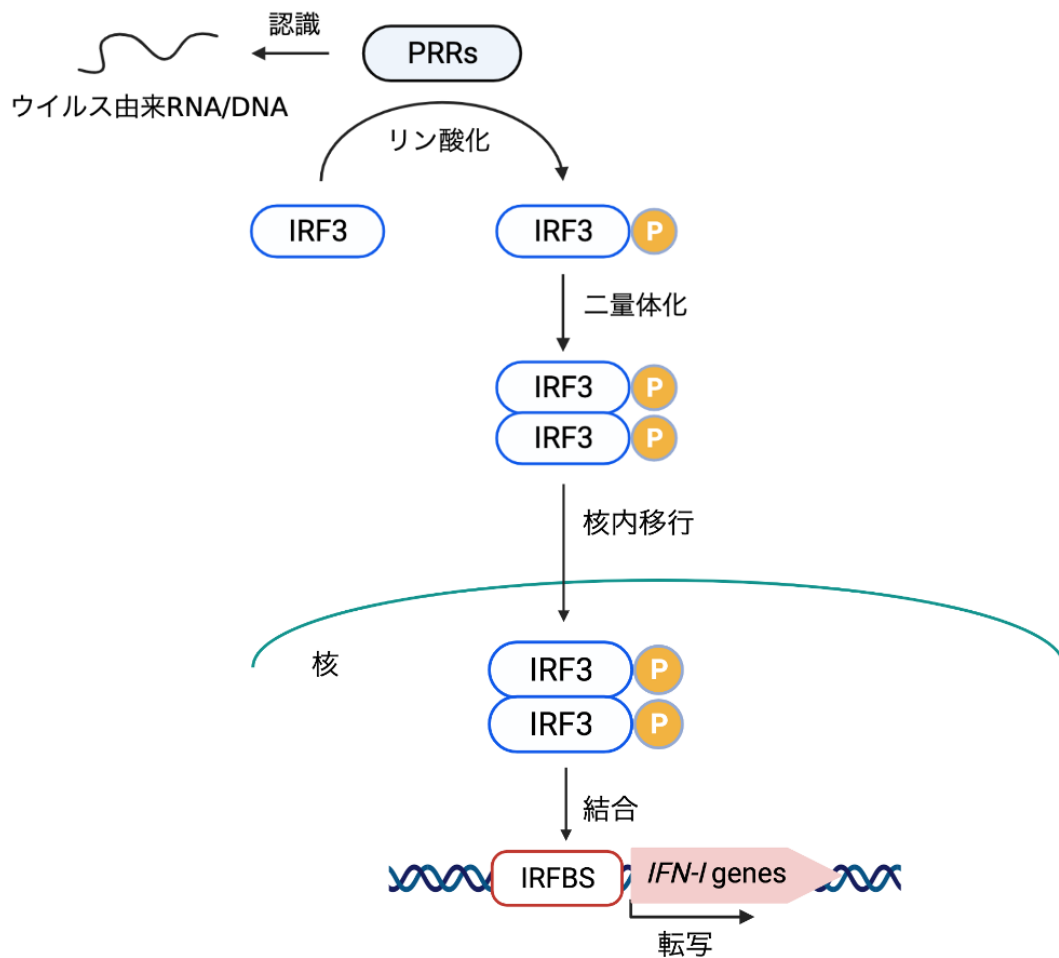


図2. ウイルス感染に対する IFN 応答

パターン認識受容体がウイルス由来の RNA および DNA を認識すると、IFN 制御因子のひとつである IRF3 がリン酸化を受け、二量体化する。リン酸化、二量体化した IRF3 は、細胞質から核へと移行し、I 型 IFN のプロモーター領域に存在する結合部位 (IRFBS) に結合することで、強いウイルス複製阻害作用を持つ物質である I 型 IFN の転写を促進する¹⁶。

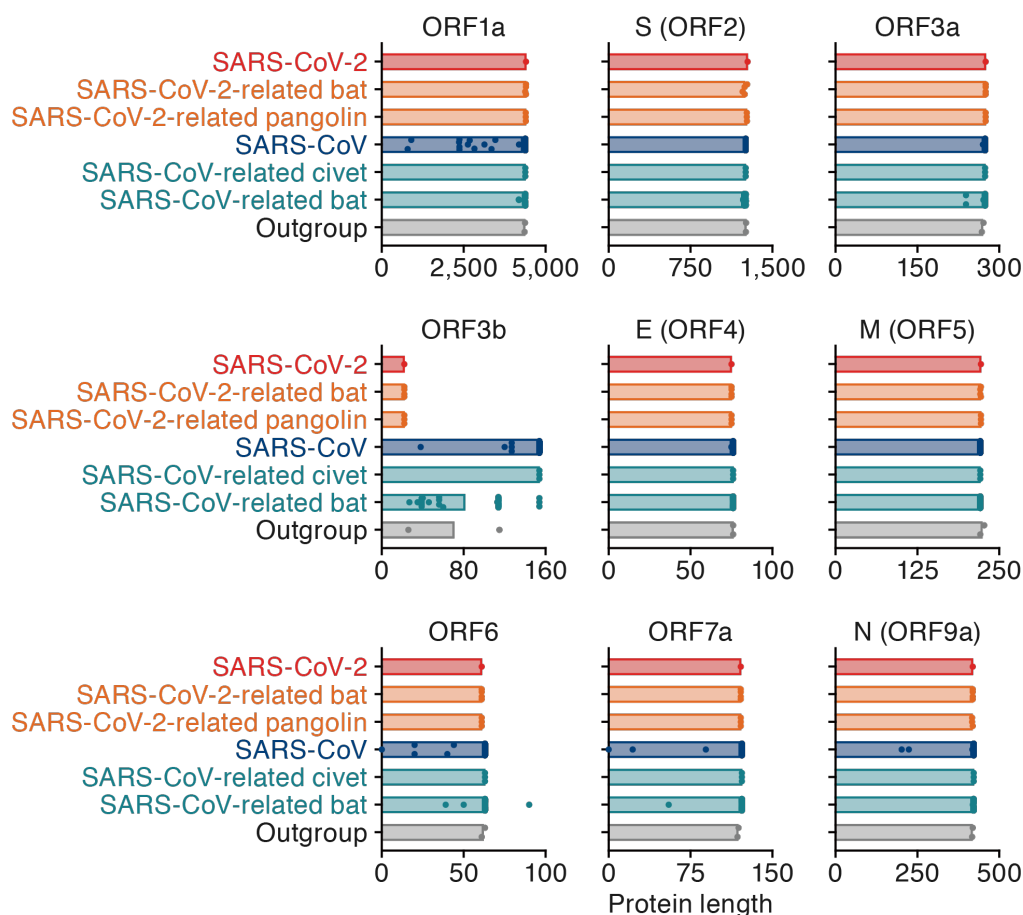


図 3. サルベコウイルス亜属のウイルスの様々な遺伝子の長さの比較

SARS-CoV-2 の属するサルベコウイルス亜属のウイルスについて、その遺伝子の長さを比較した。解析に用いたウイルスの配列については、SARS-CoV-2 には Wuhan-fu-1 株の配列を使用した。SARS-CoV-2 関連コウモリコロナウイルス (SARS-CoV-2-related bat) および SARS-CoV-2 関連センザンコウコロナウイルス (SARS-CoV-2-related pangolin) にはそれぞれ 4 株、SARS-CoV には 190 株、SARS-CoV 関連ジャコウネココロナウイルス (SARS-CoV-related civet) には 3 株、SARS-CoV 関連コウモリコロナウイルス (SARS-CoV-related bat) には 54 株、いずれにも属さない Outgroup には 2 株の配列を使用した。解析に用いた配列については表 1 に記載した。

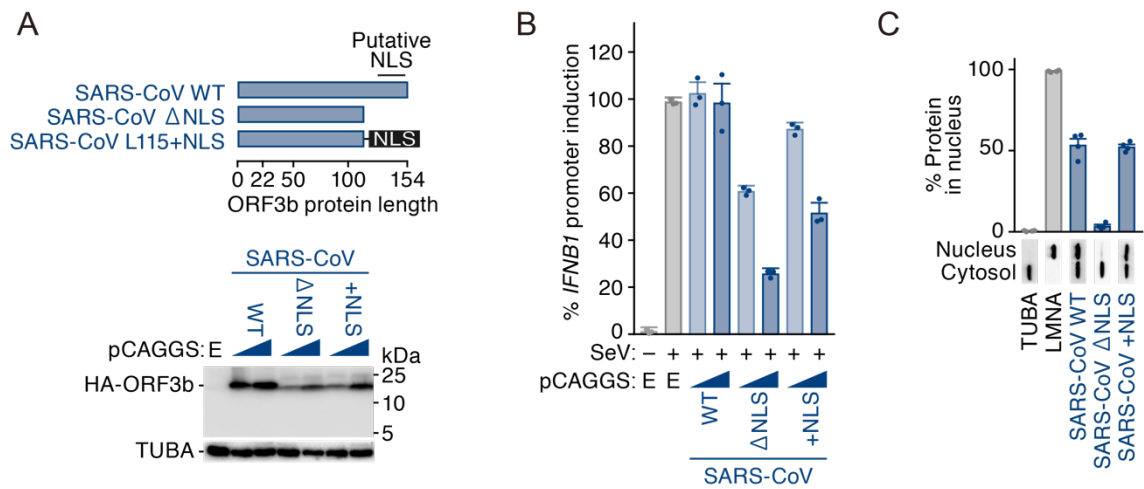


図 5. SARS-CoV ORF3b における NLS の存在による IFN 阻害活性の変化

(A) PSORT II Prediction webtool⁵⁰ を使用して、SARS-CoV ORF3b の C 末端領域に NLS を推測した。この NLS を欠損するような変異体 (SARS-CoV ΔNLS) および、SARS-CoV ΔNLS に c-myc NLS を付与した変異体 (SARS-CoV +NLS) を作製し、ウエスタンブロッティングによりその発現を確認した。(B) 図 4A の実験系により、作製した各 SARS-CoV ORF3b 変異体の IFN 阻害活性を検討した。E: 空ベクター導入細胞。(C) SARS-CoV ORF3b の野生型 (SARS-CoV WT) および作製した変異体を HEL293 細胞にトランスフェクションし、細胞質画分と核画分に分画後、ウエスタンブロッティングを行なった。実験は n=4 で実施し、ウエスタンブロッティングのバンドの輝度を定量した。細胞質タンパク質のコントロールとして TUBA を、核タンパク質のコントロールとして LMNA を使用した。

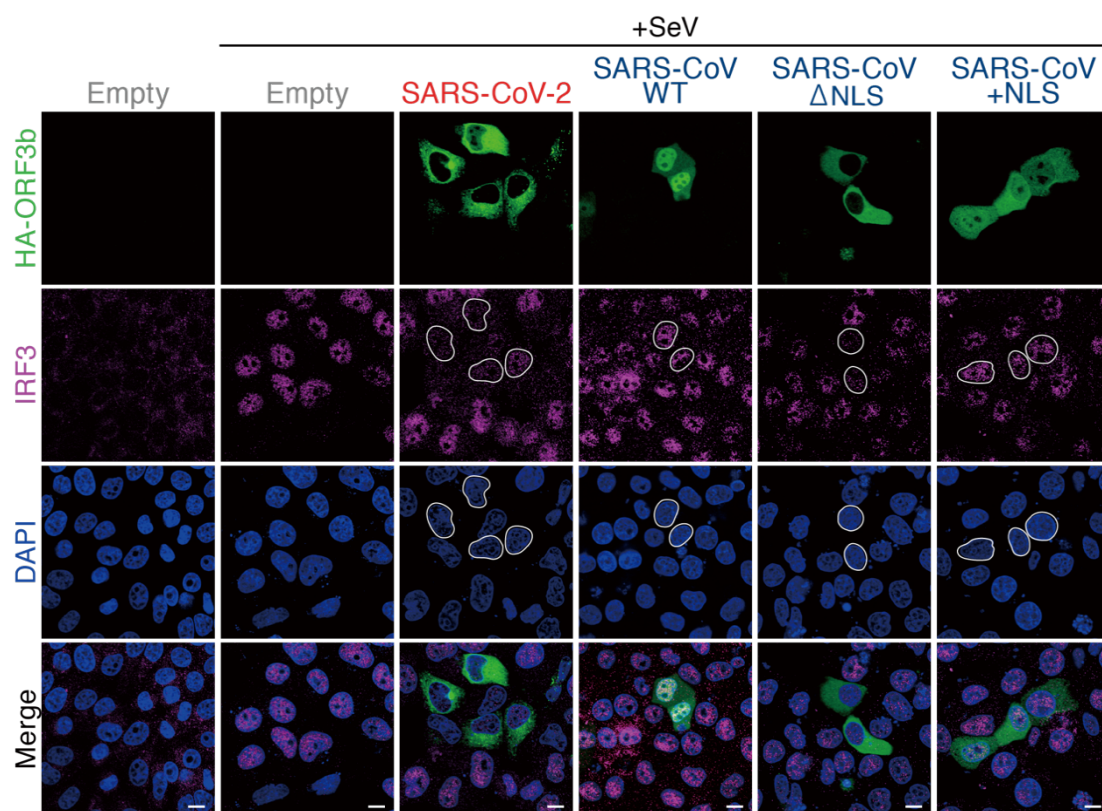


図 6. ORF3b の局在と IRF3 の局在の相関

HeLa 細胞に HA タグを付与した ORF3b をトランスフェクションし、24 時間後に MOI 5 で SeV を感染させた。感染から 24 時間後に免疫染色を行なった。図中の白い線は、ORF3b 発現細胞の核膜を示す。図中のスケールバーは 10 μ m を示す。

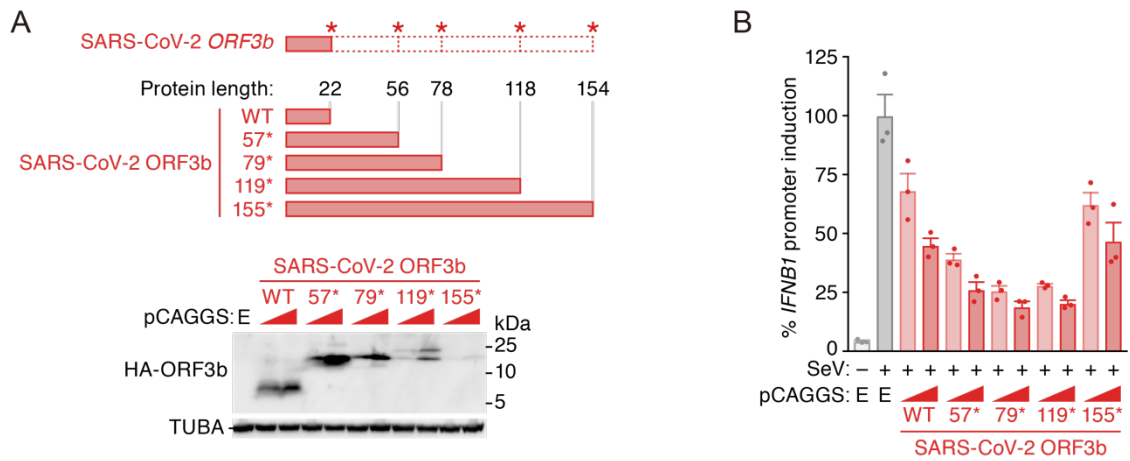


図 7. SARS-CoV-2 ORF3b のタンパク質の長さによる IFN 阻害活性の変化

(A) SARS-CoV-2 ORF3b について、終止コドン を SARS-CoV ORF3b 型に戻した変異体を作製し、ウエスタンブロッティングによりその発現を確認した。(B) 図 4A の実験系により、作製した各 SARS-CoV-2 ORF3b 変異体の IFN 阻害活性を検討した。E: 空ベクター導入細胞。

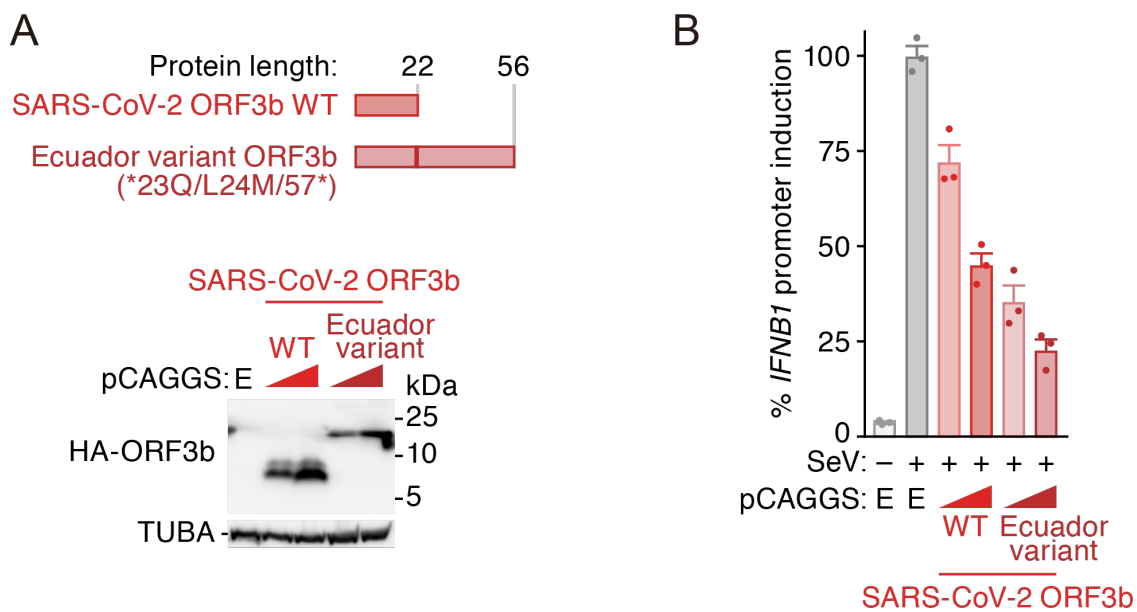


図 8. 流行拡大において出現した ORF3b 伸長変異体の IFN 阻害活性の検討

(A) エクアドルで出現した SARS-CoV-2 ORF3b 伸長変異体を作製した (Ecuador variant ORF3b)。作製した伸長変異体について、ウエスタンブロッティングによりその発現を確認した。(B) 図 4A の実験系により、作製した Ecuador variant ORF3b の IFN 阻害活性を検討した。E: 空ベクター導入細胞。

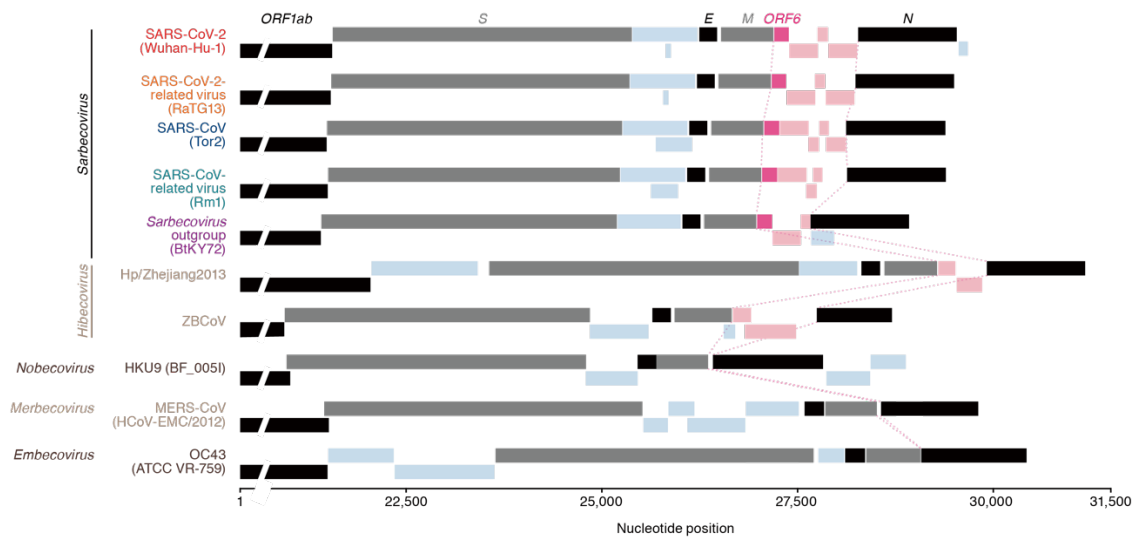


図 9. *ORF6* はサルベコウイルス亜属に特有の遺伝子である

ベータコロナウイルスに属する様々なウイルスの遺伝子構造を示した。5種類のコア遺伝子 (*ORF1ab*, *S*, *E*, *M*, *N*) を黒色および灰色で示した。*M* 遺伝子と *N* 遺伝子の間に挿入された遺伝子を薄いピンク色で示し、*ORF6* 遺伝子を濃いピンク色で示した。他の遺伝子を水色で示した。

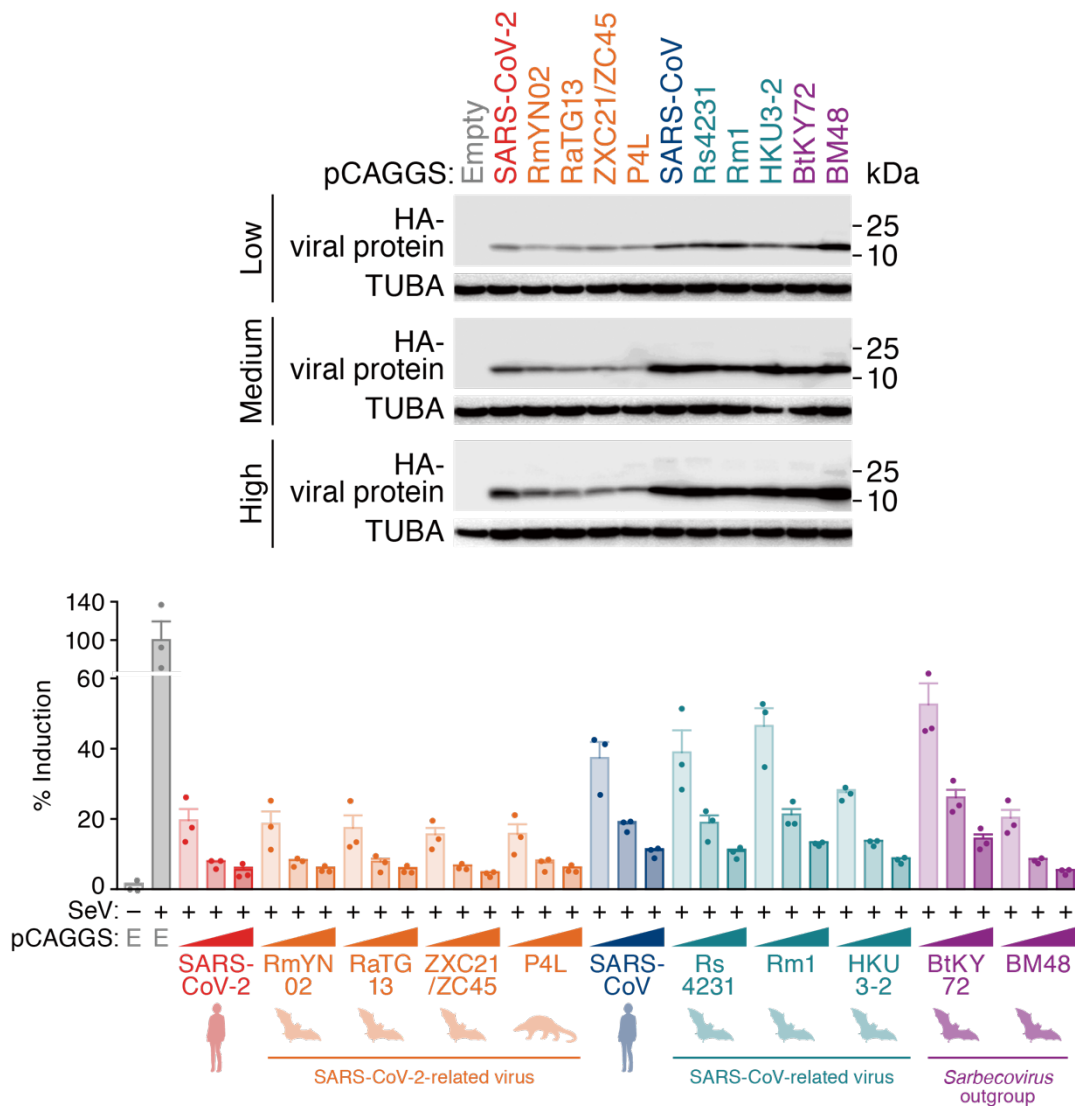


図 10. 様々なサルベコウイルスの ORF6 による IFN 阻害活性の検討

HA タグを付与した ORF6 発現ベクターを用いて、図 4A の実験系により、サルベコウイルスの ORF6 の IFN 阻害活性を検討した。上図ウエスタンブロットの"low", "medium", "high" は、導入した ORF6 発現ベクターの量を示す (low: 100 ng; medium: 300 ng; high: 500 ng)。E: 空ベクター導入細胞。

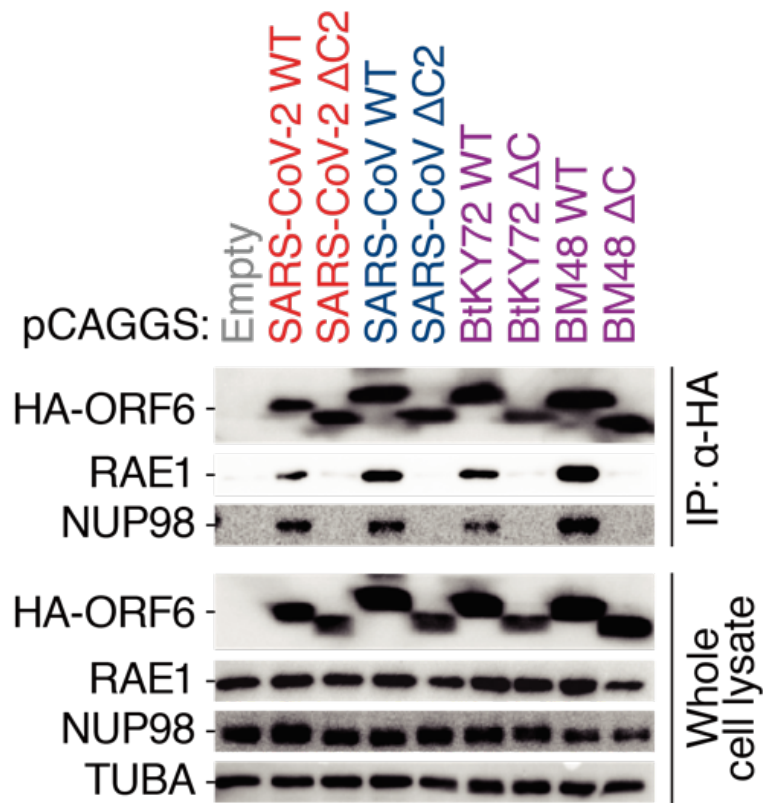


図 13. ORF6 と宿主の NUP98 および RAE1 との相互作用の検討

図 12A で作製した変異体について、共免疫沈降法により宿主タンパク質 NUP98 および RAE1 との相互作用を検討した。HA タグを付与した ORF6 発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を溶解し、この細胞溶解液に対して抗 HA ビーズを用いて免疫沈降を行なった。

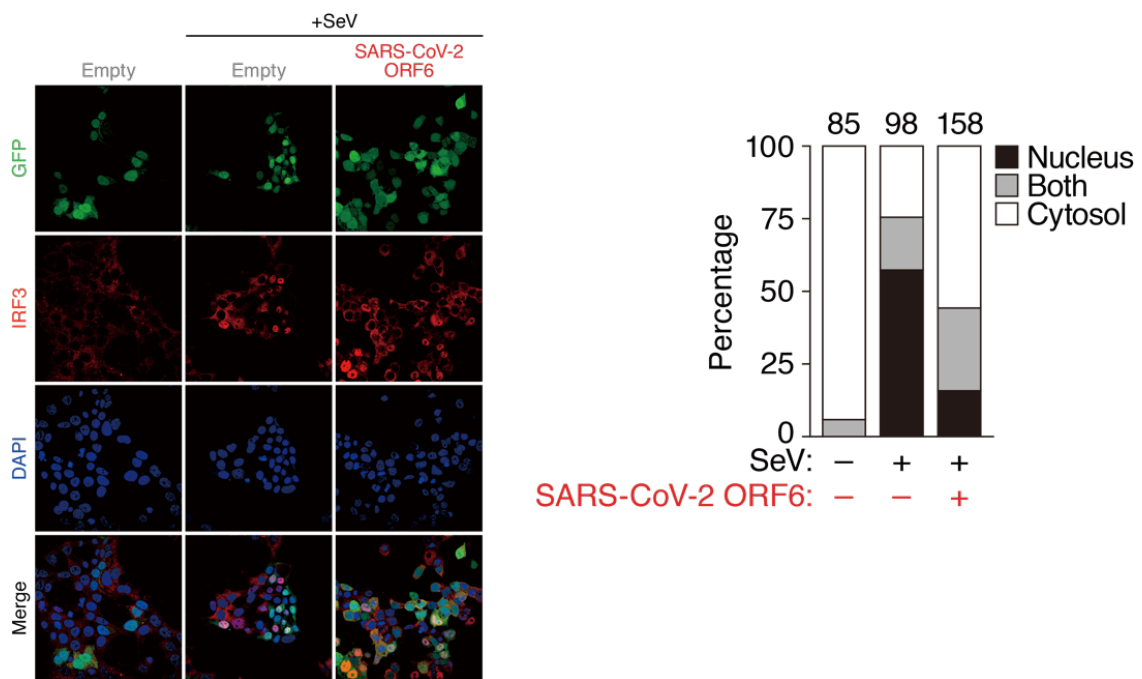


図 14. SARS-CoV-2 の ORF6 による IRF3 の核移行阻害の検討

HEK293T 細胞に ORF6 発現ベクターあるいは pCAGGS 空ベクターと GFP 発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に MOI 10 で SeV を感染させた。SeV 感染から 24 時間後に免疫染色を行い、GFP 発現細胞における IRF3 の発現および局在を観察した。グラフ上部の数字は観察した GFP 陽性細胞の数を示す。

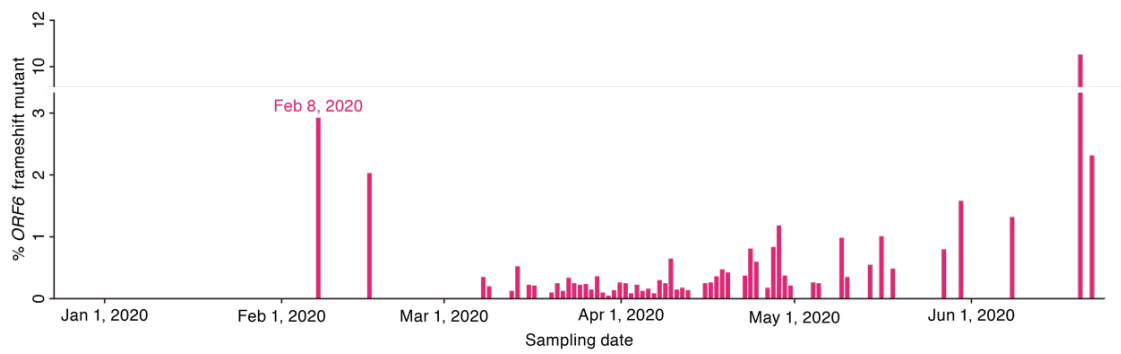


図 15. 流行拡大における *ORF6* 欠損変異体の散発的な出現

GISAID に登録された SARS-CoV-2 の配列情報を取得し、*ORF6* 遺伝子を欠損しているウイルスの出現を解析した。

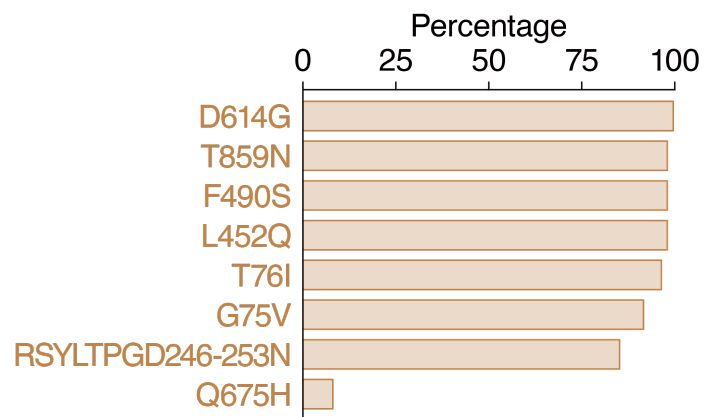


図 16. SARS-CoV-2 ラムダ株の S タンパク質に蓄積されている変異の解析

GISAID に登録された 1908 のラムダ株の配列情報を取得し、ラムダ株の S タンパク質に蓄積している変異を検出した。

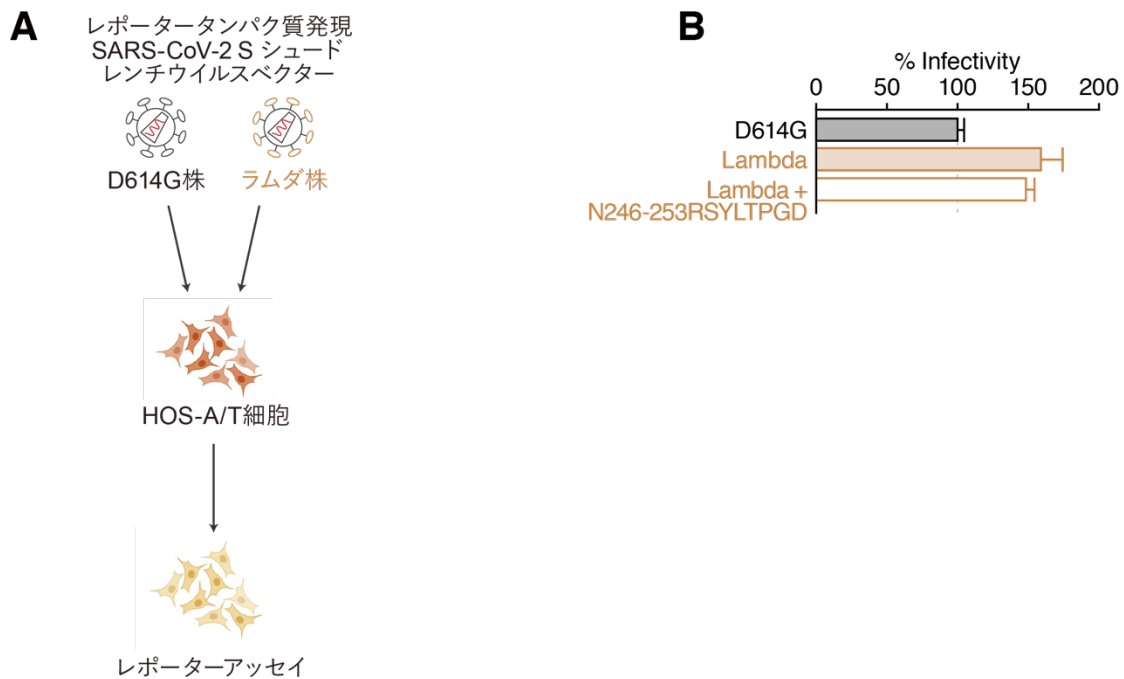


図 17. SARS-CoV-2 ラムダ株の感染価の検討

(A) S シュードウイルスを使用した感染価検討実験の概要。先行研究³²に則って行なった。HEK293 細胞に、レポータータンパク質発現ベクターである pWPI-Luc2 ベクターと、HiBiT タグを組み込んだウイルスゲノムを発現するベクターである psPAX2-IN/HiBiT と、S タンパク質を発現するベクターである pCAGGS-S をトランスフェクションし、S シュードウイルスを作製した。SARS-CoV-2 の受容体を発現している HOS-A/T 細胞に、作製した S シュードウイルスのウイルス量を揃えて感染させ、48 時間後にレポーターアッセイを行なった。

(B) (A) の実験系により、ラムダ株の親株である D614G 株、ラムダ株、ラムダ株の欠損変異のみを修復した株の S タンパク質でシュードした S シュードウイルスの感染価を測定した。

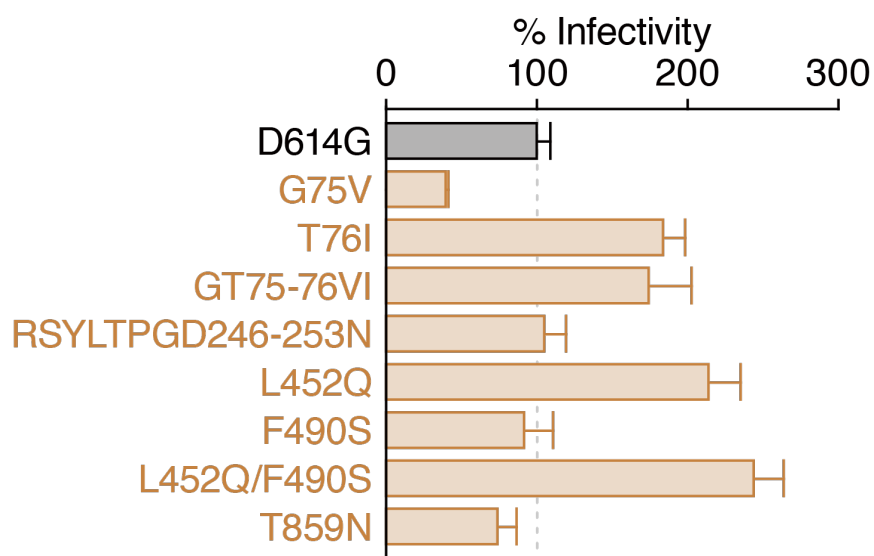


図 18. SARS-CoV-2 ラムダ株の感染価上昇に寄与する変異の検討

D614G 株に、ラムダ株に特徴的な変異を導入した点変異 S シュードウイルスを作製し、図 17A の実験系によりそれぞれの S シュードウイルスの感染価を測定した。

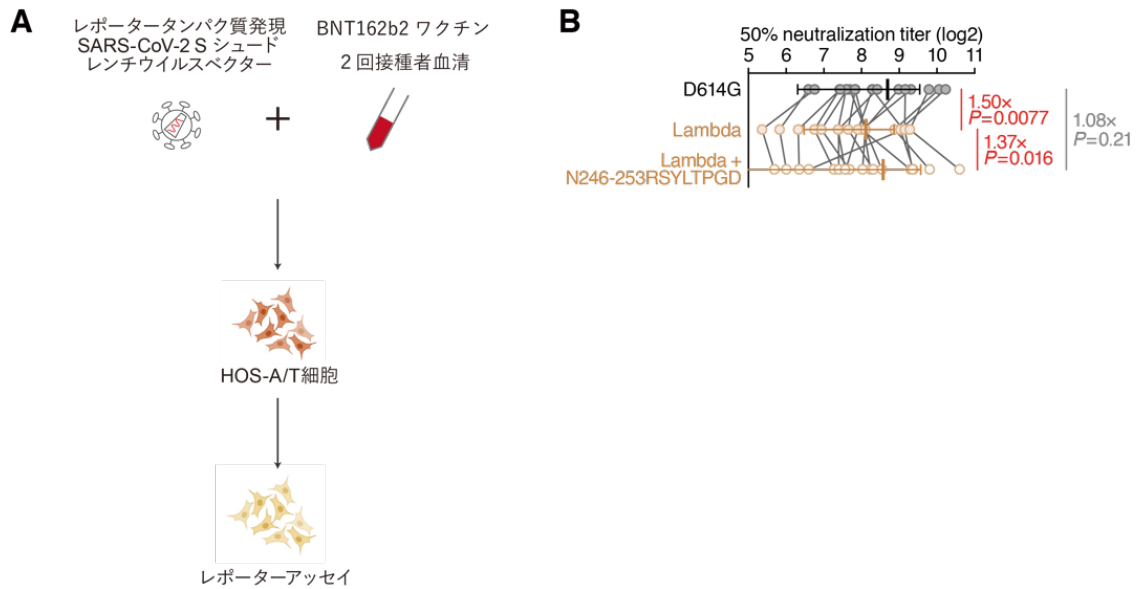


図 19. SARS-CoV-2 ラムダ株の中和抗体抵抗性の検討

(A) 中和抗体抵抗性を検討する実験の概要。図 17A でウイルスを感染させる前に、ウイルス液とワクチン接種者の血清と等量ずつ混合し、37°Cで1時間インキュベートした。インキュベート後、HOS-A/T細胞にウイルス液と血清の混合液を接種し、接種から48時間後に細胞のレポーターアッセイを行うことで、S シュードウイルスの中和抗体抵抗性を検討した。

(B) 図 17B で使用したものと同一シリーズの S シュードウイルスを用い、(A) の実験系により中和抗体抵抗性を検討した。図中に50%中和力価の倍率変化、および、ウィルコクソンの符号順位検定によるP値を記載した。

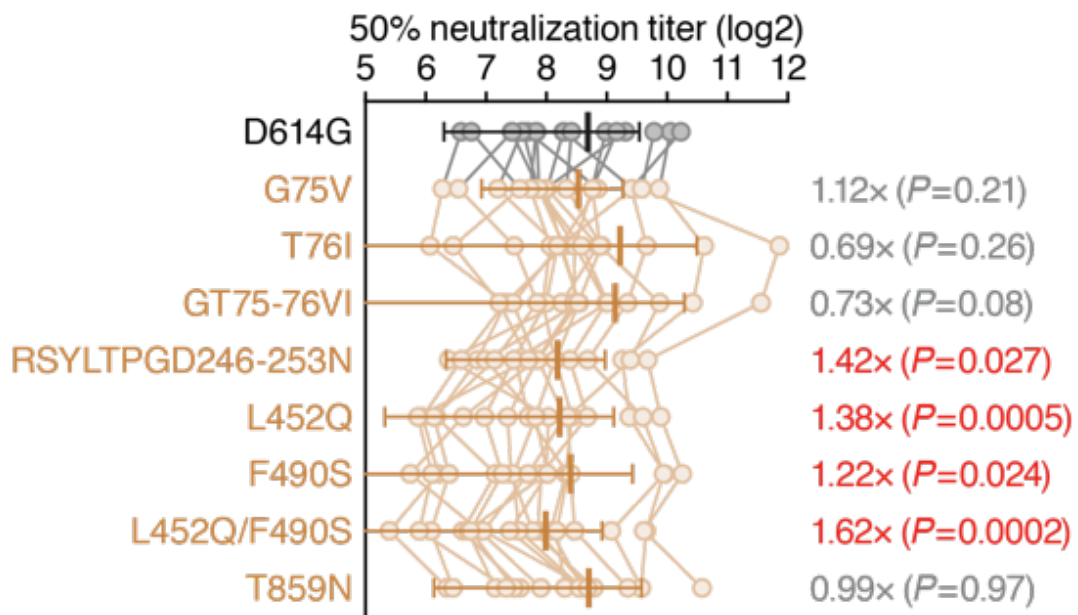


図 20. SARS-CoV-2 ラムダ株の中和抗体抵抗性に寄与する変異の検討

図 18 で使用した点変異 S シュードウイルスシリーズを用い、図 19A の実験系により中和抗体抵抗性を検討した。図中に 50%中和力価の倍率変化、および、ウィルコクソンの符号順位検定による P 値を記載した。

表 1. 遺伝子の配列解析に用いたサルベコウイルスの Accession Number

Virus group	Strain	Host	Accession no.
SARS-CoV-2	Wuhan-Hu-1	Human	NC_045512
SARS-CoV-2-related virus in bat	RmYN02	<i>Rhinolophus malayanus</i>	EPI_ISL_41297 7 #
SARS-CoV-2-related virus in bat	RaTG13	<i>Rhinolophus affinis</i>	MN996532.1
SARS-CoV-2-related virus in bat	ZXC21	<i>Rhinolophus sinicus</i>	MG772934
SARS-CoV-2-related virus in bat	ZC45	<i>Rhinolophus sinicus</i>	MG772933
SARS-CoV-2-related virus in pangolin	P4L	<i>Manis javanica</i>	EPI_ISL_41053 8 #
SARS-CoV-2-related virus in pangolin	P1E	<i>Manis javanica</i>	EPI_ISL_41053 9 #
SARS-CoV-2-related virus in pangolin	P5L	<i>Manis javanica</i>	EPI_ISL_41054 0 #
SARS-CoV-2-related virus in pangolin	Pangolin-CoV (Guangdong)	<i>Manis javanica</i>	EPI_ISL_41072 1 #
SARS-CoV	Tor2	Human	NC_004718
SARS-CoV	icSARS-C3-MA	Human	MK062182
SARS-CoV	icSARS-C3	Human	MK062181
SARS-CoV	icSARS-C7-MA	Human	MK062184
SARS-CoV	icSARS	Human	MK062179
SARS-CoV	icSARS-MA	Human	MK062180
SARS-CoV	icSARS-C7	Human	MK062183
SARS-CoV	2012255024-A/1	Human	HW375992
SARS-CoV	wtic-MB	Human	KF514397
SARS-CoV	ExoN1_c13P20	Human	KF514412
SARS-CoV	ExoN1_c5.7P20	Human	KF514407
SARS-CoV	Tor2/FP1-10851	Human	JX163924
SARS-CoV	Tor2/FP1-10895	Human	JX163925
SARS-CoV	Tor2/FP1-10895	Human	JX163928
SARS-CoV	Tor2/FP1-10851	Human	JX163927
SARS-CoV	Tor2/FP1-10912	Human	JX163926

SARS-CoV	Tor2/FP1-10912	Human	JX163923
SARS-CoV	c5P10	Human	JX162087
SARS-CoV	HKU-39849	Human	JN854286
SARS-CoV	UOB	Human	JQ316196
SARS-CoV	d3om3	Human	JF292904
SARS-CoV	d3om4	Human	JF292905
SARS-CoV	d3om5	Human	JF292906
SARS-CoV	d2ym4	Human	JF292909
SARS-CoV	d4ym1	Human	JF292911
SARS-CoV	c1P1	Human	JF292921
SARS-CoV	c5P1	Human	JF292922
SARS-CoV	d4ym5	Human	JF292915
SARS-CoV	d4ym3	Human	HQ890533
SARS-CoV	d2om2	Human	HQ890535
SARS-CoV	d2om5	Human	HQ890538
SARS-CoV	d2om3	Human	HQ890536
SARS-CoV	d4ym2	Human	HQ890532
SARS-CoV	d4ym5	Human	JF292903
SARS-CoV	TCVSP-HARROD-00003	Human	GU553365
SARS-CoV	TCVSP-HARROD-00002	Human	GU553364
SARS-CoV	P3pp23	Human	FJ882949
SARS-CoV	P3pp53	Human	FJ882956
SARS-CoV	P3pp21	Human	FJ882935
SARS-CoV	P3pp29	Human	FJ882934
SARS-CoV	P3pp34	Human	FJ882960
SARS-CoV	P3pp7	Human	FJ882947
SARS-CoV	P1pp1	Human	FJ882928
SARS-CoV	P3pp1	Human	FJ882929
SARS-CoV	P3pp8	Human	FJ882941
SARS-CoV	P3pp16	Human	FJ882939
SARS-CoV	P3pp37	Human	FJ882940
SARS-CoV	P3pp60	Human	FJ882950
SARS-CoV	P3pp46	Human	FJ882954

SARS-CoV	ExoN1	Human	FJ882926
SARS-CoV	P3pp18	Human	FJ882937
SARS-CoV	P1pp1	Human	FJ882927
SARS-CoV	MA15	Human	FJ882957
SARS-CoV	P3pp4	Human	FJ882952
SARS-CoV	P3pp23	Human	FJ882944
SARS-CoV	ExoN1	Human	FJ882943
SARS-CoV	P3pp6	Human	FJ882945
SARS-CoV	P3pp3	Human	FJ882951
SARS-CoV	P3pp4	Human	FJ882953
SARS-CoV	P3pp5	Human	FJ882942
SARS-CoV	P3pp3	Human	FJ882948
SARS-CoV	P3pp7	Human	FJ882958
SARS-CoV	P3pp10	Human	FJ882962
SARS-CoV	P3pp5	Human	FJ882961
SARS-CoV	P3pp6	Human	FJ882959
SARS-CoV	P3pp14	Human	FJ882932
SARS-CoV	P3pp12	Human	FJ882931
SARS-CoV	P3pp6	Human	FJ882933
SARS-CoV	P3pp19	Human	FJ882955
SARS-CoV	A001	Human	FJ959407
SARS-CoV	P2	Human	FJ882963
SARS-CoV	BJ182-4	Human	EU371562
SARS-CoV	ZJ02	Human	EU371559
SARS-CoV	BJ182-8	Human	EU371563
SARS-CoV	BJ182-12	Human	EU371564
SARS-CoV	BJ182a	Human	EU371560
SARS-CoV	BJ182b	Human	EU371561
SARS-CoV	-	Human	DL008527
SARS-CoV	Urbani	Human	AY278741
SARS-CoV	CV7	Human	DQ898174
SARS-CoV	GDH-BJH01	Human	DQ640652
SARS-CoV	BJ162	Human	AY864805
SARS-CoV	BJ202	Human	AY864806
SARS-CoV	MA-15	Human	DQ497008

SARS-CoV	China	Human	DQ182595
SARS-CoV	A022	Human	AY686863
SARS-CoV	B039	Human	AY686864
SARS-CoV	HKU-39849	Human	AY278491
SARS-CoV	CUHK-W1	Human	AY278554
SARS-CoV	CFB/SZ/94/03	Human	AY545919
SARS-CoV	HC/SZ/79/03	Human	AY545914
SARS-CoV	HC/SZ/266/03	Human	AY545916
SARS-CoV	HC/GZ/81/03	Human	AY545917
SARS-CoV	WH20	Human	AY772062
SARS-CoV	HC/GZ/32/03	Human	AY545918
SARS-CoV	PC4-136	Human	AY613949
SARS-CoV	GZ0402	Human	AY613947
SARS-CoV	PC4-13	Human	AY613948
SARS-CoV	PC4-227	Human	AY613950
SARS-CoV	HC/SZ/61/03	Human	AY515512
SARS-CoV	-	Human	CQ918584
SARS-CoV	-	Human	CQ918585
SARS-CoV	CDC#200301157	Human	AY714217
SARS-CoV	TJF	Human	AY654624
SARS-CoV	LLJ-2004	Human	AY595412
SARS-CoV	SinP5	Human	AY559092
SARS-CoV	Sin842	Human	AY559081
SARS-CoV	Sin852	Human	AY559082
SARS-CoV	Sin845	Human	AY559093
SARS-CoV	Sin847	Human	AY559095
SARS-CoV	Sin849	Human	AY559086
SARS-CoV	Sin3725V	Human	AY559087
SARS-CoV	SinP4	Human	AY559091
SARS-CoV	Sin846	Human	AY559094
SARS-CoV	Sin850	Human	AY559096
SARS-CoV	SinP3	Human	AY559090
SARS-CoV	SinP1	Human	AY559088
SARS-CoV	Sin3765V	Human	AY559084
SARS-CoV	Sin848	Human	AY559085

SARS-CoV	GZ02	Human	AY390556
SARS-CoV	HZS2-Fb	Human	AY394987
SARS-CoV	HZS2-E	Human	AY394990
SARS-CoV	HZS2-Fc	Human	AY394991
SARS-CoV	HSZ-Cc	Human	AY394995
SARS-CoV	LC2	Human	AY394999
SARS-CoV	LC4	Human	AY395001
SARS-CoV	LC5	Human	AY395002
SARS-CoV	GZ-B	Human	AY394978
SARS-CoV	HSZ-Bb	Human	AY394985
SARS-CoV	HZS2-C	Human	AY394992
SARS-CoV	HSZ-Bc	Human	AY394994
SARS-CoV	LC1	Human	AY394998
SARS-CoV	HSZ-Cb	Human	AY394986
SARS-CoV	GZ-C	Human	AY394979
SARS-CoV	HSZ2-A	Human	AY394983
SARS-CoV	HZS2-D	Human	AY394989
SARS-CoV	HGZ8L2	Human	AY394993
SARS-CoV	NS-1	Human	AY508724
SARS-CoV	TW9	Human	AY502932
SARS-CoV	TW11	Human	AY502924
SARS-CoV	TW8	Human	AY502931
SARS-CoV	TW3	Human	AY502926
SARS-CoV	TW10	Human	AY502923
SARS-CoV	TW2	Human	AY502925
SARS-CoV	TW6	Human	AY502929
SARS-CoV	TW7	Human	AY502930
SARS-CoV	TW4	Human	AY502927
SARS-CoV	TW5	Human	AY502928
SARS-CoV	ShanghaiQXC1	Human	AY463059
SARS-CoV	ShanghaiQXC2	Human	AY463060
SARS-CoV	GD69	Human	AY313906
SARS-CoV	Sino3-11	Human	AY485278
SARS-CoV	Sino1-11	Human	AY485277
SARS-CoV	CUHK-AG03	Human	AY345988

SARS-CoV	CUHK-AG02	Human	AY345987
SARS-CoV	SoD	Human	AY461660
SARS-CoV	PUMC03	Human	AY357076
SARS-CoV	PUMC01	Human	AY350750
SARS-CoV	PUMC02	Human	AY357075
SARS-CoV	AS	Human	AY427439
SARS-CoV	WHU	Human	AY394850
SARS-CoV	SZ16	Human	AY304488
SARS-CoV	GZ50	Human	AY304495
SARS-CoV	SZ3	Human	AY304486
SARS-CoV	TWC3	Human	AY362699
SARS-CoV	TWC2	Human	AY362698
SARS-CoV	FRA	Human	AY310120
SARS-CoV	ZMY 1	Human	AY351680
SARS-CoV	TWK	Human	AP006559
SARS-CoV	TWS	Human	AP006560
SARS-CoV	TWY	Human	AP006561
SARS-CoV	TWJ	Human	AP006558
SARS-CoV	TC3	Human	AY348314
SARS-CoV	TC1	Human	AY338174
SARS-CoV	TC2	Human	AY338175
SARS-CoV	HSR 1	Human	AY323977
SARS-CoV	TWC	Human	AY321118
SARS-CoV	Frankfurt 1	Human	AY291315
SARS-CoV	ZJ01	Human	AY297028
SARS-CoV	Sin2774	Human	AY283798
SARS-CoV	Sin2500	Human	AY283794
SARS-CoV	Sin2677	Human	AY283795
SARS-CoV	Sin2679	Human	AY283796
SARS-CoV	CUHK-Su10	Human	AY282752
SARS-CoV	BJ02	Human	AY278487
SARS-CoV	GD01	Human	AY278489
SARS-CoV	BJ03	Human	AY278490
SARS-CoV	BJ01	Human	AY278488
SARS-CoV	ZS-A	Human	AY394997

SARS-CoV	ZS-B	Human	AY394996
SARS-CoV	ZS-C	Human	AY395003
SARS-CoV-related virus in civet	civet020	Civet	AY572038
SARS-CoV-related virus in civet	civet007	Civet	AY572034
SARS-CoV-related virus in civet	civet010	Civet	AY572035
SARS-CoV-related virus in bat	BtRI-BetaCoV/SC2018	<i>Rhinolophus sp.</i>	MK211374
SARS-CoV-related virus in bat	Rf4092	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KY417145
SARS-CoV-related virus in bat	Rs4231	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417146
SARS-CoV-related virus in bat	Rs4874	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417150
SARS-CoV-related virus in bat	Rs9401	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417152
SARS-CoV-related virus in bat	As6526	<i>Aselliscus stoliczkanus</i>	KY417142
SARS-CoV-related virus in bat	Rs4084	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417144
SARS-CoV-related virus in bat	Rs4247	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417148
SARS-CoV-related virus in bat	Rs4255	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417149
SARS-CoV-related virus in bat	Rs4237	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417147
SARS-CoV-related virus in bat	Rs7327	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417151
SARS-CoV-related virus in bat	Rs4081	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY417143
SARS-CoV-related virus in bat	16BO133	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KY938558
SARS-CoV-related virus in bat	Anlong-103	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY770858

bat			
SARS-CoV-related virus in bat	Anlong-112	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KY770859
SARS-CoV-related virus in bat	Jiyuan-84	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KY770860
SARS-CoV-related virus in bat	JTMC15	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KU182964
SARS-CoV-related virus in bat	Longquan-140	<i>Rhinolophus monoceros</i>	KF294457
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-5	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153540
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-6	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153541
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-10	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153545
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-7	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153542
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-8	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153543
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-9	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153544
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-4	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153539
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-13	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153548
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-11	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153546
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-12	<i>Rhinolophus sinicus</i>	GQ153547
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-2	<i>Rhinolophus sinicus</i>	DQ084199
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-1	<i>Rhinolophus sinicus</i>	DQ022305
SARS-CoV-related virus in bat	HKU3-3	<i>Rhinolophus sinicus</i>	DQ084200

SARS-CoV-related virus in bat	F46	<i>Rhinolophus pusillus</i>	KU973692
SARS-CoV-related virus in bat	BtRs-BetaCoV/YN2013	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KJ473816
SARS-CoV-related virus in bat	BtRf-BetaCoV/JL2012	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KJ473811
SARS-CoV-related virus in bat	BtRf-BetaCoV/HeB2013	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KJ473812
SARS-CoV-related virus in bat	BtRs-BetaCoV/GX2013	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KJ473815
SARS-CoV-related virus in bat	BtRs-BetaCoV/HuB2013	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KJ473814
SARS-CoV-related virus in bat	BtRf-BetaCoV/SX2013	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KJ473813
SARS-CoV-related virus in bat	YNLF34C	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KP886809
SARS-CoV-related virus in bat	YNLF31C	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	KP886808
SARS-CoV-related virus in bat	LYRa11	<i>Rhinolophus affinis</i>	KF569996
SARS-CoV-related virus in bat	WIV1	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KF367457
SARS-CoV-related virus in bat	Rs3367	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KC881006
SARS-CoV-related virus in bat	RsSHC014	<i>Rhinolophus sinicus</i>	KC881005
SARS-CoV-related virus in bat	Rp/Shaanxi2011	<i>Rhinolophus pusillus</i>	JX993987
SARS-CoV-related virus in bat	Cp/Yunnan2011	<i>Chaerephon plicata</i>	JX993988
SARS-CoV-related virus in bat	Rs672/2006	<i>Rhinolophus sinicus</i>	FJ588686
SARS-CoV-related virus in bat	BtCoV/279/2005	<i>Rhinolophus macrotis</i>	DQ648857
SARS-CoV-related virus in bat	BtCoV/273/2005	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	DQ648856

SARS-CoV-related virus in bat	Rm1	<i>Rhinolophus macrotis</i>	DQ412043
SARS-CoV-related virus in bat	Rf1	<i>Rhinilophus ferrumequinum</i>	DQ412042
SARS-CoV-related virus in bat	Rp3	<i>Rhinolophus pearsoni</i>	DQ071615
SARS-CoV-related virus in bat	BtRs-BetaCoV/YN2018C	<i>Rhinolophus affinis</i>	MK211377
SARS-CoV-related virus in bat	BtRs-BetaCoV/YN2018B	<i>Rhinolophus affinis</i>	MK211376
Outgroup	BM48-31/BGR/2008	<i>Rhinolophus blasii</i>	NC_014470.1
Outgroup	BtKY72	<i>Rhinolophus sp.</i>	KY352407

配列データは Genbank より取得した。Accession no.に#を付記しているものについては GISAID より取得した。

表 2. ベータコロナウイルスの遺伝子構造の解析に用いたウイルスの Accession Number

ウイルス	Accession no.
Wuhan-Hu-1	NC_045512
Tor2	AY274119
RaTG13	MN996532
RmYN02	EPI_ISL_412977 #
ZC45	MG772933
P4L	MT040333
Rm1	NC_009696
BtKY72	KY352407
BM48	NC_014470

配列データは Genbank より取得した。Accession no.に#を付記しているものについては GISAID より取得した。

表 3. ORF3b, ORF6 遺伝子発現ベクター作製 PCR に使用したプライマー配列

作製したベクター	Primer	Sequence (5'-to-3')
SARS-CoV L115*	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TCTGCTGCTGCAGATCTTCACAACTCCTGAAGAG
SARS-CoV L115+NLS	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TATATATAAGATCTTCAGTCCAACCTTGACCCTCTTGGCAGCAGGCAACTCCTGAAGAGCCGT
SARS-CoV-2 57*	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TCTGCTGCTGCAGATCTTCACTCCAGATTCCCAT
SARS-CoV-2 79*	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TCTGCTGCTGCAGATCTTCAATTGAGTTGAGTACAGC
SARS-CoV-2 119*	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TCTGCTGCTGCAGATCTTCACTGGATTAACAACCTCC
Ecuador variant ORF3b	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Internal Reverse	GTAATGACAATTGAAGCATTTGTACTATTGTAAGGTATAC
	Internal Forward	GTATACCTTACAATAGTACAAATGCTTCAATTGTCATTAC
	Reverse	TCTGCTGCTGCAGATCTTCACTCCAGATTCCCAT
SARS-CoV-2 S25A	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 S25A Reverse	GATGTAATCAAGATTCCAAATAGCAACTTTAAAA GTCCTCATAAT
	SARS-CoV-2 S25A Forward	ATTATGAGGACTTTTAAAGTTGCTATTTGGAATCT TGATTACATC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 Y31V	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 Y31V Reverse	GATAAATTTTTAATTATGAGGTTTATGATAACATC AAGATTCCAAATGGAAAC
	SARS-CoV-2	GTTTCCATTTGGAATCTTGATGTTATCATAAACCT

	Y31V Forward	CATAATTA AAAAATTTATC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 N34S	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 N34S Reverse	GTGACTTAGATAAATTTTTAATTATGAGACTTATG ATGTAATCAAGATTCC
	SARS-CoV-2 N34S Forward	GGAATCTTGATTACATCATAAGTCTCATAATTA AATTTATCTAAGTCAC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 L35S	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 L35S Reverse	GTGACTTAGATAAATTTTTAATTATTGAGTTTATG ATGTAATCAAGATTCC
	SARS-CoV-2 L35S Forward	GGAATCTTGATTACATCATAAACTCAATAATTA AAATTTATCTAAGTCAC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 N34S/L35S	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 N34S/L35S Reverse	GTGACTTAGATAAATTTTTAATTATTGAACTTATG ATGTAATCAAGATTCC
	SARS-CoV-2 N34S/L35S Forward	GGAATCTTGATTACATCATAAGTTCAATAATTA AATTTATCTAAGTCAC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 S41F	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 S41F Reverse	TATTTATTCTCAGTTAGTGACTTAAATAAATTTT AATTATGAGGTTTATGATGTAATCAAGATTCC
	SARS-CoV-2 S41F Forward	GGAATCTTGATTACATCATAAACCTCATAATTA AATTTATTTAAGTCACTAAGTGAATAAATA
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 E46K	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 E46K Reverse	CTCTTCATCTAATTGAGAATATTATTCTTAGTTA GTGACTTAGATAAATTTTTAATTATGAG
	SARS-CoV-2 E46K Forward	CTCATAATTA AAAAATTTATCTAAGTCACTAACTAA GAATAAATATTCTCAATTAGATGAAGAG
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC

N47K	SARS-CoV-2 N47K Reverse	CTCTTCATCTAATTGAGAATATTTCTTCTCAGTTA GTGACTTAGATAAATTTTAAATTATGAG
	SARS-CoV-2 N47K Forward	CTCATAATTA AAAATTTATCTAAGTCACTAACTGA GAAGAAATATTCTCAATTAGATGAAGAG
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 K48N	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
SARS-CoV-2 K48N	SARS-CoV-2 K48N Reverse	GGTTGCTCTTCATCTAATTGAGAATAATTATTCTC AGTTAGTGACTTAGATAAATTTTAAATTATG
	SARS-CoV-2 K48N Forward	CATAATTA AAAATTTATCTAAGTCACTAACTGAG AATAATTATTCTCAATTAGATGAAGAGCAACC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 E46K/N47K/K48N	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
SARS-CoV-2 E46K/N47K/K48N	SARS-CoV-2 E46K/N47K/K48N Reverse	GGTTGCTCTTCATCTAATTGAGAATAATTCTTCTT AGTTAGTGACTTAGATAAATTTTAAATTATGAG
	Wuhan-Hu-1 E46K/N47K/K48N Forward	CTCATAATTA AAAATTTATCTAAGTCACTAACTAA GAAGAATTATTCTCAATTAGATGAAGAGCAACC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 Q51E	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
SARS-CoV-2 Q51E	SARS-CoV-2 Q51E Reverse	CTCCATTGGTTGCTCTTCATCTAACTCAGAATATT TATTCTCAGTTAGTGACTTAG
	SARS-CoV-2 Q51E Forward	CTAAGTCACTAACTGAGAATAAATATTCTGAGTT AGATGAAGAGCAACCAATGGAG
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 Q56E	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
SARS-CoV-2 Q56E	SARS-CoV-2 Q56E Reverse	GGGTAATCAATCTCCATTGGTTCTCTTCATCTAA TTGAGAATATTTATTCTC
	SARS-CoV-2 Q56E Forward	GAGAATAAATATTCTCAATTAGATGAAGAGGAAC CAATGGAGATTGATTACCC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 Q51E/Q56E	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
SARS-CoV-2 Q51E/Q56E	SARS-CoV-2 Q51E/Q56E Reverse	GGGTAATCAATCTCCATTGGTTCTCTTCATCTAA CTCAGAATATTTATTCTCAGTTAGTGACTTAG

	SARS-CoV-2 Q51E/Q56E Forward	CTAAGTCACTAACTGAGAATAAATATTCTGAGTT AGATGAAGAGGAACCAATGGAGATTGATTACCC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2 +Y62/P63	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 +Y62/P63 Reverse	TATATATAAGATCTACCGGTTCAAGCGTAATCTGG AACATCGTATGGGTATGGATAATCAATCTCCATTG GTTGCTC
SARS-CoV K46E	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV K46E Reverse	CTCCGAATAATTCTTCTCAGTTAGAGGCTTAAA
	SARS-CoV K46E Forward	TTTAAGCCTCTAACTGAGAAGAATTATTCCGAG
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV E56Q	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV E56Q Reverse	TCTAACTCCATAGGTTGTTCATCATCTAACTCCG
	SARS-CoV E56Q Forward	TCTAACTCCATAGGTTGTTCATCATCTAACTCCG
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV ΔC1	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TTAATTAAGATCTACCGGTTCAAGCGTAATCTG GAACATCGTATGGGTATAACTCCGAATAATTCTT CTTAG
SARS-CoV ΔC2	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TATATATAAGATCTACCGGTTCAAGCGTAATCTGG AACATCGTATGGGTATTCTTCATCATCTAACTCCG AATAAT
SARS-CoV Ala	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV Ala Reverse	TCTAACTCCATAGGGGCGGCGGGCTAACTCC GAATAATTC
	SARS-CoV Ala Forward	GAATTATTCGGAGTTAGCCGCCGCCCTATG GAGTTAGA
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
SARS-CoV-2	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC

ΔC1	Reverse	TTAATTAAAGATCTACCGGTTCAAGCGTAATCTG GAACATCGTATGGGTATAATTGAGAATATTTATTC TCAGTTAGTG
SARS-CoV-2 ΔC2	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TATATATAAGATCTACCGGTTCAAGCGTAATCTGG AACATCGTATGGGTATTGCTCTTCATCTAATTGAG
SARS-CoV-2 Ala	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	SARS-CoV-2 Ala Reverse	GGGTAATCAATCTCCATTGGTTGGGCGGCGGCTA ATTGAGAATATTTATTCTCAGTTAGTG
	SARS-CoV-2 Ala Forward	CACTAACTGAGAATAAATATTCTCAATTAGCCGC CGCCCAACCAATGGAGATTGATTACCC
	Reverse	TATGTCCTTCCGAGTGAGAG
BtKY72 ΔC	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TATATATAAGATCTACCGGTTCAAGCGTAATCTGG AACATCGTATGGGTACACTTCTTCATCTAACTTA G
BM48 ΔC	Forward	GCTCTAGAGCCTCTGCTAAC
	Reverse	TATATATAAGATCTACCGGTTCAAGCGTAATCTGG AACATCGTATGGGTATTCTTCTTCGTCTAGTTTAG

表 4. S タンパク質発現ベクター作製 PCR に使用したプライマー配列

作製したベクター	Primer	Sequence (5'-to-3')
G75V	Forward	GTGTCTGGCACCAATGTCACCAAGAGGTTTG
	Reverse	CAAACCTCTTGGTGACATTGGTGCCAGACAC
T76I	Forward	TGGCACCAATGGCATCAAGAGGTTTGACA
	Reverse	TGTCAAACCTCTTGATGCCATTGGTGCCA
GT75-76VI	Forward	GTGTCTGGCACCAATGTCATCAAGAGGTTTGACA
	Reverse	TGTCAAACCTCTTGATGACATTGGTGCCAGACAC
RSYLTPGD246-253N	Forward	CTGCTGGCTCTGCACAACCTCCTCCTCTGGCTGGACA
	Reverse	TGTCCAGCCAGAGGAGGAGTTGTGCAGAGCCAGCAG
L452Q	Forward	CAACTACAACCTACCAGTACAGACTGTTCAG
	Reverse	CTGAACAGTCTGTACTGGTAGTTGTAGTTG
F490S	Forward	GGCTTCAACTGTTACAGCCCACTCCAATCCTATG
	Reverse	CATAGGATTGGAGTGGGCTGTAACAGTTGAAGCC
T859N	Forward	AGTTCAATGGACTGAACGTGCTGCCTCCACT
	Reverse	AGTGGAGGCAGCACGTTTCAGTCCATTGAACT

謝辞

本研究は、東京大学 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 感染制御分野の川口寧教授のもとで行われました。心より御礼を申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、様々な面で丁寧なご指導を賜りました東京大学 医科学研究所 システムウイルス学分野の佐藤佳准教授、伊東潤平特任助教に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたって、多大なるご支援をいただきました京都大学 ウイルス再生医科学研究所 システムウイルス学分野の小柳義夫教授、三沢尚子女史に深く感謝いたします。ウイルスの系統解析についてご指導いただきました東海大学 中川草講師に感謝いたします。実験のご指導、および材料の分与をしていただいた国立感染症研究所 感染病理部の徳永研三主任研究官、広島大学 医系科学研究科の入江崇准教授、グラスゴー大学（イギリス）の Dr. Robert J. Gifford、チュービンゲン大学（ドイツ）の Dr. Daniel Sauter、ワクチン接種者血清を分与していただいた京都大学 医学研究科の高折晃史教授、白川康太郎助教に感謝いたします。