

所属長	所属科長	事務(局/部)長
		

令和3年3月30日

理事長 殿
学 長 殿



令和2年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

標記の件に関しまして、別紙のとおり報告いたします。

また、本研究報告の内容は、近畿大学学術情報リポジトリ (KURepo) に公開する旨、承諾いたします。

1. カテゴリー	<input checked="" type="checkbox"/> 研究 <input type="checkbox"/> 開発・改良 <input type="checkbox"/> 提案
2. 企画題目	酵母を用いた SARS-CoV-2 のリボソームスリップフレームシフト抑制による創薬スクリーニング法開発

研究代表者

所 属 : _____ 農学部

職・氏名 : _____ 教授・篠原 美紀



令和2年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	酵母を用いた SARS-CoV-2 のリボソームスリップフレームシフト抑制による創薬スクリーニング法開発
研究者所属・氏名	研究代表者：農学部生物機能科学科・篠原美紀 共同研究者：農学部生物機能科学科・松寄健一郎

1. 研究、開発・改良、提案目的・内容

コロナウイルスの増殖期に必要なタンパク質群はゲノム RNA から正しく翻訳される際には RNA 上でリボソームスリップを起こさせ、-1 塩基のフレームシフトを起こす必要がある。つまり、リボソームスリップを抑制することでウイルスは増殖に必要なタンパク質を合成できなくなり増殖を抑制することができる。この仕組みを理解することでリボソームスリップを標的とした創薬やのウイルスの増殖を遅らせる因子のスクリーニングに利用可能である。

2. 研究、開発・改良、提案経過及び成果

酵母内で SARS-CoV2 のリボソームスリップを検出するために、出芽酵母標準株 W303-1A に SARS-CoV2 の ORF1ab 由来の 81nt のスリップ配列を酵母アデニン合成に関わる *ADE2* 遺伝子に融合し、酵母 *GAL1* プロモーターの下流につなぎ、*URA3* を選択マーカーとする酵母 2 μ プラスミドにクローニングした。ウイルス由来の配列とインフレームで *ADE2* と読み枠が合う InF と、コロナウイルスと同じ+1 のフレームシフトによって *ADE2* と読み枠が合う OutF の 2 種類の融合遺伝子を作製した。InF プラスミドを保有する酵母株ではアデニン非要求性 (Ade⁺) となったことから、SARS-CoV2 の ORF1ab と酵母 *ADE2* 融合遺伝子産物が活性を持つことを確認した。また、遺伝子転写誘導を引き起こすためにガラクトース培地で同様の実験を行ったところ、予想と反して Ade⁺コロニーが減少し、かつコロニーサイズが小さくなった。これは ORF1ab と酵母 *ADE2* 融合遺伝子からの mRNA が大量に転写されることで、遺伝子発現を抑制するはたらきを持つ可能性を示唆している。

一方、コロナウイルスと同じ+1 のフレームシフトによって *ADE2* と読み枠が合う OutF では、グルコース培地で Ade⁺のコロニーが低頻度だが観察されたことから、この系は目的通りの検出系として機能する可能性があることがわかった。また、同様に遺伝子転写誘導を引き起こすためにガラクトース培地で同様の実験を行ったところ、Ade⁺のコロニーは全く観察されなかった。InF の構築の場合と同様に mRNA の転写を活性化することで遺伝子発現が抑制されることが分かった。

今回の結果から、作製した融合遺伝子は当初の目的に合致した構築となっていることが確認できた。さらに実際に転写時ではなく翻訳時にリボソームスリップによるフレームシフトが起きていることを確認する必要がある。また、今回、転写が低く抑えられているときには SARS-CoV2 の ORF1ab と酵母 *ADE2* 融合遺伝子がよく機能したが、転写誘導を行うと逆に遺伝子発現、つまり Ade⁺の表現型が抑制されることが判明した。この抑制効果が mRNA の安定性、あるいは翻訳の過程によるものであるのかを明らかにすることで、ウイルスゲノム RNA の構造的特性を明らかにする事ができる可能性がある。

また、(転写レベルのフレームシフトではないことを確認する必要があるが)今回、本来の目的である、酵母内で SARS-CoV2 のリボソームスリップを検出するための検出系を構築することができた。低転写条件下で機能することが分かったことから、リボソームスリップを高頻度で起こす条件及び、抑制する条件及び抑制を引き起こす生薬、食物由来成分因子のスクリーニングを行って行きたい。

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・改良、提案計画

酵母内で SARS-CoV2 のリボソームスリップを検出するための検出系を構築することができたことから、この検出系を用いて今後は、リボソームスリップを高頻度で起こす条件、例えば温度、酸素濃度、DNA 損傷、細胞周期などの条件の同定を行う。さらに、リボソームスリップを抑制する条件、及び抑制を引き起こす生薬、食物由来成分因子のスクリーニングを行って行きたい。最終ゴールとしては、食品由来の成分でリボソームスリップを抑制する成分をリスト化することを目指す。このことによって少しでもウイルスの増殖を遅らせる食生活を提案できると考えている。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
近畿大学(卒業研究発表)	口頭	令和3年2月4日

5. 開発・改良、提案課題の成果発表等

該当しない