

News Release



令和5年9月26日

各報道機関文教担当記者 殿

まるで連なったソーセージ？ COVID-19 重症化因子 ORF6 タンパク質による凝集体の動態観察に成功！

金沢大学大学院新学術創成研究科ナノ生命科学専攻/ナノ精密医学・理工学卓越大学院プログラム履修生の西出梧朗（博士後期課程2年）、金沢大学ナノ生命科学研究所のキイシヤン・リン特任助教、安藤敏夫特任教授、千葉大学大学院薬学研究院の西田紀貴教授、金沢大学ナノ生命科学研究所/新学術創成研究機構のリチャード・ウォング教授らの共同研究グループは、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）タンパク質の一つである Open Reading Frame 6（ORF6）（※1）が形成した、円形や線状の凝集体の動態観察に初めて成功しました。

SARS-CoV-2 は驚異的な感染力を備え、重篤な肺炎を起こすウイルスであり、その感染症 COVID-19 は 2019 年以来社会活動に甚大な影響を及ぼしています。ORF6 は、SARS-CoV-2 が宿主細胞へ感染後に発現し、核膜孔（※2）を介した宿主の正常な生体分子輸送を阻害するだけでなく、最も強力なインターフェロン（IFN）（※3）アンタゴニストとして IFN 経路活性化も阻害するため、COVID-19 重症化因子の一つであることが分かっています。しかし、数 nm (10^{-9} m) の小さな ORF6 の挙動すなわち分子動態情報が不足しているため、創薬には至っていません。

本研究では、サイズ排除クロマトグラフィー法（SEC 法）と核磁気共鳴分光測定法（NMR 法）（※4）を用いて、ORF6 が自己集合してオリゴマー（※5）化し、一部の領域は柔軟な構造をとることを発見しました。さらに、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）（※6）を用いて、ORF6 はオリゴマーをもとに、疎水性相互作用を分子間力とした円形や線状の凝集体を形成することを観察しました。また、肺がん細胞における ORF6 の蓄積は Interleukin-6（IL-6）（※7）発現を誘導することから、COVID-19 患者の肺病理やアミロイド関連の合併症発症に寄与している可能性を見いだしました。

これらの知見は将来、COVID-19 やその重症化における新たな治療法の確立に貢献することが期待されます。

本研究成果は、2023 年 9 月 14 日（米国東部時間）に米国科学誌『*The Journal of Physical Chemistry Letters*』のオンライン版に掲載されました。

【研究の背景】

ORF6 は、SARS-CoV-2 のアクセサリータンパク質の一つです。SARS-CoV-2 は感染後、宿主細胞の系を利用して ORF6 を発現させ、自身の生存に有利になるように宿主環境を再構成しています。たとえば、mRNA 輸送タンパク質である Rae1 や Nup98 を細胞質に停滞させたり、核からの mRNA の輸出を妨害したりすることを、私たちはこれまでの研究で発見しています。さらに、ORF6 は COVID-19 の重症度と関連していることや、宿主の核輸送をハイジャックして、IFN-1 のシグナル伝達を強力に抑制することが報告されています (Xia H. *et al. Cell Rep.* 2020)。COVID-19 における ORF6 の役割を明らかにすることは、COVID-19 の新たな治療法につながる重要な課題です。

また、全長 61 アミノ酸残基から成る ORF6 は、約 7 kDa ほど (数 nm) のとても小さなタンパク質であるため、X 線結晶構造解析などの従来のナノイメージングを行うことは困難です。そのため、宿主の核輸送をハイジャックするための ORF6 の構造特性や分子動態については不明でした。

【研究成果の概要】

本研究では、全長 ORF6 タンパク質をナノスケールで観察し、構造動態を明らかにすることを目的としました。結果として、ORF6 は細胞内においてアミロイド線維を形成することで、COVID-19 の肺病理やアミロイド関連の合併症発症に関連している可能性を見いだしました。

まず SEC 法による解析から ORF6 が巨大なオリゴマーを形成していること、NMR 法による解析から、自己集合した ORF6 は無秩序で特定の構造を持たない柔軟な領域を含むことが示唆されました。実際に、高速 AFM による直接観察では、ORF6 の多くがオリゴマーとして存在していることが分かりました。さらに ORF6 オリゴマーは、連なったソーセージのように、一つひとつがつながった円形や線状のプロトフィブリル、間の境目がなく成熟したアミロイド線維を形成していました (図 1)。このオリゴマー間に働く分子間力を調べるため、脂肪族アルコールなどの化合物を添加したところ、疎水性相互作用によってオリゴマーは連なっていることが明らかとなりました (図 2)。また、細胞実験により、細胞外部に存在した ORF6 は肺がん細胞に取り込まれ、細胞質の核膜近傍に集積することが分かりました。その結果、IL-6 の発現が促進されました。

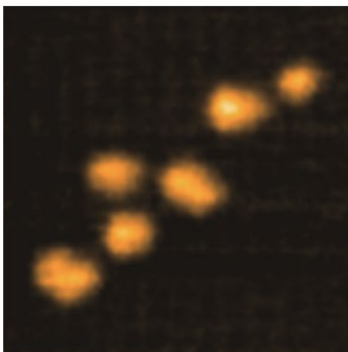
このことから、細胞内における ORF6 の蓄積は、肺の炎症が誘発され、COVID-19 特有の肺機能の低下に寄与するだけでなく、神経変性疾患などのアミロイド関連の合併症も引き起こすことが示唆されました (図 3)。

【今後の展開】

本研究成果により、ORF6 を標的とした COVID-19 における新たな治療法や創薬につながることを期待されます。

本研究は、文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム（WPI）、日本学術振興会科学研究費助成事業（19K23841, 20K16262, 21K20624, 22K15068, 21H05250, 22H05537, 22H02209, 23H04278）、小林国際奨学財団、島津科学技術振興財団、武田科学振興財団、金沢大学新学術創成研究機構ユニット研究推進経費、金沢大学超然プロジェクト、金沢大学「新型コロナウイルス感染症対策支援ファンド」研究費の支援を受けて実施されました。

ORF6オリゴマー



ORF6プロトフィブリル

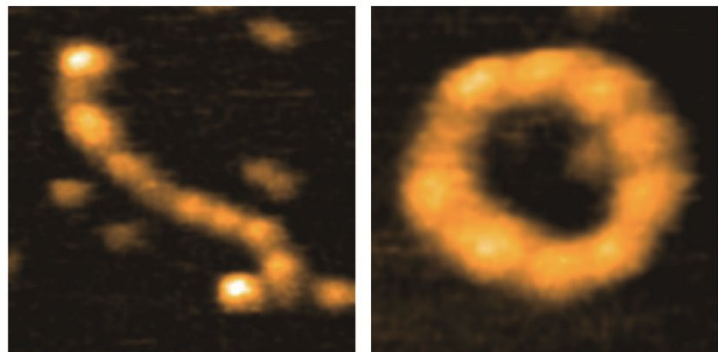


図 1: ORF6 の凝集体

高速 AFM による直接観察から、ORF6 はオリゴマーやプロトフィブリル、アミロイド線維といった凝集体を形成していることが分かりました。

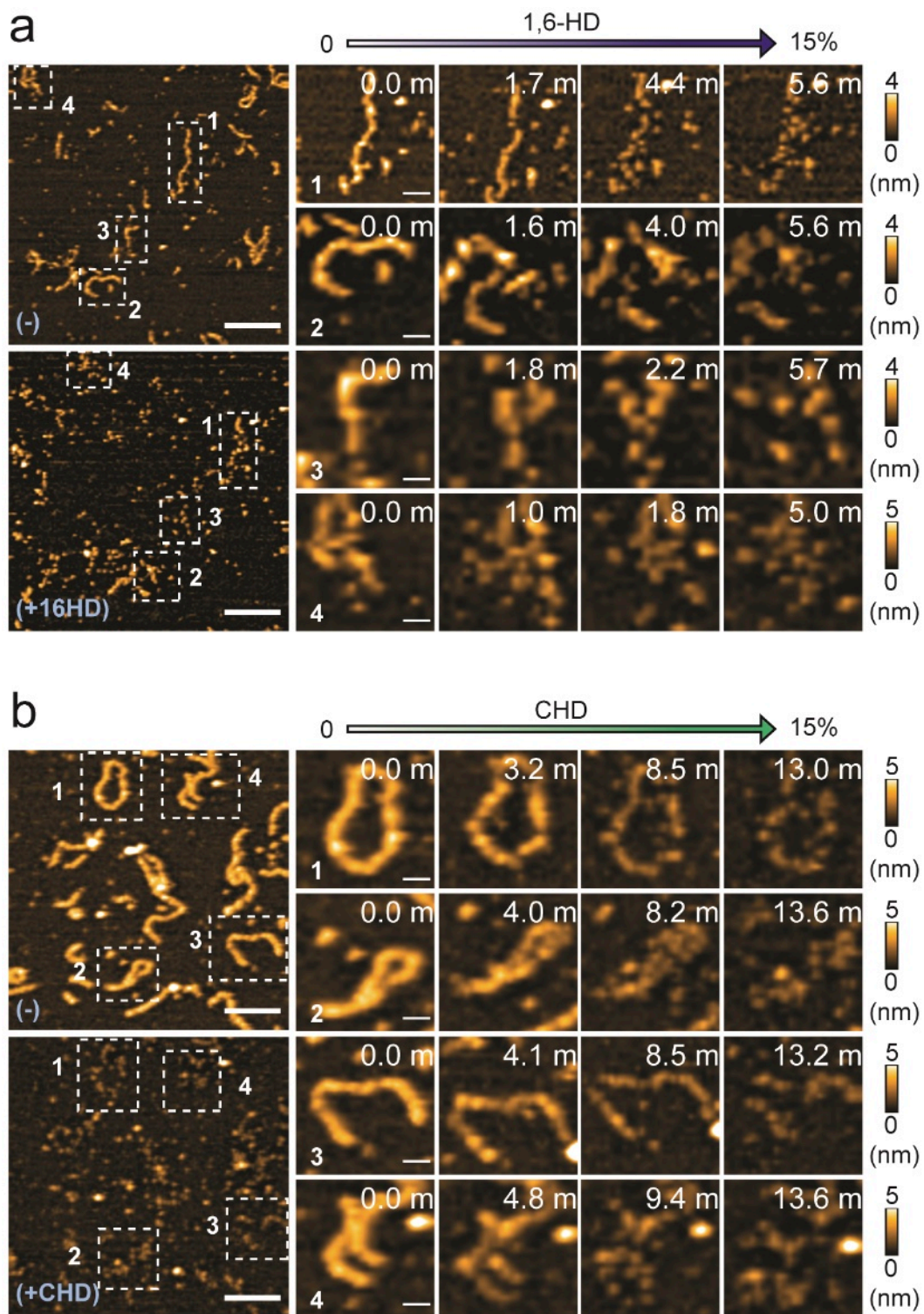


図 2: ORF6 凝集体の解離・拡散

特定の脂肪族アルコール ((a) 1,6-ヘキサンジオール (1,6-HD), (b) trans-1,2-シクロヘキサンジアミン (CHD)) は、疎水性相互作用を阻害します。これら脂肪族アルコールを ORF6 凝集体に加えると、疎水性相互作用に影響し、凝集体が解離・拡散する様子が高速 AFM により観察されました (スケールバー: a (-) & (1,6-HD), 200 nm; a (1), 56 nm; a (2), 36 nm; a (3), 24 nm; a (4), 30 nm, b (-) & (CHD), 200 nm; b (1,2), 44 nm; b (3), 48 nm, b (4), 40 nm)。

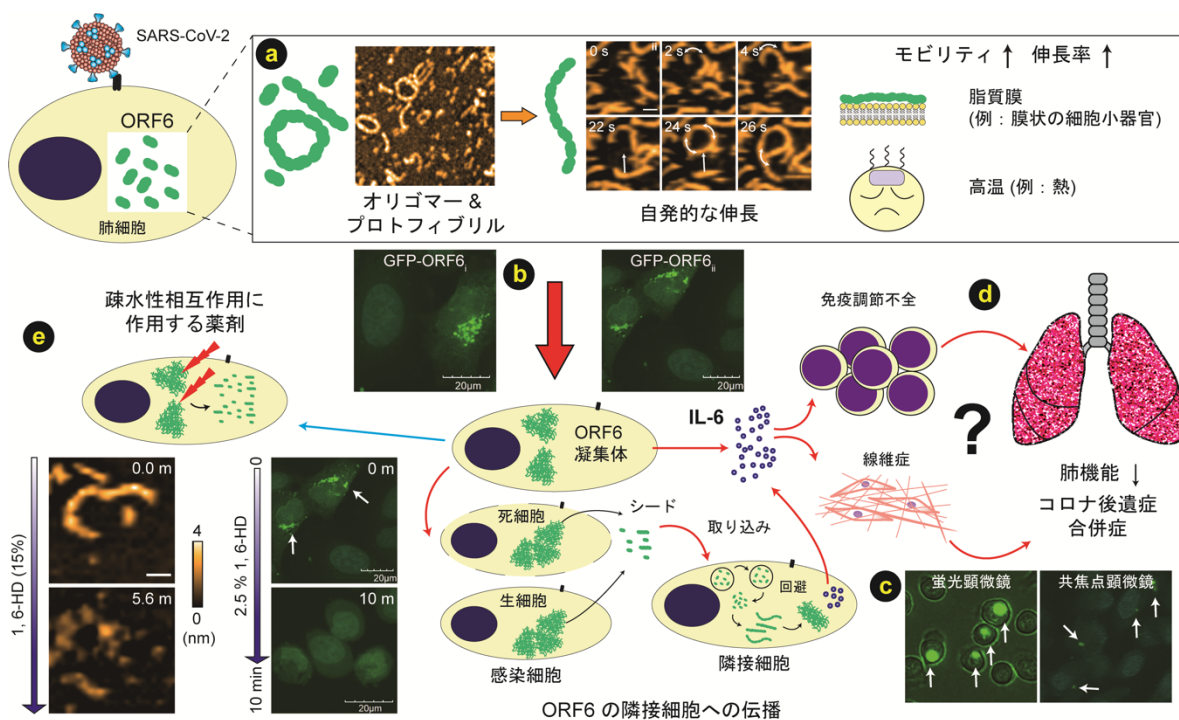


図 3: ORF6 による COVID-19 への影響および合併症の可能性

(a, b) SARS-CoV-2 ORF6 タンパク質は自己集合を起こし、感染細胞内で凝集体を形成します。(c) 感染細胞（生細胞または死細胞）から放出された外因性 ORF6 タンパク質は隣接する細胞内部に取り込まれ、凝集する可能性があります。(d) ORF6 凝集体の蓄積は肺細胞における IL-6 発現を誘導します。肺上皮由来の IL-6 は、COVID-19 患者の肺病理に関連している可能性があります。(e) ORF6 凝集体の疎水性相互作用を阻害する創薬が求められます。

【掲載論文】

雑誌名： *The Journal of Physical Chemistry Letters*

論文名： Nanoscopic Elucidation of Spontaneous Self-Assembly of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Open Reading Frame 6 (ORF6) Protein

(SARS-CoV-2 ORF6 タンパク質の自発的な自己集合の解明)

著者名： Goro Nishide¹, Keesiang Lim², Maiki Tamura³, Akiko Kobayashi⁴, Qingci Zhao³, Masaharu Hazawa^{2,4}, Toshio Ando², Noritaka Nishida³, Richard W. Wong^{2,4}

(西出梧朗¹◆, キイシヤン・リン²◆, 田村真生³◆, 小林亜紀子⁴, 趙慶慈³, 羽澤勝治^{2,4}, 安藤敏夫², 西田紀貴³#, リチャード・ウォング^{2,4}#)

1. 金沢大学大学院新学術創成研究科ナノ生命科学専攻/ナノ精密医学・理工学卓越大学院プログラム
2. 金沢大学ナノ生命科学研究所

3. 千葉大学大学院薬学研究院
4. 金沢大学新学術創成研究機構 セルバイオノミクスユニット
(◆: 共同第一著者, #: 共同責任著者)

掲載日時：2023年9月14日（米国東部時間）にオンライン版に掲載

DOI：10.1021/acs.jpcclett.3c01440

URL：https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.3c01440

【用語解説】

※1 Open Reading Frame 6 (ORF6)

全長 61 アミノ酸残基、約 7 kDa の大きさを持つ、SARS-CoV-2 アクセサリータンパク質の一つです。C 末端領域は宿主細胞のタンパク質との相互作用に重要であることが知られています。

※2 核膜孔

細胞核を取り囲んでいる二重膜構造である核膜に存在する微小な孔のことです。核膜孔は、細胞質と核の間で生体分子が出入りする唯一の通路となります。

※3 インターフェロン (IFN)

ウイルスや他の微生物に感染した際に免疫応答を活性化するために産生されるタンパク質のことです。主に免疫系の細胞によって産生され、抗ウイルス特性、増殖抑制や免疫調節などの活性を示します。

※4 核磁気共鳴分光測定法 (NMR 法)

静磁場の中に置かれた原子核が固有の周波数の電磁波と相互作用する現象（核磁気共鳴）を利用して、分子や物質の構造とダイナミクスを測定する手法です。観測可能な原子核（¹H, ¹³C, ¹⁵N など）をその原子核が置かれている化学的環境の差によって分光することができます。

※5 オリゴマー

単量体と呼ばれる基本単位がいくつか結合した重合体のことを指します。

※6 高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM)

探針と試料の間に働く原子間力を基に分子の形状やその動態をナノメートル (10⁻⁹ m) 程度の空間分解能とサブ秒という時間分解能で可視化する顕微鏡です。

※7 Interleukin-6 (IL-6)

免疫応答や炎症反応を調節するタンパク質であり、感染や炎症時に産生されて免疫細胞の活性化や体内プロセスの調節に影響を与えます。過剰に産生されるとサイトカインストームを生じ、多臓器障害を誘発します。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学ナノ生命科学研究所／新学術創成研究機構 教授

リチャード・ウォング (Richard Wong)

TEL : 076-264-6250

E-mail : rwong@staff.kanazawa-u.ac.jp

■広報担当

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

米田 洋恵 (よねだ ひろえ)

今永 藤子 (いまなが ふじこ)

TEL : 076-234-4550

E-mail : nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp

千葉大学広報室

TEL : 043-290-2018

E-mail : koho-press@chiba-u.jp