

35 ヒト細胞への SARS-CoV-2 感染に必要な宿主側の分子の同定

SARS-CoV-2 のタンパクに結合する宿主分子の網羅的な解析は、これまでもプロテオーム解析でなされてきたが、この方法では、本当にその分子が機能的に作用しているのか、単に結合しているだけなのかわからなかった。これを解明するためには、本年度のノーベル化学賞を受賞した、**CRISPR-Cas9** を用いた方法がある。これは、細胞機能に必要な遺伝子すべてを網羅するように、ガイド RNA を別々に組み込んだレトロウイルスを用いて標的遺伝子をノックアウトした細胞ライブラリーを作製し、そこにウイルスを感染させて残った細胞のガイド RNA から、欠損するとウイルス感染が起こらない遺伝子群を同定するというもの（機能欠失スクリーニング）で、これらの分子が同定されれば、COVID-19 の新しい治療法につながる。今回、ニューヨーク大学の Sanjana らは、19,050 個の遺伝子を標的とした GeCKOv2CRISPR-Cas9 ライブラリーと、SARS-CoV-2 ウイルス、ACE2 を発現しているヒト肺がん細胞株（A549^{ACE2}）を用いて実験を行い、以下の点を明らかにした。

- 1) 標的の上位 50 位に入る分子として、以下の 7 種類(分子)が挙げられた。
 - ①膜への結合 (ACE2) , ②エンドソームへの取り込み (ACTR2, RAB7A, ARPC3 など) , ③スパイク開裂と膜融合 (ATP6AP1, CTSL, ATP6V1A など) , ④エンドソームのリサイクル (Retromer, PI3K, Commander) , ⑤ウイルスの転写 (SLTM, SPEN) , ⑥小胞体(DPM3, ERMP1), ⑦ゴルジ装置 (PPID, CHST14)これらは、エンドソームの加工、輸送、酸化、細胞質分裂、ビリオン接着に関連する分子である。とくに、ACE2 は細胞（組織特異性では精巣、小腸、腎臓、心臓で多いが）への侵入経路として最も重要であるが、タンパク分解酵素の TMPRSS2 や Furin が入らず、そのかわりにカテプシン L(CTSL)が含まれた。
- 2) タンパク-タンパク相互作用 (PPIs) を検討すると、例えば、vacuolar-ATPase proton pump である ATP6AP1 と ATP6V1A は、それぞれ SARS-CoV-2 の non-structural protein 6 (nsp6), M タンパクと相互作用していた。また、エンドサイトーシス（細胞が細胞外の物質を取り込む過程の 1 つ）で重要な RAB7A は non-structural protein 7 (nsp7) と相互作用していた。他のウイルスとの相関を調べると、ジカウイルスと

- パンデミック H1N1 (2009 年新型インフルエンザ) との共通点があった。
- 3) さらに、30 の遺伝子を選んで、CRISPR ノックアウト、RNA 干渉、低分子阻害剤による検討を行ったところ、RAB7A, CCDC22, VPS35, SNX27, CTSL, ATP6AP1, ACE2, PIK3C3 などが重要と考えられた。とくに、PIK3C3 の阻害剤はウイルス量を 100 倍以上減少させた。PRKCA 阻害剤であるタモキシフェンも有望であると考えられた。
 - 4) エンドソーム形成に関連する遺伝子のうち、ATP6AP1, ATP6V1A, CCDC22, NPC1, PIK3C3, RAB7A の 6 種類のノックアウトにより、細胞内のコレステロールが上昇することがわかった。これは、SARS-CoV-2 感染により、細胞内のコレステロール合成が阻害されることと一致する。さらに、カルシウムチャンネル阻害剤であるアムロジピンを作用させると細胞内のコレステロール合成が上昇し、ウイルス抵抗性も高まった。事実、アムロジピン内服者では COVID-19 の致死率が低下するとの報告がある。
 - 5) RAB7A のノックアウトにより ACE2 の細胞表面の発現が減弱し、エンドソームに ACE2 が蓄積した。この小胞には EEA1 (early endosomal marker) ないしは LysoTracker (lysosomal marker) が見られた。

文献

- 1) Daniloski Z, et al. Identification of required host factors for SARS-CoV-2 infection in human cells. Cell 2020 doi: 10.1016/j.cell.2020.10.030