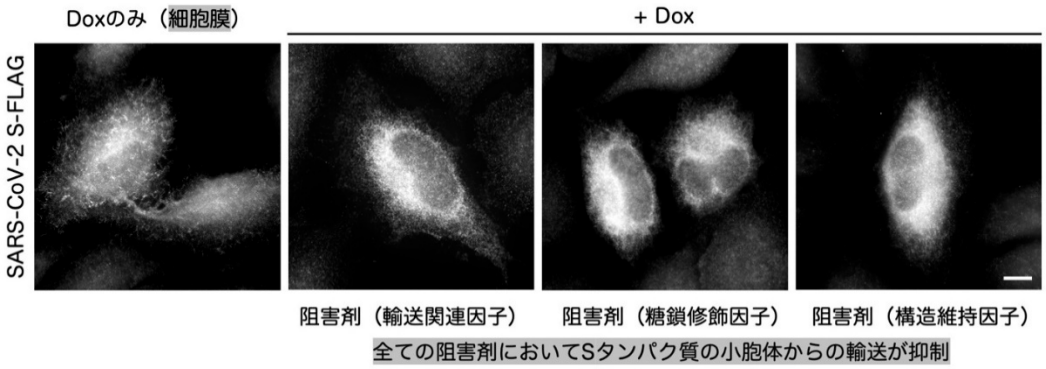
15　小胞輸送で理解するSARS-CoV-2のウイルス粒子形成機構	新崎　恒平

【目的】新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を含む全てのウイルスは、自身のタンパク質の合成やウイルス粒子の形成といった自己複製の全てのプロセスを宿主細胞の機能に依存している。SARS-CoV-2 は、4 個の構造タンパク質と 22 個の非構造タンパク質をコードする遺伝子を保有していると推測されており、ウイルス粒子の形成において、構造タンパク質である『spike（S）/membrane（M）/envelope（E）』の 3 つのタンパク質が中心的な役割を担っている。そして、宿主細胞内で合成された S/M/E タンパク質が小胞体から目的地へと適切に輸送されることがウイルス粒子形成に必須となる。それゆえ、これらタンパク質の宿主細胞内での挙動（どの輸送経路で目的地へと輸送され、その過程でどの宿主因子を利用するか）を明らかにすることは、宿主細胞内における SARS-CoV-2 ウイルス粒子形成機構の理解に役立つことが期待される。なお、興味深いことに細胞内で一過的に発現させた各タンパク質は「全て」異なる局在を示す（S タンパク質：細胞膜様局在、M タンパク質：ゴルジ体様局在、E タンパク質：核近傍凝集様局在）ことから、各々のタンパク質は『異なる輸送機構』を介して目的地へと運搬されていると考えられる。

【方法】細胞内を輸送されるタンパク質を一過的に発現させた場合、解析時には発現させたタンパク質は既に目的地へと到達していることから、本手法では発現させたタンパク質が目的地へと移行する課程をモニターすることは不可能となる。そこで、SARS-CoV-2 S/M/E タンパク質の発現を薬剤によって誘導することにより、小胞体に留めるシステムを構築し、小胞体に留めた当該タンパク質を同調的に小胞体から目的地へと輸送させる系を樹立した。更に、目的地へと輸送される際に結合する宿主因子の網羅的探索を行った。

【結果】これまでに、FLAG タグを融合させた S/M タンパク質の発現を抗生物質であるドキシサイクリン（Dox）によって誘導できるシステムを樹立し、Dox と共にブレフェルジン A（BFA：小胞体からのタンパク質輸送を阻害する薬剤）を添加することで、発現させたタンパク質を小胞体に留めることに成功した。BFA の薬効は可逆的であることから、培地中から BFA を除去すると、その薬効が消失し小胞体からの輸送が回復することが知られている。そこで、Dox と BFA 処理により小胞体に留めておいた S/M タンパク質の挙動が BFA 除去によりどのような変化を示すかを確認したところ、BFA 除去後、時間経過に応じた局在変化を介して目的地へと輸送されることを明らかにした。更には、局在を変化させる過程において結合する宿主因子の網羅的探索を行ったところ、S タンパク質においては、「細胞内輸送制御」に関連したタンパク質のみならず、「糖鎖修飾」や「構造維持」に関連した複数のタンパク質が同定された。また、本解析によって S タンパク質との結合が示唆された宿主因子の阻害剤が S タンパク質の細胞内輸送を抑制する可能性を示す結果も得た。一方、M タンパク質に関しては、細胞内の様々な輸送経路（小胞体とゴルジ体間の輸送・ゴルジ体層板間の輸送・ゴルジ体以降の複数経路の輸送）を制御する因子が多数同定された。

S タンパク質と結合する宿主因子の阻害が S タンパク質の輸送に及ぼす影響