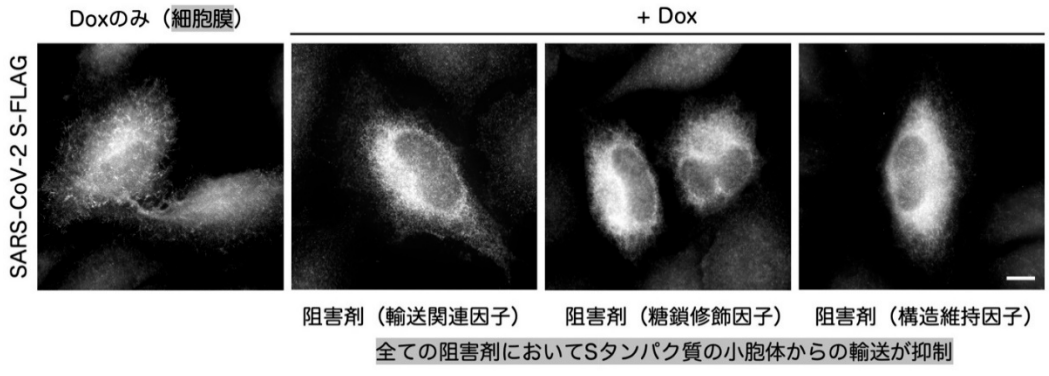
15　小胞輸送で理解するSARS-CoV-2のウイルス粒子形成機構	新崎　恒平

【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



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

東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科

Key words：SARS-CoV-2，構造タンパク質，細胞内小胞輸送，発現誘導，同調輸送

緒　言

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［1］、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（図 1a）。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（図 1b）。これまで、SARS-CoV-2 構造タンパク質と相互作用する宿主因子の網羅的解析は世界規模で行われており、その解析結果が種々のジャーナルに報告されている［2〜5］。しかしながら、これらの解析は SARS-CoV-2 構造タンパク質を一過的に発現させるシステムを用いていることから、当該タンパク質の宿主細胞内におけるダイナミックな変動やその過程における宿主因子の同定は不可能となる。そこで、本研究は SARS-CoV-2 S/M/E タンパク質を小胞体から同調的に輸送させることで、これらタンパク質の細胞内輸送機構及び輸送に応じて結合する宿主因子の同定を目的とした。

これまでに、SARS-CoV-2 S/M タンパク質を小胞体へと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、SARS-CoV-2 S/M タンパク質が目的地へと輸送される過程において結合する宿主因子を同定した。そして、S タンパク質においては、その結合因子の阻害剤が S タンパク質の細胞内輸送を抑制する可能性を見いだした。

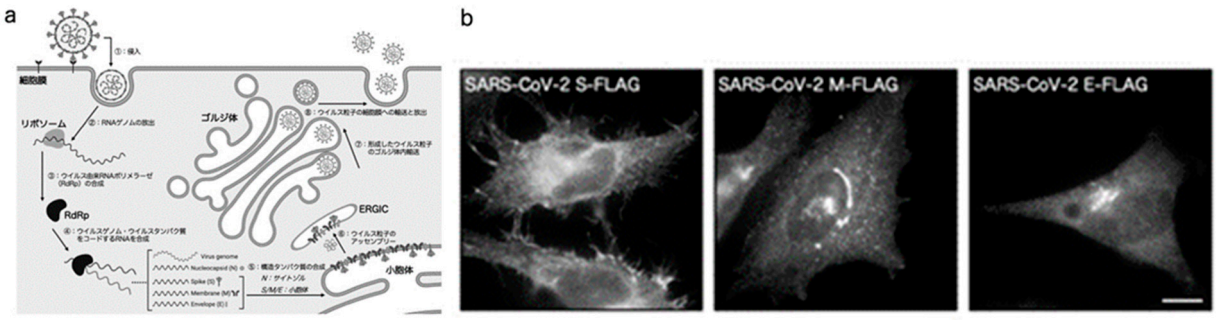


図 1. SARS-CoV-2 粒子形成機構と一過的に発現させた S/M/E タンパク質の局在

a） 現在考えられているSARS-CoV-2のウイルス粒子形成機構の模式図。

b） SARS-CoV-2 S/M/E-FLAGの発現プラスミドをHeLa細胞に発現させ、24時間後に細胞を固定し抗-FLAG抗体で染色した（スケールバー：10 μm）。

方法および結果

1. SARS-CoV-2 S-FLAG の同調輸送系の構築と輸送時間に応じて結合する宿主タンパク質の同定

本研究では、FLAG タグを融合させた SARS-CoV-2 S/M/E タンパク質を小胞体から同調的に輸送させる系を樹立し（図 2a）、これらのタンパク質が輸送される過程で結合する宿主因子を FLAG 免疫沈降により同定する（図 2b）。

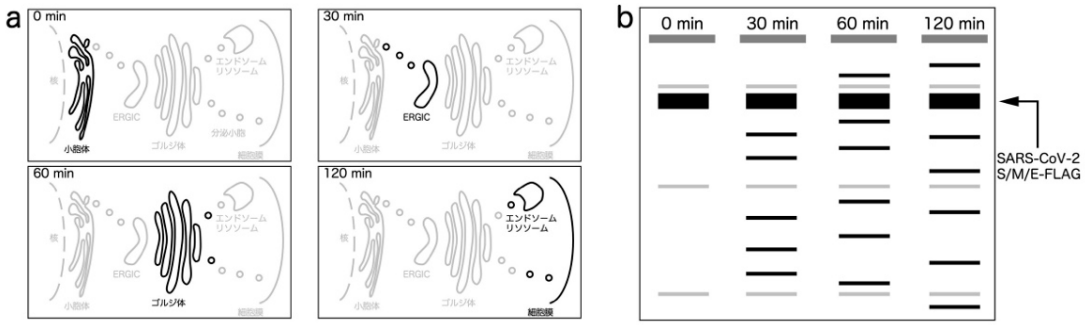


図 2. 本解析の概略図

a） 目的タンパク質の同調輸送の概略図。

b） 輸送過程において目的タンパク質と結合する宿主因子の変動を示すイメージ図。
太いバンドが沈降させた SARS-CoV-2 S/M/E-FLAG タンパク質を示しており、
黒いバンドが各時間で当該タンパク質と特異的に結合する宿主因子を表す。

まず、SARS-CoV-2-FLAG を抗生物質のドキシサイクリン（Dox）によって発現誘導できるプラスミドを構築し、Dox にて発現誘導を行った際の局在が図 3a の左上の画像となる（Dox 5h）。画像が示す通り、Dox 添加後わずか 5 時間で目的のタンパク質の発現誘導は行えているが、その局在は「細胞膜」である。それゆえ、本研究の目的を達成するためには、発現誘導させたタンパク質を小胞体に留めなくてはならない。そこで注目した薬剤がブレフェルジン A（BFA）である。BFA は小胞体からの輸送を強力にブロックする薬剤であることから、小胞体から輸送されるタンパク質は BFA によって小胞体に留まることになる。Dox 誘導性 SARS-CoV-2 S-FLAG 発現プラスミドを導入した細胞に Dox と BFA の双方を添加し 5 時間培養したものが図 3a の右上（Dox＋BFA）であり、その局在は期待通り典型的な小胞体様パターンである網目状構図として観察された。続いては、小胞体に留めたタンパク質を同調的に輸送させる系の確立となる。ここでは、BFA の薬効が可逆的である性質を利用する。BFA は小胞体からの輸送を阻害する薬剤であるが、培地中から除去すると薬効が消失し小胞体からの輸送が回復する。そこで、図 3a 右上（Dox＋BFA）の細胞から Dox と BFA を除去し、その挙動を観察した。図 3a の下段を見ると、小胞体に留まっていた SARS-CoV-2 S-FLAG の局在が除去後の時間経過に応じてダイナミックに変化していることが分かる。更には、各々のタイムコースにおいて SARS-CoV-2 S-FLAG と結合する宿主因子を示すバンドが変動していることが分かる（図 3b）。そして、当該サンプルの溶出物に対して網羅的な質量分析を行った結果、輸送時間に応じた結合・解離を示す様々な宿主因子が同定された。

2. SARS-CoV-2 M-FLAG の同調輸送系の構築と輸送時間に応じて結合する宿主タンパク質の同定

次に、SARS-CoV-2 M-FLAG においても、SARS-CoV-2 S-FLAG と同様のシステムを用いた解析を行った。図 4a の左上の画像の通り、SARS-CoV-2 M-FLAG はその局在がゴルジ体であることが特徴となる。なお、BFA 処理によってその局在は小胞体様の網目状構造を示した（図 4 右上：Dox＋BFA）。また、BFA 除去後の挙動においては SARS-CoV-2 S-FLAG よりも早い時間経過（60 分）で目的地（ゴルジ体）へと到達することが明らかになった。更に、輸送時間依存的に SARS-CoV-2 M-FLAG と結合・解離を示すバンドが確認でき（図 4b）、当該

サンプルの質量分析を行ったところ、SARS-CoV-2 M-FLAG で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）を制御する因子と強く結合する結果を得た。

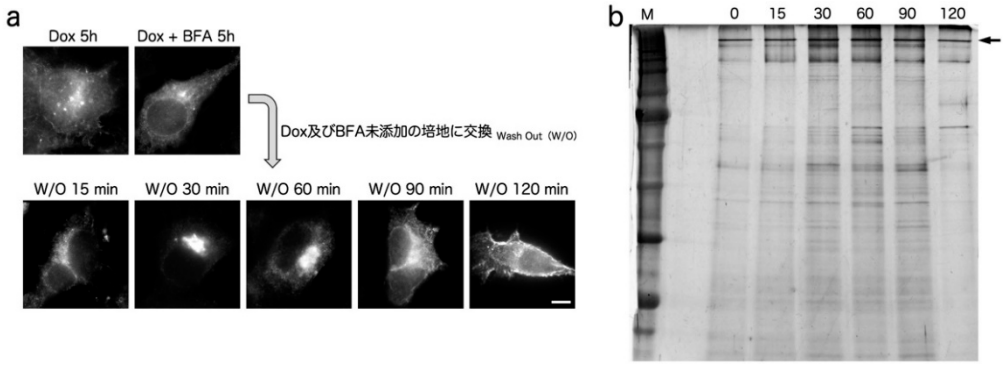


図 3. SARS-CoV-2 S-FLAG の同調輸送と時間に応じて結合する宿主因子の同定

a） 上段）Dox 誘導性 SARS-CoV-2 S-FLAG 発現プラスミドを 293 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に Dox（1μg/ml）もしくは Dox と BFA（2.5μM）を添加した。その後細胞を固定し、抗-FLAG 抗体で染色した。

（下段）Dox 誘導性 SARS-CoV-2 S-FLAG 発現プラスミドを 293 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に Dox と BFA を添加し 5 時間培養した。その後、薬剤を含まない培地に交換（W/O）して図に示す時間で細胞を固定し、抗-FLAG 抗体で染色した（スケールバー：10μm）。

b） a）の条件の細胞を回収し、破砕液を作製した。破砕液を抗-FLAG 抗体ビーズと混合し、免疫沈降を行い、沈降物を FLAG peptide により溶出した。溶出物に含まれるタンパク質は銀染色により検出した。ゲル上部の数字は培地交換後の時間を示す。矢印は沈降させた SARS-CoV-2 S-FLAG である。

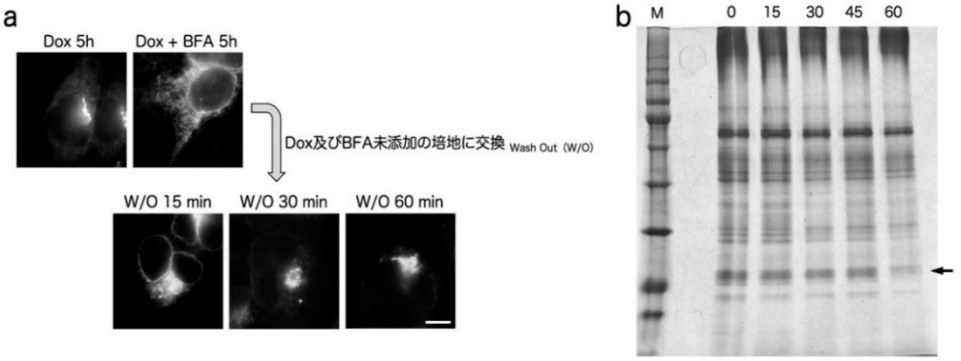


図 4. SARS-CoV-2 M-FLAG の同調輸送と時間に応じて結合する宿主因子の同定

a） （上段）Dox 誘導性 SARS-CoV-2 M-FLAG 発現プラスミドを 293 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に Dox（1μg/ml）もしくは Dox と BFA（2.5μM）を添加した。その後細胞を固定し、抗-FLAG 抗体で染色した。

（下段）Dox 誘導性 SARS-CoV-2 S-FLAG 発現プラスミドを 293 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に Dox と BFA を添加し 5 時間培養した。その後、薬剤を含まない培地に交換（W/O）して図に示す時間で細胞を固定し、抗-FLAG 抗体で染色した（スケールバー：10μm）。

b） a）の条件の細胞を回収し、破砕液を作製した。破砕液を抗-FLAG 抗体ビーズと混合し、免疫沈降を行い、沈降物を FLAG peptide により溶出した。溶出物に含まれるタンパク質は銀染色により検出した。ゲル上部の数字は培地交換後の時間を示す。矢印は沈降させた SARS-CoV-2 M-FLAG である。

3. SARS-CoV-2 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輸送に及ぼす影響の評価

ここまでの解析により、SARS-CoV-2 S タンパク質が小胞体から目的地へと輸送される過程において様々な宿主因子と結合・解離していることを見いだした。そして、それら宿主因子には「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含まれていた。そこで、これら因子の阻害剤が SARS-CoV-2 S タンパク質の輸送に及ぼす影響を評価した。図 5 を見ると、SARS-CoV-2 S タンパク質との結合が示された「輸送関連因子」・「糖鎖修飾因子」・「構造維持因子」の全ての阻害剤が SARS-CoV-2 S タンパク質の輸送を抑制することが示された。このことから、本解析によって見いだされた輸送段階特異的に SARS-CoV-2 S タンパク質と結合する宿主因子は SARS-CoV-2 S タンパク質の細胞内輸送において重要な役割を担っていることを示唆している。

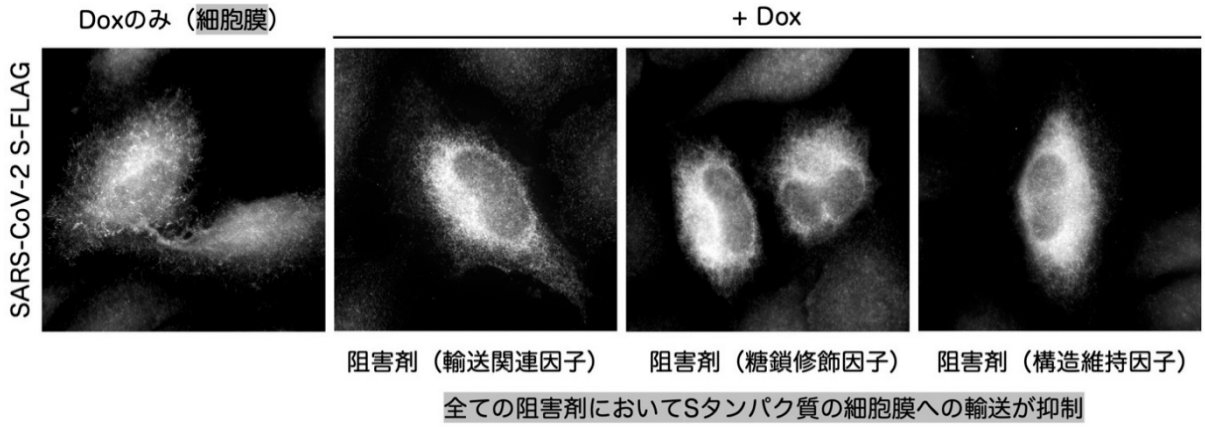


図 5. 結合因子の阻害剤が SARS-CoV-2 S-FLAG の輸送に与える影響の評価
Dox 誘導性 SARS-CoV-2 S-FLAG 発現プラスミドを 293 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に Dox（1μg/ml）もしくは Dox と各種阻害剤を添加した。その後細胞を固定し、抗-FLAG 抗体で染色した（スケールバー：10μm）。

考　察

SARS-CoV-2 のパンデミック以降、発症機序の理解や治療法の開発を目的とした多くの研究が行われている。そして、その中には構造タンパク質を含む SARS-CoV-2 タンパク質と相互作用する宿主因子の同定が含まれている。しかしながら、本解析では一過的に発現させた SARS-CoV-2 タンパク質と相互作用する宿主因子の網羅的探索を軸に展開しているが、この方法では細胞内をダイミックに移動するタンパク質の時間的・空間的な情報を得ることは不可能である。そこで、本研究では宿主小胞体から目的地まで輸送されることにより機能を発揮する SARS-CoV-2 S/M/E タンパク質の細胞内ダイナミクスの解明を目的として着手した。その結果、SARS-CoV-2 S 及び M タンパク質においては小胞体から同調的に輸送させる系の樹立と、輸送過程に応じて相互作用する宿主因子の同定に成功した。また、S タンパク質においては、相互作用する宿主因子の阻害剤によって最終目的地である細胞膜への輸送が阻害されることを明らかにした。今後、これら阻害剤がウイルス感染後のウイルス増殖に及ぼす効果を検証する必要がある。また、他の因子の阻害剤においても、その効果を検証する必要がある。一方、M タンパク質は細胞内の様々な輸送経路を制御する因子を好んで結合する可能性が示唆された。これまでの解析により、SARS-CoV-2 ウイルス粒子のアッセンブリーは小胞体とゴルジ体の中間区画（別名：ERGIC）で行われることが示されているが、形成されたウイルス粒子が細胞外へと放出される経路に関しては混沌としている（通常の分泌経路という報告もあれば、ERGIC からリソソームを介するという新規経路という報告もある）。よって、本解析で得られた各種輸送制御因子と M タンパク質との相互作用の詳細を調べることにより、SARS-CoV-2 ウイルス粒子の放出機構の解明に寄与できる可能性を秘めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所ウイルス制御分野教授の橋口隆生博士である。

文　献

1） Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, Yu F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. Signal Transduct Target Ther. 2021 Jun 11;6(1):233. PMID: 34117216 DOI: 10.1038/s41392-021-00653-w.

2） Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, et al.（著者多数）. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. Nature. 2020 Jul;583(7816):459-468. PMID: 32353859 DOI: 10.1038/s41586-020-2286-9

3） Gordon DE, Hiatt J, Bouhaddou M, Rezelj VV, Ulferts S, et al.（著者多数） Comparative host-coronavirus protein interaction networks reveal pan-viral disease mechanisms. Science. 2020 Dec 4;370(6521):eabe9403. PMID: 33060197 DOI: 10.1126/science.abe9403.

4） Stukalov A, Girault V, Grass V, Karayel O, Bergant V, Urban C, Haas DA, Huang Y, Oubraham L, Wang A, Hamad MS, Piras A, Hansen FM, Tanzer MC, Paron I, Zinzula L, Engleitner T, Reinecke M, Lavacca TM, Ehmann R, Wölfel R, Jores J, Kuster B, Protzer U, Rad R, Ziebuhr J, Thiel V, Scaturro P, Mann M, Pichlmair. Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV. Nature. 2021 Jun;594(7862):246-252. PMID: 33845483 DOI: 10.1038/s41586-021-03493-4.

5） Chen Z, Wang C, Feng X, Nie L, Tang M, Zhang H, Xiong Y, Swisher SK, Srivastava M, Chen J. Interactomes of SARS-CoV-2 and human coronaviruses reveal host factors potentially affecting pathogenesis. EMBO J. 2021 Sep 1;40(17):e107776. PMID: 34232536 DOI: 10.15252/embj.2021107776.