



利用邻位标记-质谱联用技术发掘 冠状病毒 HCoV-229E 互作宿主因子*

琚睿霞¹⁾ 汪浩勇¹⁾ 刘海楠²⁾ 刘莹²⁾ 曹诚^{2)**}⁽¹⁾ 湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 武汉 430068; ⁽²⁾ 军事科学院军事医学研究院, 北京 100850

摘要 目的 通过邻位标记-质谱联用与生物信息学分析结合筛选与人冠状病毒 229E (HCoV-229E) 核衣壳蛋白 (NP) 相互作用的潜在宿主因子, 并利用免疫共沉淀等技术验证, 寻找 HCoV-229E NP 的相互作用蛋白, 为揭示病毒复制增殖的分子机制, 及不同人冠状病毒致病力差异奠定基础。**方法** 首先构建了表达 HCoV-229E NP 与生物素连接酶标签融合蛋白 (NP-TurboID) 的重组腺病毒 Ad-V5-NP^{HCoV-229E}-TurboID (Ad-N), 感染人非小细胞肺癌细胞 A549, 48 h 后添加外源生物素, 通过生物素连接酶标记 NP 相互作用蛋白, 利用链霉亲和素交联的磁珠纯化生物素标记蛋白, 而后进行无标记 (label-free) 蛋白质组学质谱分析, 筛选出潜在的与 NP 互作的蛋白质, 并通过免疫沉淀和免疫荧光等实验进行验证。**结果** 无标记蛋白质组学质谱筛选出 584 个潜在互作蛋白, 从中选取糖原合成酶激酶 3 (GSK3) A 和 GSK3B 进行免疫共沉淀和免疫荧光验证, 实验结果表明, 二者与 NP^{HCoV-229E} 存在相互作用。**结论** 邻位标记-质谱联用技术可以用于病毒-宿主相互作用因子的挖掘, 为进一步研究冠状病毒复制、增殖及致病机制奠定了基础。

关键词 邻位标记, 冠状病毒 229E, 核衣壳蛋白, TurboID, 糖原合成酶激酶 3

中图分类号 R373.9, Q503

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0100

冠状病毒是一种有包膜的单股正链 RNA 病毒, 可分为 α 、 β 、 γ 和 δ 属。目前, 已证实能够感染人的冠状病毒共有 7 种, 其中 HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-HKU1 属于 α 属冠状病毒, HCoV-OC43 及能够导致人类严重呼吸道疾病的中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 以及严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 属于 β 属冠状病毒^[1-2]。冠状病毒基因组主要编码 4 种结构蛋白: 刺突蛋白 (S)、核衣壳蛋白 (N)、膜蛋白 (M) 和包膜蛋白 (E)。核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, NP) 是冠状病毒的主要结构蛋白之一, 在冠状病毒的生命周期中起着至关重要的作用。NP 是 RNA 结合蛋白, 对于病毒基因组 RNA 特征性序列的识别具有重要作用, 可与病毒 RNA 形成核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP) 复合物, 从而保护病毒基因组, 参与病毒粒子的组装^[3-4]。NP 由两个主要的结构域组成, 即 N 端结构域 (NTD) 和 C 端结构域 (CTD)。N 端主要发挥与

RNA 结合的功能^[5], C 端的功能主要与多聚化相关^[6-7]。有研究表明, 为了实现最佳的 RNA 结合, 可能需要两个结构域的共同作用^[8]。有研究表明, NP 通过与宿主蛋白相互作用, 诱导宿主的免疫反应或调控被感染细胞的细胞周期。SARS-CoV-2 NP 通过与 Ras-GAP SH3 结构域结合蛋白 (Ras-GAP SH3 domain binding proteins, G3BPs) 相互作用抑制宿主先天性抗病毒反应^[9]; 高致病性冠状病毒 (MERS-CoV、SARS-CoV 及 SARS-CoV-2) NP 与甘露糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 2 (MBL-associated serine protease-2, MASP-2) 结合并通过 MASP-2 激活显著增强补体活化^[10]; SARS-CoV-2 NP 损害病毒 RNA 诱导的应激颗粒形成来促进病毒自身复制^[11]。MERS-CoV NP 和视黄酸诱导基因蛋白 I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I) 竞争与

* 国家自然科学基金 (82101865) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13911462341, E-mail: caoc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2024-03-14, 接受日期: 2024-04-10

三基序蛋白25 (tripartite motif 25, TRIM25) 相互作用, 从而抑制 RIG-I 泛素化和干扰素 (interferon, IFN) 的产生^[12], SARS-CoV-2 NP 同样与 TRIM25 相互作用, 抑制了 TRIM25 介导的 RIG-I 泛素化, 从而抑制 IFN 的产生^[13]。病毒与宿主因子的相互作用一定程度上决定了病毒的致病性, 而 NP 是冠状病毒中丰度最高的蛋白质之一, 深入解析 NP 与宿主因子的相互作用对揭示冠状病毒的致病机制具有重要意义。HCoV-229E 在人群中传播最广泛, 该病毒通常引起轻度上呼吸道疾病, 并且与 10%~30% 的普通感冒病理有关^[14]。但其致病能力显著弱于 MERS-CoV、SARS-CoV 以及 SARS-CoV-2, 其分子机制未知, 目前对于 HCoV-229E NP 通过与宿主因子相互作用调控病毒增殖、宿主抗病毒免疫以及参与病毒致病机制的研究并不透彻。

病毒在宿主细胞中复制、增殖及致病离不开与宿主的相互作用。近年来发展成熟的邻位标记 (proximity labeling, PL) 技术为研究生理病理条件下病毒与宿主蛋白质相互作用提供了强有力的工具。该技术依赖于具有邻近标记功能的工具酶, 包括过氧化氢酶 (如, 工程抗坏血酸过氧化物酶 (engineered ascorbate peroxidase, APEX2)、辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP))^[15] 和生物素连接酶 (如 BioID、TurboID)^[16-17] 等, 在生物素连接酶的催化作用下将小分子底物 (如生物素 (biotin)) 连接到与目的蛋白邻近的内源蛋白上, 从而在活细胞水平对邻近生物分子进行生物素标记。而后可通过链霉亲和素交联的磁珠富集被标记的蛋白质, 进行质谱分析, 即可鉴定目的蛋白邻近的蛋白质信息。其中 TurboID 与目的蛋白融合, 其催化效率高于 BioID 或 APEX, 可将所需的标记时间从 18 h 缩短到 10 min, 它结合了 BioID 的简单性和无毒性以及高效的催化性^[18], 并且与过氧化氢酶相比, 生物素连接酶对细胞刺激小, 能够更好地模拟生理状态。目前, PL 技术已应用于多种蛋白质互作以及多种病毒蛋白质组学的研究, 包括卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus, KSHV)^[19]、腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV)^[20] 等。新型冠状病毒感染 (COVID-19) 爆发后, 贺福初院士团队 2021 年基于 APEX2 邻近标记系统, 成功筛选到辅助 SARS-CoV-2 入侵宿主因子肌球蛋白重链 9 (myosin heavy chain 9, MYH9), 该蛋白质介导病

毒通过内吞作用以血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 依赖性方式进入宿主细胞, 并可能作为未来临床干预策略的潜在靶点^[21]。

COVID-19 爆发以来, 冠状病毒研究获得极大的关注。本研究使用 HCoV-229E NP 与 TurboID 融合, 利用邻位标记-质谱联用技术能够快速找到大量与 NP 互作的蛋白质。通过质谱结果分析, 筛选出 584 个潜在互作蛋白, 基因本体论 (gene ontology, GO) 分析与京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析发现, 在糖酵解/糖异生途径中富集的糖原合成酶激酶 3 (GSK3) A 和 GSK3B, 其异常活性与糖尿病密切相关^[22-24]。SARS-CoV-2 可通过活化 ACE2 受体加剧糖尿病患者血糖升高和代谢异常, 且病毒引起的潜在胰脏 β 细胞损伤导致胰岛素缺乏, 从而不仅加重了糖尿病患者病情, 还可能诱发非糖尿病患者新发糖尿病。基于以上所述, 本文选取 GSK3A 和 GSK3B 进行相互作用验证实验, 发现二者与 NP 存在相互作用, 提示 NP 可能通过与 GSK3 相互作用, 参与到多种冠状病毒致病过程。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

人非小细胞肺癌细胞 A549 与人胚胎肾细胞 HEK293 购于北京协和细胞资源中心。

1.1.2 质粒与腺病毒

质粒: pCDNA3.1-NP^{HCoV-229E}-Flag、pCDNA3.1-HA-GSK3A、pCDNA3.1-HA-GSK3B 均由通用生物构建; pCDNA3.1-HA-Vector 为实验室保存; 腺病毒: Ad-V5-NP^{HCoV-229E}-TurboID 和对照空病毒 Ad-null 由北京百奥川生物合成与扩增, 滴度均为 2×10^{13} PFU/L。

1.1.3 试剂

Ham's F-12K (Kaighn's) 培养基 (货号: 21127-022) 以及 DMEM 高糖培养基 (货号: 11995065) 购于 Gibco 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum) 购于 EXCL 公司; 青霉素和链霉素分别购于石药集团与华北制药; 胰蛋白酶-EDTA 溶液、生物素、anti-HA 琼脂糖珠购于 Sigma-Aldrich; 转染试剂 Lipofectamine3000 购于 Invitrogen; 4% 多聚甲醛固定液购于索莱宝公司,

链霉亲和素磁珠、V5-HRP、Flag-HRP、 β -actin-HRP、GSK3A、GSK3B 抗体购于 proteintech; 山羊抗鼠 FITC 以及山羊抗兔 TRITC 购于中杉金桥。

1.1.4 仪器设备

蛋白质电泳仪和半干转膜仪 (Bio-Rad)、激光共聚焦显微镜 (ZEISS)、多功能酶标仪、细胞计数仪 (Thermo Fisher)、化学发光蛋白质印迹成像仪 (eBLOT)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

A549 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 Ham's F-12K (Kaighn's) 培养基中, HEK293 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 所有细胞均在 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 用胰蛋白酶消化传代。选择处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 基于 TurboID 的邻位生物素标记技术

提前将 A549 细胞接种在 100 mm 培养皿中, 待皿底细胞长至 70% 融合度时, 用感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 5 的 Ad-V5-NP^{HCoV-229E}-TurboID 感染细胞, 48 h 后加入生物素 (DMSO 配制, 终浓度为 100 μ mol/L) 放入细胞培养箱标记 30 min。结束后, 立即弃培养基加入 PBS 终止标记, 将细胞转移至冰上, 并用预冷的 PBS (4°C) 冲洗 3~5 遍, 用细胞刮铲将所有细胞收集, 进行冰上裂解, 最后用 Anti-Streptavidin 抗体检测所标记的生物素化蛋白, 用 Anti-V5 抗体检测 NP 的表达^[25]。

1.2.3 生物素标记蛋白亲和纯化

将 A549 细胞接种至 100 mm 培养皿中 (3 个重复), 待细胞生长至 70% 融合度时进行感染, 实验组为 Ad-V5-NP^{HCoV-229E}-TurboID, 对照组为 Ad-null。待 48 h 后将生物素 (终浓度 100 μ mol/L) 加入培养基, 30 min 后用 PBS 洗涤终止反应, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次后, 收集细胞进行冰上裂解, 离心后将细胞裂解液转移至新离心管中, 取 5% 的细胞裂解液用蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测样品生物素化蛋白, 剩余细胞裂解液中加入 40 μ l 链霉亲和素磁珠进行免疫沉淀, 4°C 旋转孵育 2~3 h。结束后利用磁铁架, 将磁珠吸至离心管管壁一侧, 再吸弃上清液, 用新的细胞裂解液洗珠 1 次, 用 1 mol/L KCl 洗涤磁珠 1 次, 用 0.1 mol/L Na₂CO₃ 洗涤磁珠 1 次, 用含有 2 mol/L 尿素的 Tris-HCl

(pH 8.0) 洗涤磁珠 1 次, 最后用新的细胞裂解液洗涤磁珠 2 次。洗珠结束吸干液体后, 用适量的 1 $\times$ SDS 蛋白质上样缓冲液重悬磁珠, 沸水煮样 10 min, 将上清转移至新的离心管, 再用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离样品, 电泳结束将凝胶放入考马斯亮蓝染色液中染色, 再使用脱色液清洗多余的染色液, 待凝胶变透明可清晰观察到蛋白质条带时, 用无菌的刀片切下目的条带, 送样进行质谱分析^[25]。

1.2.4 质谱分析

实验流程为蛋白质提取、蛋白质定量、SDS-PAGE、蛋白质酶解最终上质谱仪进行检测。首先将样品充分进行胰蛋白酶和糜蛋白酶消化, 肽段脱盐后, 采用纳升洗脱 NanoElute 系统和含有 CaptiveSpray 离子源的质谱仪 timsTOF Pro 连用进行分离 (流速为 300 nl/min)。最后样品经色谱分离后用 timsTOF Pro 质谱仪 (Bruker, Bremen, Germany) 的 PASEF 模式进行质谱分析。本研究采用的是基于 MS1 数据积分的非标记定量方法, 利用 MaxQuant 软件定性匹配以及 FDR 原理算法进行数据筛选及分析 (数据库为 uniprot_homo_20230312_20423_9606_swiss_prot)。

1.2.5 免疫共沉淀与免疫印迹法实验

将 HEK293 细胞接种至 6 孔板中, 进行 3 组处理, 待细胞生长至 70% 融合度时将 pCDNA3.1-NP^{HCoV-229E}-Flag、pCDNA3.1-HA-GSK3A、pCDNA3.1-HA-GSK3B 以及 HA-Vector 质粒各 2 μ g 进行共转染, 48 h 后收细胞, 加入细胞裂解液冰上裂解, 进行蛋白质相对浓度测定, 调整 3 组实验蛋白质浓度后加入 Anti-HA beads 4°C 旋转孵育 2 h, 富集带有 HA 标签的 GSK3A 或 GSK3B 并进行沉淀与其存在相互作用的蛋白质, 洗珠煮样处理后进行电泳。电泳结束后, 将产物转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 (TBS-T 配制) 室温封闭 1 h, TBS-T 洗涤 3 次, 使用带有 HRP 抗体进行室温孵育 1 h, 回收一抗, TBS-T 清洗 3 次, 结束后进行化学发光显影观察结果。

1.2.6 免疫荧光

提前将浸泡在 75% 乙醇的盖玻片烧干置于 6 孔板中, 再将适量 HEK293 细胞接种在 6 孔板中, 待皿底细胞长至 60%~70% 融合度时, 对细胞进行转染, 48 h 后, 用室温 PBS (避免细胞皱缩) 洗涤 3 次后, 用 1 ml 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 再用 0.2% Triton X-100 室温穿孔 15 min, 5% 山羊血清

封闭 30 min, 用 GSK3A、GSK3B、Flag 一抗室温孵育 1 h。用对应种属二抗室温避光孵育 1 h, PBST 清洗后, 滴加含有 DAPI 封片液至载玻片, 将细胞面朝下扣置, 避光静置 10 min, 结束后用激光共聚焦显微镜观察拍照并保存。

2 结 果

2.1 基于 TurboID 邻位标记重组载体的构建及潜在互作蛋白挖掘

本研究使用腺病毒载体表达的病毒 NP 与生物

素连接酶 (TurboID) 融合蛋白进行邻位标记和蛋白质互作研究。在含有 5 型腺病毒 (Ad5) 载体中, 将 NP-TurboID 融合基因克隆在 V5 标签下游, 感染细胞后可表达 Ad-V5-NP^{HCov-229E}-TurboID 融合蛋白。重组腺病毒感染 A549 细胞 48 h 后, 加入生物素 (终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$), 在生物连接酶作用下, 与 NP 邻近的蛋白质被生物素化, 生物素化蛋白通过链霉亲和素沉淀并富集, 最终通过无标记 (label-free) 蛋白质组学质谱分析完成潜在互作蛋白的鉴定 (图 1)。

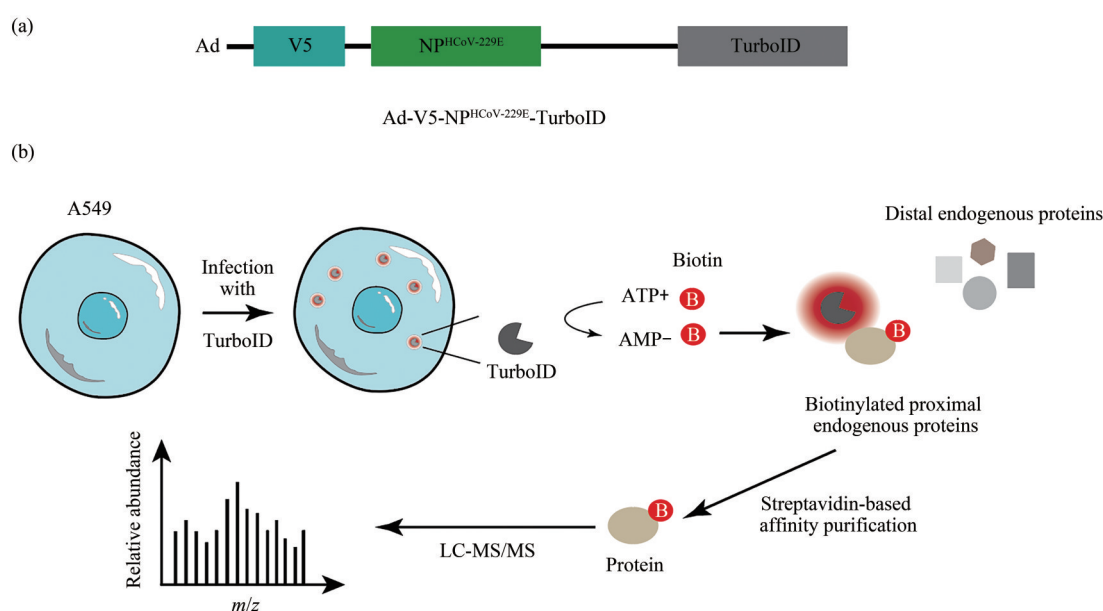


Fig. 1 Proximity labeling methods for protein-protein interaction (PPI) mapping

(a) Schematic of Ad-V5-NP^{HCov-229E}-TurboID structure; (b) example proteomic workflow for mapping PPIs of NP^{HCov-229E} in A549 cell lines (modified according to the reference [14]).

2.2 细胞感染效率优化

首先, 测试不同 MOI 的 Ad-V5-NP^{HCov-229E}-TurboID 对细胞的感染效率, 利用不同 MOI 的 Ad-V5-NP^{HCov-229E}-TurboID 感染 A549 细胞, 通过分析细胞状态以及 NP 表达水平来确定最佳 MOI 值。显微镜观察结果表明, 感染 48 h 后, MOI 值为 10 及 20 的细胞有较为明显的死亡 (结果未展示)。再通过 Western blot 检测 NP 表达量, 最终选定最佳 MOI 值为 5 (图 2)。

2.3 生物素标记效率测定

通过 1.2.3 实验方法, 经过生物素处理的 Ad-V5-NP^{HCov-229E}-TurboID 细胞裂解液用 Anti-Streptavidin-HRP 的抗体检测到了大量的蛋白质, 表明邻位标记实验成功 (图 3)。

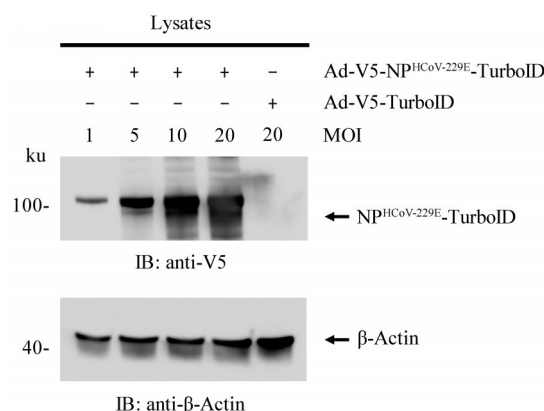


Fig. 2 Infection efficiency of Ad-V5-NP^{HCov-229E}-TurboID in A549 cells

A549 cells was infected by Ad-V5-NP^{HCov-229E}-TurboID with the indicated MOI, and immunoblotting was then performed with the indicated antibodies.

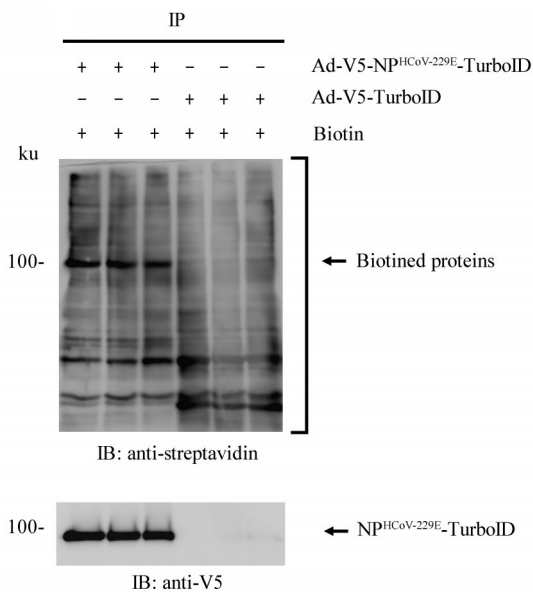


Fig. 3 Analysis of biotinylated proteins
A549 cells were infected by Ad-V5-NP^{HCoV-229E}-TurboID (MOI=5), and immunoblotting was then performed with the indicated antibodies.

2.4 通过质谱鉴定生物素化蛋白

利用无标记蛋白质组学质谱技术进行鉴定, 该技术的优势在于不需要对样本进行复杂标记处理, 即可实现对多组样本进行蛋白质定量及显著性差异分析。采用皮尔森相关性 (Pearson's correlation coefficient) 统计分析方法评估蛋白质定量重复性。所有样本两两之间计算皮尔森相关系数而绘制的热图。此系数是度量两组数据线性相关程度的值: 皮尔森系数大于0为正相关; 小于0为负相关; 相关性系数越接近1或-1, 表示正相关性或负相关性越强; 越接近0, 表示越不相关 (图4a)。通过质谱数据结果分析, 邻近标记技术共收集到584个相互作用蛋白 (表S1)。采用Blast2Go (<https://www.blast2go.com/>) 软件对所有差异蛋白质进行GO分析^[26-27] (图4b)。首先, 在细胞组分 (cellular component, CC) 分析中, 相互作用蛋白主要在核糖体亚基、细胞质应激颗粒、多核糖体、RNA诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)、病毒复制复合体、P体 (P-body)、运动神经元存活 (survival of motor neuron, SMN) 蛋白质

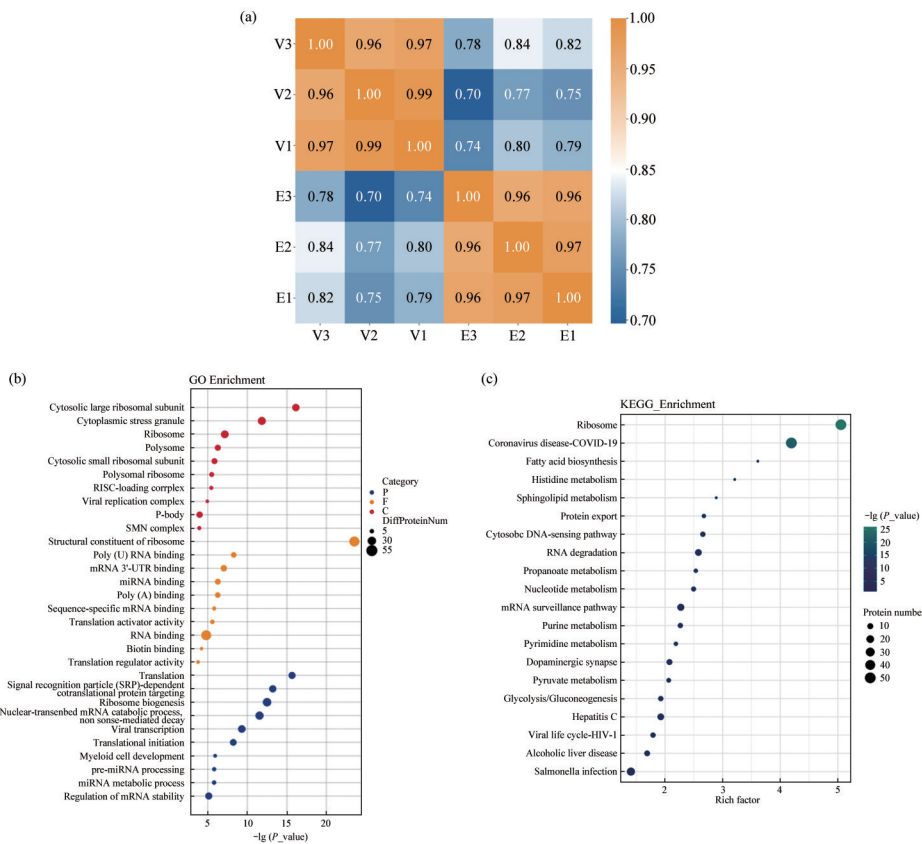


Fig. 4 Gene ontology and KEGG analysis of the potential HCoV-229E-NP interacting proteins
(a) The heat map drawn by Pearson correlation coefficient. (b) Gene ontology (GO) annotation. P: biological process (blue); F: molecular function (yellow); C: cellular component (red). GO annotation was performed using GO term (database version: go_201504.obo). (c) KEGG pathway annotation. Pathway analysis was performed using KEGG database.

复合体等细胞成分中富集, 尤其大量富集在核糖体。而在分子功能 (molecular function, MF) 的分析中, 相互作用蛋白的功能主要富集于核糖体结构成分、poly (U) RNA 结合因子、mRNA 3'-UTR 结合因子、miRNA 结合因子、poly(A) 结合因子、序列特异性 mRNA 结合因子、翻译激活剂活性因子、RNA 结合因子、生物素结合因子和翻译调节因子, 提示 NP 的结合蛋白主要是 RNA 结合蛋白。此外, 在生物过程分析 (biological process, BP) 中发现了几个显著的富集区, 包括翻译、依赖信号识别颗粒 (signal recognition particle, SRP) 的共翻译转运、核糖体生物发生、核转录 mRNA 分解代谢过程、病毒转录、翻译起始、骨髓细胞发育、前 miRNA 加工、miRNA 代谢过程以及 mRNA 稳定性调控等。其次, 经 KEGG 分析发现, 相互作用蛋白富集于核糖体、冠状病毒感染、RNA 降解途径、mRNA 监测途径、细胞质 DNA 感应途径、丙型肝炎、多巴胺能突触通路、核苷酸代谢途径、嘌呤代

谢途径、蛋白质输出途径、丙酸代谢途径、脂肪酸生物合成途径、糖酵解/糖异生途径、人类免疫缺陷病毒 1 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1) 病毒生命周期等。这些都可能与病毒侵染、复制以及致病相关 (图 4c)。

2.5 相互作用蛋白验证

由于糖酵解/糖异生途径中富集的 GSK3A 和 GSK3B 蛋白在不同冠状病毒致病过程中具有重要的作用, 因此本文选择这两个蛋白质来进行相关实验验证。通过研究 GSK3A 和 GSK3B 蛋白与 NP 相互作用来验证邻位标记筛选的可靠性。WB 结果显示, GSK3A 与 GSK3B 可以特异性沉淀 NP^{HCov-229E} (图 5a, b), 而阴性对照 (HA-Vector) 不与 NP^{HCov-229E} 相互作用。免疫荧光结果显示, NP^{HCov-229E} 与 GSK3A、GSK3B 在胞质中存在明显的共定位 (图 5c, d)。上述结果说明, 利用邻位标记技术可有效筛选出与病毒致病、增殖相关蛋白。

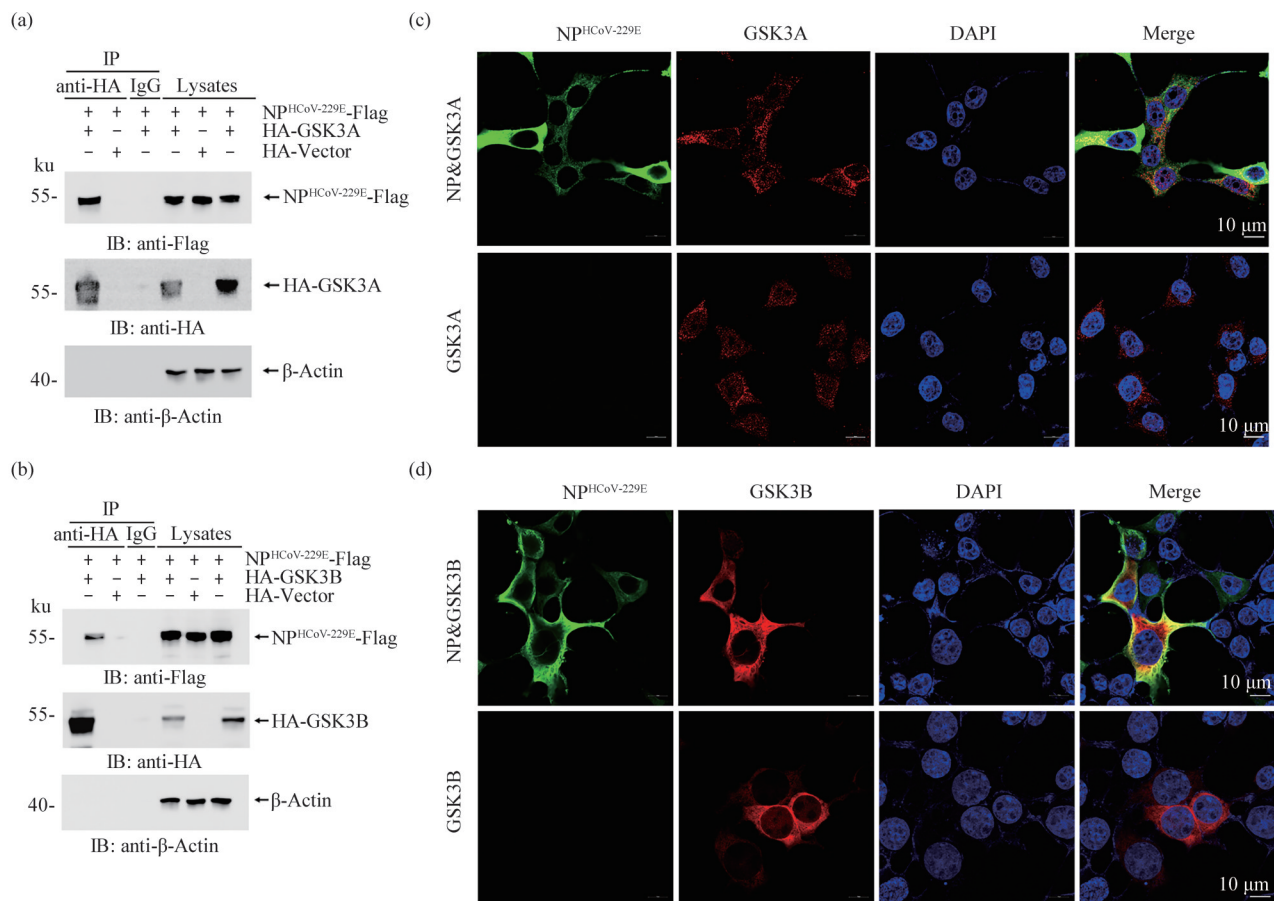


Fig. 5 GSK3A and GSK3B interact with NP of HCoV-229E

(a, b) Lysates of HEK293T cells expressing the indicated plasmids were subjected to immunoprecipitation and immunoblot with the indicated antibodies. (c, d) HEK293T cells were transfected with the indicated plasmids for 48 h. NP (green), GSK3A (red) and GSK3B (red) were labeled by immunofluorescence staining, and the nuclei were stained with DAPI (blue).

3 讨 论

COVID-19大流行产生巨大的社会影响, 引发了对冠状病毒研究的极大重视。冠状病毒HCoV-229E在世界范围内流行, 15%~30%的成人普通感冒病例由该病毒引起, 在婴儿、老年人或免疫功能低下的患者中可产生危及生命的下呼吸道感染^[28]。冠状病毒NP也与病毒的致病力相关, 在小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)中, NP可以抑制转录激活因子蛋白1(activator protein-1, AP1)、蛋白激酶R(PKR)以及核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)^[29], SARS-CoV-2的NP可以促进NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体激活以诱导过度炎症, 加重肺损伤, 加速脓毒症和急性炎症模型小鼠的死亡并促进小鼠白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白介素-6(interleukin-6, IL-6)的激活^[30], 同时, NP也是一种干扰素拮抗剂, 可以抑制干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)的激活, 阻断核糖核酸酶L(ribonuclease L, RNase L)的活性^[31], NP促进RNA包装并参与许多其他过程, 包括病毒基因组复制和逃避免疫反应, NP在冠状病毒的基因组复制、转录和病毒粒子组装中发挥重要作用^[32], 因此本研究利用邻位标记-质谱联用技术发掘与HCoV-229E NP的互作因子为抗冠状病毒药物提供一些新思路。

GSK3是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的一种, 是高度保守的蛋白激酶家族, 最初被视为胰岛素依赖性糖原合成的关键蛋白激酶, 随后越来越多的研究提示: GSK3参与调节多种细胞功能活动, 能够使多种底物发生磷酸化。GSK3的异常活性与糖尿病、炎症、神经退行性疾病和精神疾病有关。而SARS-CoV-2可通过更活跃的ACE2受体加剧糖尿病患者血糖升高和代谢异常, 并且病毒引起的潜在胰脏 β 细胞损伤导致胰岛素缺乏, COVID-19不仅加重了糖尿病患者的病情, 还有可能诱发正常人新发糖尿病, GSK3具有两种结构相同的同工型(α 和 β), 它们的催化结构域相似度高达97%^[33-34]。GSK3(A和B)可磷酸化SARS-CoV-2 NP, 抑制其活性可抑制人肺上皮组织中SARS-CoV-2复制, 此外, GSK3A和GSK3B的敲除证实了它对NP磷酸化至关重要^[35]。GSK3抑制剂可以同时抑制SARS-CoV复制, 并增强CD8⁺适应性T细胞和先天性自然杀

伤(natural killer, NK)细胞效应^[35]。此外, GSK3使MHV毒株MHV4(JHM)和SARS-CoV NP精氨酸-丝氨酸富集区(RS区)内磷酸化^[36-38]。传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)NP直接与GSK3相互作用, 其敲低GSK3后抑制IBV在Vero细胞系中的复制^[39]。本实验研究结果提示, HCoV-229E可能通过其NP与GSK3相互作用, 从而影响宿主糖代谢, 参与病毒增殖致病过程。

本研究利用邻近标记-质谱联用技术筛选, 通过GO分析与KEGG分析发现, HCoV-229E NP主要与宿主细胞内的核糖体蛋白等RNA结合蛋白相互作用, 提示其调控病毒复制的分子机制。NP与糖酵解/糖异生相关蛋白结合, 提示该途径相关蛋白很有可能参与冠状病毒生命周期甚至能够调控病毒的致病性。尽管本研究挖掘了大量潜在HCoV-229E NP的互作蛋白, 但这种相互作用需要进一步通过其他蛋白质-蛋白质相互作用研究方法进一步证实。该研究可为冠状病毒复制和致病分子机制研究提供基础数据。

4 结 论

本研究成功构建了NP-TurboID邻位标记系统, 进一步研究HCoV-229E NP与宿主因子之间的联系, 利用邻位标记-质谱联用技术实现病毒-宿主相互作用的挖掘, 为研究冠状病毒的致病机制奠定了基础, 并为抗病毒靶点发掘提供了重要方法。

附件 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>, <http://www.cnki.net>):

PIBB_20240100_Table_S1.xlsx

参 考 文 献

- [1] Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, *et al.* The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem*, 2020, **295**(37): 12910-12934
- [2] Paules C I, Marston H D, Fauci A S. Coronavirus infections-more than just the common cold. *JAMA*, 2020, **323**(8): 707-708
- [3] Yao H, Song Y, Chen Y, *et al.* Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*, 2020, **183**(3): 730-738.e13
- [4] Klein S, Cortese M, Winter S L, *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication characterized by *in situ* cryo-electron tomography. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 5885
- [5] McBride R, van Zyl M, Fielding B C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, 2014, **6**(8): 2991-3018
- [6] Chang C K, Hou M H, Chang C F, *et al.* The SARS coronavirus

- nucleocapsid protein—forms and functions. *Antiviral Res*, 2014, **103**: 39-50
- [7] Peng T Y, Lee K R, Tarn W Y. Phosphorylation of the arginine/serine dipeptide-rich motif of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein modulates its multimerization, translation inhibitory activity and cellular localization. *FEBS J*, 2008, **275**(16): 4152-4163
- [8] Huang Q, Yu L, Petros A M, *et al.* Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry*, 2004, **43**(20): 6059-6063
- [9] Liu H, Bai Y, Zhang X, *et al.* SARS-CoV-2 N protein antagonizes stress granule assembly and IFN production by interacting with G3BPs to facilitate viral replication. *J Virol*, 2022, **96**(12): e0041222
- [10] Gao T, Zhu L, Liu H, *et al.* Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, **7**(1): 318
- [11] Zheng Z Q, Wang S Y, Xu Z S, *et al.* SARS-CoV-2 nucleocapsid protein impairs stress granule formation to promote viral replication. *Cell Discov*, 2021, **7**(1): 38
- [12] Chang C Y, Liu H M, Chang M F, *et al.* Middle east respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein suppresses type I and type III interferon induction by targeting RIG-I signaling. *J Virol*, 2020, **94**(13): e00099-20
- [13] Hu Y, Li W, Gao T, *et al.* The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid inhibits type I interferon production by interfering with TRIM25-mediated RIG-I ubiquitination. *J Virol*, 2017, **91**(8): e02143-16
- [14] Davis B M, Foxman B, Monto A S, *et al.* Human coronaviruses and other respiratory infections in young adults on a university campus: prevalence, symptoms, and shedding. *Influenza Other Respir Viruses*, 2018, **12**(5): 582-590
- [15] Han Y, Branon T C, Martell J D, *et al.* Directed evolution of split APEX2 peroxidase. *ACS Chem Biol*, 2019, **14**(4): 619-635
- [16] Roux K J, Kim D I, Raida M, *et al.* A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*, 2012, **196**(6): 801-810
- [17] Qin W, Cho K F, Cavanagh P E, *et al.* Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nat Meth*, 2021, **18**: 133-143
- [18] May D G, Scott K L, Campos A R, *et al.* Comparative application of BioID and TurboID for protein-proximity biotinylation. *Cells*, 2020, **9**(5): 1070
- [19] Kumar A, Salemi M, Bhullar R, *et al.* Proximity biotin labeling reveals Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interferon regulatory factor networks. *J Virol*, 2021, **95**(9): e02049-20
- [20] Sun X, Sun H, Han X, *et al.* Deep single-cell-type proteome profiling of mouse brain by nonsurgical AAV-mediated proximity labeling. *Anal Chem*, 2022, **94**(13): 5325-5334
- [21] Chen J, Fan J, Chen Z, *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA facilitates SARS-CoV-2 infection in human pulmonary cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(50): e2111011118
- [22] Eldar-Finkelman H, Eisenstein M. Peptide inhibitors targeting protein kinases. *Curr Pharm Des*, 2009, **15**(21): 2463-2470
- [23] Doble B W, Woodgett J R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, 2003, **116**(pt 7): 1175-1186
- [24] Hur E M, Zhou F Q. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*, 2010, **11**: 539-551
- [25] Branon T C, Bosch J A, Sanchez A D, *et al.* Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**: 880-887
- [26] Götz S, García-Gómez J M, Terol J, *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(10): 3420-3435
- [27] Wang P, Sun X, Xie Y, *et al.* Melatonin regulates proteomic changes during leaf senescence in *Malus hupehensis*. *J Pineal Res*, 2014, **57**(3): 291-307
- [28] Liu D, Chen C, Chen D, *et al.* Mouse models susceptible to HCoV-229E and HCoV-NL63 and cross protection from challenge with SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, **120**(4): e2202820120
- [29] White T C, Yi Z, Hogue B G. Identification of mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein phosphorylation sites. *Virus Res*, 2007, **126**(1/2): 139-148
- [30] Pan P, Shen M, Yu Z, *et al.* SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 4664
- [31] Chen K, Xiao F, Hu D, *et al.* SARS-CoV-2 nucleocapsid protein interacts with RIG-I and represses RIG-mediated IFN- β production. *Viruses*, 2020, **13**(1): 47
- [32] Hurst K R, Koetzner C A, Masters P S. Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex. *J Virol*, 2013, **87**(16): 9159-9172
- [33] Kaidanovich-Beilin O, Woodgett J R. GSK-3: functional insights from cell biology and animal models. *Front Mol Neurosci*, 2011, **4**: 40
- [34] Rao R, Patel S, Hao C, *et al.* GSK3 β mediates renal response to vasopressin by modulating adenylate cyclase activity. *J Am Soc Nephrol*, 2010, **21**(3): 428-437
- [35] Rudd C E. GSK-3 inhibition as a therapeutic approach against SARs CoV2: dual benefit of inhibiting viral replication while potentiating the immune response. *Front Immunol*, 2020, **11**: 1638
- [36] Surjit M, Lal S K. The SARS-CoV nucleocapsid protein: a protein with multifarious activities. *Infect Genet Evol*, 2008, **8**(4): 397-405
- [37] Calvo E, Escors D, López J A, *et al.* Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells. *J Gen Virol*, 2005, **86**(Pt 8): 2255-2267
- [38] Wu C H, Yeh S H, Tsay Y G, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 regulates the phosphorylation of severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein and viral replication. *J Biol Chem*, 2009, **284**(8): 5229-5239
- [39] Emmott E, Munday D, Bickerton E, *et al.* The cellular interactome of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein and functional implications for virus biology. *J Virol*, 2013, **87**(17): 9486-9500

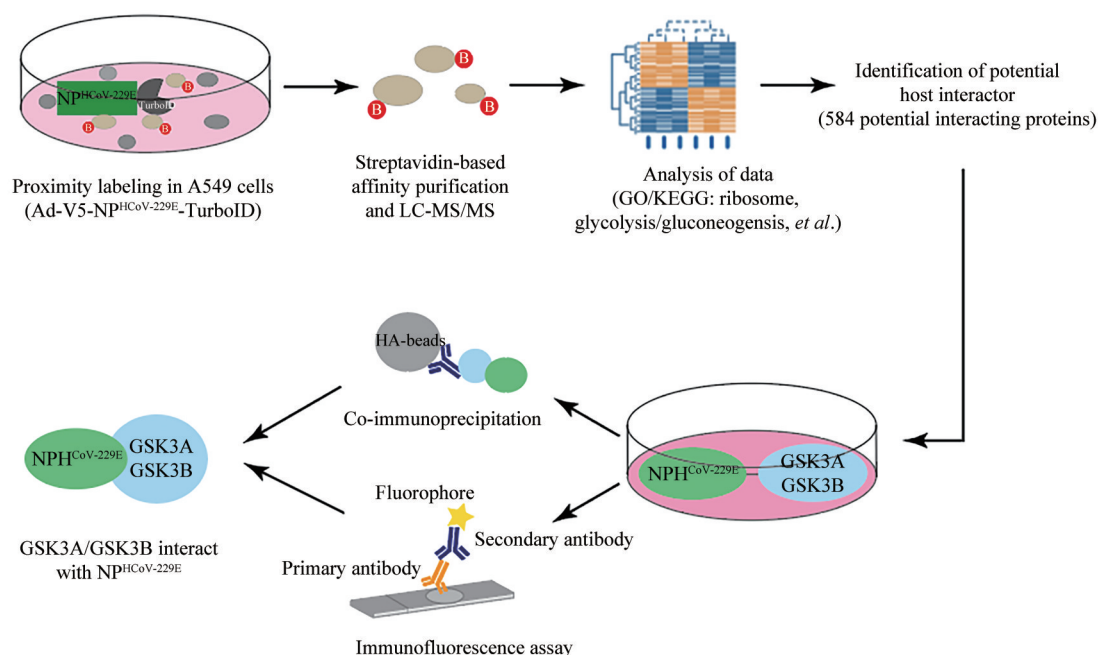
Identification of HCoV-229E Interacting Host Factor by Utilization of Proximity Labeling–Mass Spectrometry Technique*

JU Rui-Xia¹⁾, WANG Hao-Yong¹⁾, LIU Hai-Nan²⁾, Liu Xuan²⁾, CAO Cheng^{2)**}

⁽¹⁾College of Life Sciences and Health Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

⁽²⁾Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Coronavirus is a class of long-standing pathogens, which are enveloped single-stranded positive-sense RNA viruses. The genome all encodes 4 structural proteins: spike protein (S), nucleocapsid protein (N), membrane protein (M), and envelope protein (E). The nucleocapsid protein (NP) serves as a key structural component of coronaviruses, playing a vital function in the viral life cycle. NP acts as an RNA-binding protein, with a critical role in identifying specific sequences within the viral genome RNA, facilitating the formation of ribonucleoprotein (RNP) complexes with viral RNA to stabilize the viral genome and contribute to viral particles assembly. The NP consists of two primary structural domains, the N-terminal domain (NTD) and the C-terminal domain (CTD). The NTD is primarily responsible for RNA binding, whereas the CTD is involved in polymerization. The N protein demonstrated to trigger the host immune response and to modulate the cell cycle of

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (82101865).

** Corresponding author.

Tel: 86-13911462341, E-mail: caoc@nic.bmi.ac.cn

Received: March 14, 2024 Accepted: April 10, 2024

infected cells by interacting with host proteins. The NP, one of the most abundant protein in coronaviruses, is essential in understanding the pathogenic mechanism of coronaviruses through its interaction with host factors, which response for determining the virus pathogenicity. HCoV-229E is a widely distributed coronavirus that typically causes mild upper respiratory tract diseases, accounting for a significant portion of common cold cases. However, its pathogenicity is notably lower compared to other coronaviruses like MERS-CoV, SARS-CoV, and SARS-CoV-2. The exact molecular mechanism behind remains unexplained, and how HCoV-229E N protein influences virus replication, host antiviral immunity, and pathogenesis need to be further explored.

Methods Proximity labeling-mass spectrometry technique and bioinformatics analysis were used to screen for potential host factors interacting with the NP of human coronavirus 229E (HCoV-229E). In this study, a recombinant adenovirus Ad-V5-NP^{HCoV-229E}-TurboID was constructed to express the fusion protein of HCoV-229E NP and biotin ligase (TurboID). A549 cells were infected with the Ad-V5-NP^{HCoV-229E}-TurboID. After 30 min biotin treatment, NP interacting proteins were labeled with biotin by biotin ligase, and subsequently isolated with streptavidin cross-linked magnetic beads. The potential interacting proteins were identified using label-free proteomic mass spectrometry and further validated through immunoprecipitation and immunofluorescence assays.

Results We identified a total of 584 potential interacting proteins. Gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis highlighted the enrichment of glycogen synthase kinase (GSK)3A and GSK3B in the glycolysis/gluconeogenesis pathway, indicating HCoV-229E NP connection to diabetes through aberrant activity. Moreover, SARS-CoV-2 infection can exacerbate hyperglycemia and metabolic dysregulation in diabetic individuals by activating the ACE2 receptor. Moreover, SARS-CoV-2 was observed to cause potentially harm to pancreatic β -cells and leading to insulin deficiency, which not only worsens the condition of diabetic patients but also raises the possibility of new-onset diabetes in non-diabetic individuals. We demonstrated that GSK3A and GSK3B interacted with NP of HCoV-229E, suggesting that the NP may engage in various coronavirus pathogenic processes by interacting with GSK3. **Conclusion** These findings suggest that proximity labeling-mass spectrometry technique is a valuable tool for identifying virus-host interaction factors, and lay the foundation for future investigations into the mechanisms underlying coronavirus replication, proliferation, and pathogenesis.

Key words proximity labeling, HCoV-229E, nucleocapsid protein, TurboID, GSK3

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0100