



SARS-CoV-2 papain-like protease inhibits ISGylation of the viral nucleocapsid protein to evade host anti-viral immunity

RHAMADIANTI, AULIA FITRI

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2024-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8999号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492508>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

SARS-CoV-2 papain-like protease inhibits ISGylation of the viral nucleocapsid protein to evade host anti-viral immunity.

SARS-CoV-2 パパイン様プロテアーゼは宿主の抗ウイルス免疫を回避するためにウイルス核カプシドタンパク質の ISGylation を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

微生物感染症学講座 感染制御学

(指導教員：勝二 郁夫 教授)

AULIA FITRI RHAMADIANTI

SUMMARY

Background:

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was first identified in Wuhan, China, and spread globally. It leads to respiratory symptoms ranging from mild to severe, even acute respiratory distress and death. Vaccines targeting viral spike (S) protein and several antiviral drugs have been developed to treat COVID-19. SARS-CoV-2 genome possesses a positive-sense, single-stranded RNA that encodes 29 kb, consisting of 16 non-structural proteins (nsp1-16), 4 structural proteins (spike, nucleocapsid [also referred to as ORF9], envelope, and membrane proteins), and 7 accessory proteins (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, and ORF10). Despite remarkable efforts to investigate the virological and pathological impacts of SARS-CoV-2, many of the characteristics of SARS-CoV-2 remain unknown.

The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein contains 419 amino acids and consists of five domains: the N-terminal tail region (residues 1 to 50, termed N1a), the N-terminal RNA-binding domain (residues 51 to 174, termed NTD/N1b), the serine/arginine-rich region (residues 175 to 247, termed N2a), the C-terminal dimerization domain (residues 248 to 364, termed CTD/N2b), and the intrinsically disordered regions (residues 365 to 419, termed spacer B/N3 [SB/N3]). The C-terminal SB/N3 domain has been implicated in the involvement of CTD-mediated nucleocapsid oligomerization.

ISG15, which is one of the ubiquitin-like proteins, is covalently conjugated to the target protein via specific lysine (Lys) residues by three intracellular enzymes, i.e., E1 activating enzyme (UBE1L), E2 conjugating enzyme (UbcH8), and E3 ligase (HERC5). This process is called ISGylation and is a posttranslational protein modification similar to ubiquitylation. In the present study, we aimed to elucidate the role of ISGylation in SARS-CoV-2 replication. We demonstrate that the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is a target protein for the HERC5 E3 ligase-mediated ISGylation in cultured cells and that the residue K374 within the SB/N3 domain is required for nucleocapsid-ISGylation. We also demonstrate that nucleocapsid-ISGylation results in the disruption of nucleocapsid oligomerization, thereby inhibiting viral replication. Finally, we demonstrate that SARS-CoV-2 PLpro inhibits ISGylation of the nucleocapsid protein to evade the ISGylation-mediated anti-viral activity.

Methods:

1. To investigate which SARS-CoV-2 protein serves as a target for ISG15 conjugation, we cotransfected HEK293T cells with plasmids carrying ISGylation components, including E1 (UBE1L), E2 (UbcH8), E3 (HERC5/HA-HERC5), and FLAG-ISG15, alongside

SARS-CoV-2 proteins. This was followed by immunoprecipitation assay and immunoblotting analysis.

2. To determine which lysine residues are responsible for nucleocapsid ISGylation, nucleocapsid mutants were generated via PCR mutagenesis, substituting lysine residues with arginine. These mutants were then cotransfected with plasmids carrying ISGylation components.
3. The structure of the nucleocapsid's NTD (PDB: 7VNU) and CTD (PDB: 7C22) domains was prepared using the UCSF Chimera software (ChimeraX version 1.6).
4. To clarify the role of PLpro in de-ISGylation activity, we cotransfected pEF1-Nucleocapsid-Myc-His6 with plasmids carrying ISGylation components, with or without FLAG-PLpro and treated the cells with GRL0617 in a dose-dependent manner.
5. To determine the role of ISG15/ISGylation, we performed gain-of-function and loss-of-function experiments in VeroE6/Rep3 cells. We knocked down monkey ISG15 genes using siRNA#1 and siRNA#2 for the loss-of-function experiments. For the gain-of-function experiments, we cotransfected an empty vector, pCAG-FLAG-ISG15, or FLAG-ISG15 mutant (pCAG-FLAG-ISG15-AA) with pCAG-UBE1L (E1), pCAG-UbcH8 (E2), and pCAG-HA-HERC5 (E3 ligase) in 293T cells, followed by measurement of viral replication via renilla luciferase and sgRNA levels by qPCR.
6. To elucidate the effect of ISGylation on nucleocapsid functions, we performed NATIVE-PAGE to visualize nucleocapsid oligomerization, followed by immunoblotting analysis.
7. To confirm that the RNA-nucleocapsid complex does not affect nucleocapsid oligomerization, we treated the cells with RNase I. The efficacy of RNase I treatment was determined by measuring RNA concentration and performing gel electrophoresis.

Results:

1. The immunoprecipitation assay demonstrated that only the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 co-precipitated with FLAG-ISG15.
2. Immunoprecipitation and immunoblot analyses revealed that HERC5 is a specific E3 ligase for nucleocapsid ISGylation, whereas TRIM25 and HHARI failed to induce nucleocapsid ISGylation.
3. The nucleocapsid protein can conjugate with ISG15 at multiple lysine residues, with K374 within the SB/N3 domain serving as a major acceptor site for nucleocapsid ISGylation.
4. SARS-CoV-2 PLpro sequesters ISG15 from the nucleocapsid protein, whereas the catalytically inactive PLpro(C111S) mutant cannot cleave ISG15 from the nucleocapsid. Additionally, treatment with the PLpro inhibitor GRL0617 restores nucleocapsid ISGylation.

5. Knockdown of monkey ISG15 genes in VeroE6/Rep3 cells significantly enhanced viral replication and the sgRNA levels of SARS-CoV-2, whereas overexpression of ISGylation components significantly reduced SARS-CoV-2 transcription and replication. These findings suggest that ISGylation functions as an antiviral factor against SARS-CoV-2 replication.
6. ISGylation of the nucleocapsid protein disrupts its oligomerization. Moreover, RNase treatment did not affect ISGylation-mediated disruption of nucleocapsid oligomerization, indicating that ISGylation interferes with nucleocapsid function without affecting the RNA-nucleocapsid complex.

Discussion:

The IFN-inducible ISGylation has essential roles in anti-viral activity against many RNA and DNA viruses. This study demonstrated that the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is a target for ISGylation, with HERC5 identified as a specific E3 ligase for this process. Mechanistic analysis revealed that nucleocapsid-ISGylation disrupts nucleocapsid oligomerization, thereby inhibiting viral replication. Additionally, SARS-CoV-2 PLpro was shown to cleave ISG15 from the ISGylated nucleocapsid protein, helping the virus evade ISGylation-mediated anti-viral activity.

The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein contains distinct domains responsible for RNA binding and dimerization. The C-terminal SB/N3 region facilitates nucleocapsid oligomerization, essential for viral replication. This study found that residue K374 in the SB/N3 domain is a major acceptor site for ISGylation. The findings suggest a mechanism where ISGylation disrupts nucleocapsid oligomerization, suppressing viral replication. Developing small molecules that inhibit nucleocapsid oligomerization by targeting the CTD-SB/N3 domain could be a promising therapeutic approach.

The study also revealed that nucleocapsid-ISGylation results in slowly migrating forms of the protein in cells expressing ISGylation machinery. Immunoblot analyses indicated that ISG15 is conjugated to the nucleocapsid protein, forming mono- and di-ISG15 conjugates. SARS-CoV-2 PLpro preferentially cleaves ISG15 from the nucleocapsid protein, facilitating immune evasion. Inhibitors of PLpro, such as GRL-0617, could suppress this de-ISGylation activity, suggesting a potential therapeutic strategy to enhance ISGylation-mediated antiviral activity. Development of more potent and selective PLpro inhibitors against SARS-CoV-2 merits further investigation.

In summary, the present study demonstrated that the C-terminal SB/N3 domain on the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is a target for ISGylation-mediated anti-viral activity. Furthermore, SARS-CoV-2 PLpro preferentially cleaves the ISG15-conjugation on the

ISGylated nucleocapsid protein to escape from ISGylation-mediated anti-viral activity. Targeting the machinery of ISGylation to the SB/N3 domain of the nucleocapsid protein may lead to the development of more potent and selective inhibitors against SARS-CoV-2 infection.

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3409 号	氏 名	AULIA FITRI RHAMADIANTI
論 文 題 目 Title of Dissertation	SARS-CoV-2 パパイン様プロテアーゼは宿主の抗ウイルス免疫を回避するためにウイルス核カプシドタンパク質の ISGylation を抑制する SARS-CoV-2 papain-like protease inhibits ISGylation of the viral nucleocapsid protein to evade host anti-viral immunity		
審 査 委 員 Examiner	主 査 青井 貴之 Chief Examiner 副 査 児玉 裕三 Vice-examiner 副 査 森 康子 Vice-examiner		

（要旨は1，000字～2，000字程度）

【背景】

SARS-CoV-2 ゲノムは 29kb のポジティブセンス一本鎖 RNA を持ち、16 の非構造タンパク質 (nsp1-16)、4 つの構造タンパク質 (スパイク、ヌクレオカプシド [ORF9 とも呼ばれる]、エンベロープ、膜タンパク質)、および 7 つのアクセサリタンパク質 (ORF3a、ORF3b、ORF6、ORF7a、ORF7b、ORF8、ORF10) から構成されている。SARS-CoV-2 のウイルス学および病理学的影響を解明するために多くの取り組みがなされているが、SARS-CoV-2 に関する多くのことは不明のままである。

SARS-CoV-2 ヌクレオカプシドタンパク質は 419 アミノ酸からなり、5 つのドメインから構成されている: N 末端テール領域 (残基 1 から 50、N1a と呼ばれる)、N 末端 RNA 結合ドメイン (残基 51 から 174、NTD/N1b と呼ばれる)、セリン/アルギニンリッチ領域 (残基 175 から 247、N2a と呼ばれる)、C 末端二量体化ドメイン (残基 248 から 364、CTD/N2b と呼ばれる)、および本質的に無秩序な領域 (残基 365 から 419、スパーサー B/N3[SB/N3]と呼ばれる)。C 末端の SB/N3 ドメインは、CTD を介したヌクレオカプシドのオリゴマー化に関与していることが示唆されている。

ユビキチン様タンパク質の一つである ISG15 は、E1 活性化酵素(UBE1L)、E2 結合酵素(UbcH8)、E3 リガーゼ(HERC5)の 3 つの細胞内酵素によって、特定のリジン(Lys)残基を介して標的タンパク質に共有結合する。この過程は ISGylation (以下、ISG 化) と呼ばれ、ユビキチン化と同様の翻訳後タンパク質修飾である。そこで申請者らは本研究において、SARS-CoV-2 の複製における ISG 化の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】:

1. どの SARS-CoV-2 タンパク質が ISG15 と結合するかを調べるため、ISG 化コンポーネント (E1 (UBE1L)、E2 (UbcH8)、E3 (HERC5/HA-HERC5)) を ISG15 と共に HEK293T 細胞に導入した。この細胞の抽出物を用いて免疫沈降アッセイとイムノ・ブロッティングを行った。その結果、ヌクレオカプシドタンパク質のみが FLAG-ISG15 と結合することが示された。
2. ヌクレオカプシドタンパク質のどのリジン残基が ISG 化に重要かを明らかにするために、様々なリジン残基をアルギニンに置換したヌクレオカプシド変異体を作製して ISG 化コンポーネントと共に培養細胞に導入し、免疫沈降によりそれぞれのヌクレオカプシド変異体と ISG15 との結合を評価した。その結果、SB/N3 ドメイン内の K374 がヌクレオカプシド ISG 化の主要なアクセプター部位であることが明らかとなった。

3. 脱 ISG 化活性におけるパパイン様プロテアーゼ (PLpro) の役割を明らかにするために、ヌクレオカプシドと ISG 化コンポーネントのみ、あるいは PLpro (野生型もしくは変異型) とともに培養細胞に導入し、さらに PLpro 阻害剤である GRL0617 で処理しヌクレオカプシドの ISG 化状態を評価した。この結果、SARS-CoV-2 の PLpro はヌクレオカプシドタンパク質と ISG15 を切断するが、触媒的に不活性な PLpro(C111S) 変異体はヌクレオカプシドから ISG15 を切断できなかった。さらに、PLpro 阻害剤 GRL0617 で処理すると、ヌクレオカプシドの ISG 化が回復した。
4. ISG15/ISG 化の意義を明らかにするために、VeroE6/Rep3 細胞で ISG15 の機能獲得実験と機能喪失実験を行った。機能喪失実験では、siRNA を用いて ISG15 遺伝子をノックダウンした。機能獲得実験では、293T 細胞に野生型または変異型 ISG15 と他の ISG 化コンポーネントを共導入し、ルシフェラーゼアッセイによるウイルス複製と qPCR による sgRNA レベルの評価を行った。サル ISG15 遺伝子のノックダウンは、SARS-CoV-2 のウイルス複製と sgRNA レベルを有意に増加させた。一方、ISG 化コンポーネントの過剰発現は、SARS-CoV-2 の転写と複製を有意に減少させた。これらから、ISG 化が SARS-CoV-2 の複製を標的とする抗ウイルス因子として機能していることが示唆された。
5. ヌクレオカプシドの機能に対する ISG 化の影響を解明するために、native PAGE によりヌクレオカプシドのオリゴマー化の可視化を行った。ヌクレオカプシドタンパク質の ISG 化は、そのオリゴマー化を抑制した。さらに、RNase 処理は ISG 化によるヌクレオカプシドのオリゴマー化抑制には影響しなかった。

本研究は、SARS-CoV-2 感染について、宿主タンパク質である ISG15 と ISG 化の意義およびウイルス因子とそれらの相互作用を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった SARS-CoV-2 のヌクレオカプシドタンパク質の ISG 化の意義と、パパイン様プロテアーゼによるこの機構の阻害について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める