

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19230

研究課題名（和文）抗体融合近位依存性ビオチン化酵素によるウイルス侵入解析技術の開発

研究課題名（英文）Development of antibody-fusion proximity biotinylation enzyme for analysis of virus entry

研究代表者

澤崎 達也（Sawasaki, Tatsuya）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：50314969

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題はレンチウイルスをモデルに、1)ウイルス認識抗体FabにAirIDが融合した抗ウイルス-AirIDの構築、2)抗体-AirIDを付与されたウイルスの作製、3)ウイルス表面タンパク質のビオチン化の検証、4)細胞への感染能の確認、5)抗体-AirID付与ウイルス感染細胞におけるビオチン化宿主タンパク質の同定、からなる5項目により技術開発を行うことにより、近位依存性ビオチン標識法をウイルス感染エントリ経路の解明に向けて応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスの構造タンパク質を特異的に認識する抗体に近位依存性ビオチン化酵素を融合することにより、ウイルス粒子を近位依存性ビオチン化酵素でラベルし、ウイルスが細胞へ侵入するために関与する宿主タンパク質をビオチン化という形で検出・同定する技術の開発は、世界初の試みであるため挑戦的で社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Using lentivirus as a model, we applied the proximal-dependent biotinylation method to elucidate the virus infection entry pathway, consisting of 1) construction of an anti-virus-AirID fused with a virus recognition antibody Fab, 2) generation of antibody-AirID-loaded virus, 3) verification of biotinylation of virus surface proteins, 4) confirmation of infection ability in cells, and 5) identification of antibody-AirID-loaded We developed technologies for the following five research projects: 1) creation of biotinylated viruses, 2) creation of biotinylated viruses, 3) validation of biotinylation of viral surface proteins, 4) confirmation of virus infectivity, and 5) identification of biotinylated host proteins in cells infected with virus. With this method, the proximal-dependent biotinylation labeling method was applied to elucidate the viral infection entry pathway.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：近位依存性ビオチン標識法 ウイルス 感染症 AirID ビオチン 新型コロナウイルス レンチウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症は、人類の脅威であり、新型コロナウイルスの例を挙げるまでもなく、人類の歴史の中で幾度となくパンデミックを引き起こしている。そのため、ウイルス感染症における基礎研究は非常に重要であるといえる。中でもウイルス感染の最初のステップであるウイルスの細胞への侵入機構の解明は、ウイルスの感染機構を理解するために必須である。ウイルスが細胞に侵入するためには、細胞表面にある宿主側の受容体タンパク質を認識すると考えられている。しかし、ウイルス受容体の同定は難しく、ノロウイルスの様な身近なウイルスでさえ受容体タンパク質の同定に成功していない。そのため、ウイルスの受容体の同定に向けた技術開発は喫緊の課題である。

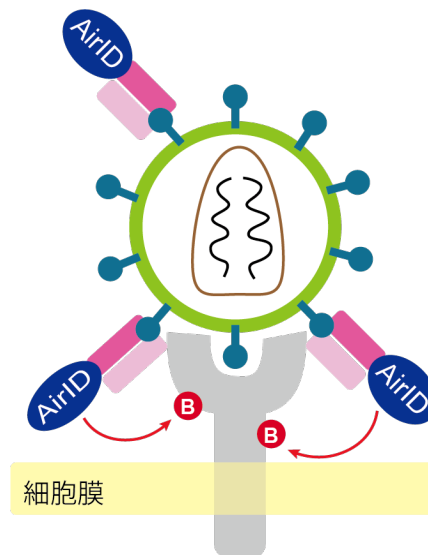


図1. 抗ウイルス-AirID を用いたウイルス受容体や侵入関連宿主タンパク質のビオチン化技術

2. 研究の目的

我々は、2020年に相互作用するタンパク質を効率良くビオチン化できる酵素 AirID の開発に成功した (Kido, et al, eLife, 2020)。本申請では、レンチウイルスをモデルに、ウイルスの表面タンパク質を認識する抗体に AirID を融合した抗体-AirID を構築し、ウイルスを AirID でラベル化する技術の開発を行う。AirID 結合ウイルスを細胞に感染させることにより、ウイルスの侵入によりビオチン化される宿主タンパク質を検出・同定し、ウイルス受容体が同定できる技術の開発を目的とする (技術的概念 図1)。

3. 研究の方法

本申請課題はレンチウイルスをモデルに、下記に示す5項目により技術開発を行う。

- 1) ウイルス認識抗体FabにAirIDが融合した抗ウイルス-AirIDの構築
- 2) 抗体-AirIDを付与されたウイルスの作製
- 3) ウイルス表面タンパク質のビオチン化の検証
- 4) 細胞への感染能の確認
- 5) 抗体-AirID付与ウイルス感染細胞におけるビオチン化宿主タンパク質の同定

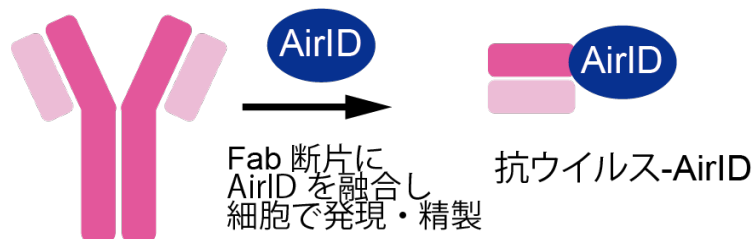


図2. 抗ウイルス抗体のFab領域にAirIDを融合した分子の構築

レンチウイルスを用いた具体例として詳細には、1) レンチウイルスのエンベロープ膜タンパク質である VSV-G を認識するモノクローナル抗体の Fab 遺伝子に AirID を融合した抗 VSV-G-

AirID を構築する (図 2)。2) HEK293T 細胞を用いてルシフェラーゼ遺伝子を含むレンチウイルスを作製し、密度勾配遠心法で単離・濃縮後、抗 VSV-G-AirID とレンチウイルスを混合する。その結果、抗 VSV-G-AirID 付加レンチウイルスが作製できる (図 3)。3) レンチウイルス上の AirID が機能しているかどうか評価するために、抗 VSV-G-AirID 付加レンチウイルスと 1 mM ATP と 500 nM ビオチンを含む溶液を組成後 37°C で 1 時間反応させた後、ストレプトアビジンビーズによりビオチン化タンパク質を回収し、イムノブロットングにより VSV-G がビオチン化を評価する。4) 抗 VSV-G-AirID 付加レンチウイルスが細胞への感染能を有しているかどうか調べるために、感染細胞のルシフェラーゼアッセイを行い、感染能や感染率を評価する。5) 抗 VSV-G-AirID 付加レンチウイルスを HEK293T に感染させ、1 mM ATP と 50 μM ビオチンを培地に添加後、先ずは 6 時間後に細胞を回収し、塩酸グアニジンで抽出後、トリプシン処理し、ビオチン化ペプチドを回収し、質量分析によりビオチン化ペプチドを解析する。細胞抽出液からビオチン化ペプチドの単離・解析は共同研究先の徳島大学先端酵素学研究所の小迫教授が開発した手法 (Motani K, & Kosako H, JBC 2020) により解析を依頼する。ウイルスと細胞の反応時間に関しては複数ポイント処理を行う。

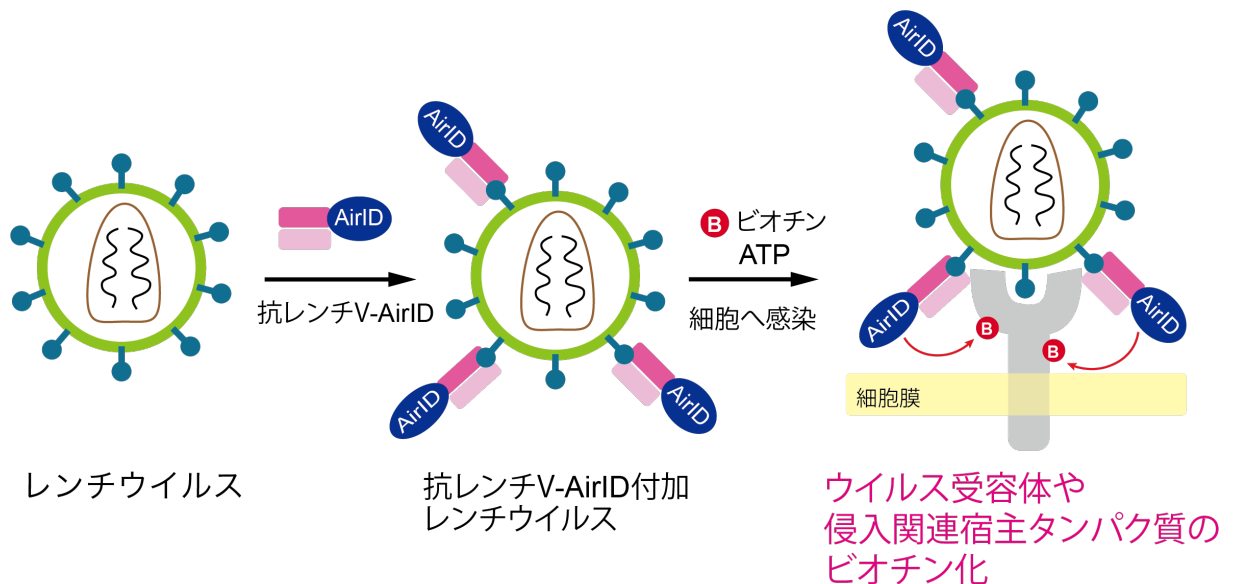


図 3. 本申請課題での実験の流れ

4. 研究成果

上記研究項目 1) を進めた結果、レンチウイルスを用いて、レンチウイルスのエンベロープ膜タンパク質である VSV-G を認識するモノクローナル抗体の Fab 遺伝子に AirID を融合した抗 VSV-G-AirID を構築した。またパンデミックに対応するため新型コロナウイルスの VSV-G を SARS-CoV-2 の S タンパク質に置換した SARS-CoV2-S-レンチウイルスの作製を行い、S タンパク質を認識するモノクローナル抗体の Fab 遺伝子に AirID を融合した抗 SARS-CoV2-S-AirID を構築した。研究項目 2) において、HEK293T 細胞を用いてルシフェラーゼ遺伝子を含む VSV-G 型および SARS-CoV2-S 型レンチウイルスを作製し、密度勾配遠心法で単離・濃縮後、抗 VSV-G-AirID もしくは抗 SARS-CoV2-S-AirID とレンチウイルスを混合した結果、抗 VSV-G-AirID 付加レンチウイルスおよび抗 SARS-CoV2-S-AirID 付加レンチウイルスの作製に成功した。さらに、研究項目 3) のレンチウイルスのエンベロープ膜タンパク質である VSV-G を認識する抗体に AirID を融合した抗 VSV-G-AirID は構築に成功 (図 2 参照) し、抗 VSV-

G-AirID が付加されたレンチウイルスが細胞への感染能を有していること (図 4)、ウイルス上の VSV-G をビオチン化している (図 5) ことから、期待通り、抗 VSV-G-AirID が付加されたレンチウイルスが相互作用するタンパク質をビオチン化できる能力があることが分かった。

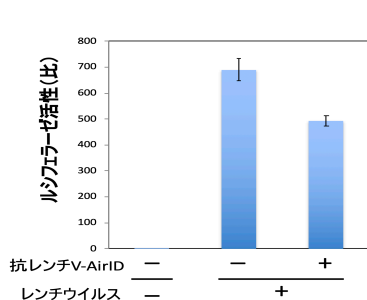


図 4. 抗 VSV-G-AirID 付加ウイルスの感染能

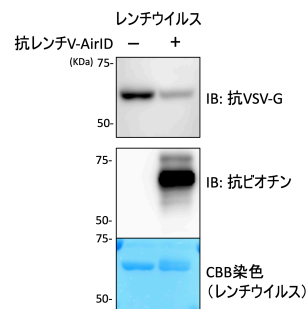


図 5. 抗 VSV-G-AirID 付加ウイルスの近接ビオチン化能を有する

次に、研究項目 4) を進めた結果、レンチウイルスを用いて昨年度作製したレンチウイルスのエンベロープ膜タンパク質である VSV-G を SARS-CoV-2 の S タンパク質に置換した SARS-CoV2-S-レンチウイルスと、S タンパク質を認識するモノクローナル抗体の Fab 遺伝子に AirID を融合した抗 SARS-CoV2-S-AirID を研究に用いた。HEK293T 細胞を用いて作製したルシフェラーゼ遺伝子を含有する ARS-CoV2-S 型レンチウイルスを密度勾配遠心法で単離・濃縮後、細胞への感染を試みた。その結果、ARS-CoV2-S 型レンチウイルスが ACE2 依存的な感染能を有し、その感染能は TMPRSS2 の発現により顕著に上昇した。これらの結果から、ARS-CoV2-S 型レンチウイルスが SARS-CoV-2 と同様なエントリー経路で感染できることを示唆している。さらに、ARS-CoV2-S 型レンチウイルス感染後に抗 SARS-CoV2-S-AirID を混合して、細胞抽出液からビオチン標識タンパク質をストレプトアビジンにより回収し、イムノブロットングでの検出を試みたが、感染細胞において、ACE2 や TMPRSS2 のタンパク質、さらにレンチウイルス上での S タンパク質へのビオチン標識は検出できなかった。低温や MOI などの感染条件を検討してみたが、改善はみられなかった。おそらく、感染に必要なウイルス数がイムノブロットングでの検出限界以下であることが主原因だと思われる。今後は、検出感度を上げるために、15 cm ディッシュ 20 枚程度の大規模感染と ACE2 等の免疫沈殿を行い、さらに改善を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamanaka Satoshi, Horiuchi Yuto, Matsuoka Saya, Kido Kohki, Nishino Kohei, Maeno Mayaka, Shibata Norio, Kosako Hidetaka, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 A proximity biotinylation-based approach to identify protein-E3 ligase interactions induced by PROTACs and molecular glues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27818-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shioya Ryouhei, Yamada Kohdai, Kido Kohki, Takahashi Hirotaka, Nozawa Akira, Kosako Hidetaka, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 592
2. 論文標題 A simple method for labeling proteins and antibodies with biotin using the proximity biotinylation enzyme TurboID	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 54 ~ 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.12.109	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Kohei, Suzuki Hitomi, Uemura Takuya, Nozawa Akira, Desaki Yoshitake, Hoshino Ryosuke, Yoshida Ayako, Abe Hiroshi, Nishiyama Makoto, Nishiyama Chiharu, Sawasaki Tatsuya, Arimura Gen ichiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Immune gene activation by <i>NPR</i> and <i>TGA</i> transcriptional regulators in the model monocot <i>Brachypodium distachyon</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 470 ~ 481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15681	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morita Masayuki, Kanoi Bernard N., Shinzawa Naoaki, Kubota Rie, Takeda Hiroyuki, Sawasaki Tatsuya, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 11
2. 論文標題 AGIA Tag System for Ultrastructural Protein Localization Analysis in Blood-Stage Plasmodium falciparum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 777291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2021.777291	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaoka Yousuke, Suzuki Kaho, Nozawa Akira, Takahashi Hirotaka, Sawasaki Tatsuya, Ueda Minoru	4. 巻 298
2. 論文標題 Protein-protein interactions between jasmonate-related master regulator MYC and transcriptional mediator MED25 depend on a short binding domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101504 ~ 101504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101504	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jeremiah Sundararaj Stanleyraj, Miyakawa Kei, Matsunaga Satoko, Nishi Mayuko, Kudoh Ayumi, Takaoka Akinori, Sawasaki Tatsuya, Ryo Akihide	4. 巻 12
2. 論文標題 Cleavage of TANK-Binding Kinase 1 by HIV-1 Protease Triggers Viral Innate Immune Evasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 643407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.643407	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakakibara Iori, Yanagihara Yuta, Himori Koichi, Yamada Takashi, Sakai Hiroshi, Sawada Yuichiro, Takahashi Hirotaka, Saeki Noritaka, Hirakawa Hiroyuki, Yokoyama Atsushi, Fukada So-ichiro, Sawasaki Tatsuya, Imai Yuuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Myofiber androgen receptor increases muscle strength mediated by a skeletal muscle splicing variant of Mylk4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102303 ~ 102303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102303	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山中 聡士、堀内 雄斗、西野 耕平、小迫 英尊、澤崎 達也
2. 発表標題 新規近接ピオチン化酵素AirIDを用いたタンパク質分解誘導剤依存的なインタクトーム解析技術の開発
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原 颯太、杉山 修世、小塚 康平、中野 祥吾、伊藤 創平、森下 了、野澤 彰、澤崎 達也
2. 発表標題 植物での解析に最適化された近位依存性ビオチン標識酵素の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内雄斗、山中聡士、城戸康希、西野耕平、小迫英尊、澤崎達也
2. 発表標題 新規ビオチン化酵素AirIDを用いた細胞内分子のり型薬剤依存的な相互作用タンパク質を解析する技術の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 庄屋 祐希、三輪 和慶、城戸 康希、山中 聡士、澤崎 達也
2. 発表標題 タンパク質分解誘導分子探索・解析のためのDCAFプロテインアレイとAirID融合DCAFファミリー細胞ライブラリー
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohdai Yamada, Ryohei Shioya, Soh Tokunaga, Fumiya Soga, Kohki Kido, Mika K Kaneko, Yukinari Kato, Tatsuya Sawasaki
2. 発表標題 mAbID and FabID: Antibody dependent proximity biotinylation technology using AirID for cell-surface protein-protein interactome analysis of membrane proteins
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Linh T.T. Tran、清水康平、及川大輔、小迫英尊、高橋宏隆、澤崎達也、徳永文稔
2. 発表標題 A novel LUBAC-associated protein plays important roles in inflammatory response through regulation of programmed cell death.
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 重松 裕樹, 鈴木 陽一, Vasudevan G. Subhash, 澤崎 達也
2. 発表標題 デングウイルスNS3に結合する新規宿主因子SIGIRRの機能解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江村 祐希, 野澤 彰, Subhash G. Vasudevan, 高橋 宏隆, 澤崎 達也
2. 発表標題 コムギ無細胞系によって合成したデングウイルスポリプロテインによるin vitroでのウイルス複製複合体の再構成
3. 学会等名 コムギ無細胞系によって合成したデングウイルスポリプロテインによるin vitroでのウイルス複製複合体の再構成
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村松 ちひろ、野澤 彰、西野 耕平、小迫 英尊、澤崎 達也
2. 発表標題 近位依存性ピオチン化酵素AirlDを用いた植物個体内でのジベレリン受容体相互作用タンパク質の探索
3. 学会等名 第56回植物化学調節学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 宏隆, 坂口 詩穂, 林 徳宙, 入江 崇, 小迫 英尊, 澤崎 達也
2. 発表標題 In vitroおよび細胞レベルの2つの相互作用解析を基盤としたウイルスRNA受容体MDA5の新規結合タンパク質の網羅的同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西原優斗, 山田航大, 澤崎達也
2. 発表標題 近位依存性ピオチン化酵素(AirID)融合上皮成長因子(AirID-EGF)を用いたリガンド依存的受容体解析法の開発
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田航大, 塩屋亮平, 金子美華, 加藤幸成, 小迫英尊, 澤崎達也
2. 発表標題 近接ピオチン化酵素AirID融合抗体(FabID/mAbID)を用いた膜タンパク質細胞外ドメイン相互作用解析法の開発
3. 学会等名 2022年度文部科学省学術変革領域研究【先端モデル動物支援プラットフォーム(AdAMS)】若手支援技術講習会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田航大, 塩屋亮平, 金子美華, 西野耕平, 加藤幸成, 小迫英尊, 澤崎達也
2. 発表標題 近接ピオチン化酵素AirID融合抗体を用いた膜タンパク質細胞外ドメイン相互作用解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田航大、塩屋亮平、澤崎達也
2. 発表標題 近接ビオチン化酵素TurboIDを使用したタンパク質簡易ラベリング法の開発
3. 学会等名 第17回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳永 聡、長岡 ひかる、小澤 龍彦、岸 裕幸、坪井 敬文、高島 英造、澤崎 達也
2. 発表標題 マラリアワクチン候補PfRipr5を標的とした中和抗体の開発と評価
3. 学会等名 第17回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田航大、塩屋亮平、金子美華、西野耕平、土方敦司、加藤幸成、小迫英尊、澤崎達也
2. 発表標題 膜タンパク質細胞外ドメイン相互作用解析のための近接ビオチン化酵素AirID融合抗体技術の開発
3. 学会等名 第一回 日本抗体学会設立記念 学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曾我郁弥、山田航大、徳永聡、降旗大岳、長岡ひかる、小澤龍彦、岸裕幸、村口篤、高島英造、澤崎達也
2. 発表標題 ビオチン標識タンパク質解析に適した新規GATSタグシステムの開発
3. 学会等名 第1回日本抗体学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森玲香、山田航大、曾我郁弥、北村真一、澤崎達也
2. 発表標題 AirID融合抗ヒラメIgM抗体を用いたスクーチカ症ワクチン抗原タンパク質の探索
3. 学会等名 第1回日本抗体学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東山陽香、山田航大、小迫英尊、西野耕平、土方敦司、澤崎達也
2. 発表標題 Tracing the fate of Nivolumab-1PD-1 complex via proximity biotinylation enzyme AirID
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 第95回日本生化学会大会
2. 発表標題 近接ピオチン化酵素AirIDを融合したDCAF細胞株ライブラリーの構築と評価
3. 学会等名 長岡昂治、河野将大、庄屋祐希、山中聡士、澤崎達也
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀内雄斗、山中聡士、西野耕平、小迫英尊、澤崎達也
2. 発表標題 近位依存性ピオチン化酵素AirIDを用いたタンパク質分解誘導剤依存的なピオチン標識解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原口 真輝、西野 耕平、小迫 英尊、小野 慎子、松浦 義治、高橋 宏隆、澤崎 達也
2. 発表標題 SARS-CoV2の侵入過程を制御する宿主タンパク質の同定および機能解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

澤崎研究室HP http://www.pros.ehime-u.ac.jp/cell-free/index.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------