

戊型肝炎病毒衣壳蛋白同源二聚体的相互作用结构域

李少伟 何志强 王颖彬 陈毅歆 刘如石 林鉴 顾颖 张军 夏宁邵*

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘 要 为了探讨戊型肝炎病毒衣壳蛋白同源二聚体形成的关键区域和相互作用结构域, 以及二聚体形成与主要天然中和表位的形成之间的关系, 通过末端缺失、定点突变技术研究戊型肝炎病毒(HEV)ORF2 的 aa394-aa606 片段 NE2 的聚合现象, 发现其 C 端的 aa597-aa606(AVAVLA)疏水区是该片段同源聚合的核心区域, 提高该区域氨基酸的亲水性将妨碍聚合现象的发生; 半胱氨酸化学交联实验表明 NE2 形成同源二聚体时, aa597 在空间位置上相接近, 处于可生成化学键的距离, 提示所处区域为疏水聚合的作用结构域; 通过 Blast 程序估算核心区域的天然突变率, 发现其疏水性高度保守; N 端缺失实验表明, 至少 65 个氨基酸既不影响同源聚合也不直接参与主要的天然中和表位的形成, 但可协助中和表位构象的形成, 而这种协助作用可被 ORF2 的末端肽段所代替。aa597-aa606(AVAVLA)疏水区为戊肝病毒衣壳组装的第一步骤的核心区域, 并与重要的天然中和表位的形成直接相关, 从而为戊肝病毒疫苗的研究提供更详细的信息。

关键词 戊型肝炎病毒, ORF2, 基因突变, 同源聚合, 作用结构域

中图分类号 Q617 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0090-09

戊型肝炎病毒(HEV)是一种无包膜、二十面体对称结构的 RNA 病毒, 其基因组包含 3 个开放读码框架(ORF), 其中 ORF2 编码 660 个氨基酸的结构蛋白(PORF2), 组成病毒衣壳。在过去的研究中, 我们在大肠杆菌中表达了 ORF2 的 aa394-aa606 的重组蛋白(NE2), 发现其溶液可形成从二聚体到至少六聚体的多种聚体, 二聚体形式的多肽与戊型肝炎病人急性期和恢复期血清及中和单抗的反应性均显著优于其单体形式, 提示其较好地模拟了衣壳蛋白组装成病毒衣壳时的结构状态^[1]。用该重组蛋白免疫恒河猴, 可以产生高效价的抗 HEV 抗体, 并可保护免疫猴在大剂量 HEV 攻击下仍不出现任何肝炎症状, 提示 NE2 蛋白的折叠方式与 HEV 衣壳蛋白的天然折叠方式较为接近^[2]。NE2 形成的二聚体可被尿素或热处理所解聚, 而且序列中不含半胱氨酸, 不可能形成二硫键, 提示疏水相互作用对 NE2 二聚体的形成具有关键作用。本研究通过疏水性分析、肽段末端缺失、氨基酸定点突变、半胱氨酸的化学交联实验和生物信息学等手段, 进一步研究 NE2 蛋白二聚体形成的关键区域和发生同源聚合的作用结构域, 以及二聚体形成与主要免疫表位的形成之间的关系。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌种

含有 HEV ORF2 aa394-aa606 基因片段的非融合表达载体 pTO-T7-E2^[3]及 pTO-T7^[1]为本实验室所构建与保存, 含有 HEV ORF2 aa394-aa660 基因的质粒 pGEX-20T-ORF2.1 由香港大学吴文翰教授惠赐, 受体菌 *E. coli* ER2566 购自 New England Biolabs 公司。

1.2 引物

根据 pTO-T7-E2 上 HEV ORF2 基因序列, 定点突变时, 尽可能选用 *E. coli* 的嗜性密码子, 由上海博亚公司合成。E2 基因两端的引物^[4]为: 5'端引物 HEF1(5'-catatgcagctgttcta ctctcgtc-3'), 3'端引物 HERP(5'-ctcgagaaataaactataactccga-3')。其它引物序列如表 1、表 2 和表 3 所示。

1.3 工具酶及其它

限制性核酸内切酶、TaqDNA 聚合酶和 pMD 18-T 载体为 TaKaRa 产品, 酶标记抗体购自晶美公司, 为 PROTOS 产品, 预染蛋白分子量标准和蓝染试剂为 HyClone Pierce 公司产品。

表 1 NE2 C 端缺失的引物

Table 1 The primers of NE2 C-terminal deletion		
Peptide	Location	3'Primer
210N	394-603	5'-ctcgagttaggggctaaaacagc-3'
209N	394-602	5'-ctcgagttaggtctaaaacagcaacc-3'
208N	394-601	5'-ctcgagttataaaacagcaaccgc-3'
207N	394-600	5'-ctcgagttaaacagcaaccgcg-3'
203N	394-596	5'-ctcgagttaggaatagagacgggac-3'
193N	394-586	5'-ctcgagttaggtggtgaagtggaaatag-3'

表 2 NE2 定点突变的引物

Table 2 The primers of NE2 site-mutant		
Peptide	Position	Mutant Primer
L601G	601	5'-tccgcggttgctgttggagcccccc-3'
L601P	601	5'-tccgcggttgctgttccagcccccc-3'
L601I	601	5'-tccgcggttgctgttatagcccccc-3'
L601A	601	5'-tccgcggttgctgttctgcccccc-3'
L601F	601	5'-tccgcggttgctgtttttgcccccc-3'
L601C	601	5'-tccgcggttgctgtttgcgcccccc-3'
L601M	601	5'-tccgcggttgctgtttatgcccccc-3'
L601V	601	5'-tccgcggttgctgttttgcccccc-3'
L601T	601	5'-tccgcggttgctgttactgcccccc-3'
L601S	601	5'-tccgcggttgctgtttctgcccccc-3'
L601W	601	5'-tccgcggttgctgtttgggcccccc-3'
L601Y	601	5'-tccgcggttgctgtttatgcccccc-3'
L601Q	601	5'-tccgcggttgctgttcaagcccccc-3'
L601K	601	5'-tccgcggttgctgtttaagcccccc-3'
L601N	601	5'-tccgcggttgctgtttaagcccccc-3'
L601E	601	5'-tccgcggttgctgtttaagcccccc-3'
L601H	601	5'-tccgcggttgctgttccagcccccc-3'
L601D	601	5'-tccgcggttgctgttgacgcccccc-3'
L601R	601	5'-tccgcggttgctgttctgcccccc-3'
S596E	596	5'-ggccctctctctattgaagcggttgct-3'
A597E	597	5'-ccgctctctatttcgaggttgctgtt-3'
A597C	597	5'-ggtcctctctctatttcggttgctgtt-3'
V598E	598	5'-gtctctatttcgcggagagctgttta-3'
A599E	599	5'-tctatttcgcgggtgaagtgttagcc-3'
V600E	600	5'-ttcgcggttgctgaattagcccccc-3'
A602E	602	5'-cgcggttgctgttttagagcccc-3'
P603E	603	5'-cggttgctgttttagccgaacctccgcgc-3'
P603C	603	5'-gcctgcctccgcgcgtagc-3'

表 3 NE2 N 端缺失的引物

Table 3 The primers of NE2 N-terminal deletion		
Peptide	Location	5'Primer
193C	414-606	5'-catatgacatctgtagagaatgctca-3'
178C	429-606	5'-catatgcatgacatcgacctgc-3'
168C	439-606	5'-catatggttaltcaggattatgac-3'
158C	449-606	5'-catatgcaggaccgaccgcac-3'
148C	459-606	5'-catatgtcgcgcctttttt-3'

1.4 重组表达载体的构建

1.4.1 NE2 N 端和 C 端缺失片段基因的获得 :以质

粒 pTO-T7-E2(图 1)为模板 根据表 1 和表 3 所列引物 其中 N 端缺失的 5'端引物均与 HERP 引物配对、C 端缺失的 3'端引物与 HEFP 引物配对 ,进行 PCR 扩增。PCR 条件为 :94℃预变性 5min ,94℃变性 50s ,55 ~ 57℃退火 50s ,72℃延伸 1min ,共扩增 25 循环 ;最后再 72℃延伸 10min。

1.4.2 含 ORF2 C 末端多肽 201(aa459-aa660)基因的获得 :以 pGEX-20T-ORF2.1 质粒(图 1)为模板 ,5'端引物为 148C 多肽基因的 5'端引物 ,3'端引物为 HERP 引物 ,PCR 条件为 :94℃预变性 5min ,94℃变性 50s ,56℃退火 50s ,72℃延伸 40s ,共扩增 25 循环 ;最后再 72℃延伸 10min。

1.4.3 NE2 定点突变基因的获得 :以质粒 pTO-T7-E2 为模板 ,5'端引物如表 2 所示 ,3'端引物为 HERP 引物 ,PCR 条件为 :94℃预变性 5min ,94℃变性 50s ,56℃退火 50s ,72℃延伸 20s ,共扩增 25 循环 ,最后再 72℃延伸 10min。所得 PCR 产物经琼脂糖电泳、胶回收纯化。再以质粒 pTO-T7-E2 为模板 ,5'端引物为 HEFP 引物 ,以上述的回收的 PCR 产物为 3'端引物 ,PCR 条件为 :94℃预变性 5min ,94℃变性 50s ,57℃退火 50s ,72℃延伸 1min ,共扩增 25 循环 ,最后再 72℃延伸 10min。

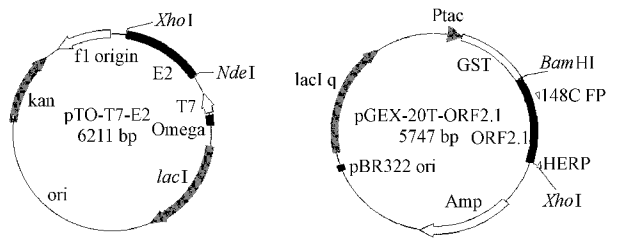


图 1 pTO-T7-E2 和 pGEX-20T-ORF2.1 质粒图

Fig.1 Plasmid map of pTO-T7-E2 and pGEX-20T-ORF2.1

1.4.4 多肽表达载体的构建 :上述 PCR 扩增片段与 pMD 18-T 载体连接 ,得到插入 E2 基因的阳性亚克隆 ,再经 Nde I / Xho I 酶切处理 ,接入 pTO-T7 ,获得表达载体 ,并测序证实序列无误(测序由上海博亚公司进行)。重组子转化受体菌 *E. coli* ER2566。

1.5 重组蛋白的表达、纯化

诱导表达的条件为 25℃ ,0.2mmol/L IPTG ,6h。离心收集菌体 ,超声(SONICS& MATERIALS 公司 ,Uilbra-Cell VCX500 型超声破碎仪)破碎 ,包涵体经 1% Triton X-100 洗涤 2 次 ,直接溶于缓冲液 A(4mol/L 尿素 ,200mmol/L Tris · Cl ,pH8.5 ,5mmol/L EDTA ,100mmol/L NaCl)中 ,离心获得变性液 ,对 1 × PBS(pH 7.45)透析过夜 ,离心获得复性上清液 ,以 SDS-PAGE

分析判断多肽的复性得率和能否形成二聚体,可形成二聚体的多肽再经 TSK GEL SW3000 21.5mm × 60cm 硅胶柱 HPLC(Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP 高效液相色谱仪)纯化。定点突变为半胱氨酸的多肽,复性纯化后的二硫键偶联二聚体、疏水相互作用二聚体与单体进一步采用全胶洗脱法进行分离纯化:蛋白经 12% 制备型 SDS-PAGE (DYY-III24A 型,北京市六一仪器厂)分离,转移到全胶洗脱仪上(BioRad 公司),225mA 恒电流洗脱 60min,反向 225mA 恒电流电泳 10s,收集分离组分。

1.6 NE2 蛋白的疏水性分析

使用 DNASTAR 软件包中的 Protean 程序提供的 Kyte-Doolittle、Hopp-Woods 和 Eisenberg 三种算法进行分析。分析时平均氨基酸残基长度常数采用默认值,Kyte-Doolittle 算法为 9 个残基,Hopp-Woods 算法为 7 个残基,Eisenberg 算法为 11 残基。

1.7 含半胱氨酸 C 的二聚体的二硫键化学交联

经全胶洗脱纯化的疏水相互作用二聚体和单体样品先对 PBS(pH 7.45)透析,再对 PBS(pH 7.45) 2mmol/L CaCl₂/2mmol/L 还原型谷胱甘肽(GSH) 0.1mmol/L 氧化型谷胱甘肽(GSSG) 溶液,于 4℃透析 64h,加入 SDS 至终浓度 1% 终止偶联反应。

1.8 蛋白印迹实验(Western blotting)

按常规方法操作,SDS-PAGE(为了对各种多肽进行复性率的横向比较,所有的分析样品均以 6 × 上样缓冲液稀释,取 20μL 进行分析)后转移到硝酸纤维膜进行杂交,一抗分别为恢复期病人血清和鼠抗 HEV 中和单抗 8C11^[5],二抗为羊抗人或羊抗鼠 IgG-AR(DAKO 公司)。

1.9 核心区域 aa597-aa602(AVAVLA)的自然突变率的估算

使用美国国家生物技术信息中心(NCBI)在国际互联网上提供的 Blast 程序进行氨基酸序列比对分析,输入数据为 NE2 的 aa394-aa606 的氨基酸序列(单字母缩写);程序版本号为 BLASTP 2.2.5 ;数据库为 GenBank、PDB、SwissProt、PIR、PRF ;比对参数均采用默认值。

2 结果及分析

2.1 NE2 同源聚合作用的核心疏水区的发现

2.1.1 NE2 蛋白疏水性分析:如图 2 所示,横坐标为氨基酸残基的位置,纵坐标为氨基酸的疏水指数。其中疏水指数为正值时,表示氨基酸呈疏水性,负值则表示氨基酸呈亲水性,疏水指数的绝对值越大表示疏水性或亲水性越强。综合 DNASTAR 软件三种疏水性分析算法的结果可发现,在 NE2 肽段中,C 端 aa197-211 区段(相当于 ORF2 aa589-603)为疏水性最强的连续疏水区,可能对 NE2 发生疏水相互作用形成同源二聚体有较重要的贡献,因此,我们首先对 NE2 多肽的 C 末端疏水区逐段进行缺失突变。

2.1.2 NE2 重组蛋白的 C 端缺失:NE2 的 C 端缺失获得重组蛋白 210N(aa394-603) 209N(aa394-602) 208N(aa394-601) 207N(aa394-600) 203N(aa394-596)和 193N(aa394-586)。其中 207N、203N、193N 不能从 4mol/L 尿素变性液中透析复性(复性上清液中无可溶性的目的蛋白,图 3 分析的样品为 4mol/L 尿素变性液)。208N 可从尿素溶液中复性,但如图 3-A 所示,在 SDS-PAGE 中无明显的聚体形

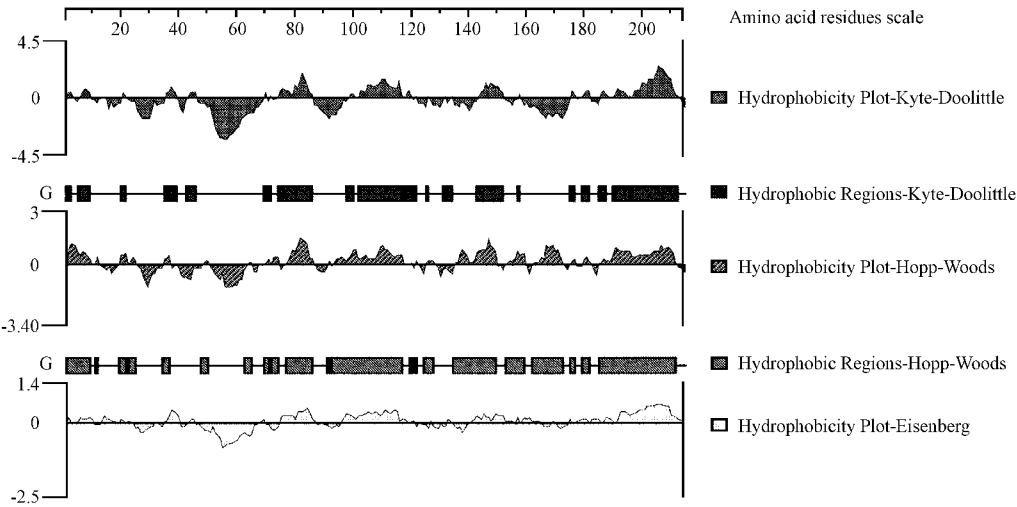


图 2 NE2 重组蛋白的疏水性分析图

Fig.2 The hydrophobicity profile of NE2 analyzed by DNASTAR software

成,而 209N、210N 可形成同源二聚体。以中和单抗 8C11 和恢复期人血清对系列 C 端缺失肽段进行蛋白印迹检测,如图 3-B 和 3-C 所示,209N 和 210N 均能形成与中和单抗和恢复期人血清强反应的二聚体和多聚体。提示 aa601 的 L 对 NE2 重组蛋白能否正确折叠及发生同源聚合起关键作用。为了解 aa601 位置的 L 对 NE2 疏水相互作用形成二聚体的影响,对该位点进行定点突变。

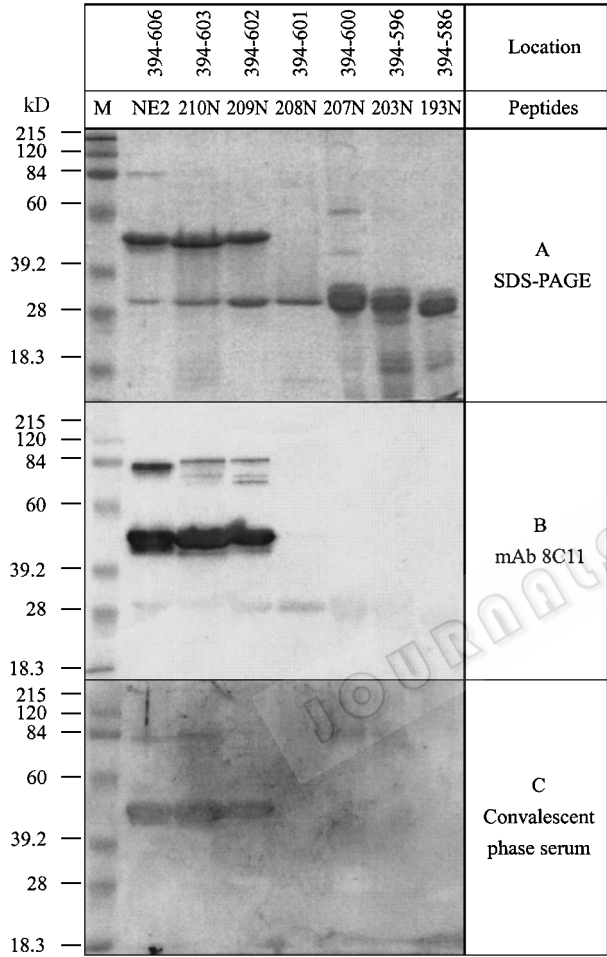


图 3 C 端缺失的 NE2 重组蛋白的 SDS-PAGE 和蛋白印迹实验

Fig.3 The 12% SDS-PAGE and Western blotting of C-terminal truncated NE2 proteins

PBS-insoluble proteins (aa394-600 , aa394-596 , aa394-586) were analyzed in 4mol/L urea solution. (A) SDS-PAGE ; (B) Western blotting with monoclonal antibody 8C11 ; (C) Western blotting with convalescent serum of an acute hepatitis E patient

2.1.3 NE2 重组蛋白的 aa601 定点突变 :将 aa601 的 L 突变为其余的 19 种氨基酸 ,氨基酸的亲水性以 Radzicka A 等^[6]的计算值为准 ,以 SDS-PAGE 分析突变多肽的聚体形式 ,结果如图 4 所示 ,二聚体的形成与替换氨基酸的亲水性有密切关系 ,亲水性弱的氨

基酸(数值大于 $-32\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$),包括 G(无侧链) ,P(无计算值,不含亲水基团,侧链为环形烃链) ,I、A、F、C、M、V、T 和 S 均可以形成二聚体,形成的二聚体均与中和单抗 8C11、恢复期人血清的反应良好,提示其折叠方式与野生型基本相同,而亲水性强的氨基酸(数值小于 $-34\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)替换的突变体,除 R 以外,均无法形成二聚体,与中和单抗 8C11、恢复期人血清也基本不反应,提示折叠方式与野生型相比有了很大的变化。R 的替换不影响蛋白的折叠方式,推测与其侧链基团的特殊结构相关 :R 侧链端头为胍基,在一个刚性平面中含有 5 个氢键给体基团,可与主链上的氧原子或水分子形成氢键,因此沿着侧链常有强烈的疏水作用,有时甚至可以弯曲回来形成一个疏水平面保守地代替^[7]。此外,替换的氨基酸还与多肽的复性率相关,这些突变多肽在大肠杆菌中的表达量与野生型 NE2 基本相同,但经过变性和再折叠过程后,无法形成二聚体的突变体复性率很低,而除了 F 和 M 之外,可形成二聚体的多肽均有较高的复性率,M 和 F 的突变体复性率很低,F 的二聚体需通过具有酶联放大效应的蛋白印迹实验方可检测。提示 aa601 位氨基酸与多肽的折叠复性及二聚体的形成有密切的关系。根据疏水性分析结果,在 aa601 两侧亦存在连续的多个疏水氨基酸,为了解其他疏水氨基酸的强亲水性突变对蛋白折叠的影响,将 aa596-603 逐一突变成为强亲水性氨基酸。

2.1.4 NE2 aa596-603 疏水区的定点突变 :将 aa596-603 分别突变成强亲水性氨基酸 E,SDS-PAGE 结果表明,重组蛋白 S596E 和 P603E 可形成二聚体和多聚体;V600E 可形成二聚体;A597E、V598E、A599E、L601E 和 A602E 都不能形成二聚体(图 5-A)。以中和单抗 8C11 和恢复期人血清对这些突变多肽进行蛋白印迹检测,发现 S596E 和 P603E 与中和单抗 8C11 和恢复期血清的反应性和 NE2 相同,V600E 只形成二聚体,没有形成更高级结构的多聚体(图 5-B),说明 aa600 位置的强亲水性对 NE2 聚合能力的影响较小,但与进一步形成多聚体有关。提示 aa597-602 的 AVAVLA 疏水区段是 NE2 发生同源疏水相互作用的核心区域,其中 aa600V 可能位于该结构域的外侧,强亲水性对疏水作用的干扰较小。

2.1.5 NE2 同源聚合的作用结构域 :将 NE2 aa597 突变成为半胱氨酸 C 得到重组蛋白 A597C,其溶于 4mol/L 尿素的包涵体经 PBS 透析复性后,可同时形成两种形式的二聚体(图 6-A, Lane 2)。其一是与 NE2 相同的疏水相互作用形成的二聚体,分子量 42kD

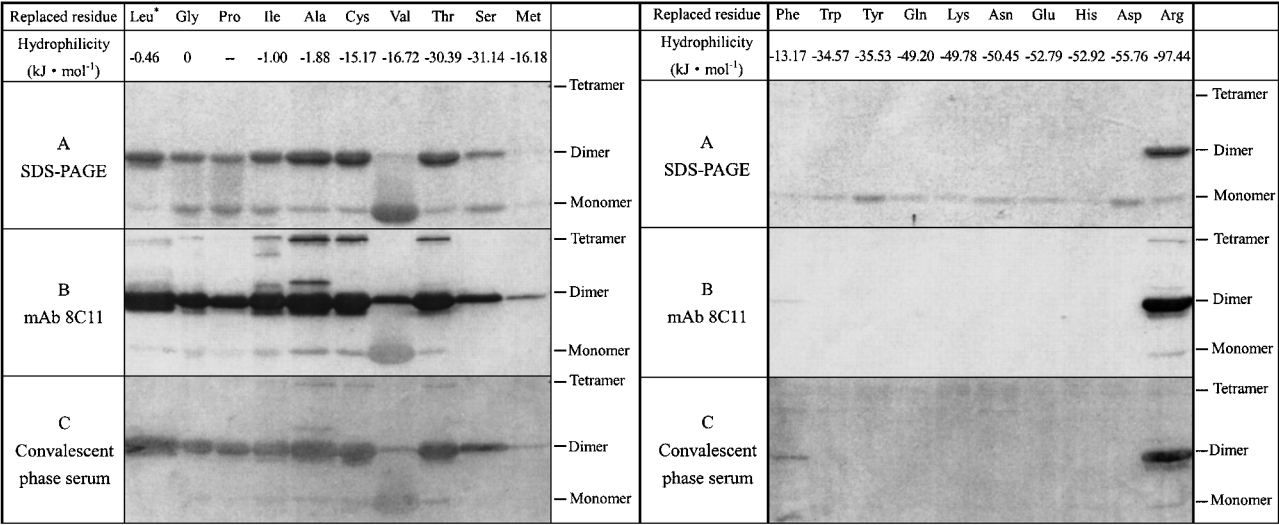


图 4 aa601 定点突变的 NE2 重组蛋白的 SDS-PAGE 和蛋白印迹实验

Fig.4 The SDS-PAGE and Western blotting of aa601L-mutated NE2 proteins(non-reduced 12% SDS-PAGE)

(A)SDS-PAGE ;(B) Western blotting with monoclonal antibody 8C11 ;(C) Western blotting with convalescent serum of an acute hepatitis E patient.

* : Wild-type , NE2

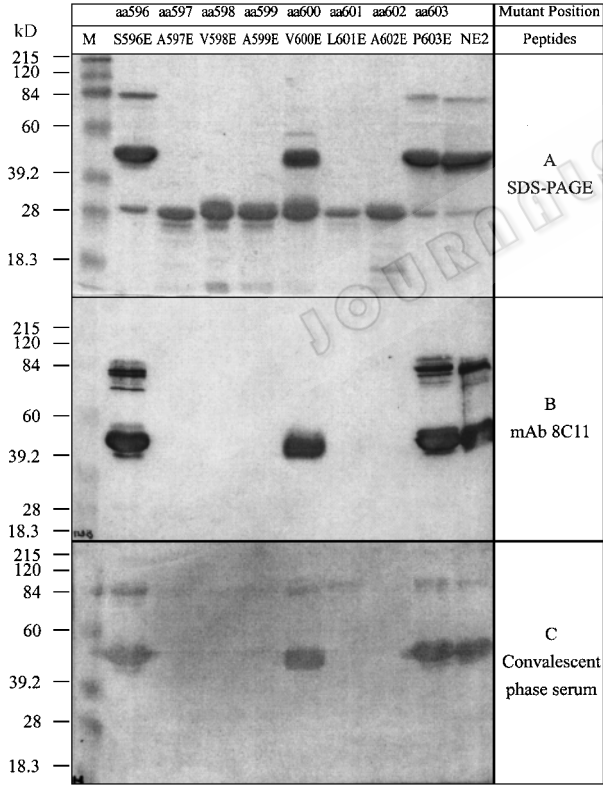


图 5 aa596-aa603 定点突变的 NE2 的 SDS-PAGE 和蛋白印迹实验

Fig.5 The SDS-PAGE and Western blotting of aa596-aa603 site-mutated NE2 proteins(12% SDS-PAGE)

(A)SDS-PAGE ;(B) Western blotting with monoclonal antibody 8C11 ;
(C) Western blotting with convalescent serum of an acute hepatitis E patient

左右,可被沸水浴或尿素解聚(图 6-A ,Lane 8) ;其二为二硫键共价结合的同源二聚体,分子量 60kD 左右(相当于单体 29kD 的 2 倍),可被 DTT(二巯基苏糖醇)还原解聚(图 6-A ,Lane 9)。NE2 的理论分子量为 23097.02D ,MALDI-TOF 质谱测得分子量为 22899.18D ,与理论值相近,而 SDS-PAGE 观察到的单体分子量约为 29kD ,这种差别可能是由于重组蛋白构型导致的^[1]。蛋白印迹实验(图 6-B、图 6-C ,Lane 2)显示 ,A597C 由疏水作用形成的 42kD 二聚体和 80kD 多聚体对中和单抗 8C11 和人恢复期血清的反应性较好,与 NE2(图 6-B、图 6-C ,Lane 10)相当 ;而由二硫键形成的 60kD 二聚体的反应性则与其单体相同,明显弱于疏水作用形成的二聚体,提示二硫键形成的二聚体丧失了主要天然免疫表位的构象。此外,NE2 蛋白的 aa601I(图 4 ,Lane Cys)和 aa603P(结果未显示)分别突变成为 C 时,只形成疏水相互作用的同源二聚体,但不能形成二硫键。可见,二硫键的形成不仅需要一定的氧化环境,而且要求蛋白质分子的特定构象,使得发生键合偶联的两个 C 在空间位置上足够接近。

为了确定是单体还是疏水相互作用的二聚体的构象促使 aa597 位置的 C 发生键合,进一步分离单体、疏水二聚体和二硫键二聚体。结果显示,分离后的单体由于 SDS 的不可逆变性作用,不能重新形成疏水二聚体(图 6 ,Lane 3) ;疏水二聚体有部分解聚成单体(Lane 4) ;二硫键二聚体在非还原 SDS-PAGE 中,无明显的解聚发生(Lane 5)。将分离的单体和疏

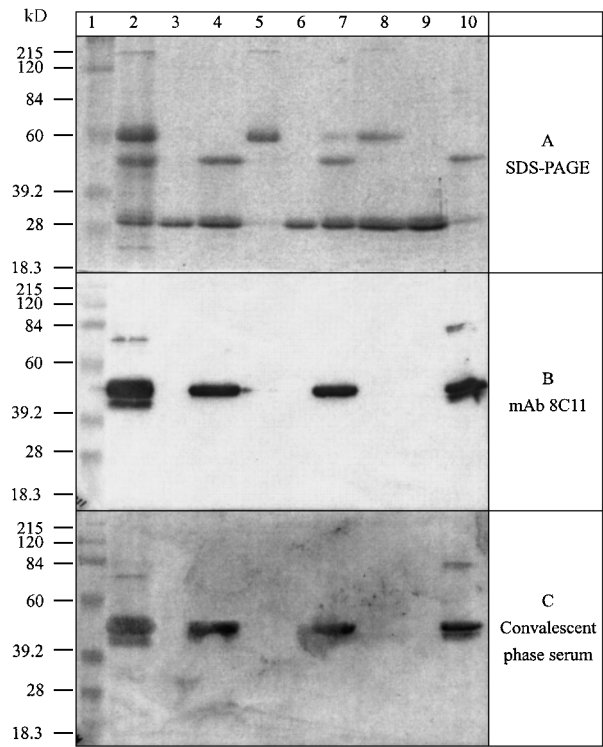


图 6 aa597 定点突变为 C 的 NE2 的 SDS-PAGE 和蛋白印迹实验

Fig.6 The SDS-PAGE and Western blotting of NE2 mutant aa597A-mutated to Cysteine residue (12% non-reduced SDS-PAGE)

1 :prestained protein molecular weight marker ; 2 : A597C renaturalizing from 4mol/L urea ; 3 :monomer of A597C ; 4 :hydrophobic interaction dimer ; 5 :dimer formed by disulfide covalent combination ; (Lane3 4 5 show the three forms of A597C separated by whole gel eluter. And the monomer and hydrophobic interaction dimer dialyzed against GSH/GSSG , which were showed on Lane 6 ~ 9.) 6 : monomer of A597C ; 7 :hydrophobic interaction dimer ; 8 :hydrophobic interaction dimer boiled for 10min ; 9 :hydrophobic interaction dimer boiled for 10min and reduced by 100mmol/L DTT ; 10 :NE2 dialyzed against GSH/GSSG
(A) SDS-PAGE ; (B) Western blotting with monoclonal antibody 8C11 ;
(C) Western blotting with convalescent serum of an acute hepatitis E patient

水二聚体样品进行二硫键化学交联实验 ,同时以 NE2 为对照。结果显示 ,单体的 aa597C 不能被氧化形成二硫键(Lane 6) ;疏水二聚体的 aa597C 发生键合偶联 ,形成不为沸水溶解聚但可被 DTT 还原的二硫键同源二聚体(Lane 7 ~ 9) ,其对中和单抗 8C11 和人恢复期血清的反应性大大减弱 ,提示共价二硫键的刚性结构破坏了疏水相互作用结构域的柔性 ,导致主要天然免疫表位的丧失。另外 ,对照样品 NE2 蛋白的结果(Lane 10)表明 ,化学交联实验的条件本身不会破坏疏水二聚体的构象。综上所述 ,NE2 重

组蛋白发生疏水聚合时 ,aa597 相距较接近 ,处于可形成化学键的距离 ,提示 aa597-602 的 AVAVLA 疏水区段是同源二聚体疏水相互作用的作用结构域。

2.1.6 核心区域 aa597-aa602 (AVAVLA) 的自然突变率的估算 搜索得到 51 个包含 HEV ORF2 C 端的氨基酸序列 ,如表 4 所示 ,含 AVAVLA 序列的有 30 株 (占 58.8%) ;aa597A 和 aa600V 最为保守 ;aa598V 发生突变有 2 株 ,均突变成为氨基酸 A ;aa599 为 G 的有 16 株 (占 31.4%) ;1 株序列中 aa601L 突变成 F 2 株序列的 aa602A 发生突变 ,一为 G ,一为 T。A、G、F、T 均为弱亲水性氨基酸 ,提示着 HEV ORF2 aa597-aa602 (AVAVLA) 的疏水性是天然保守的 ,其作为疏水相互作用结构域对于 HEV 病毒颗粒的组装和复制是必不可少的。

表 4 核心区域 AVAVLA 的自然突变率
Table 4 The natural mutation of the core region (AVAVLA)

Sequence						Frequency	Ratio
A	V	A	V	L	A	30	58.8%
A	V	A	V	F	A	1	2.0%
A	V	A	V	L	T	1	2.0%
A	V	G	V	L	A	16	31.4%
A	V	A	V	L	G	1	2.0%
A	A	A	V	L	A	2	3.9%
Total						51	100%

2.2 二聚体形成天然中和表位所需的环境氨基酸

2.2.1 NE2 重组蛋白的 N 端缺失 :NE2 的 N 端缺失得到重组蛋白 193C(aa414-606) 178C(aa429-606) 168C(aa439-606) 158C(aa449-606) 和 148C(aa459-606)。如图 7-A 显示 ,193C、178C、168C、158C、148C 均能形成多聚体 ,而且所形成的多聚体可被尿素或沸水溶解聚(结果未显示) ,提示这些多聚体的形成均依赖于单体间的疏水相互作用。其中 ,168C 的二聚体的表观分子量最大 ,但二聚体与单体量的比例最小 ,这可能是由于 168C 形成的二聚体的构象更为舒展 ,在 SDS-PAGE 条件下较不稳定。蛋白印迹检测结果显示 :N 端缺失多肽形成的多聚体对中和单抗 8C11 或恢复期人血清的反应性均较 NE2 二聚体及多聚体有显著的下降或消失(图 7-B , 7-C) ,提示 ORF2 主要免疫表位的形成不仅需要单体的多聚化 ,还需要其他环境氨基酸的协助。

2.2.2 ORF2 C 末端对 N 端缺失多肽的作用 :为了确定 aa394-aa458 是否直接参与主要的天然中和表位的形成 ,将 148C 多肽的 C 端延伸至 ORF2 aa660 获得多肽 201C(aa459-660) , 201 多肽在 SDS-PAGE 可

形成二聚体和多聚体(图7, Lane2),其二聚体与中和单抗 8C11 和恢复期人血清的反应性与 NE2 相当(图7-B, 7-C)。说明 ORF2 C 端 aa605-aa660 肽段也

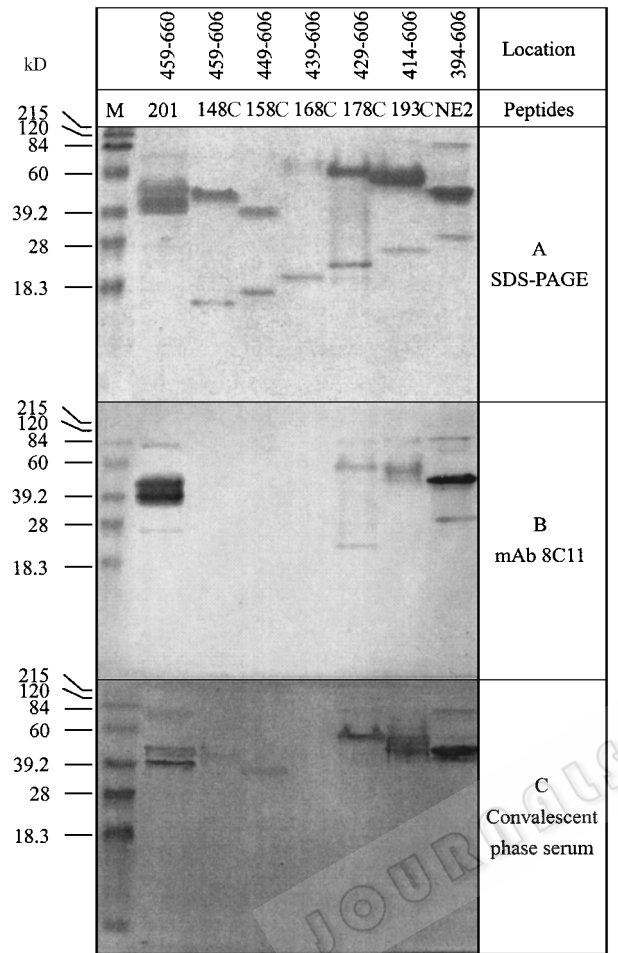


图7 N端缺失的NE2重组蛋白的SDS-PAGE和蛋白印迹实验
Fig. 7 The SDS-PAGE and Western blotting of N-terminal truncated NE2 proteins (15% SDS-PAGE)
(A) SDS-PAGE; (B) Western blotting with monoclonal antibody 8C11;
(C) Western blotting with convalescent serum of an acute hepatitis E patient

可促使148C多肽形成主要的天然中和表位,提示NE2的N端aa394-aa458既不参与聚合作用,也不直接参与主要天然中和表位的形成,但可作为环境氨基酸协助特定的聚体构象的形成,这种协助作用可被ORF2C端肽段所代替。

3 讨论

在过去的研究中,我们在大肠杆菌中表达了HEV ORF2的aa394-aa606多肽NE2,首次报道了原核系统表达的ORF2区段成功地装配成HEV子粒核心结构^[1]。为了寻找NE2发生同源聚合的核心区

域,并初步阐明聚体形成和中和免疫表位的关系,本研究进行了肽段系列缺失和定点突变等实验,得出以下结论:(1)NE2重要天然中和表位的形成依赖于多聚体的形成,其C端疏水区为单体发生同源聚合所必需的,关键区域为aa597-aa602(VAVALA),是分子疏水聚合的作用结构域,其中aa597A在发生聚合时的空间位置最为接近,处于可生成化学键的距离,aa600V位于作用结构域的外侧。(2)聚合作用的核心区域的疏水性高度保守,突变成为强亲水性氨基酸将破坏单体蛋白发生疏水同源聚合,并导致重要天然中和表位的丧失。(3)NE2重组蛋白的N端至少65个氨基酸(aa394-aa458)不参与同源聚合作用的发生,也不直接参与主要天然中和表位的形成,但可作为环境氨基酸而协助中和表位构象的形成,而这种协助作用可为ORF2C端aa605-aa660肽段所代替。

Li等^[8]利用COS-1细胞和体外翻译系统表达全长ORF2,在SDS-PAGE中均可见二聚体、三聚体等多聚体的形成,N端缺失110个氨基酸时,不影响多聚体的形成,而C端aa585-aa610的缺失将导致蛋白的异常折叠,从而减少了多聚体的形成,提示C端疏水区对ORF2衣壳蛋白发生同源聚合起重要的作用。Zhang等^[9]利用昆虫细胞表达ORF2时,得到56kD和53kD两种蛋白,N端同为aa112,而C端分别为aa607和aa578。53kD蛋白经明确沉淀纯化后,在高压液相分子筛色谱中呈稳定的单体形式。本研究利用原核表达系统,通过蛋白质变性和再折叠过程研究ORF2衣壳蛋白的聚合现象,进一步发现N端缺失至aa458位仍不影响同源聚合的发生,且不直接参与主要的天然中和表位的形成,而C端缺失至aa601位时,在SDS-PAGE中已观察不到明显的多聚体,aa601以前的C端缺失得到的蛋白无法进行再折叠复性。在过去的研究中,我们发现NE2形成的二聚体可被尿素解聚,这是同源聚合缘于疏水相互作用的间接证据。本研究将蛋白再折叠的关键点aa601L突变成为各种氨基酸,发现氨基酸的强亲水性破坏了二聚体的形成,成为同源聚合缘于疏水相互作用的直接证据,进而发现了同源疏水相互作用聚合的核心区域位于疏水区aa597-aa602(AVAVLA),并通过化学交联实验间接证明,该区域为疏水聚合发生的作用结构域。

NE2蛋白C端缺失至少位于aa601,所得多肽无法从尿素变性液中折叠复性;在601位氨基酸定点突变实验中,替代氨基酸含强亲水性侧链(亲水性指数小于-34kJ·mol⁻¹)不仅破坏了二聚体的形成,而

且极大降低了蛋白的折叠复性率,而亲水性弱的替代氨基酸大多不影响蛋白的复性和同源二聚体的形成,均说明 aa601 与多肽的起始折叠有较大的关系,其侧链可能参与了形成起始蛋白折叠的疏水内核,并进一步形成疏水作用结构域,提示二聚体的形成与蛋白的正确折叠有较重要的关系。值得一提的是,定点突变时需要考虑到有些氨基酸的侧链具有特殊的性质,如精氨酸虽然具有最强亲水性的胍基,却可能由于其特殊结构与主链形成氢键而呈疏水性,不影响蛋白质的复性和同源二聚体的形成,而苯丙氨酸和甲硫氨酸,侧链亲水性较弱,虽然不破坏聚合现象的发生,却大大降低了蛋白的复性率,这也可能与其侧链的特殊结构有关,具体的解释则有待于从蛋白质的结构和复性机理方面进一步深入探讨。

在 N 端缺失突变结果的 SDS-PAGE 电泳中,单体的表观分子量 $NE2 > 193C > 178C > 168C > 158C > 148C$ 依次递减,而形成二聚体时的表观分子量与理论分子量很不相符: $168C > 178C > 193C > NE2 > 148C > 158C$ 。对中和单抗 8C11 的反应性,NE2 反应很强,193C 和 178C 仅有弱的反应性,而 148C、158C 和 168C 则无明显的反应。可见,虽然这些肽段通过 C 端的疏水相互作用形成二聚体,但由于在 SDS-PAGE 中分子仍存在一定的构象,其分子紧密程度不同使得迁移率与相当分子量的线性分子有差别,并与能否形成天然免疫表位相关,提示 N 端氨基酸作为环境氨基酸而协助特定构象的形成,有趣的是,ORF2 C 端 aa605-660 可代替 NE2 的 N 端促使其天然中和免疫表位的形成。相反的,通过二硫键共价偶联成二聚体的 A597C 蛋白,由于二硫键的刚性结构破坏了疏水相互作用结构域的柔性,舒展成线性分子,在 SDS-PAGE 中的迁移率与其理论分子量相同,却丧失了天然的中和表位。这些现象均提示 ORF2 天然中和表位的形成依赖于壳蛋白的特定的聚体构象,这也是重组 HEV 疫苗所必需模拟的构象表位。

为了明确 HEV ORF2 同源聚合的生物学意义,利用生物信息学的手段统计同源聚合核心区域的自然突变率,发现该区域的疏水性是高度保守的,揭示了衣壳蛋白发生同源聚合对天然 HEV 的生存与复制是必需的。其中,aa597A 和 aa600V 完全保守,可能对病毒的组装过程是较为关键的,推测 aa597A 在作用结构域中处于核心的位置,而 aa600V 对多聚体子粒结构的形成起较关键的作用。1999 年,Xing 等^[10]用冰冻蚀刻电镜技术对昆虫细胞表达的类病毒颗粒的结构进行研究,结果提示戊肝病毒 ORF2

衣壳蛋白首先形成同源二聚体,3 对同源二聚体进而形成六聚体的子粒结构,并逐渐组装形成病毒衣壳。我们在进一步寻找原核表达的 ORF2 衣壳蛋白组装成颗粒的相互作用区域时,初步发现组装成类病毒颗粒(VLP)所需的区段,与本研究发现的同源聚合核心区域是相互独立的,不能形成二聚体的多肽(C 端位于 aa601 以前或 AVAVLA 疏水区突变成强亲水性氨基酸),包含有颗粒组装区段,亦可形成 VLP,但仍丧失了依赖于二聚体的主要天然中和表位,从而为颗粒性重组 HEV 疫苗的研究提供更充分的理论依据(结果另文报道)。

本研究将 NE2 蛋白的 aa597A 定点突变为半胱氨酸进行自交联反应,大大简化了已有的化学交联和氨基酸定位过程^[11],而且形成二硫键的键长比偶联剂的分子长度更短,较为有力地说明发生交联的氨基酸在空间位置上的接近。aa601L 和 aa603P 突变为半胱氨酸不能发生交联,说明所处的位置在空间位置上不够靠近,提示 aa597A 是 NE2 单体相互作用界面上较为接近的位置。从蛋白质构象对交联反应的影响来考虑,半胱氨酸的亲水性较弱(亲水性指数为 $-15.17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)不会破坏疏水相互作用二聚体的形成,在一定的氧化条件下疏水二聚体的半胱氨酸可发生键合共价交联,而未聚合的单体分子却不能发生交联,说明 NE2 聚体(而不是未形成天然中和表位的单体)上的 aa597 在空间位置的接近,初步证明 aa597 所处区域(AVAVLA)是疏水相互作用的直接作用结构域。然而,疏水二聚体一旦发生共价偶联,则丧失了主要的天然中和免疫表位,提示疏水相互作用结构域具有一定的柔性。综上所述,相互作用结构域是 NE2 发生疏水聚合的重要元件,促使主要天然中和免疫表位构象的形成,聚合的 NE2 可能具有较普通重组蛋白更好的免疫原性,从而具有作为 HEV 疫苗的良好前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Li SW(李少伟), Zhang J(张军), He ZQ(何志强) et al. The study of aggregate of the ORF2 peptide of hepatitis E virus expressed in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(4): 463-467
- [2] Ge SX(葛胜祥), Zhang J(张军), Huang GY(黄果勇) et al. The immuno-protect study of a hepatitis E virus ORF2 peptide expressed in *E. coli*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2003, **43**(1): 35-42
- [3] Luo WX(罗文新), Zhang J(张军), Yang HJ(杨海杰) et al. Construction and application of an *Escherichia coli* high effective expression vector with an enhancer. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(5): 578-581

- [4] Zhang JZ , Ng MH , Xia NS *et al.* Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein. *J Med Virol* , 2001 , **64** :125 – 132
- [5] Gu Y (顾颖) , Ge SX (葛胜祥) , Huang GY (黄果勇) *et al.* Identification of neutralizing monoclonal antibodies to the hepatitis E virus. *Chinese Journal of Virology (病毒学报)* , 2003 , **19** (3) :217 – 223
- [6] Radzicka A , Wolfenden R. Comparing the Polarities of the Amino Acids : Side Chain Distribution Coefficients Between the Vapor Phase , Cyclohexane , 1-Octanol and Neutral Aqueous Solution. *Biochemistry* , 1988 , **27** :1664 – 1670
- [7] Lai LH (来鲁华) . Prediction of Protein Structure and Design of Protein Molecular (蛋白质的结构预测与分子设计) , Peking University Press (北京大学出版社) , 1993 .pp.20 – 24
- [8] Li XF , Mohammad Z , Faizan A *et al.* A C-terminal hydrophobic region is required for homo-oligomerization of the hepatitis E virus capsid (ORF2) protein. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* , 2001 , **1** :3122 – 3128
- [9] Zhang MD , Emerson SU , Nguyen H *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53kD truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine* , 2002 , **20** :853 – 857
- [10] Xing L , Kato K , Li T *et al.* Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes. *Virology* , 1999 , **265** :35 – 45
- [11] Bennett KL , Kussmann M , Bjork P *et al.* Chemical cross-linking with thiol-cleavable reagents combined with differential mass spectrometric peptide mapping—a novel approach to assess intermolecular protein contacts. *Protein Sci* , 2000 , **9** (8) :1503 – 1518

Interface Domain of Hepatitis E Virus Capsid Protein Homodimer

LI Shao-Wei HE Zhi-Qiang WANG Ying-Bin CHEN Yi-Xin

LIU Ru-Shi LIN Jian GU Ying ZHANG Jun XIA Ning-Shao *

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract Hepatitis E is a main cause of acute viral hepatitis in developing countries where it occurs as sporadic cases and in epidemics form. The causative agent , hepatitis E virus , is transmitted primarily by the fecal-oral route. The ~7.5kb positive-sense single-strand RNA genome includes three open reading frames (ORFs) , one of which (ORF2) is postulated to encode the major viral capsid protein (pORF2) of 660 amino acid residues. We earlier showed that a bacterially expressed peptide , designated as NE2 , located from amino acid residues 394 to 606 of ORF2 , was found to aggregate into homodimer to at least hexamer. To understand the interface domains within this peptide vital for dimerization and formation of major neutralizing epitopes , NE2 protein underwent terminal-truncated and site-directed mutation. The hydrophobic region , ORF2 aa597-aa602 (AVAVLA) , played a key role in oligomerization. Any amino acid residue of this region replaced with glutamic acid residue , the peptide can not refold as homodimer and/or oligomer. The immunoreactivities of these mutant peptides , blotted with anti-HEV neutralizing monoclonal antibody (8C11) and convalescent human sera , show associated to the formation of homodimer. The intermolecular contact region on homodimer was investigated by chemical cross-linking of two site-directed cysteines. When the alanine on aa597 site mutated with cysteine , two different homodimers were found in SDS-PAGE analysis. One (42kD) can be disassociated with 8mol/L urea , which is postulated to form by virtue of hydrophobic interaction , and the other (60kD) falls apart with the reductant DTT present. The exact conformation , generating the cross-linking reaction of cysteines , was further investigated by induced-oxidation on monomer and hydrophobic homodimer of A597C protein with GSH/GSSG. And the results revealed , it is the conformation of hydrophobic homodimer that induces the disulfide bond come into being , instead of the one of monomer. So the aa597 site was verified to be located on interface domain of hydrophobically interacting homodimeric complex. To evaluate the biological significance of hydrophobicity of interface domain , we searched natural variations as to the region on all available databases with NCBI blast program. All variations on these amino acid residues kept higher hydrophobicity , which suggests that the hydrophobic domain is critical for the assemblage and propagation of HEV. NE2 N-terminal deletions up to aa458 had no effect on dimerization and took no exact part in formation of major neutralizing epitopes , but the fragment may act as helper for the formation of major neutralizing epitopes on NE2. Interestingly , the C-terminus aa605-aa660 of ORF2 can also act as helper instead of the N-terminus of NE2. This study suggests an interface domain of NE2 might be vital for HEV capsomer assembly and formation of major neutralizing epitopes. These results may offer clues to the rational design of recombinant anti-HEV vaccine.

Key words Hepatitis E Virus , ORF2 , interface domain , homodimer

Received : 06-12-2003

This work was supported by Grant from Science and Technology Projects of Fujian Province , China (No.2002F013) ; Excellent Scholar Incubation Plan of the Ministry of Education , China.

* Corresponding author. Tel 86-592-2184110 ; Fax 86-592-2184110 ; E-mail: xia_ningshao@xmu.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>