

副粘病毒附着蛋白在病毒融合过程中的作用*

王恩秀¹ 于明¹ 高福² 田波¹

(中国科学院微生物所 北京 100080)¹

(Harvard University, Boston, Massachusetts MA # 02115, USA)²

摘要: 副粘病毒附着蛋白 (AP) 是病毒表面的一种主要糖蛋白, 它能够诱导机体产生中和抗体。近年来的研究表明附着蛋白在病毒融合过程中的作用不仅限于其对受体的识别和结合, 它还促进融合蛋白 (F) 介导病毒与宿主细胞的融合。由此可见, 副粘病毒具有其特有的融合机理, 因此研究附着蛋白在病毒融合过程中的作用是揭示副粘病毒融合机理的前提, 同时也将为新型抑制药物的研究提供思路。

关键词: 副粘病毒, 附着蛋白, 融合促进作用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0082-04

副粘病毒科分为副粘病毒和肺病毒两个亚科。副粘病毒在侵染细胞的过程中需要两种表面糖蛋白的参与, 一种是附着蛋白 (AP), 一种是融合蛋白 (F)。附着蛋白又因其在不同病毒中的不同作用和特点有不同的名称, 有 HN, HA 和 G 蛋白之称。附着蛋白能附着在靶细胞上, 具有吸附作用 (通脱结合宿主细胞的唾液酸受体完成) 和目前尚不完全清楚的融合促进 (fusion promotion) 活性。除此之外大部分附着蛋白还具有血凝素-神经氨酸酶 (HN) 活性或者单独的血凝素 (HA) 活性。而 F 蛋白则直接介导病毒的融合。F 蛋白的研究进展较快, 目前大量的研究结果都支持针对于流感病毒和 HIV 提出的融合假说, 认为该假说在一定程度上适用于副粘病毒乃至其他囊膜病毒。该假说认为 F 蛋白 (含有两个 7 肽重复序列 HR1, HR2 或者 C-peptide 和 N-peptide) 在融合过程中有一系列的构象变化, 最终 HR1 和 HR2 形成极其稳定的超螺旋结构 (coiled-coil structure) 三聚体^[1]。根据这个假说人们对有关囊膜病毒进行了融合抑制实验, 结果发现外源性 F 蛋白 HR 序列具有抑制病毒融合的活性, 这也反过来对该假说给予进一步证实。我们实验室证实原核表达的 NDV HR2 能够有效抑制病毒的融合^[2]。基于此, 新药的研究发展迅速, 尤其是 HIV 新型抑制药物 (如 T-20) 的研究更成为其他囊膜病毒抑制药物研究的模型。

众所周知, 副粘病毒亚科的病毒具有不同于其他囊膜病毒的融合特性, 它的融合

* 国家重大科研项目课题资助项目 (No. G1999011902)

收稿日期: 2001-04-21, 修回日期: 2002-02-20

机理有别于流感病毒和 HIV。因为在副粘病毒中,除 SV5 和 RSV 之外,其他所有病毒的融合都严格需要附着蛋白的参与。即便在 SV5 和 RSV 中附着蛋白仍具有促进病毒融合的作用。因此掌握附着蛋白的作用机制十分重要:这不仅有利于对副粘病毒的融合机理给出合适的解释,同时也会为针对附着蛋白新型防治药物的研究提供思路。

1 对于附着蛋白的结构和传统功能的认知

在附着蛋白中,关于 HN 蛋白结构的研究较多也较为深入。HN 蛋白由跨膜的长茎(stalk) 以及其支撑着一个球状头部(globular head) 所组成。它的球状头部具有与人流感病毒神经氨酸酶相同的蛋白结构:6 个 β 折叠,每个 β 折叠由 4 条反向平行的肽链组成,称为“ β 片层”基序(motif)^[3]。HN 是一个同源四聚体结构的 II 型膜蛋白,它能够识别靶细胞受体上的唾液酸并能切除溶液中或膜结合的唾液酸成分,使得子代病毒不至于聚集在一起。

经典的观念认为:通过对受体的识别和吸附,附着蛋白成为病毒囊膜和宿主细胞膜的连接桥梁,它是病毒侵入细胞的必备条件。同时附着蛋白是决定病毒与细胞膜作用时间长短的一个重要因素,它在很大程度上决定着病毒融合的程度,从而决定病毒的感染。

2 附着蛋白的融合促进作用

然而随着研究的深入,人们发现一种保留了吸附活性的附着蛋白的突变体却丧失了融合促进活性,所以看来吸附活性不是病毒融合的充分的条件^[4]。另外,在新城疫病毒(NDV)的研究中,人们发现神经氨酸酶活性缺失的 NDV 仍然能够在体外培养的细胞上增殖,可见神经氨酸酶活性同样不是病毒融合的充分条件^[5]。因此有人推断附着蛋白除了具有吸附和神经氨酸酶等活性外,还必定存在一种称为融合促进活性的作用。下面这些实验进一步证实了这种推断。首先,Smith 等人在实验中,以外源性凝集素模拟 HN 蛋白的吸附作用加入到 NDV 持续感染的缺乏唾液酸的细胞中,并不能引起细胞融合^[6]。另外 Lamb 报道在很多副粘病毒中,能够有效阻断病毒融合的单克隆抗体却不能阻断病毒对受体的识别^[7]。此外,人们对 HN 蛋白的球状头部,茎部以及跨膜区等部位进行了系列基因定点突变研究,也得到了类似的结果,即能够降低或完全摧毁病毒融合活性的突变却对病毒的受体识别没有明显的影响。这些结果表明,附着蛋白不仅具有吸附作用,而且参与病毒的融合,并且这两种作用是相对独立的。

另外对 II、III 型人副流感病毒(HPIV-2 或 HPIV-3) F 基因与附着蛋白基因共转染的研究发现,只有同源的 F、附着蛋白基因共转染才能引起细胞融合^[8]。这说明,附着蛋白促进 F 蛋白介导的融合作用是病毒特异性的。现已证明这种特异性存在于多种副粘病毒中。

3 附着蛋白融合促进活性的区域定位研究

既然附着蛋白具有融合促进作用,人们集中了较大精力来定位附着蛋白融合促进活性区域。Ronald 等人通过单抗筛选确定出 NDV 病毒 HN 蛋白 193 位的 Phe 和 203 位的 His 是 HN 蛋白的受体识别位点,而将它们分别突变为 Ile 和 Gln 后,HN 蛋白受体结合能力受到干扰同时,其融合促进活性也受到影响。因此他们认为 HN 的融合促进活性与受体的识别有关^[9]。Mirza 将 NDV HN 蛋白最长的连续保守序列 NRKSCS 中 236 位的 Lys

突变为 Ser 后, HN 的融合促进活性全部丧失, 他们不能用吸附活性下降加以解释, 认为带有这段保守序列的球状头部参与融合促进作用^[10]。Lori 对 NDV HN 蛋白跨膜区的 7 肽重复序列进行了突变研究: 单独将 44 位 Leu 突变为 Ala, 或者将 44、30 位的 Leu 突变为 Ala, 以及将 44、30、37 位的 Leu 同时突变为 Ala 时, HN 四聚体的稳定性受到破坏的同时, 其融合促进活性也被削弱。鉴于对 HN 融合促进活性的病毒特异性考虑, Deng 等人进行了 HN 蛋白嵌合体研究, 他们将分别来自 NDV 和 HPIV-3 的 HN 基因片段进行体外嵌合, 构成“完整”的 HN 基因, 与来自于 NDV 的 F 基因进行共表达, 结果当 HN 前面 82 个氨基酸残基为来自 NDV HN 蛋白的氨基酸残基而其余为来自 HPIV-3 蛋白时, HN 蛋白仍表现对 NDV 的融合促进活性^[11]。此外, Tsurudome 等^[12]对 HPIV 和 SV5 病毒的附着蛋白也进行了嵌合体研究, 结果表明以一定方式嵌合的嵌合附着蛋白也能够完成其融合促进作用。可见, 附着蛋白和 F 蛋白之间的较弱的相互作用即能启动融合。然而这两个实验都没有给出附着蛋白活性的精确定位, 只是给出范围很大的一个区域。因此还不能据此对机理给出解释, 也不可能在此基础上研制新型药物。

由于生物信息学的迅速发展, 借助生物信息学知识研究这个问题成为新的突破点。1999 年 Judith 等人深受 F 蛋白研究的启发, 利用已有数据对副粘病毒 HN 蛋白的二级结构进行了预测, 结果发现 HN 蛋白中也存在类似于 F 蛋白的 7 肽重复序列。他们进一步对 NDV HN 蛋白 HR 进行了突变, 得到的结果与预期一致: 即突变的 HN 与 F 基因共感染后细胞胞体的形成受到了不同程度的抑制^[13]。这说明 HN HR 参与了病毒的融合过程, HR 有可能成为 HN 促进融合的活性区域。为了进一步检测 HN HR 的这种活性, 我们实验室分别合成了它的两个 HR——HRa 和 HRb。融合分析表明, 单独的 HRa, HRb 以及 HRa、HRb 的等摩尔浓度的混合物均不能抑制病毒诱导的细胞融合(数据尚未发表)。对此, 我们认为有如下几种可能: (1) 突变研究之所以认为 HR 具有融合活性, 是因为突变可能改变了整个 HN 蛋白的结构, 而不仅仅是因为影响了 HR 局部结构所造成的; (2) HN HR 不具有 F HR 的特性, 不存在融合过程中两个 HR 之间的相互作用; (3) HN HR 不能直接与受体或 F 蛋白相互作用。

4 附着蛋白与 F 蛋白直接相互作用

因为附着蛋白具有病毒特异性, 即附着蛋白的融合促进活性仅针对于同种病毒的 F 蛋白。由此可以推测附着蛋白与 F 蛋白之间存在着特异性的相互作用, Deng 等^[14]通过免疫共沉淀的方法证明了这种相互作用存在于 NDV 中, 而当将 HN 蛋白球状头部区域第 198 位的 Asp 突变位 Arg 时, HN 和 F 蛋白之间的免疫共沉淀就不再形成。Deng 认为这可能是因为突变干扰了 HN 对受体的识别, 从而阻断了通过受体识别过程激发的 HN 和 F 之间的相互作用。至于这种相互作用具体是通过怎样的途径完成的, 或者说 HN 和 F 蛋白的相互作用是通过各自的哪些区域来完成的, 目前只停留在推测当中, 而直接的研究数据报道甚少。2000 年 Sergel 将 NDV F 蛋白 HR3 序列中的第 289 为 Leu 突变为 Ala 后, F 蛋白可单独介导融合, 尽管 HN 蛋白能促进这种过程, 但是它不再是这个过程必需的^[15]。由此人们猜测 HN 是否通过 HR3 对 F 行使融合促进作用, 但是这种推测还未得到证实。

5 展望

最近在 HIV、NDV 等囊膜病毒的研究中人们已经发现, 外源性的 F HR 具有抑制病

毒融合的活性。相信这些小肽型治疗药物最终一定会应用于临床。然而针对于副粘病毒融合特点而设计的药物尚未出现。值得注意的是,2000年美国两家实验室联合解析了NDV HN蛋白的膜外区域的结构,对该结构的分析,必将为针对于附着蛋白的新型副粘病毒防治药物的研究提供重要思路。今年澳大利亚一个实验室又报道了NDV F蛋白的晶体结构。对于附着蛋白和F蛋白结构特点的分析一定会对其相互作用机制的研究有所启发。因此,附着蛋白的融合促进活性以及附着蛋白和F蛋白的相互作用的研究仍将会是副粘病毒今后研究的热点,这也为完善副粘病毒的融合机理,为副粘病毒的有效控制和最终消灭奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Carr C M, Kim P S. *Cell*, 1993, **73**: 823 ~ 832.
- [2] Ming Y, Enxiu W, Youfang L, *et al.* *J. Gen. Virol*, 2002.
- [3] Grennell S, Takimoto T, Portner A, *et al.* *Nature. Struct. Biol*, 2000, **7**: 1068 ~ 1074.
- [4] Sergel T, McGinnes L W, Morrison T G. *Virology*, 1993, **193**: 717 ~ 726.
- [5] Sakai Y, Shibuta H. *J. Virol*, 1989, **63**: 3661 ~ 3668.
- [6] Smith G W, Hightower L. *J. Virol*, 1983, **47**: 385 ~ 391.
- [7] Lamber R A. *Virology*, 1993, **197**: 1 ~ 11.
- [8] Hu X, Ray R, Compans R W. *J. Virol*, 1992, **66**: 1528 ~ 1534.
- [9] Iorio R M, Glickman R L. *J. Virol*, 1992, **66**: 6626 ~ 6633.
- [10] Mirza A M, Deng R, Iorio R M. *J. Virol*, 1994, **68**: 5093 ~ 5099.
- [11] Deng R, Wang Z, Mirza A M, *et al.* *Virology*, 1995, **209**: 457 ~ 469.
- [12] Tsurudome M, Kawano M, Yuasa T, *et al.* *Virology*, 1995, **213**: 190 ~ 203.
- [13] Judith S H, Morrison T G. *J. Virol*, 1999, **73**: 3630 ~ 3637.
- [14] Deng R, Wang Z, Paul J, *et al.* *Virology*, 1999, **253**: 43 ~ 54.
- [15] Sergel G T, Mcquain C, Morrison T G. *J. Virol*, 2000, **74**: 765