

II 类囊膜病毒膜融合分子机制*

王晓佳 汪 明**

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要 病毒囊膜与宿主细胞膜的膜融合是囊膜病毒入侵的重要过程, 病毒囊膜融合糖蛋白的一系列结构变化引发此过程. 综述了 II 类囊膜病毒、弹状病毒及疱疹病毒融合蛋白结构与功能研究的最新进展, 介绍了软件分析并定位融合蛋白功能区域的方法. II 类病毒与 I 类病毒融合蛋白的融合前结构不同, 但融合后结构 (发夹三聚体结构) 相似. 弹状病毒与疱疹病毒的融合蛋白集合了 I / II 类融合蛋白的某些特征, 但其结构变化及融合过程各不相同, 被归为新型融合蛋白. 上述研究为基础设计的以病毒融合过程为靶标的抑制子, 可为抗病毒新药的研制提供新思路.

关键词 囊膜病毒, 融合蛋白, 发夹结构, 抗病毒抑制子

学科分类号 Q6

病毒囊膜糖蛋白通常有 1~3 种, 他们介导病毒囊膜与病毒细胞膜之间的融合, 使病毒的内容物释放到宿主细胞中. I 类囊膜病毒糖蛋白在电镜下可见到明显的“纤突”或刺突, 这类病毒包括正粘病毒科、冠状病毒科、逆转录病毒科、纤丝病毒科及副粘病毒科. 本研究组曾对 I 类病毒膜融合机制进行了全面综述, 请看参考文献[1]. II 类囊膜病毒糖蛋白不形成“纤突”, 而是富含 β 折叠结构, 这类病毒包括披膜病毒科、黄病毒科及布尼亚病毒科^[2]. 弹状病毒参与融合的糖(G)蛋白与其他囊膜病毒糖蛋白明显不同的是, 无论 G 蛋白被激活引致的结构变化过程, 及 G 蛋白插入宿主靶膜的过程, 都是可逆的^[3]. 某些病毒含有多种糖蛋白, 如疱疹病毒有至少 12 种糖蛋白, 而且与 I / II 类糖蛋白不同的是, 具有融合功能的糖蛋白分为 2 种, 病毒与宿主细胞膜融合方式也有多种^[4]. 本文综述了 II 类囊膜病毒、弹状病毒以及疱疹病毒的几种不同糖蛋白介导的膜融合分子机制.

1 II 类囊膜病毒膜融合分子机制

1.1 融合糖蛋白的前融合结构

对 II 类囊膜病毒膜融合机制研究最多的是森林病毒 (Semliki forest virus, SFV). 与登革热病毒 (Dengue virus, DV) 及蜱传脑炎病毒 (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) 的糖蛋白 E 形成反平行同源二聚体不同, SFV 的 E_1 及 E_2 形成异源二聚

体, 其中 E_1 为融合蛋白^[5]. 无论是 E 蛋白还是 E_1 蛋白, 都可在受体结合部位形成一种以 3 个富含 β 折叠结构区域为主的特定结构. 以 SFV 的 E_1 蛋白为例, 区域 I 包括 N 端及 2 个长插入片段, 2 个插入片段与 β 链共同形成区域 II. 第一个插入片段包括其顶部高度保守的内部融合肽环区, 其与区域 II 的 c 及 d β 链连接 (称 cd 环). 第二个插入片段包括其顶部的 ij 环, ij 环连接于融合环. 区域 I 与区域 II 之间的柔性区域为铰链区, 可使两区域运动不同的角度. 区域 III 位于区域 I 与区域 II 的羧基端, 与区域 I 之间由短的连接区域所连接, 区域 III 包含免疫球蛋白类似结构, 被 3 个保守的二硫键所稳定 (图 1). 此外, E_1 蛋白羧基末端还有茎部区域与跨膜区^[2,5,6].

1.2 融合糖蛋白的变构及融合后结构

在酸性 pH 条件下, 融合蛋白 E_1 被解离, 并暴露出原来被分子间相互作用所屏蔽的内部融合环, 融合环插入到宿主细胞膜引发整个融合蛋白不可逆的三聚体化, 即形成由区域 I / 区域 II 及融合环构成的融合核心三聚体结构, 此间区域 I / 区域 II 之间的铰链区发生 15° 角的旋转, 三聚体化过程

*高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金(200769), 中国农业大学科研启动基金资助项目(2004009).

** 通讯联系人. Tel: 010-62732840, E-mail: vetdean@cau.edu.cn

收稿日期: 2006-12-11, 接受日期: 2007-01-06

同时产生了茎区结合位点, 随后区域Ⅲ的反向折叠使茎区与跨膜区向融合环接近, 此间区域Ⅲ及茎区向融合环运动 3.7 nm. 最终, 形成重新排序的新三聚体结构(发夹三聚体), 此变构过程引发病毒囊膜

与宿主细胞膜的进一步靠近并使膜融合发生 (图 1). 在融合蛋白变构过程中, 有研究认为存在中间状态, 其可能包括 ij 环与靶膜或茎区的相互作用, 还未定论^[2,5~7].

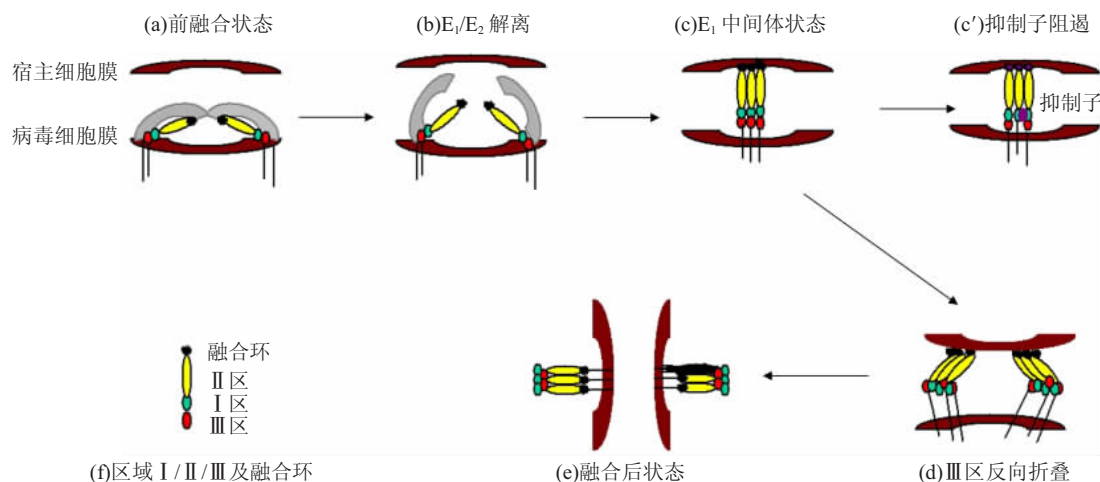


Fig. 1 Membrane fusion model of SFV

图 1 SFV 病毒膜融合模式图

(a) E_1 及 E_2 异源二聚体, 其中灰色为 E_2 , E_1 由 3 个区域组成: 绿色为区域 I, 黄色为区域 II, 红色为区域 III. (b) 酸性 pH 条件下, E_1/E_2 被解离, 融合环(黑色星状)暴露出来. (c) 瞬间中间体状态形成, 融合环插入宿主细胞膜引发三聚体化(由区域 I、区域 II 及融合环构成). (c') 抑制子(紫色)阻遏融合蛋白的进一步折叠. (d) 区域 III 的反向折叠使 E_1 蛋白羧基末端的茎区与跨膜区向融合环接近. (e) E_1 重新折叠成新的三聚体(发夹结构)并引发病毒囊膜与宿主细胞膜的膜融合. (f) 区域 I / 区域 II / 区域 III 及融合环.

1.3 I 类与 II 类囊膜病毒膜融合的差异

II 类病毒与 I 类病毒膜融合机制有很多相似处, 包括都含有无融合活性的融合糖蛋白前体; 融合前结构不同, 但融合激活过程中的瞬间中间体结构及融合后结构(发夹三聚体)相似, 且在融合后状态时融合肽与羧基端跨膜区都可相互拉近^[5,6]; 融合蛋白从亚稳定状态到稳定的融合后状态的变构过程都是从高能量到低能量的不可逆的转变过程^[2,6]. 虽然 I 类病毒与 II 类病毒膜融合的某些过程相近, 但参与融合的蛋白质基本结构不同, I 类病毒融合蛋白有 α 螺旋卷曲结构, 而 II 类病毒融合蛋白包含的 β 链状区域不形成卷曲结构, II 类病毒膜融合过程比 I 类病毒膜融合过程进展快^[6], II 类病毒融合蛋白不形成“纤突”, 这些特征使 II 类病毒膜融合机制与 I 类病毒膜融合机制不能归为一类.

2 弹状病毒膜融合机制

弹状病毒广泛分布于脊椎 / 非脊椎动物及许多

植物, 由于宿主广泛, 受体也广泛. 弹状病毒的膜融合过程由糖蛋白 G 的变构所引致, G 蛋白结构高度保守, 约 500 个氨基酸, 含有信号肽、2~6 个糖基化位点、6~8 个高度保守的二硫键, 以及羧基端的跨膜区与胞外区域. G 蛋白包括 3 个结构状态, 即中性 pH 条件的天然状态、激活的疏水状态(融合过程的第一步)及融合非活性状态(融合后结构)^[8]. 天然状态的 G 蛋白以三聚体形式通过羧基端单个跨膜区域锚定病毒囊膜, 三聚体结构在弱酸性 pH 条件下很稳定, 但不如 I 类 / II 类囊膜病毒融合蛋白的三聚体稳定^[9]. 任何导致不稳定的试剂或因素都可能导致病毒膜融合, 如加热 / 尿素等方法, 但中性 pH 条件下, 加热或尿素都不能引致弹状病毒的膜融合及 G 蛋白的结构变化, 且酸性 pH 条件诱导的 G 蛋白二级结构的变化也不同于中性 pH 条件下二级结构的变化^[9]. 弹状病毒 G 蛋白从天然状态到融合后状态结构变化的能量壁垒小于 I 类及 II 类病毒糖蛋白, G 蛋白变构及插入靶膜过程都

是可逆的,表明 G 蛋白与其他囊膜病毒糖蛋白的明显不同^[3,8].病毒膜融合过程中 G 蛋白的结构变化依赖于组氨酸(His),G 蛋白含有 2~3 个七肽重复区域(heptad repeat, HR),其中 HR₁ 区域的组氨酸 His 148 及 His 149 的去质子化过程启动了 G 蛋白的完全变构,并暴露融合肽,使其与靶膜发生作用^[9].G 蛋白变构的程度依赖于靶膜上的负电荷数量,也可能与小泡中的磷脂酶丝氨酸(PS)含量相关.最近的研究还证明,酸性 pH 条件下,弹状病毒 G 蛋白的融合后发夹结构集合了 I/II 类病毒融合蛋白的某些典型特征,既有 α 螺旋卷曲结构,又有 β 折叠发夹结构,与疱疹病毒 gB 蛋白结构也很相似^[10,11].G 蛋白的变构过程还不清楚,被归为新型病毒融合糖蛋白^[8].

3 疱疹病毒膜融合机制

疱疹病毒结构复杂,其表面至少有 12 个糖蛋白(gA~gL),疱疹病毒入侵宿主细胞一般需要 4 个主要的糖蛋白(gB、gH、gL、gD),其中 gH 与 gL 以 gH-gL 二聚体的形式存在,入侵过程依赖于 gD 糖蛋白与多个细胞表面受体的相互作用,这些非单一类型受体参与病毒的结合及病毒的融合过程,包括糖脂多聚分子——硫酸乙酰肝素(其可同时作为结合及融合受体)、柄蛋白家族,以及 TNF 受体家族的 HVEM 等^[4,12].某些疱疹病毒(如 Pseudo rabies virus, PRV)仅 gB、gH-gL 就可引致膜融合,提示可能存在 gB 或 gH-gL 的细胞表面受体,而不仅仅只存在针对 gD 糖蛋白的常见受体^[4].不同疱疹病毒入侵不同宿主细胞的途径不同,其感染结果也有生物学差异,如巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)入侵成纤维细胞是通过与质膜的直接融合,入侵视网膜色素上皮细胞及内皮细胞则通过胞吞作用,EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)入侵正常 B 细胞通过胞吞,而入侵上皮细胞则是通过直接融合^[12].疱疹病毒 gB 与 gH 糖蛋白都有融合功能,这与其他 I 类/II 类糖蛋白只有一个融合糖蛋白不同,证明疱疹病毒膜融合机制与 I/II 类囊膜病毒都不同.其中, gH 蛋白与 II 类病毒融合蛋白相似的是,无氨基端融合肽,但含有具备内部融合肽作用的 α 螺旋区域;与 I 类病毒融合蛋白相似的是,有 2 段可结合形成稳定复合物(其三级结构还未获得)的 HR 区域^[8,13],证明 gH 蛋白具备 I 类及 II 类病毒融合蛋白的典型特征^[14].另有研究人员将 gH 蛋白归为 I 类病毒融合蛋白^[13].最近,疱疹病毒 HSV-1 gB 蛋

白的三级结构被解析出来,证明 gB 蛋白包含的 α 螺旋卷曲结构与 I 类病毒融合蛋白相近,而 2 个 β 发夹结构与 II 类病毒融合蛋白相近,也与弹状病毒 G 蛋白相似^[10,11].gB 蛋白也含有 2 段 HR 区域,但 HR₁ 与 HR₂ 不能结合形成复合物, gB 与 gH 的 HR 区域之间也不相互作用,但其他区域可能相互作用^[13,14]. I 类病毒融合蛋白的 HR₁ 与 HR₂ 区域可通过形成发夹三聚体结构引致膜融合,提示,疱疹病毒 gB 与 gH 蛋白的 HR 区域可作为该类研究病毒膜融合机制的入手点.

4 囊膜病毒膜融合抑制子

I 类囊膜病毒体外合成的 HR₂ 可高效、特异性地于中间体状态通过阻止病毒自身发夹三聚体结构的形成从而抑制膜融合发生^[1], II 类病毒的区域 III 及茎部区域也能有效阻止病毒膜融合过程,其中区域 III 可抑制 SFV、DV 的融合,茎区可抑制 DV₁ 及西尼罗河病毒(West Nile virus, WNV)的融合,而区域 III 及茎区的共表达蛋白抑制效果更强^[7,15].免疫共沉淀等研究表明,区域 III 可稳定结合到 E(E₁) 蛋白三聚体的中间体状态,而茎区可增强发夹三聚体的稳定性^[15],证明区域 III 可能作用于中间体状态,而茎区作用于融合后状态.区域 III 与茎区作为病毒膜融合抑制子,有病毒种属内的交叉抑制活性,这与 I 类病毒特异性抑制子不同,提示可能存在于此区域的相互作用位点,这为广谱抗 II 类病毒药物提供有效靶点^[7].疱疹病毒 gB 与 gH 蛋白都含 2 个以上的 HR 区域,其中 gB 蛋白的 HR₁ 区域以及 gH 蛋白的 HR₁ 与 HR₂ 区域都有膜融合抑制活性, gH 蛋白的 HR 区域抑制活性强于 gB 蛋白的 HR 区域,不同病毒 HR 区域之间还有交叉抑制活性^[14,16~18].虽然疱疹病毒 HR 区域与 I 类病毒 HR 区域具备相似的典型特征,但 I 类病毒仅 HR₂ 有膜融合抑制活性,而疱疹病毒具有多个有膜融合抑制活性的 HR 区域^[14,17],进一步证明疱疹病毒膜融合机制与 I 类病毒膜融合机制不同.

5 囊膜病毒融合糖蛋白分析软件

LearnCoil-VMF 及 ExPASy-Coils 等程序,已成功用于分析 I 类囊膜病毒融合糖蛋白形成六聚体融合核心结构的 HR₁ 与 HR₂ 区域^[1,19],疱疹病毒糖蛋白的 HR 区域也可用上述程序预测出来^[13,14]. II 类囊膜病毒融合蛋白功能区域的定位常将分析二级结构的 chou-Fasma 及 Robson-Garnier 程序,分析跨

膜卷曲形成区域的 TMPred 程序, 以及分配到质脂双层的序列确定系统 Explorer 等程序联合应用^[20,21]. I 类病毒融合蛋白之间的氨基酸序列相似性较高, 融合蛋白的三级结构相似^[1], II 类病毒融合蛋白之间的氨基酸序列相似性低, 但融合蛋白的三级结构相似^[2], 提示软件分析定位关键功能区域的可行性. 现已开发出多种计算机程序用于病毒蛋白功能区的预测与分析, 其准确性很高, 成为科学研究中有力的辅助工具.

6 展 望

对 I 类囊膜病毒膜融合机制及融合抑制子研究基础上设计的药物已成功应用于临床, 对 II 类及其

他新型病毒膜融合机制的研究也取得了长足进展, 但仍存在很多关键性问题尚不清楚, 如 II 类糖蛋白保守的组氨酸残基的作用、酸性 pH 条件诱导的融合反应中胆固醇与结构变化的关系、铰链区与 ij 环的作用, 以及茎区、区域 III 及其他位点中哪个是最有效的抗病毒药物作用靶点等. 弹状病毒 G 蛋白融合过程中的结构变化也不甚清楚. 此外, 对疱疹病毒 gB、gH 糖蛋白 HR 区域的结构与功能研究取得了一定进展, 但是 gB、gH 蛋白的结构变化、HR₁ 与 HR₂ 结合形成稳定复合物的结构、以及 gB、gH 蛋白其他功能区域的研究还需要进一步探讨, 这也是本研究组正面临需解决的问题. 表 1 列出了这些病毒糖蛋白的融合特性与研究近况.

Table 1 Characters of fusion proteins of enveloped viruses
表 1 囊膜病毒糖蛋白特性

病毒科	代表病毒	融合模式	融合肽	糖蛋白结构变化	其他特性
黄病毒 (Flaviviridae)	Dengue virus(DV)	酸性 pH, 前体不被蛋白酶裂解	融合蛋白区域 II 顶部 有内部融合肽 / 无氨基 基端融合肽	E 蛋白从二聚体变 构为三聚体, 无 卷曲结构	融合蛋白变构不 可逆 茎区及区域 III 为 抑制子
	Yellow Fever virus (YFV)				
	West Nile virus (WNV)				
	Hepatitis C virus(HCV)				
	Tick-borne Encephalitis virus (TBEV)				
披膜病毒 (Togaviridae)	Semliki Forest virus (SFV) Sindbis virus(SV)	酸性 pH, 前体不被蛋白酶裂解	融合蛋白内部	E 蛋白从二聚体变 构为三聚体, 无 卷曲结构	融合蛋白变构不 可逆 茎区及区域 III 为 抑制子
弹状病毒 (Rhabdoviridae)	Vesicular Stomatitis virus (VSV) Rabies virus (RV)	酸性 pH, 前体不被蛋白酶裂解	融合蛋白内部 非疏水性	G 蛋白三聚体结构 / 融合后结构集合 了 I / II 类病毒典 型特征	融合蛋白结构变 化可逆
疱疹病毒 (Herpesviridae)	Herpes Simplex virus-1 (HSV-1) Pseudo Rabies virus (PRV) Cytomegalovirus(CMV) Epstein-Barr virus (EBV)	中性 pH, 多个受体及多个膜融 合途径	融合蛋白内部, 疏水性	gB 与 gH 蛋白融 合后结构都集合 了 I / II 类病毒的 典型特征	gB/gH 2 种融合 蛋白都有 HR 抑 制子

参 考 文 献

1 王晓佳, 张卫红, 汪明, 等. 囊膜病毒膜融合 的分子机制. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31** (6): 482~491
Wang X J, Zhang W H, Wang M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2004, **31** (6): 482~491

2 Kielian M. Class II virus membrane fusion proteins. Virology, 2006, **344** (1): 38~47

3 Yao Y, Ghosh K, Epanand R F, *et al.* Membrane fusion activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein G is induced by low pH but not by heat or denaturant. Virology, 2003, **310** (2): 319~332

4 Spear P G, Manoj S, Yoon M, *et al.* Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. Virology, 2006, **344** (1): 17~24

5 Sollner T H. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. Curr Opin Cell Biol, 2004, **16** (4): 429~435

6 Zaitseva E, Mittal A, Griffin D E, *et al.* Class II fusion protein of

- alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins. *J Cell Biol*, 2005, **169** (1): 167~177
- 7 Liao M, Kielian M. Domain III from class II fusion proteins functions as a domain-negative inhibitor of virus membrane fusion. *J Cell Biol*, 2005, **171** (1): 111~120
 - 8 Da Poian A T, Carneiro F A, Stauffer F. Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses representative of a new class of viral fusion proteins?. *Braz J med Biol Res*, 2005, **38** (6): 813~823
 - 9 Carneiro F A, Vandenbussche G, Juliano M A, *et al.* Charged residues are involved in membrane fusion mediated by a hydrophilic peptide located in vesicular stomatitis virus G protein. *Mol Membr Biol*, 2006, **23** (5): 396~406
 - 10 Roche S, Bressanelli S, Rey F A, *et al.* Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*, 2006, **313** (5784): 187~191
 - 11 Heldwein E E, Lou H, Bender F C, *et al.* Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science*, 2006, **313** (5784): 217~220
 - 12 Milne R S B, Nicola A V, Whitbeak J C, *et al.* Glycoprotein D receptor-dependent, low-PH-independent endocytic entry of Herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 2005, **79** (11): 6655~6663
 - 13 Gianni T, Piccoli A, Bertucci C, *et al.* Heptad repeat 2 in Herpes simplex virus 1 gH interact with Heptad repeat 1 and is critical for virus entry and fusion. *J Virol*, 2006, **80** (5): 2216~2224
 - 14 Galdiero S, Vitiello M, D'Isanto M, *et al.* Analysis of synthetic peptides from heptad-repeat domains of herpes simplex virus type 1 glycoproteins H and B. *J Gen Virol*, 2006, **87** (5): 1085~1097
 - 15 Hrobowski Y M, Garry R F, Michael S F. Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity. *Virol J*, 2005, **2**: 49
 - 16 Okazaki K, Kida H. A synthetic peptide from a heptad repeat region of herpesvirus glycoprotein B inhibits virus replication. *J Gen Virol*, 2004, **85** (8): 2131~2137
 - 17 Looper M, Compton T. Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in Human cytomegalovirus membrane fusion. *J Virol*, 2004, **78** (15): 8333~8341
 - 18 Galdiero S, Falanga A, Vitiello M, *et al.* Fusogenic domains in Herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Boil Chem*, 2005, **280** (31): 28632~28643
 - 19 Lupas A. Predicting coiled-coil regions. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, **7** (3): 388~393
 - 20 Garry R F, Dash S. Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology*, 2003, **307** (2): 255~265
 - 21 Garry C E, Garry R F. Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). *Theor Biol Med Model*, 2004, **1** (10): 1~16

Molecular Mechanism of Class II Enveloped Viruses Membrane Fusion*

WANG Xiao-Jia, WANG Ming**

(College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Entry of enveloped viruses into host cells requires fusion of the viral envelope with a cellular membrane. This step is mediated by viral glycoproteins that undergo a dramatic conformational change. Recent advances in structure and function of the fusion proteins of the class II viruses, Rhabdoviruses and Herpesviruses were described. Proteomics computational analyses to locate the functional domain of fusion protein were introduced. The fusion proteins of class II and class I viruses differ radically in their initial structures but refold toward similar final conformation (trimer of hairpin). The Rhabdoviruses and Herpesviruses have a novel fold combining features of fusion proteins from class I and class II. The fusion proteins of these viruses have a different conformation change and mediate a different fusion process, therefore, the proteins belong to a novel class of fusion proteins. The potent inhibitor of virus entry should be new strategies for developing antiviral drugs.

Key words enveloped virus, fusion protein, hairpin structure, antiviral inhibitor

*This work was supported by grants from Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of PR China (FANEDD, 200769) and The Foundation of China Agricultural University (2004009).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62732840, E-mail: vetdean@cau.edu.cn

Received: December 11, 2006 Accepted: January 6, 2007