

流感病毒在脂筏上组装与出芽 *

马 坤 王玉娟 王俊峰 **

(中国科学院合肥物质科学研究院强磁场科学中心, 合肥 230031)

摘要 流感病毒造成的季节性流行性疾病给全世界带来沉重的健康负担。近年来, 甲型流感病毒的变种 H5N1、H7N9 给各国带来了很大危害。流感病毒属于正黏附病毒科, 它的遗传物质由多个节段的负链 RNA 组成, 其组装和出芽剪切生殖是一个涉及到多种病毒因子, 多步骤、复杂的生化过程。流感病毒会使用宿主的细胞膜上的“脂筏”区域作为病毒出芽位点。首先病毒的两种糖蛋白 NA 蛋白、HA 蛋白会在脂筏区域聚集, 造成脂筏区膜变形弯曲, 并且发动出芽的过程。接着, 流感病毒基质蛋白 M1 的 C 端与 HA、NA 结合, 其自身在脂筏区域开始多聚化并使膜向外弯曲形成原始病毒体的内部结构, 接着招募病毒的核糖核蛋白复合物(VRNP)与 M2 蛋白, 使组装的过程进一步完成。最后, M2 蛋白会富集在原始病毒体的底部, 完成膜的剪切和病毒体的释放。

关键词 流感病毒, 脂筏, 病毒组装, 膜出芽, 膜剪切, M2 蛋白

学科分类号 R373

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0014

1 流感病毒简介

流感病毒具有致命性、易感染性、易突变性等特点。其中最具代表性是甲型流感, 1918 年的西班牙甲型大流感, 直接导致全世界范围内近 4000 万人的死亡。近些年, 猪源的 H1N1, 禽源的 H5N1/H7N9 等甲型流感病毒突变成具有感染人类能力的高致病性毒株, 对世界各国的社会经济造成了巨大破坏^[1-6]。

甲型流感病毒属于正黏附病毒科家族, 其遗传物质是由 8 节段反义 RNA 链包裹形成。从外到内, 病毒体主要由 3 部分组成: a. 病毒囊膜, 其表面有 3 种跨膜蛋白, 糖基化修饰的血球凝集素蛋白(HA 蛋白)、糖基化修饰的神经氨酸酶蛋白(NA 蛋白)、离子通道 M2 蛋白。b. 处于病毒体中间位置的基质蛋白 M1。c. 病毒内部的 RNA 与核蛋白 NP 蛋白复合体 VRNP^[7-13]。在病毒的生命周期中, HA 糖蛋白具有调节流感病毒体感染并进入到宿主细胞的功能, 并且在出芽过程大量聚集在宿主细胞膜, 成为很多蛋白质的结合受体。NA 糖蛋白主要功能是保证新生病毒体从被感染宿主细胞表面释放。在病毒出芽过程中, 基质蛋白 M1 大量平铺聚

集于原始病毒体的内表面, 不仅可以影响流感病毒体结构, 还能大量招募 RNPs 并将其组装到原始病毒体的内部^[14-16]。M2 蛋白是一种多功能蛋白, 不仅仅在感染期具有离子通道功能, 还在病毒出芽的过程起到膜剪切的作用^[17-18]。

2 病毒出芽位置——脂筏区域

流感病毒出芽会选择极化的上表皮膜的脂筏作为组装病毒原件、遗传物质的区域。Chen 等^[19], Lamb 等^[20]和 Ohkura 等^[21]指出膜上的脂筏环境会给流感病毒出芽剪切提供一个有利环境。Wang 等^[22]实验也发现, 当宿主表达了蝾蛇毒素, 可以破坏脂筏结构, 直接导致病毒复制能力降低。

生物体膜系统是由有序流动磷脂相(Lo)和无序流动磷脂相(Ld)混合组成, 其中 Lo 区域就是脂筏膜区域前身。Lo 磷脂相包含了较高比例的胆固醇、鞘脂类、GPL 锚定蛋白和饱和的磷脂, 而 Ld 磷脂相主要成分是不饱和的磷脂(图 1)^[23-27]。在病毒感染

* 国家自然科学基金资助项目(5049696)。

** 通讯联系人。

Tel: 0551-65595652, E-mail: junfeng@hmf.ac.cn

收稿日期: 2015-01-14, 接受日期: 2015-04-28

期, 宿主细胞的 Lo 磷脂相中的蛋白和磷脂会进一步高度有序化密集形成微型区域, 称为病毒脂筏区域. 富含鞘磷脂、胆固醇的环境会使膜环境更加稳定, 蛋白质的插入消耗能量更少, 有助于富集流感原件蛋白. 由于 Lo 充满大量高度有序的酰基侧链, 会导致 Lo 区域的磷脂挤压变得更长, 所以 Lo 相的磷脂膜比 Ld 相要厚一些. 两种相位的高度差, 造成了 Ld 相的磷脂头与 Lo 的疏水内芯在一个水平线, 从而直接导致生物膜产生局部的线性张

力. 当这种线性张力大于膜变形所需要的能量时, 即使在没有别的因子的参与调解下, 膜本身也会自发弯曲最终导致出芽^[27-29]. 但是在大多数的生物膜系统中, 这种线性张力是无法达到, 常常需要特定蛋白与膜环境相互作用, 操纵磷脂流动相, 从而更有效调节膜的出芽与剪切^[30]. Simons、Cary 等也证明脂筏环境不仅适用于流感病毒的出芽, 还适用于 HIV 病毒、埃博拉病毒等^[31-33]. 由此可以判断脂筏环境是病毒组装、出芽必需的一种通用膜环境.

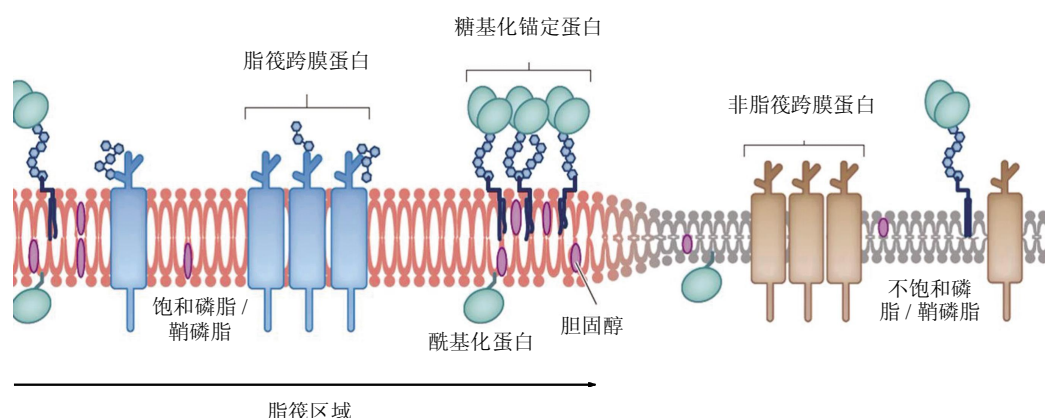


Fig. 1 Depiction of the lipid bilayer showing the differences between the raft and nonraft phases^[13]

图 1 细胞膜上的脂筏区域与非脂筏区域的结构对比^[13]

3 病毒出芽启动与 HA、NA

当脂筏的区域逐渐形成时, 病毒的 2 种糖蛋白 HA 与 NA 的聚集加入扩大了脂筏区域, 触发了病毒出芽开始. 而第 3 种膜蛋白 M2, 却被排除在脂筏区域以外, 但是 M2 仍然参与出芽的过程^[19, 34-35]. 早期的研究, 使用温度敏感型突变株, 发现 HA 缺失的流感病毒可以在活体中组装、出芽^[36], 但是近期的研究表明, 类病毒颗粒(VLP)只在 HA 糖蛋白参与下, 才可以从细胞中出芽, 表明 HA 可以让脂筏区域的膜发生弯曲, 触发流感病毒出芽^[19]. HA 是一种多聚化的糖蛋白, 大约是由 530 多位氨基酸残基组成, 分子质量约为 76 ku, 主要负责与宿主细胞识别, 并且促进内吞到宿主细胞中. HA 的跨膜区是由 27 个残基组成, 其中 3 个被棕榈酰化的半胱氨酸(其中 2 个位于胞内区), 可以与脂筏相互作用. Chen 等发现, 若是突变了 HA 的跨膜区域氨基酸残基会削弱流感病毒的复制能力, 但在 NA 病毒缺失株中, 病毒体组装和出芽依然正常^[36-37].

在类病毒(VLP)体系中, 单独组装 NA 或者 M2 蛋白, 也可以在细胞中出芽, 若是将 3 种蛋白同时组装到 VLP 中, 会大大提高 VLP 的出芽和释放^[19, 38]. 这些结果暗示, 在触发病毒出芽中, 每一种膜蛋白都对病毒出芽起到一定作用, 而不能单独归结为哪一种病毒原件.

4 病毒体的组装与 M1

当 3 种膜蛋白被聚集到脂筏区域后, 下一步是病毒体的组装. 膜上 HA、NA 与 M1 的相互结合, M1 多聚化平铺在整个脂筏的内表面, 并且可以与刚形成的 RNPs 复合物相互作用, 将病毒的遗传物质装入到新生病毒体中. M1 蛋白在整个组装过程中起到一种桥梁的作用, 不仅将病毒膜蛋白与病毒内部蛋白复合物联系到一起, 还可以与大部分的病毒原件相互作用^[39-41]. M1 蛋白是由 252 个氨基酸残基组成, 形成 3 个结构域, 其中中间的结构域可以多聚化, 可以与 RNP 相互结合作用^[41-42]. 由于 M1 可以与 HA、NA 的跨膜区、胞内近膜区相互作

用而使 M1 进入到脂筏磷脂中, 所以 M1 在组装的过程中, 可能对脂筏膜的弯曲起到一定作用, 进一步形成出芽体. 除此之外, M1 蛋白也会影响流感病毒的形状. 流感病毒一般存在两种形态, 一种是球型, 另一种是纤维状, 后者更普遍. Calder 等^[43]和 Bialas 等^[44]发现, 两种形态的流感病毒, M1 蛋白的螺旋结构有很大的区别, 并且 M1 在球形的流感病毒中都是呈现单体. Rossman 等^[34]认为可能在组装的过程中, M1 在脂筏的环境下, 被多聚化, 伸长了病毒体, 使流感病毒形成纤维状. 在组装的后期, 在 M1 的招募下, M2 蛋白会进入到流感病毒组装位点的边缘.

5 病毒体的膜剪切与释放

流感病毒出芽的最后一步就是膜的剪切, 发生在出芽体的“颈部”即脂筏区域与非脂筏区的边缘. 早期研究认为大部分病毒出芽的膜剪切方式是依赖 ESCRT 蛋白复合物调节, 导致胞膜产生足够的变形. ESCRT 蛋白一般由 4 种复合组成, ESCRT-0, -I, -II 和 -III, 其中 ESCRT-0, -I, -II 主要与目标蛋白结合、聚集, 使膜发生弯曲, 而 ESCRT-III 参与膜的剪切^[45-46]. 如 Van、Garrus 等发现, HIV 病毒基质蛋白的 P(T/S)AP 区段可以间接激活 ESCRT-I 等复合物在病毒出芽区内膜中大量聚集而产生一种收缩力, 使出芽区发生变形, 导致病毒体的颈部位置直径小于 50 nm, 进一步收缩后使膜发生剪切^[46-48]. 但是最近研究发现, 流感病毒的剪切不是依赖于 ESCRT 的复合物的调节, 而是 M2 蛋白在流感病毒体膜剪切中起到至关重要的作用^[17, 49].

流感病毒 M2 蛋白是一种跨膜蛋白(图 2), Wang、Jason 等分别使用固体核磁和液体核磁的方法证明 M2 蛋白在膜中呈现四聚体结构, 其中甲型流感 M2 蛋白的 19 个跨膜氨基酸残基组成离子通道, 胞内近膜区 17 个两性氨基酸残基, 形成平行于膜的区域^[51-53]. 早期 M2 蛋白都被认为只具调节 pH 的作用, 但是 Lamb、Rossman 等发现 M2 蛋白 C 端近膜的亲水亲脂两性区域(APH), 可以直接插入到磷脂双分子层中. 特别在含一定浓度的胆固醇条件下可以使细胞膜产生很强的弯曲, 但在很高浓度的胆固醇条件下, 却无法造成包膜弯曲. Schmidt 等^[54]也通过小角度衍射的方法, 发现在 M2 跨膜区参与下, M2 的 APH 可以使细胞膜发生弯曲. 所以, 流感病毒组装完成后, M2 蛋白大量聚

集到病毒体的 Lo 区域与 Ld 区域的交界处, M2 的 APH 区插入到膜中磷脂中, 造成边界发生强烈弯曲, 病毒在强大收缩力下, 其颈部的直径可能小于十几纳米, 直接导致病毒自行发生剪切. 实验表明, 若将 M2 的 APH 区段氨基酸全部突变, 发现流感病毒无法完成出芽, 并且可以发现组装完成的病毒会在其宿主细胞表面形成小颗粒形态^[17, 54]. 关于 M2 蛋白到底是如何弯曲细胞膜的, Campelo 等^[55]认为当 M2 的 APH 插入到 Lo 与 Ld 的交界磷脂中后, 会造成磷脂头被挤开, 导致 Ld 的两层疏水基产生配对的错位, 而这种错位需要通过膜的弯曲, 才能够被抵消. 出芽最后过程, 在细胞的唾液酸与 HA 受体的作用下病毒体仍然附着在宿主的膜表面, 需要通过 NA 糖蛋白水解唾液酸并且抑制宿主 HA 受体的作用, 最终完成释放病毒体^[56].

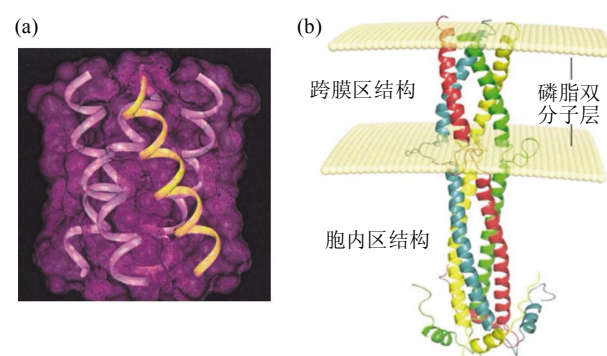


Fig. 2 The structure of influenza M2 protein^[50-51]

图 2 流感病毒 M2 蛋白结构^[50-51]

(a)甲型流感病毒 M2 蛋白跨膜区. (b)乙型流感病毒 M2 蛋白跨膜区.

6 结 语

流感病毒在脂筏上的组装、剪切、释放, 是一个多步骤、复杂的生理过程, 需要各种病毒蛋白的参与(图 3)^[57]. 尤其是脂筏膜弯曲, 大量研究表明, 它是逐渐形成的过程, HA、NA、M1、M2 等病毒蛋白在整个出芽过程中都能使膜弯曲, 而并不是由某一种蛋白直接就决定膜的弯曲. 从流感病毒生活史来看, 病毒上的各种蛋白不单单只有一种功能, 它们常常在病毒的不同阶段起到不同功能. 例如 M2 蛋白, 在病毒感染期, M2 的离子通道可调节 pH, 释放病毒进入到宿主体内, 在增殖期, M2 位于高尔基体, 可以阻止 RNPs 的酸化, 而在病毒的出芽期, M2 又具有剪切膜的功能. 最近 Rupert Beale 等发现 M2 还能够与宿主中的 LC3 相互作用阻止病毒体被宿主细胞吞噬^[52, 58]. 近些年来, 单一

作用于某种病毒原件的流感药物,如针对NA蛋白的药物虽然能很好地抑制流感,但是仍然由于突变产生病毒逃逸株^[59-61]。而多种病毒因子参与出芽的概念,告诉我们可以设计多个药物靶点,用cocktail的方法来避免病毒逃逸。

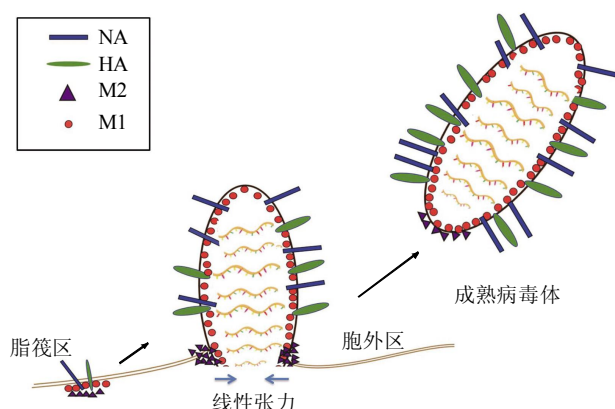


Fig. 3 Model of influenza virus budding^[57]

图3 流感病毒出芽模式图^[57]

近几年,对流感病毒出芽的研究获得很大突破,但是同时还有很多问题仍然未解决。例如,流感病毒的脂筏区膜弯曲的精确分子机制是什么? M2蛋白、RNPs等蛋白是如何被运输到脂筏区的? Bruce等^[62]和 Amorim等^[63]发现宿主体内的Rab11蛋白可以促进病毒蛋白、核酸的组装,那么Rab11是否直接参与病毒蛋白的运输和出芽?通过对这些问题的探索,人们会对流感病毒的出芽机制有更深入理解,为相关抗流感药物的设计奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] Chen Y, Liang W, Yang S, *et al.* Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. *The Lancet*, 2013, **381**(9881): 1916-1925
- [2] Zhou J, Wang D, Gao R, *et al.* Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus. *Nature*, 2013, **499**(7459): 500-503
- [3] Krammer F, Palese P. Universal influenza virus vaccines: need for clinical trials. *Nature Immunology*, 2014, **15**(1): 3-5
- [4] Shi Y, Zhang W, Wang F, *et al.* Structures and receptor binding of hemagglutinins from human-infecting H7N9 influenza viruses. *Science*, 2013, **342**(6155): 243-247
- [5] Lu G, Hu Y, Wang Q, *et al.* Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature*, 2013, **500**(7461): 227-231
- [6] Liu D, Shi W, Shi Y, *et al.* Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses. *The Lancet*, 2013, **381**(9881): 1926-1932
- [7] Jagger B, Wise H, Kash J, *et al.* An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 2012, **337**(6091): 199-204
- [8] Krug R, Lamb R. *Fields Virology*. Netherland: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001: 1487-1503
- [9] Yang H, Nguyen H T, Carney P J, *et al.* Structural and functional analysis of surface proteins from an A (H3N8) influenza virus isolated from New England harbor seals. *Journal of Virology*, 2014, **JVI**. 02723-02714
- [10] Kradin R L, Fishman J A. *Viruses and The Lung*. Berlin: Springer, 2014: 79-86
- [11] Zhang W, Shi Y, Lu X, *et al.* An airborne transmissible avian influenza H5 hemagglutinin seen at the atomic level. *Science*, 2013, **340**(6139): 1463-1467
- [12] Zhang X, Lu G, Qi J, *et al.* Structure of measles virus hemagglutinin bound to its epithelial receptor nectin-4. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, **20**(1): 67-72
- [13] Wu Y, Bi Y, Vavricka C J, *et al.* Characterization of two distinct neuraminidases from avian-origin human-infecting H7N9 influenza viruses. *Cell Research*, 2013, **23**(12): 1347-1355
- [14] Russell R J, Gamblin S J, Skehel J J. Influenza glycoproteins: hemagglutinin and neuraminidase. *Textbook of Influenza*, 2nd Edition, 2013: 67-100
- [15] Ali A, Avalos R T, Ponimaskin E, *et al.* Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *Journal of Virology*, 2000, **74**(18): 8709-8719
- [16] Hilsch M, Jungnick N, Sieben C, *et al.* Role of M1 self-organization in influenza virus assembly: a combined rics and AFM study. *Biophysical Journal*, 2014, **106**(2): 61a
- [17] Rossman J S, Jing X, Leser G P, *et al.* Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 2010, **142**(6): 902-913
- [18] Yu Y, Li X, Hao P, *et al.* Research/review: structure and linkage disequilibrium analysis of adamantane resistant mutations in influenza virus M2 proton channel. *Current Drug Metabolism*, 2014, **15**(5): 526-534
- [19] Chen B J, Leser G P, Morita E, *et al.* Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *Journal of Virology*, 2007, **81**(13): 7111-7123
- [20] Leser G P, Lamb R A. Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology*, 2005, **342**(2): 215-227
- [21] Ohkura T, Momose F, Ichikawa R, *et al.* Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase mutually accelerate their apical targeting through clustering of lipid rafts. *Journal of Virology*, 2014, **88**(17): 10039-10055
- [22] Wang X, Hinson E R, Cresswell P. The interferon-inducible protein

- viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host & Microbe*, 2007, **2**(2): 96–105
- [23] Brown D. Structure and function of membrane rafts. *International Journal of Medical Microbiology*, 2001, **291**(6): 433–437
- [24] Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 2009, **327**(5961): 46–50
- [25] Pike L J. Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 2006, **47**(7): 1597–1598
- [26] Head B P, Patel H H, Insel P A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2014, **1838**(2): 532–545
- [27] Naulin P A, Alveal N A, Barrera N P. Toward atomic force microscopy and mass spectrometry to visualize and identify lipid rafts in plasmodesmata. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**(234): 1–9
- [28] Bischof A A, Wilke N. Molecular determinants for the line tension of coexisting liquid phases in monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2012, **165**(7): 737–744
- [29] Garcia-Saez A J, Chiantia S, Schwille P. Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(46): 33537–33544
- [30] Döbereiner H, Käs J, Noppl D, *et al.* Budding and fission of vesicles. *Biophysical Journal*, 1993, **65**(4): 1396–1403
- [31] Cary L, Cooper J. Molecular switches in lipid rafts. *Nature*, 2000, **404**(6781): 945–947
- [32] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, **387**(6633): 569–572
- [33] Suomalainen M. Lipid rafts and assembly of enveloped viruses. *Traffic*, 2002, **3**(10): 705–709.
- [34] Rossman J S, Jing X, Leser G P, *et al.* Influenza virus M2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *Journal of Virology*, 2010, **84**(10): 5078–5088
- [35] Takeda M, Leser G P, Russell C J, *et al.* Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (25): 14610–14617
- [36] Pattnaik A K, Brown D J, Nayak D P. Formation of influenza virus particles lacking hemagglutinin on the viral envelope. *Journal of Virology*, 1986, **60**(3): 994–1001
- [37] Chen B J, Takeda M, Lamb R A. Influenza virus hemagglutinin (H3 subtype) requires palmitoylation of its cytoplasmic tail for assembly: M1 proteins of two subtypes differ in their ability to support assembly. *Journal of Virology*, 2005, **79**(21): 13673–13684
- [38] Liu C, Eichelberger M C, Compans R W, *et al.* Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *Journal of Virology*, 1995, **69**(2): 1099–1106
- [39] Gómez-Puertas P, Albo C, Pérez-Pastrana E, *et al.* Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *Journal of Virology*, 2000, **74**(24): 11538–11547
- [40] Barman S, Adhikary L, Chakrabarti A K, *et al.* Role of transmembrane domain and cytoplasmic tail amino acid sequences of influenza A virus neuraminidase in raft association and virus budding. *Journal of Virology*, 2004, **78**(10): 5258–5269
- [41] Brunotte L, Flies J, Bolte H, *et al.* The nuclear export protein of H5N1 Influenza A viruses recruits matrix 1 (M1) protein to the viral ribonucleoprotein to mediate nuclear export. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(29): 20067–20077
- [42] Shtykova E V, Baratova L A, Fedorova N V, *et al.* Structural analysis of influenza A virus matrix protein M1 and its self-assemblies at low pH. *PloS One*, 2013, **8**(12): e82431
- [43] Calder L J, Wasilewski S, Berriman J A, *et al.* Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(23): 10685–10690
- [44] Bialas K M, Bussey K A, Stone R L, *et al.* Specific nucleoprotein residues affect influenza virus morphology. *Journal of Virology*, 2014, **88**(4): 2227–2234
- [45] Hurley J H, Boura E, Carlson L A, *et al.* Membrane budding. *Cell*, 2010, **143**(6): 875–887
- [46] Van Engelenburg S B, Shtengel G, Sengupta P, *et al.* Distribution of ESCRT machinery at HIV assembly sites reveals virus scaffolding of ESCRT subunits. *Science*, 2014, **343**(6171): 653–656
- [47] Garrus J E, Von Schwedler U K, Pornillos O W, *et al.* Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 2001, **107**(1): 55–65
- [48] Chamontin C, Rassam P, Ferrer M, *et al.* HIV-1 nucleocapsid and ESCRT-component Tsg101 interplay prevents HIV from turning into a DNA-containing virus. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(1): 336–347
- [49] Chen B J, Lamb R A. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology*, 2008, **372**(2): 221–232
- [50] Wang J, Pielak R M, McClintock M A, *et al.* Solution structure and functional analysis of the influenza B proton channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, **16**(12): 1267–1271
- [51] Wang J, Kim S, Kovacs F, *et al.* Structure of the transmembrane region of the M2 protein H⁺ channel. *Protein Science*, 2001, **10**(11): 2241–2250.
- [52] Pielak R M, Chou J J. Influenza M2 proton channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, **1808**(2): 522–529
- [53] Wang J, Schnell J R, Chou J J. Amantadine partition and localization in phospholipid membrane: a solution NMR study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, **324**(1): 212–217
- [54] Schmidt N W, Mishra A, Wang J, *et al.* Influenza virus A M2 protein generates negative Gaussian membrane curvature necessary for budding and scission. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**(37): 13710–13719
- [55] Campelo F, Malhotra V. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annual Review of Biochemistry*, 2012, **81**: 407–427
- [56] Li Q, Sun X, Li Z, *et al.* Structural and functional characterization

- of neuraminidase-like molecule N10 derived from bat influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(46): 18897–18902
- [57] Gottlinger H G. Influenza exits the cell without an ESCRT. *Cell*, 2010, **142**(6): 839–841
- [58] Beale R, Wise H, Stuart A, *et al.* A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host & Microbe*, 2014, **15**(2): 239–247
- [59] Cho Y W, Kim J D, Park K. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2003, **55**(6): 721–734
- [60] Wadia J S, Stan R V, Dowdy S F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature Medicine*, 2004, **10**(3): 310–315
- [61] Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nature Medicine*, 2002, **8**(9): 950–954
- [62] Bruce E A, Digard P, Stuart A D. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *Journal of Virology*, 2010, **84**(12): 5848–5859
- [63] Amorim M J, Bruce E A, Read E K, *et al.* A Rab11-and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *Journal of Virology*, 2011, **85**(9): 4143–4156

Influenza Virus Assembly and Budding in Lipid Rafts*

MA Kun, WANG Yu-Juan, WANG Jun-Feng**

(High Magnetic Field Laboratory, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract Influenza A virus causes annual epidemics, and occasional pandemics that bring a significant global health threat. Influenza virus, which belongs to the Orthomyxoviridae family, is an enveloped virus that contains a segmented and negative-sense RNA genome. The assembly and budding of progeny influenza is a complicated and multi-step process involving many viral factors. Influenza budding occurs in lipid raft domains of cells membrane. Firstly, two viral glycoproteins HA and NA, concentrate in lipid rafts to initiate the budding process by causing membrane enlargement and curvature. Secondly Matrix protein 1 (M1), which forms the inner virion matrix, is then recruited to the budding site followed by the incorporation of viral VPNS and M2 proteins. In the later stages of budding, M2 is concentrated to the bottom of the budding virion at the lipid rafts boundary, resulting in viral scission and virion release.

Key words influenza virus, lipid rafts, virus assembly, membrane budding, membrane scission, protein M2

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0014

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (5049696).

**Corresponding author.

Tel: 86-551-65595652, E-mail: junfeng@hml.ac.cn

Received: January 14, 2015 Accepted: April 28, 2015