

天然免疫限制因子 Tetherin 的抗病毒机理研究进展*

尹鑫^{1, 2)} 魏萍²⁾ 王晓钧^{1)**}

(¹⁾ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001; ²⁾ 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 天然免疫限制因子 Tetherin(骨髓基质细胞抗原 2)是 I 型干扰素诱导产生的 II 型跨膜蛋白。Tetherin 通过其特殊的拓扑结构, 在病毒出芽过程中将病毒粒子连接在细胞膜表面, 限制病毒的有效释放, 从而发挥广谱性的抗病毒活性, 而病毒也可以通过多种策略拮抗 Tetherin 的抗病毒活性。病毒与宿主长期抗争进化的结果表现为病毒特定拮抗蛋白对抗不同种属细胞 Tetherin 的限制存在种属特异性。本文通过对 Tetherin 的分子结构、抗病毒活性及其拮抗蛋白的对抗机制等最新进展进行综述, 为研究病毒与宿主相互作用的分子机制以及新型抗病毒药物的筛选提供借鉴。

关键词 Tetherin, 抗病毒活性, 拮抗蛋白, 进化

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00148

病毒感染宿主细胞后, 可诱导产生干扰素, 而后通过信号传导通路诱导刺激宿主防御基因的产生, 从而使得宿主细胞处于“抗病毒态”; I 型干扰素诱导产生的 Tetherin(骨髓基质细胞抗原 2)可直接靶向病毒蛋白, 在病毒出芽过程中发挥抗病毒作用。Tetherin 又称 CD317、HM1.24、BST-2, 最早于 1995 年从风湿性关节炎患者的关节细胞中克隆获得, 是终末分化 B 细胞的特异性表面标志, 可能在 B 细胞的发育过程中发挥作用, 同时也是骨髓瘤免疫疗法的靶向抗原^[1-3]。Tetherin 在哺乳动物细胞中普遍存在, 在 B 细胞、T 细胞、单核细胞、巨噬细胞、类浆树突状细胞中固有表达。由于 Tetherin 的启动子区域含有相对保守的干扰素应答元件和 STAT3 结合位点, 因此在多种细胞中, I 型、II 型干扰素可诱导其表达, 同时在髓系细胞和淋巴细胞中, 促炎性细胞因子也可诱导 Tetherin 的表达^[4]。

目前, Tetherin 已在多种哺乳动物的基因组中被鉴定, 虽序列差异较大, 但均具有限制逆转录病毒粒子从感染细胞释放的功能。人源性 Tetherin 基因呈单体型, 仅在蛋白胞外区存在非同义替换的单核苷酸多态性^[5]。某些旧大陆猴细胞编码的 Tetherin 存在多态性; 牛、山羊、绵羊等反刍动物

中, Tetherin 基因存在两种同源体, 但抗病毒活性相似^[6]。不同种属 Tetherin 蛋白的序列差异性, 可能是 Tetherin 与病毒拮抗蛋白相互对抗过程中的进化标记特征。

1 Tetherin 抗病毒活性的发现

早期研究证实: 在某些特定细胞中(HeLa 细胞、原代 CD4⁺ T 细胞), Vpu 是人类免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)病毒粒子有效释放的关键辅助蛋白, 因此, 在 HIV-1 非允许细胞中, 可能存在未知的限制性因子或缺乏 Vpu 的协同共因子。关于 HIV-1 允许细胞和非允许细胞形成的异核融合体对 HIV-1 敏感性的研究表明, 限制表型在异核体细胞中重现, 由此推测, 非允许细胞可能表达 Vpu 对抗的限制性因子。随后研究发现, 该内源性的限制性因子是 IFN- α 诱导型的膜蛋白, Vpu 可对抗其抗病毒

* 国家自然科学基金面上项目(31072113), 国家自然科学基金优秀青年基金项目(31222054), 兽医生物技术国家重点实验室基金项目(SKLVBP201205)和中央级公益性基本科研业务费预算增量项目(2012ZL080)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 18946066285, E-mail: xjw@hvri.ac.cn

收稿日期: 2013-04-08, 接受日期: 2013-08-14

活性. 通过 cDNA 基因芯片技术, 分析干扰素处理和未处理细胞 mRNA 的差异表达, 鉴定出 Tetherin 是限制 HIV-1 释放的限制性因子^[7].

目前, 已发现 Tetherin 能限制逆转录病毒、丝状病毒(埃博拉病毒、马尔堡病毒)、沙粒病毒(拉沙热病毒、马秋波病毒)、副黏病毒(尼帕病毒)、流感病毒、 γ -疱疹病毒(卡波西肉瘤相关疱疹病毒)、弹状病毒(水泡性口炎病毒)、丙型肝炎病毒、登革病毒、布尼亚病毒等^[8-11]. Tetherin 广谱性的抗病毒活性可能源于病毒与 Tetherin 均可靶向宿主细胞来源的脂质双分子层的特征, 因此 Tetherin 可限制从细胞膜出芽的部分囊膜病毒.

2 Tetherin 的分子特征

人源性 Tetherin 是由 180 个氨基酸编码而成的 II 型膜蛋白, 定位于质膜或细胞区室中, 由于糖基化修饰, 蛋白质分子质量为 29~33 ku. Tetherin 由 N 端胞质尾区(CT)、跨膜结构区(TM)、coiled-coil 胞外结构域(EC)以及 C 端糖基磷脂酰肌醇锚定域(GPI)构成. Tetherin 的 N 端跨膜区和 C 端 GPI 插入细胞膜形成特殊拓扑结构(图 1), 目前仅发现朊病毒蛋白 PrP 与 Tetherin 具有相似结构^[12]. 定位于胞外结构域的三个半胱氨酸形成分子间二硫键, 从而构成 Tetherin 的二聚体. 该结构特征决定了 Tetherin 的抗病毒活性, 同时也决定它对不同病毒拮抗物的敏感性.

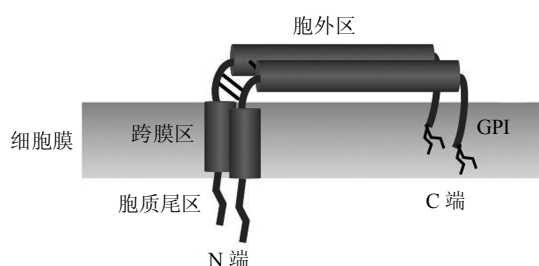


Fig. 1 The molecular structure of Tetherin

图 1 Tetherin 的分子结构

不同物种 Tetherin 胞质尾区序列同源率较低, 是 Tetherin 细胞内转运的关键功能域, 同时也影响 Tetherin 生命周期以及对不同病毒拮抗蛋白的敏感性. 灵长类动物 Tetherin 的胞质尾区含一个保守的双酪氨酸基序(Y₆X₈), 负责招募网格衔接蛋白复合物, 与 AP-1 和 AP-2 配体相互作用, 介导 Tetherin

蛋白内吞过程^[13]. 人源性 Tetherin 含有 S₃T₄S₅ 基序, 其在 Vpu/ β -TrCP 依赖性的泛素化过程中是必需的, 而其他物种 Tetherin 胞质尾区却不存在该基序^[14]. 同时, 人源性 Tetherin 的 K₁₈、K₂₁ 是卡巴西肉瘤疱疹病毒(KSHV)编码的 RING-CH 连接酶 K5 蛋白对 Tetherin 进行泛素化的关键位点^[15]. 在非人类灵长类动物 Tetherin 同系物的胞质尾区含有 D/GDIWK 基序, 决定猴免疫缺陷病毒(SIV) Nef 蛋白对 Tetherin 拮抗作用的敏感性^[16]. Tetherin 跨膜区呈单跨膜螺旋结构, 是与 HIV-1 Vpu 跨膜区相互作用的结构域^[17].

Tetherin 胞外区形成 α 螺旋结构, 是其发挥抗病毒活性的关键功能域, 同时也是与人类免疫缺陷病毒 II 型(HIV-2) Env 蛋白相互作用的功能域. 目前已鉴定的 Tetherin 同系物胞外区均含有 3 个半胱氨酸残基和 2 个糖基化位点. 3 个半胱氨酸残基参与 Tetherin 分子间二硫键的形成, 从而构成二聚体形式, 二硫键的形成是 Tetherin 发挥抗病毒作用的关键, 突变分析表明, 3 个半胱氨酸残基全部突变的 Tetherin 突变体虽定位于细胞膜上, 但完全丧失抗病毒活性(除拉沙热病毒和马尔堡病毒)^[18]. EC 结构域含有几个保守性氨基酸, 通过微弱的 coiled-coil 结构域互作(包括 E₁₀₅-K₁₀₆ 和 E₁₃₃-R₁₃₈ 两个螺旋间盐桥与一个螺旋间氢键 N₁₄₁)而稳定二聚体, 同时 α 螺旋内的若干个氨基酸使得 Tetherin 的构象更富柔韧性从而使得 Tetherin 在与病毒粒子的相互作用过程中, 形成二聚体解离和重构的动态模式, 利于 Tetherin 抗病毒功能的发挥^[19]. 胞外区的 2 个 N 连接糖基化位点是异构糖基化的底物, 有助于蛋白质的正确折叠和顺向运输^[20], 然而糖基化位点是否是 Tetherin 发挥抗病毒活性所必需的关键位点尚存争议, 其重要性亟待发掘.

Tetherin 的 C 端含有一个 GPI 锚定域, 是 Tetherin 发挥抗病毒活性的关键功能域, 缺失 GPI 锚定域可致使 Tetherin 的抗病毒活性丧失. 新生 Tetherin 蛋白可能在 160 位丝氨酸残基位点进行裂解, 而后在内质网中装配预加工的 GPI 锚定点, 因此, 成熟的 Tetherin 蛋白是以 C 端 GPI 锚点嵌入细胞膜脂筏的单跨膜糖基化蛋白形式存在.

3 Tetherin 的抗病毒作用机制

越来越多的证据表明, Tetherin 通过直接将病毒粒子限定在细胞膜表面的方式发挥抗病毒作用, 而 Tetherin 特殊的拓扑结构特征是 Tetherin 发挥抗

病毒活性的关键. 由三个不相关异质蛋白的相似功能域(转铁蛋白受体的 TM 结构域、强直性肌营养不良蛋白激酶的螺旋-螺旋结构域、尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活受体的 GPI 锚定域)组合而成的 Tetherin 样蛋白, 虽与 Tetherin 的序列无相关性, 但人工生成的 Tetherin 也具有抗病毒活性^[21]. 因此, 四个功能性结构域构成的特殊拓扑结构对于 Tetherin 发挥抗病毒活性至关重要.

Tetherin 抗病毒模型可能存在两种模式: 模式 1, Tetherin 单体 TM 结构域以及 GPI 结构域共同锚定于细胞膜或病毒粒子表面, 锚定于细胞膜的 Tetherin 单体和锚定于病毒粒子表面的 Tetherin 单体通过胞外区的二硫键构成二聚体, 从而形成限制病毒粒子释放的抗病毒模型. 模式 2, Tetherin 单体膜锚定域分别插入病毒粒子表面和细胞膜, 通过平行或反平行方式组合构型. 目前通过生物化学、

电镜观察以及晶体结构等方面研究证实了以上模式的存在性, 水解磷脂酰肌醇的特定性磷脂酶 C (Pi-PLC)能切除 GPI 锚定域, 但并不能有效地将限定在细胞膜表面的病毒粒子释放, 表明即使切除 GPI 锚点, 单体依然可通过 TM 结构域插入细胞膜和病毒粒子表面, 推测可能存在 EC 自我作用模型和反平行横跨膜构型^[22]. 再者, 电镜分析细胞膜和病毒粒子表面之间的距离得知: 如果 Tetherin 单体以平行方式插入细胞膜和病毒粒子表面(EC 自我相互作用模型), 病毒粒子与细胞膜之间的距离应小于 3~5 nm; 事实上, 病毒粒子与细胞膜之间的距离较预测距离大, 推测膜横跨模型的存在, 同时 Tetherin 胞外区的晶体结构也证实了膜横跨模型的存在性^[18]. 根据已有研究绘制图 2, 总结了 Tetherin 抗病毒的两种作用模型.

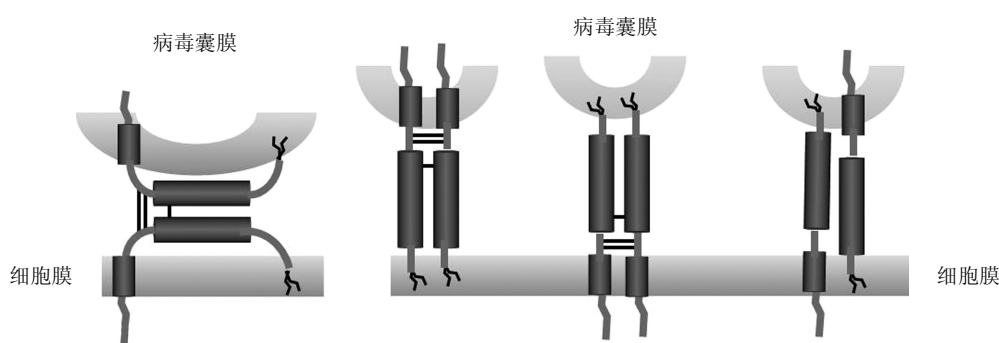


Fig. 2 Models of molecular tethering mechanism

图 2 Tetherin 的抗病毒作用模式

被 Tetherin 锚定在细胞膜表面的病毒粒子可能通过内化的方式运输至晚期细胞内体或溶酶体而被降解, 从而降低出芽病毒粒子的数量^[23]. 同时 Tetherin 可能影响细胞间病毒的传播. 但目前相关的研究数据存在争议, 由于细胞间传播是 HIV-1 在宿主靶细胞和二级淋巴组织中感染传播的主要模式, 尚需阐明 Tetherin 在 HIV-1 细胞间传播过程扮演的角色^[24]. 部分研究发现, Tetherin 不但影响病毒粒子的产量, 同时能降低 Vpu 缺失病毒粒子的感染能力^[25], 推测 Tetherin 可能干扰病毒 Gag 蛋白的加工过程, 从而影响病毒的形态.

4 Tetherin 的拮抗蛋白

Tetherin 靶向病毒脂质囊膜, 而并非特定的病毒编码蛋白, 因此, 病毒不能简单地通过结构蛋白的变异逃逸 Tetherin 的限制作用. 首先, 病毒可通过切断干扰素途径的方式, 抑制 Tetherin 等干扰素诱导性抗病毒因子的表达; 其次, 病毒进化特定的出芽方式, 避免从 Tetherin 富集的细胞膜区域出芽, 例如人类嗜 T 淋巴细胞 I 型病毒 (HTLV-I) 通过细胞至细胞的侵染方式逃避 Tetherin 的限制作用^[26]; 再者, 病毒通过编码 Tetherin 拮抗蛋白对抗

其抗病毒活性, 目前已报道, HIV-1 Vpu、HIV-2 Env、SIV Env、埃博拉病毒(Ebola) GP、SIV Nef、KSHV K5、猫免疫缺陷病毒(FIV) Env、仙台病毒 GP 等蛋白通过不同的机制对抗 Tetherin 的限制作用, 通常它们的对抗作用呈现种属特异性^[11, 27-30].

4.1 HIV-1 Vpu 拮抗 Tetherin 的作用活性

Vpu 蛋白是从 HIV-1 Vpu-Env 双顺反子 mRNA 翻译表达, 由 81 个氨基酸构成的 I 型跨膜蛋白. HIV-1 Vpu N 端是由 27 个氨基酸构成的单股 α 螺旋跨膜区, C 端为 54 个氨基酸构成的双股 α 螺旋胞质域, 其在 HIV-1 感染后期表达, 不包装入病毒粒子, 通常在感染细胞的反面高尔基体或胞内体中. HIV-1 Vpu 招募 β -TrCP 蛋白, 通过蛋白酶体途径降解新合成的 CD4 分子, 阻止 gp160 与 CD4 的过早结合, 同时也具有促进病毒粒子释放的功能^[31].

Vpu 通过不同的策略对抗 Tetherin 的抗病毒活性. 其中, Vpu 可通过蛋白酶体或溶酶体降解细胞内 Tetherin 表达蛋白, 介入蛋白酶体或溶酶体抑制剂可部分恢复 Tetherin 的表达水平, 影响 Vpu 介导的病毒粒子释放功效. 然而, MG132 等蛋白酶体抑制剂的长时间孵育影响了蛋白酶体和溶酶体泛素化依赖性的降解作用, 从而不能区分蛋白酶体或内溶酶体途径在 Tetherin 降解中的作用. 业已证明, Vpu 招募 Skp1-Cullin1-F-box 泛素化连接酶复合物的 β -TrCP 亚基诱导 Tetherin 泛素化降解, 突变 Vpu 胞质区高度保守的磷酸化丝氨酸基序(DSGNES)的 β -TrCP 结合位点(S₅₂、S₅₆)或表达 β -TrCP 的突变体均能降低 Vpu 对抗 Tetherin 的活性, 但并不能致使 Vpu 完全丧失对抗 Tetherin 的功能, 同时突变人源性 Tetherin 胞质尾区的赖氨酸残基可使 Tetherin 突变体获得对抗 Vpu 诱导降解的能力, 但 Tetherin 突变体依然对 Vpu 介导的对抗作用敏感^[30]. Vpu 除了通过降解 Tetherin 的方式对抗其抗病毒活性, 同时也通过将 Tetherin 从病毒出芽位点移除的方式对抗其抗病毒功能, 大量研究已证实 Vpu 的介入表达能降低细胞表面 Tetherin 的表达量, 减少包装入病毒粒子内的 Tetherin 蛋白量. 其中, Vpu 可将新合成或循环过程中的 Tetherin 限定于反面高尔基体中, 从而干扰 Tetherin 转运至细胞膜的过程^[32], 其次, Vpu 可直接将细胞表面的 Tetherin 迁移至溶酶体中进行降解, 但该作用是泛素化依赖性的.

Vpu 的 TM 结构域与 Tetherin 的 TM 结构域相互作用, 发挥拮抗 Tetherin 的功能. 其中 Vpu 螺旋结构域疏水面的 A₁₄、A₁₈ 和 W₂₂ 等氨基酸以及 Tetherin 跨膜区的 I₃₄、L₃₇、L₄₁ 等氨基酸是决定 Vpu 与 Tetherin 相互作用的关键氨基酸^[33-34]. 更为重要的是, 灵长类动物 Vpu 蛋白对抗 Tetherin 的种属特异性主要决定于两者跨膜区之间的相互作用, 而不同种属 Tetherin 跨膜结构域 30~45 位氨基酸的差异显著, 因此非人类灵长类动物 Tetherin 蛋白对 HIV-1 Vpu 蛋白的对抗作用不敏感.

SIVgsn (greater spot-nosed monkey)、SIVmus (mustached monkey)、SIVmon (mona monkey)、SIVden(dent's mona monkey)等病毒编码的 Vpu 蛋白能对抗它们各自宿主细胞的 Tetherin 蛋白, 但 SIVcpz(chimpanzee)编码的 Vpu 蛋白不具有该功能^[35]. 进一步分析研究灵长类慢病毒编码的 Vpu 蛋白对抗 Tetherin 的关键位点和互作机理, 以及 Vpu 结合 Tetherin 后在细胞内的运转过程, 对于阐明灵长类慢病毒的进化起源以及天然免疫限制因子 Tetherin 在病毒进化中扮演的角色至关重要.

4.2 SIV Nef 蛋白拮抗 Tetherin 的作用活性

大多数 SIV 不编码 Vpu 蛋白, SIVmac(macaque)等通过编码的 Nef 蛋白对抗 Tetherin 的抗病毒活性^[29]. Nef 蛋白是定位于细胞膜胞内侧的酰化衔接蛋白, 能下调细胞表面 CD4、MHC- I、MHC- II 分子. SIV Nef 蛋白对抗灵长类动物的 Tetherin 蛋白, 但并不对抗人源性 Tetherin 的活性, 该特异性取决于非人类灵长类动物 Tetherin 胞质尾区的 5 个氨基酸(G/DDIWK), 在人源性 Tetherin 的相应区域插入该基序, 可使 Tetherin 突变体对 SIVmac Nef 蛋白介导的拮抗作用敏感. 已有研究证实, 丧失下调 CD4 能力的 SIV Nef 突变体, 也丧失了对抗非人类灵长类 Tetherin 的活性, 表明 Nef 蛋白拮抗 Tetherin 的作用机制可能与 CD4 的下调机制存在相似性, 但 MHC- I 的下调途径与对抗 Tetherin 的过程无关. 值得注意的是, HIV-1 和 HIV-2 编码的 Nef 并不具有对抗 Tetherin 的活性, 但具有部分对抗非人类灵长类(例如: 恒河猴和白颈白眉猴) Tetherin 的活性^[36].

4.3 HIV-2 (SIVtan)Env 蛋白与 Ebola GP 蛋白拮抗 Tetherin 的作用活性

Ebola、HIV-2、SIVtan、FIV 等病毒编码的囊膜蛋白具有对抗 Tetherin 的功能, 它们的作用机制

存在差异, 但似乎均靶向 Tetherin 的胞外结构域。目前已明确 HIV-2、SIVtan 编码的 Env 蛋白靶向各自物种 Tetherin 的胞外结构域, 引起 Tetherin 从质膜到核外周区域的重定位, 该策略与 Vpu 对抗人源性 Tetherin 的策略相似^[37]。HIV-2 与 HIV-1 不同, HIV-2 不编码 Vpu 蛋白, 但 HIV-2 Env 蛋白能行使 Vpu 的功能促进病毒粒子的释放。进一步研究表明, HIV-2 Env 通过对抗 Tetherin 的活性促进病毒粒子从感染细胞内释放, HIV-2 Env 蛋白拮抗 Tetherin 蛋白的活性呈现细胞依赖性, HIV-2 Env gp41 胞质尾区高度保守的内吞基序(GYxx□)和胞外基序决定其对人源性 Tetherin 的对抗活性。该基序通过招募网格衔接蛋白复合体(clathrin adaptor complex AP-2), 将与其结合的 Tetherin 蛋白从质膜迁移至核外周区室中。前体囊膜蛋白裂解为 gp120 和 gp41 的蛋白水解过程是對抗 Tetherin 活性所必需的, 未加工的前体囊膜蛋白(gp160)不能促进病毒粒子的释放。突变 HIV-2 Env 蛋白膜基部氨基酸 Y707 可使其丧失对抗 Tetherin 的功能, 同时人源性 Tetherin 胞外域氨基酸突变(A100D)可使 Tetherin 突变体对 HIV-2 Env 蛋白不敏感。有趣的是, 已有报道证实 SIV Env 蛋白也具有对抗多数灵长类动物 Tetherin 的活性, 但该对抗活性并不具有细胞依赖性。SIV Env 蛋白对抗 Tetherin 的关键功能性位点与 HIV-2 Env 蛋白的功能位点不同, 但是两者均需 gp41 胞质尾区高度保守的内吞基序(GYxx□)的参

与, 同时, Tetherin 螺旋结构域的 A100D 功能性位点突变并不影响 Tetherin 对 SIVmac Env 的敏感性。但它们对抗 Tetherin 的具体作用机制仍需进一步明确。

埃博拉病毒编码的 GP 蛋白对抗 Tetherin 的活性呈现广谱性, 可对人、鼠以及人造 Tetherin 蛋白发挥拮抗功能^[27]。GP 蛋白的结构与正确定位是其发挥对抗 Tetherin 作用的关键, 内质网滞留的 GP 突变体不能有效地促进病毒粒子出芽。GP 蛋白作为 Tetherin 的拮抗物并不通过影响 Tetherin 细胞内的表达水平, 或下调细胞表面 Tetherin 含量的方式发挥功能, 它可能采取了不同于目前所认知的 Tetherin 对抗机制克服不同物种 Tetherin 的限制作用, 这可能源于 Ebola 病毒广谱性的宿主感染谱。

4.4 KSHV K5 蛋白拮抗 Tetherin 的作用活性

KSHV 编码两种免疫调节性的膜相关蛋白 K3/MIR1 和 K5/MIR2。K5 蛋白能下调 MHC-I、PE-CAM-1、CD80/CD86、ICAM-1、IFN- γ 受体和 NKG20 等多种细胞表面标志的表达。蛋白质组学分析表明, K5 能靶向 Tetherin 蛋白, 下调其细胞表面的表达量, 拯救病毒的复制。K5 通过其 RING 功能域, 介导 Tetherin 胞质尾区 18 位的赖氨酸残基泛素化。泛素化的 Tetherin 被转运至 CD63 阳性的晚期胞内体区室中降解^[15]。表 1 和图 3 总结了 Tetherin 拮抗蛋白的种类与作用模式。

Table 1 Summary of viral Tetherin antagonists

表 1 Tetherin 的拮抗蛋白汇总

病毒	Tetherin 拮抗蛋白	拮抗机制	目标结构域	种属特异性
HIV-1	Vpu	下调 Tetherin 在细胞表面的表达量 / 降解	跨膜区	有
SIV gsn/mus/mon	Vpu	未知	未知	有
HIV-2	Env	引起 Tetherin 从质膜到核外周区室的重定位	胞外区	无
SIVcpz/gor	Nef	未知	胞质尾区(DDICK)	有
SIV smm/rcm/mac/aggm	Nef	未知	胞质尾区(DDICK)	有
SIVtan	Env	引起 Tetherin 从质膜到核外周区室的重定位	胞外区	无
FIV	Env	未知	未知	无
Ebola virus	GP	非降解途径	未知	无
KSHV	K5	下调 Tetherin 在细胞表面的表达量 / 溶酶体降解	胞质尾区(K18)	有

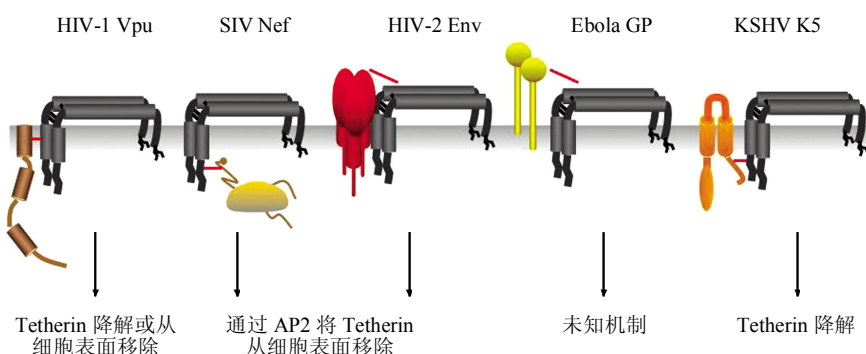


Fig. 3 Schematic representation of Tetherin and its viral antagonists

图 3 Tetherin 与其拮抗蛋白的作用模式

5 Tetherin 和灵长类逆转录病毒的进化

在动物与病毒长期斗争的过程中, 宿主形成了利用天然免疫防御系统来抵抗病毒感染的机制, 使得病毒不能够轻易实现跨种间传播. 而病毒在建立感染和适应宿主的过程中, 进化出可以有效抵抗宿主天然免疫限制的机制, 表现为适应宿主的新型病毒的出现和广泛传播. 在灵长类逆转录病毒的进化过程中, 形成了宿主限制性因子的多样性以及其拮抗蛋白的种属特异性等特征, 这些特性有效地控制了病毒的跨种间传播. 在不同病毒拮抗蛋白的选择压力下, 不同灵长类动物的 Tetherin 蛋白也相应地出现了阳性选择标记, 例如, 相对于其他灵长类动物 Tetherin 蛋白, 人源性 Tetherin 胞质尾区存在 5 个氨基酸(14-G/DDIWK-18), 这可能源于 Nef 蛋白的选择压力^[38].

SIVcpz 源于 SIVgsn 和 SIVrcm 的重组, 而获得 SIVgsn 编码的 Vpu 蛋白和 SIVrcm 编码的 Nef 蛋白^[39]. 推测原始的 SIVcpz 毒株编码的 Vpu 和 Nef 蛋白仅有微弱的对抗 Tetherin 的能力, 随着后期的持续进化, SIVcpz Nef 逐步获得对抗 Tetherin 的能力, 而 Vpu 蛋白保持了其下调细胞表面 CD4 的能力. 当 SIVcpz 克服种间限制感染人类, 由于缺乏 Nef 蛋白敏感的 DDIWK 基序, Nef 蛋白不能对抗人源性的 Tetherin, 随之 Vpu 蛋白获得对抗 Tetherin 的能力. 有趣的是, 仅有流行的 HIV-1 M 毒株通过 Vpu 蛋白对抗 Tetherin 的活性, 而 HIV-1 O 毒株与 P 毒株的 Vpu 蛋白拮抗 Tetherin 的作用不明显, HIV-1 不同毒株编码的 Vpu 蛋白的序列及

功能需进一步阐明^[40]. 由于 Nef 蛋白不能对抗人源性 Tetherin 的抗病毒活性, 同时 SIVsmm 派生的 HIV-2 不编码 Vpu 蛋白, 因此 HIV-2 通过其囊膜蛋白对抗人源性 Tetherin 的限制作用. 然而, 该对抗策略可能让病毒付出了一定的代价, 表现为 HIV-2 的低致病力. 尽管如此, 病毒对抗 Tetherin 策略的灵活性反映了在 HIV-1 和 HIV-2 前体病毒适应新宿主的过程中, Tetherin 发挥了不可估量的作用.

6 展 望

Tetherin 作为一种广谱性限制囊膜病毒释放的天然免疫因子, 其分子结构和抗病毒活性的研究较为深入, 但 Tetherin 广谱性限制囊膜病毒出芽的共有方式、病毒对抗 Tetherin 的精确作用机制、Tetherin 在细胞膜病毒装配和出芽过程中的作用以及拮抗蛋白结合 Tetherin 后在细胞内的运转过程尚不明确^[41]. 同时有待发现是否存在其他细胞因子参与 Tetherin 的抗病毒过程. 目前, 大量的体外实验证实 Tetherin 在限制囊膜病毒的传播和病毒粒子的产量方面发挥重要作用, 但仍需大量研究阐明其在病毒的细胞间传播所发挥的作用.

灵长类动物 Tetherin 蛋白的分子特征及抗病毒活性的研究较为深入, 但部分非灵长类动物 Tetherin 的基因序列以及抗病毒活性等方面的相关研究尚属空白, 明确不同种属哺乳动物的 Tetherin 基因序列、抗病毒活性以及逆转录病毒逃逸 Tetherin 的限制策略, 将为逆转录病毒的先天性免疫和种间屏障的分子机制研究提供直接证据.

虽然 Tetherin 在病毒的感染早期发挥重要功能, 但其在病毒感染的全身免疫应答中的重要性也需进一步阐明. 例如: 巨噬细胞是机体内重要的抗原递呈细胞, 同时也是 HIV-1 体内感染的靶细胞, 巨噬细胞内表达的 Tetherin 将病毒粒子限定在细胞内, 部分病毒粒子可靶向吞噬体进行蛋白水解, 同时也有部分病毒组分被抗原递呈, 那么 Tetherin 在获得性免疫应答的产生和增强方面发挥功能如何, 值得探讨. 最近研究表明: 在 HIV-1 突变体感染的 CD4⁺ T 细胞中, Tetherin 可侦测囊膜病毒的组装, 进而诱导 NF- κ B 依赖性的促炎性基因的表达, 推测该作用可招募大量的固有免疫细胞和获得性免疫细胞积聚于感染位点, 增强抗病毒应答^[42].

目前, 研究者基于 Tetherin 的抗病毒活性以及 Vpu 对 Tetherin 的对抗作用, 试图寻找治疗 HIV-1 的新策略, 例如, 通过干扰素等 Tetherin 诱导剂介入, 诱导 Tetherin 等限制性因子的表达, 或通过合成小分子化合物阻遏 Vpu 的功能, 增强 Tetherin 限制 HIV-1 的效果. 基于限制性因子的作用机制探索新型的 HIV-1 治疗方法也是可行的手段.

参 考 文 献

- [1] Billcliff P G, Rollason R, Prior I, *et al.* CD317/Tetherin is an organiser of membrane microdomains. *J Cell Sci*, 2013, **126**(7): 1553–1564
- [2] Goto T, Kennel S J, Abe M, *et al.* A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. *Blood*, 1994, **84**(6): 1922–1930
- [3] Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, *et al.* A CD317/Tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*, 2009, **184**(5): 721–736
- [4] Yoo H, Park S H, Ye S K, *et al.* IFN-gamma-induced BST2 mediates monocyte adhesion to human endothelial cells. *Cell Immunol*, 2011, **267**(1): 23–29
- [5] Gupta R K, Hue S, Schaller T, *et al.* Mutation of a single residue renders human Tetherin resistant to HIV-1 Vpu-mediated depletion. *PLoS Pathog*, 2009, **5**(5): e1000443
- [6] Arnaud F, Black S G, Murphy L, *et al.* Interplay between ovine bone marrow stromal cell antigen 2/Tetherin and endogenous retroviruses. *J Virol*, 2010, **84**(9): 4415–4425
- [7] Neil S J, Zang T, Bieniasz P D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 2008, **451** (7177): 425–430
- [8] Jouvenet N, Neil S J, Zhadina M, *et al.* Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by Tetherin. *J Virol*, 2009, **83**(4): 1837–1844
- [9] Pan X B, Han J C, Cong X, *et al.* BST2/Tetherin inhibits dengue virus release from human hepatoma cells. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e51033
- [10] Pan X B, Qu X W, Jiang D, *et al.* BST2/Tetherin inhibits hepatitis C virus production in human hepatoma cells. *Antiviral Res*, 2013, **98**(1): 54–60
- [11] Jones P H, Maric M, Madison M N, *et al.* BST-2/Tetherin-mediated restriction of chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1). *Virology*, 2013, **438**(1): 37–49
- [12] Moore R C, Lee I Y, Silverman G L, *et al.* Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol*, 1999, **292**(4): 797–817
- [13] Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, *et al.* Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. *J Cell Sci*, 2007, **120**(21): 3850–3858
- [14] Blanchet F P, Mitchell J P, Piguet V. beta-TrCP dependency of HIV-1 Vpu-induced downregulation of CD4 and BST-2/Tetherin. *Curr HIV Res*, 2012, **10**(9): 307–314
- [15] Pardieu C, Vigan R, Wilson S J, *et al.* The RING-CH ligase K5 antagonizes restriction of KSHV and HIV-1 particle release by mediating ubiquitin-dependent endosomal degradation of tetherin. *PLoS Pathog*, 2010, **6**(4): e1000843
- [16] Serra-Moreno R, Evans D T. Adaptation of human and simian immunodeficiency viruses for resistance to Tetherin/BST-2. *Curr HIV Res*, 2012, **10**(4): 277–282
- [17] Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, *et al.* HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/Tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J Biol Chem*, 2009, **284** (50): 35060–35072
- [18] Hinz A, Miguet N, Natrajan G, *et al.* Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/Tetherin ectodomain. *Cell Host Microbe*, 2010, **7**(4): 314–323
- [19] Dafa-Berger A, Kuzmina A, Fassler M, *et al.* Modulation of hepatitis C virus release by the interferon-induced protein BST-2/Tetherin. *Virology* 2012, **428**(2): 98–111
- [20] Sakuma T, Noda T, Urata S, *et al.* Inhibition of Lassa and Marburg virus production by Tetherin. *J Virol*, 2009, **83**(5): 2382–2385
- [21] Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, *et al.* Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell*, 2009, **139**(3): 499–511
- [22] Fitzpatrick K, Skasko M, Deerinc T J, *et al.* Direct restriction of virus release and incorporation of the interferon-induced protein BST-2 into HIV-1 particles. *PLoS Pathog*, 2010, **6**(3): e1000701
- [23] Sato K, Yamamoto S P, Misawa N, *et al.* Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology*, 2009, **6**(1): 53
- [24] Coleman C M, Spearman P, Wu L. Tetherin does not significantly restrict dendritic cell-mediated HIV-1 transmission and its expression is upregulated by newly synthesized HIV-1 Nef. *Retrovirology*, 2011, **8**(1): 26
- [25] Chu H, Wang J J, Qi M, *et al.* Tetherin/BST-2 is essential for the formation of the intracellular virus-containing compartment in

- HIV-infected macrophages. *Cell Host Microbe*, 2012, **12** (3): 360–372
- [26] Ilinskaya A, Derse D, Hill S, *et al.* Cell-cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent Tetherin restriction. *Virology*, 2013, **436**(1): 201–209
- [27] Yasuda J. Ebolavirus replication and Tetherin/BST-2. *Front Microbiol*, 2012, **3**(3): 111–116
- [28] Celestino M, Calistri A, Del Vecchio C, *et al.* Feline tetherin is characterized by a short N-terminal region and is counteracted by the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Virol*, 2012, **86**(12): 6688–6700
- [29] Zhang F, Landford W N, Ng M, *et al.* SIV Nef proteins recruit the AP-2 complex to antagonize Tetherin and facilitate virion release. *PLoS Pathog*, 2011, **7**(5): e1002039
- [30] Le Tortorec A, Willey S, Neil S J. Antiviral inhibition of enveloped virus release by Tetherin/BST-2: action and counteraction. *Viruses*, 2011, **3**(5): 520–540
- [31] Dube M, Bego M G, Paquay C, *et al.* Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology*, 2010, **7**(1): 114–133
- [32] Goffinet C, Allespach I, Homann S, *et al.* HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell Host Microbe*, 2009, **5**(3): 285–297
- [33] Skasko M, Tokarev A, Chen C C, *et al.* BST-2 is rapidly down-regulated from the cell surface by the HIV-1 protein Vpu: evidence for a post-ER mechanism of Vpu-action. *Virology*, 2011, **411**(1): 65–77
- [34] Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, *et al.* Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J Virol*, 2011, **85** (2): 932–945
- [35] Yang S J, Lopez L A, Hauser H, *et al.* Anti-tetherin activities in Vpu-expressing primate lentiviruses. *Retrovirology*, 2010, **7** (1): 13–28
- [36] Zhang F, Wilson S J, Landford W C, *et al.* Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are Tetherin antagonists. *Cell Host Microbe*, 2009, **6**(1): 54–67
- [37] Gupta R K, Mlcochova P, Pelchen-Matthews A, *et al.* Simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein counteracts Tetherin/BST-2/CD317 by intracellular sequestration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(49): 20889–20894
- [38] Lim E S, Malik H S, Emerman M. Ancient adaptive evolution of tetherin shaped the functions of Vpu and Nef in human immunodeficiency virus and primate lentiviruses. *J Virol*, 2010, **84**(14): 7124–7134
- [39] Gao F, Bailes E, Robertson D L, *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, 1999, **397**(6718): 436–441
- [40] Yang S J, Lopez L A, Exline C M, *et al.* Lack of adaptation to human Tetherin in HIV-1 group O and P. *Retrovirology*, 2011, **8**(1): 78–96
- [41] Grover J R, Llewellyn G N, Soheilian F, *et al.* Roles played by capsid-dependent induction of membrane curvature and Gag-ESCRT interactions in Tetherin recruitment to HIV-1 assembly sites. *J Virol*, 2013, **87**(8): 4650–4664
- [42] Galao R P, Le Tortorec A, Pickering S, *et al.* Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NF κ B-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe*, 2012, **12** (5): 633–644

Antiviral Activity of The Host Restriction Factor Tetherin*

YIN Xin^{1,2)}, WEI Ping²⁾, WANG Xiao-Jun^{1)**}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;

²⁾ College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract The host restriction factor Tetherin is an interferon-inducible type II membrane glycoprotein, and plays a vital role in retroviral life cycle. The unusual topology of Tetherin is important for its antiviral activity. Tetherin restricts viral replication by inhibiting enveloped virus release from the surface of infected cells. However, viruses have evolved different strategies to antagonize the antiviral action of Tetherin. The interaction between Tetherin and its antagonist is species-specific which evidenced a long term co-evolution during the fighting history between host and viruses. In this review, we focus on the current advances in our understanding of the molecular structure and antiviral activity of Tetherin, as well as the mechanism used to counteract Tetherin by its antagonists.

Key words Tetherin, antiviral activity, antagonists, evolution

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00148

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(31072113), The National Natural Science Foundation for Outstanding Young Scholars of China (31222054), State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology (SKLVBP201205), and Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2012ZL080).

**Corresponding author.

Tel: 86-18946066285, E-mail: xjw@hvri.ac.cn

Received: April 8, 2013 Accepted: August 14, 2013