

中国流感病毒结构生物学研究 ——40 年回眸

高 福* 施 一

(中国科学院北京生命科学研究院, 北京 100101)

摘要 自 20 世纪 70 年代以来, 中国结构生物学研究日新月异, 在多个生命科学领域取得了丰硕成果. 近年来, 在流感病毒研究领域, 也做出了不少出色工作, 包括流感病毒的跨种间传播机制和聚合酶复合物结构解析等. 本文对国内外流感病毒蛋白的结构生物学进展做一简单总结, 为大家提供一个视角, 纵观我国病毒结构生物学的发展历程.

关键词 流感病毒, 结构, 传播机制

学科分类号 R373

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00239

结构生物学致力于研究生命系统中的大分子及其复合物的三维原子结构细节, 它所提供的结构信息给生物学带来了巨大革命, 给相应的生物学功能提供了原子水平的分子机理和更加深入可靠的认识, 让人们戴上了一副“特殊眼镜”来看到生命过程. 1953 年 DNA 双螺旋原子模型是其标志性成果, 其深远影响直到今天仍在继续. 通观结构生物学的发展历程, 也是众多科学领域交叉融合、科学家精诚合作的成功典范, 物理学、化学、生物学、医学、计算机科学及其他学科的相互交叉渗透与合作成就了今天的结构生物学, 使其不仅停留在学术活动层面, 而且已经成为药物研究及生物技术领域的重要基础.

中国结构生物学的发展历程可以回溯到 20 世纪 70 年代对胰岛素的晶体学研究所做的出色工作. 随着结构生物学技术的发展, 中国结构生物学领域也是蓬勃发展, 在多个生命科学分支都有精彩工作呈现. 近年来, 在流感病毒研究领域, 更是走在世界前沿. 本文将对国内外流感病毒蛋白的结构生物学进展做个简述, 为各个学术领域的同仁们提供一个视野.

1 流感病毒简述

流感病毒属于正黏病毒科, 根据其核蛋白的抗原性, 可分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型, 是流行性

感冒(流感)的病原体. 在核蛋白抗原性的基础上, 流感病毒还根据血凝素 HA 和神经氨酸酶 NA 的抗原性分为不同的亚型, 如 H1N1 和 H3N2, H 代表血凝素 HA, N 代表神经氨酸酶 NA, 数字代表不同亚型. 流感病毒结构由外而内可以分为囊膜、基质蛋白及核心三部分. 流感病毒的遗传物质为单股负链核糖核酸(ssRNA), 分节段组成, 与核蛋白 NP 和 RNA 聚合酶共同组成了病毒的核心. 甲型和乙型流感病毒的遗传物质由 8 个节段组成, 而丙型流感病毒的遗传物质由 7 个节段组成. 第 1、2、3 节段编码的是 RNA 聚合酶, 包括 PA、PB1 和 PB2, 负责病毒遗传物质 RNA 转录和复制; 第 4 节段编码血凝素蛋白 HA, 负责病毒侵入; 第 5 节段编码核蛋白 NP, 负责与遗传物质 RNA 组装; 第 6 节段编码的是神经氨酸酶 NA, 负责病毒释放; 第 7 节段编码基质蛋白 M1 和离子通道蛋白 M2, 负责组成病毒的基质蛋白层; 第 8 节段编码非结构蛋白(包括 NS1 和 NS2), 其功能目前已知与 RNA 出核和拮抗宿主抗病毒反应等有关. 丙型流感病毒缺少第 6 节段, 其第 4 节段编码的血凝素酯酶融合蛋白 HEF, 兼具行使病毒侵入和释放两种功能. 此外,

* 通讯联系人.

Tel: 010-64807688, E-mail: gaogf@mail.biols.ac.cn

收稿日期: 2014-08-19, 接受日期: 2014-10-10

陆续有新的甲型流感病毒蛋白被发现, 如 PA-X、PA-N155、PA-N182、PB1-F2、N40、M42, 这些蛋白都是上述 10 个蛋白的转录水平的不同剪辑形式^[1-3].

2 流感病毒的囊膜表面蛋白

流感病毒的 HA 蛋白晶体结构于 1981 年被 Don C Wiley 等美国科学家所解析, 是第一个三维结构信息清楚的流感病毒蛋白^[4]. HA 蛋白存在 HA0 前体形式, 成熟后会被蛋白酶从中间切成由二硫键相连的 HA1 和 HA2 两个亚基. HA 蛋白是病毒表面参与受体结合、膜融合和病毒侵入宿主细胞的主要膜蛋白, HA 蛋白介导的受体结合是流感病毒跨种间传播的主要决定因素之一. X 射线晶体结构表明, HA 单体蛋白在三维结构上可分成两个结构域, 包括顶端的球形结构域和下部的茎部结构域(图 1). 其受体结合位点位于顶端的球形结构域, 为一浅坑状区域, 区域周围主要由 3 个二级结构元件组成, 包括 130 环、190 螺旋和 220 环, 而底部

则由高度保守的 4 个氨基酸组成, 包括 98 位、153 位、183 位和 195 位氨基酸(Shi Y, *et al.* Nat Rev Microbiol, 2014, 待发表). 3 个二级结构元件上的氨基酸组成情况决定了 HA 蛋白的受体结合特性. HA 蛋白结合的受体为唾液酸受体, 可分成 α -2, 3 和 α -2, 6 两种受体类型(图 1). 病毒表面的 HA 蛋白以同源三聚体形式存在, 由茎部结构域的 α 螺旋通过疏水相互作用稳定三聚体的形成. 而在低 pH 值下, 茎部结构域的 α 螺旋发生变构是导致病毒与宿主细胞膜相互融合的关键步骤, 从而实现病毒的入侵^[5]. 在第一个 HA 蛋白结构被解析之后, 科学家们陆续解析了几种不同亚型 HA 蛋白的三维结构, 发现整体结构类似, 尽管不同亚型之间的氨基酸相似性在 50% 左右. 近几年来, HA 蛋白的结构生物学研究主要集中在两个领域, 不同亚型 HA 蛋白与受体相互作用的结构基础和广谱性中和抗体与 HA 蛋白相互作用的结构基础, 前者阐明流感病毒跨种间传播机制研究, 而后者阐明广谱性中和抗体的中和机制.

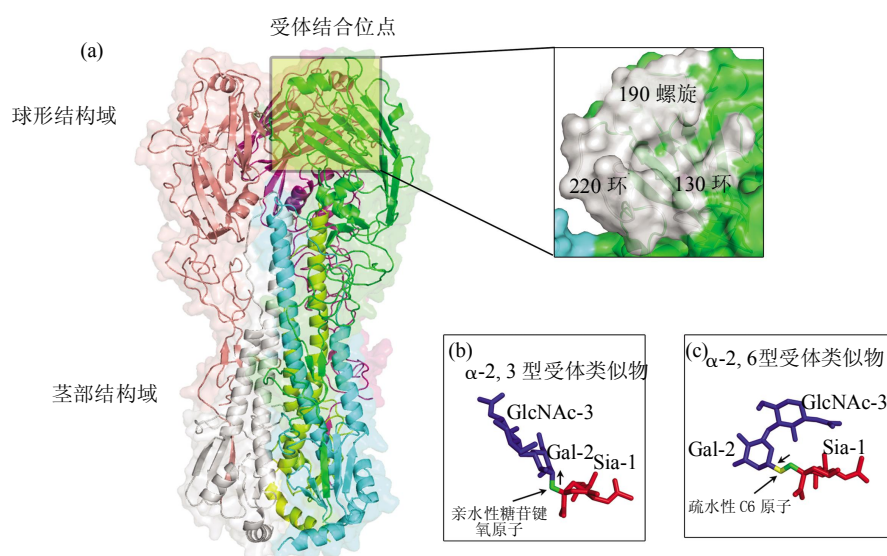


Fig. 1 Structural features of influenza virus HA protein and its sialic acid receptors

图 1 流感病毒 HA 蛋白的结构特征与结合受体类型

流感病毒跨种间传播机制研究是流感疫情科学预判和科学防控的理论基础. 中国科学院高福课题组利用结构生物学技术和生物物理技术等手段对 H1N1、H5N1、H7N9、H10N8、H13N6 和 H16N3 等流感病毒的受体结合特性进行了系统研究, 在跨种间传播分子机制研究领域获得重大突破性进展. 在国际上, 率先阐明了 H7N9 禽流感病毒能够感染

人是由于获得人源受体结合能力及其结构基础^[6]; 揭示了 HA 蛋白上的几个突变使高致病性 H5N1 禽流感病毒获得空气传播能力的分子机制^[7]. 概括地说, 禽流感病毒受体结合特性为禽源受体偏好性, 而人流感病毒为人源受体偏好性; 禽流感病毒要突破种间屏障感染人必须发生受体结合偏好性转变, 这种偏好性转变是由病毒表面血凝素蛋白 HA 受体

结合位点的关键氨基酸决定, 其关键氨基酸在不同亚型之间存在差异, 这一概念的阐明对于流感病毒的防控具有重要理论价值。

流感病毒表面还有另外一个重要膜蛋白, 就是神经氨酸酶 NA 蛋白, 在流感病毒侵染末期通过催化宿主细胞表面唾液酸受体水解以协助新生病毒颗粒从被感染宿主细胞表面释放, 以便进一步感染其他细胞, 因此, 在流感病毒的复制和传播过程中具有重要作用。NA 蛋白在病毒表面是同源四聚体形式, 晶体结构表明其功能域为一球形结构域, 主体部分是由多个 β 折叠片组成的螺旋桨式结构, 酶活性位点就位于“螺旋桨”的中心。常用的达菲等抗流感药物就是基于 NA 蛋白与唾液酸的复合物结构设计, 为唾液酸类似物。高福课题组长期以来从事流感病毒表面神经氨酸酶 NA 抑制剂对抗流感病毒感染的分子基础研究, 阐明了 NA 抑制剂抑制不同亚型流感病毒时, 存在组别特异性, 并且对 NA 蛋白酶活中心周边的 150 环特性进行了系统的研究, 以及提出共价结合抑制剂的概念, 为新型 NA 抑制剂的开发设计提供了必要的理论指导^[8-12]。此外, 国际上也在研究针对 NA 蛋白的中性抗体, 为抗流感药物研发提供了一个新的视角。

3 流感病毒的基质蛋白及离子通道蛋白

流感病毒的基质蛋白 M1 为多功能蛋白, 已知具有两个功能: a. 帮助病毒遗传物质出核, 能够结合 RNA; b. 结合病毒囊膜, 形成基质蛋白层。目前 M1 蛋白只有 N 端结构, 尚无全长结构。NMR 数据表明 M1 蛋白的 C 端柔性很大, 存在多种构象^[13]。M1 蛋白 N 端的晶体结构表明, 它具有一块由带正电荷氨基酸组成的表面区域, 能够用于结合 RNA, 同时它还具有一块疏水面, 可用于结合病毒囊膜, 而这块疏水面通过构象调整, 既可以暴露也能被包埋起来。表达 M1 蛋白的基因片段同时也表达另外一种蛋白 M2, 它是一类离子通道, 也是金刚胺和金刚乙胺等烷胺类抗流感药物的靶点。大量的生物化学、生物物理和结构生物学研究表明 M2 蛋白由 N 端一段疏水相的跨膜区螺旋和 C 端一段亲水相的细胞质区螺旋组成, 而跨膜区螺旋会在细胞膜中形成四聚体形式^[14]。目前多个课题组解析过 M2 蛋白跨膜区螺旋三维结构以及与烷胺类药物的复合物结构, 其构象存在差别, 这种不一致性可能是由于所截取的蛋白长度以及不同的实验条件引起的, 需要进一步验证。烷胺类抗流感药物现

在市场上已经不常用, 因为目前流行的流感病毒对烷胺类药物产生了耐药性。其中最流行的突变位点为 S31N 突变, 该突变位点位于四螺旋束的核心通道上, 在烷胺类药物结合位点的附近, 会对烷胺类药物的结合产生空间位阻, 从而产生耐药性^[14]。

4 流感病毒复制相关蛋白

流感病毒的 NP 蛋白负责与病毒遗传物质 RNA 结合, 形成核糖核蛋白复合物。NP 蛋白同时参与核糖核蛋白复合物的入核和出核过程, 以及病毒的复制。晶体结构表明 NP 蛋白的整体结构呈现月牙形, 可分成头部区和茎部区两个结构域^[15-16]。RNA 结合槽在 NP 蛋白两个结构域之间的外表面上, 位于月牙形的内环。NP 蛋白茎部区有一段由 12 个氨基酸组成的柔性环可以紧紧插入另外一个月牙形 NP 分子外环面的结合槽中, 形成 NP 多聚体。这个过程包含亲水和疏水相互作用, 尤其重要的是 R416 和 E339 介导的强盐桥相互作用。根据这个柔性环可以设计小分子类药物, 破坏 NP 多聚体的形成, 从而破坏病毒遗传物质的形成, 起到抗病毒效果。前面提到过, NP 也参与病毒的复制, 其与流感病毒聚合酶的相互作用分子基础, 目前还不是很清晰, 需要进一步的探索。

解析流感病毒聚合酶复合物的三维结构对于我们了解流感病毒复制机制具有重要科学意义, 而且对开发抗流感药物具有重要理论价值。中国科学院饶子和院士与刘迎芳研究员领衔的联合研究组在这一领域取得了突破性进展(图 2), 他们在国际上率先揭示了聚合酶关键部分 PA 亚基的功能和结构基础, 解析了 PA 亚基的羧基端与 PB1 亚基氨基端多肽的复合物晶体结构, 发现多肽上的残基组合对于两者结合十分重要, 而且 PA 亚基上负责与 PB1 结合的氨基酸残基在流感病毒中高度保守, 并且集中在蛋白分子中很小的区域^[17]; 紧接着他们解析了 PA 亚基的氨基端结构, 通过结构预测并证实其具有内切酶活性^[18]; 随后, 他们解析了 PA 亚基内切酶结构域与底物单磷酸核苷的复合物结构^[19], 这些成果为研究流感病毒的复制机制和设计抗流感药物提供了真实有用的模型。此外, 高福课题组最近解析了蝙蝠来源流感样病毒的 PA 亚基的 N 端结构, 结果表明其结构与经典甲型流感病毒很相似, 同时证明其具有内切酶活性, 虽然现在并没有从蝙蝠中分离出活病毒, 但是得警惕蝙蝠流感样病毒基因组会与经典甲型流感病毒发生重组从而产生新型病毒^[20]。

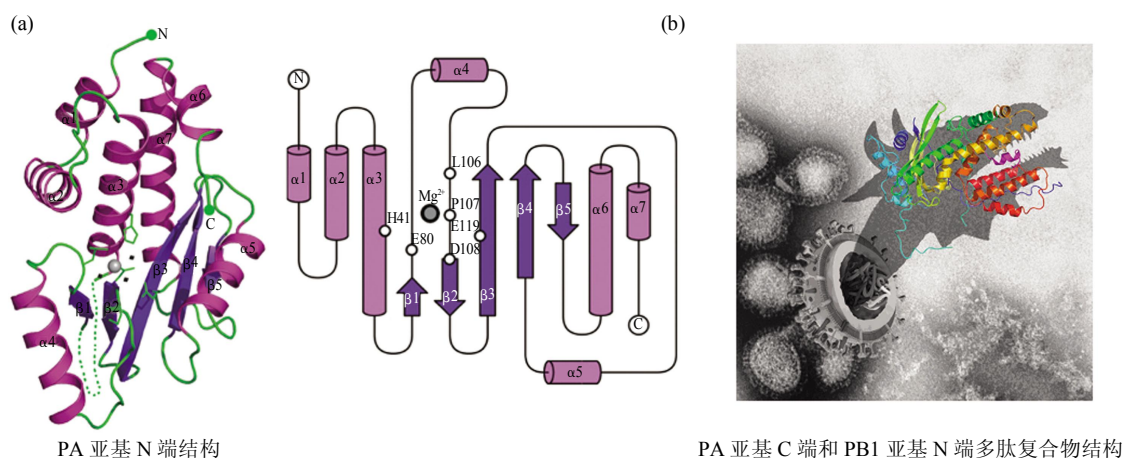


Fig. 2 Structures of influenza virus polymerase complex

图 2 流感病毒聚合酶复合物结构

此外,中国科学院广州生物医药与健康研究院刘劲松在国外工作期间解析了流感病毒 NS1 蛋白 RNA 结合域的高精度三维晶体结构,回国后也在继续相关工作^[21]。

5 结 语

新的流感病毒蛋白不断被发现,如 PA-X 等^[2],同时,部分已知流感病毒蛋白缺乏高精度三维结构信息,如完整聚合酶复合物(PA/PB1/PB2)和全长 NS2 蛋白等,流感病毒的结构生物学研究将要在未来几年面临新的挑战,期待越来越多的中国结构生物学家能够加盟该领域。

参 考 文 献

- [1] Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, *et al.* Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*, 2013, **87**(5): 2455–2462
- [2] Jagger B W, Wise H M, Kash J C, *et al.* An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 2012, **337**(6091): 199–204
- [3] Wise H M, Foeglein A, Sun J, *et al.* A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, 2009, **83** (16): 8021–8031
- [4] Wilson I A, Skehel J J, Wiley D C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, 1981, **289**(5796): 366–373
- [5] Wiley D C, Skehel J J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 365–394
- [6] 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
- [7] 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
- [8] Li Q, Qi J, Zhang W, *et al.* The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(10): 1266–1268
- [9] Vavricka C J, Li Q, Wu Y, *et al.* Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathogens*, 2011, **7**(10): e1002249
- [10] 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
- [11] Vavricka C J, Liu Y, Kiyota H, *et al.* Influenza neuraminidase operates via a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors. *Nat Commun*, 2013, **4**: 1491
- [12] Wu Y, Bi Y, Vavricka C J, *et al.* Characterization of two distinct neuraminidases from avian-origin human-infecting H7N9 influenza viruses. *Cell Res*, 2013, **23**(12): 1347–1355
- [13] Shishkov A, Bogacheva E, Fedorova N, *et al.* Spatial structure peculiarities of influenza A virus matrix M1 protein in an acidic solution that simulates the internal lysosomal medium. *FEBS J*, 2011, **278**(24): 4905–4916
- [14] Das K, Aramini J M, Ma L C, *et al.* Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(5): 530–538
- [15] Ye Q, Krug R M, Tao Y J. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, 2006, **444**(7122): 1078–1082
- [16] Ng A K, Zhang H, Tan K, *et al.* Structure of the influenza virus A

- H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J*, 2008, **22** (10): 3638–3647
- [17] He X, Zhou J, Bartlam M, *et al.* Crystal structure of the polymerase PA (C)-PB1 (N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature*, 2008, **454**(7208): 1123–1126
- [18] Yuan P, Bartlam M, Lou Z, *et al.* Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature*, 2009, **458**(7240): 909–913
- [19] Zhao C, Lou Z, Guo Y, *et al.* Nucleoside monophosphate complex structures of the endonuclease domain from the influenza virus polymerase PA subunit reveal the substrate binding site inside the catalytic center. *J Virol*, 2009, **83**(18): 9024–9030
- [20] Tefsen B, Lu G, Zhu Y, *et al.* The N-terminal domain of PA from bat-derived influenza-like virus H17N10 has endonuclease activity. *J Virol*, 2014, **88**(4): 1935–1941
- [21] Liu J, Lynch P A, Chien C Y, *et al.* Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**(11): 896–899

Structural Biology of Influenza Virus in China

GAO Fu*, SHI Yi

(Beijing Institutes of Life Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract From 1970s, structural biology has been advanced promptly in China, and many achievements are reached in different areas of life science. Recently, excellent efforts have been done in structural biology of influenza virus, including molecular basis on interspecies transmission of influenza virus and structure determination of polymerase complex. Here, we present a brief introduction of the advancements on structural biology of influenza virus in and out of China, providing a view of development of structural biology in China.

Key words influenza virus, structural biology, interspecies transmission

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00239

*Corresponding author.

Tel: 86-10-64807688, E-mail: gaogf@mail.biols.ac.cn

Received: August 19, 2014 Accepted: October 10, 2014