PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
XXXX, XX(XX): 1~14
www.pibb.ac.cn

病毒膜融合蛋白构象转变机制与稳定策略*

解宸一[1)] 董翔歌[2)] 战久宇[1)**] 朱洪伟[1,2)**] 于 馨[1,2)] 刘 洋[1,2)] 于佳玉[1,2)] 张兴晓[1,2)]
([1)] 鲁东大学生命科学学院，烟台 264025；[2)] 烟台市动物病原微生物与免疫学重点实验室，烟台 264025）

摘要 病毒膜融合蛋白通过从预融合构象转变成融合后构象，介导病毒与宿主细胞膜融合，并进一步使病毒的核酸转移到细胞内部。其预融合构象是疫苗设计和抗病毒药物开发的理想靶标构象。研究这类蛋白质的构象转变机制及如何稳定其预融合构象，一直是具有挑战性的课题。本文总结了三类膜融合蛋白在结构和功能上的差异：I类蛋白以α螺旋为主，形成三聚体，依赖受体结合或低pH触发融合肽释放；II类蛋白（如登革病毒E蛋白）以β折叠为主，二聚体向三聚体重排，融合环由低pH激活；III类蛋白（如单纯疱疹病毒gB）融合α螺旋和β折叠，机制涉及内部融合环插入和膜重塑。并通过深入理解病毒的膜融合机制，介绍了几种目前能够有效地稳定病毒膜融合蛋白预融合构象的方法，包括二硫键连接稳定结构域间相互作用、疏水空腔填充增强疏水核心稳定性、脯氨酸限制铰链区域的结构转变、多聚体结构域稳定三聚体构象。本文所总结讨论的稳定化策略已经在多种病毒膜融合蛋白的研究中得到验证并进一步应用疫苗抗原设计中。另外，本文介绍时间分辨冷冻电镜等新型技术在捕捉构象中间态和解析动态转变过程中的应用潜力。为开发稳定的病毒膜融合蛋白提供了理论参考，为理解病毒膜融合机制和下一代疫苗和抗病毒药物的开发提供了重要基础。

关键词 病毒膜融合蛋白，膜融合机制，预融合构象，融合后构象，构象稳定性
中图分类号 Q6，Q67 **DOI**：10.3724/j.pibb.2025.0284 **CSTR**：32369.14.pibb.20250284

包膜病毒（enveloped virus）的病毒粒子（virion）表面一般由来源于宿主的脂膜和病毒表面糖蛋白组成。病毒通过表面蛋白质结合敏感细胞受体，触发病毒包膜与宿主细胞膜融合，进入宿主细胞。参与该融合过程的病毒膜蛋白结构动态变化一直是本领域的最大挑战，传统X射线晶体学（X-ray crystallography）依赖高质量晶体形成，但膜蛋白的疏水性和动态性导致结晶困难，样品需求量大，且在晶体制备过程中易引入非生理状态的人为干扰因素[1]。核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）光谱学虽可在溶液中捕捉动态，但受限于蛋白质分子大小。随着结构生物学技术的迭代，冷冻电子显微术（cyro-electron microscopy，cryo-EM）相较于X-ray和NMR[2-3]，其样品需求量低且无需结晶和同位素标记，已发展至在低于2 Å（ångströms）的超高分辨率上解析蛋白质空间结构，推动了病毒膜融合蛋白融合前（pre-fusion）和融合后（post-fusion）的蛋白质构象和与宿主细胞融合机制的研究。

病毒表面膜融合蛋白如流感病毒（influenza A virus，IAV）的血凝素（hemagglutinin，HA）蛋白、黄病毒（flavivirus）E蛋白、水疱性口炎（vesicular stomatitis virus，VSV）G蛋白、冠状病毒（coronavirus）刺突蛋白，是免疫系统识别和攻击的靶点，也是基因工程亚单位疫苗的理想抗原。然而，这类蛋白质预融合构象极不稳定，常以稳定的融合后构象存在，其诱导产生的中和抗体（neutralizing antibody，NAb）无法提供对侵入细胞之前的病毒提供有效免疫保护。本文旨在总结现有三类病毒膜融合蛋白及其构象转变机制，稳定病毒膜融合蛋白预融合构象的方法及其相关应用，为疫苗和抗病毒药物的开发提供理论支持。

* 烟台市校地融合发展项目（2022）资助。
** 通讯联系人。
战久宇 Tel：13001620978，E-mail：zhanjy@ldu.edu.cn
朱洪伟 Tel：17852615790，E-mail：hwzhu@ldu.edu.cn
收稿日期：2025-06-11，接受日期：2025-10-28

1　膜融合机制

理论上，病毒包膜和细胞质膜两个双层膜的融合在热力学上有利，但该过程需要克服非常高的动力学势垒（kinetic barrier）[4]。病毒融合蛋白则利用其蛋白质构象变化，释放自由能，将两个膜拉在一起[5]。因此，嵌入病毒包膜的膜融合蛋白是催化病毒与宿主细胞膜融合的关键[6]。宿主细胞膜表面受体与膜融合蛋白相互作用，将其引导至特定位置。在pH值变化等触发因素的作用下，膜融合蛋白经历一系列构象变化，导致其向宿主细胞膜延伸，并将其先前隐藏的疏水融合肽环插入宿主细胞膜内[7]。一旦疏水融合肽与宿主细胞膜结合，延伸的结构会发生塌陷，进而折叠回主体，拉近病毒膜和宿主细胞膜。此时，半融合柄沿径向延伸至半融合隔膜，并开始在外层膜上引发脂质混合，而内层膜仍然分开。由于融合蛋白引起的局部膜张力，半融合隔膜进一步破裂并打开融合孔，并完成膜的完全融合[8-10]。最后，膜融合蛋白以稳定的融合后构象形式存在于膜上。近年来，利用时间分辨冷冻电子断层扫描（cryo-electron tomography，cryo-ET）技术，研究人员成功捕捉到病毒膜融合的中间态，例如在流感病毒中观察到紧密对接的膜接触区（tightly docked membrane contact zones），其中近端膜叶层（proximal leaflets）密切贴合，而远端膜叶层（distal leaflets）保持分离。这种中间态被视为融合路径上的通用特征，揭示了膜重塑的不对称性（如病毒膜向靶膜的局部变形），这挑战了经典对称半融合茎（hemifusion stalk）的假设，并为理解融合动力学提供了新视角。cryo-ET研究进一步发现，在流感病毒中，融合蛋白不仅驱动脂质混合，还与病毒内部结构（如基质蛋白）协同调控膜融合[11]。这些机制的深入理解为设计融合抑制剂提供了新的视角。

自从第一个病毒膜融合蛋白——流感病毒HA蛋白的结构被确定以来[12]，多个不同病毒的膜融合蛋白结构也被解析。在这些膜融合蛋白中，均发现亲脂融合肽或环介导膜融合作用。在插入宿主细胞膜之前，这些融合肽或环需先屏蔽外部环境[13]。同时，病毒膜融合蛋白还需要通过膜锚区域定位和附着于病毒膜表面。尽管这些膜融合蛋白在结构上存在显著差异，但通过对其结构的鉴定，可将其大多数归为三类。第一类和第二类膜融合蛋白分别含有较多的α螺旋和β折叠结构，而第三类膜融合蛋白则兼具二者的特点。第一类和第三类膜融合蛋白在融合前和融合后均为同源三聚体，而第二类膜融

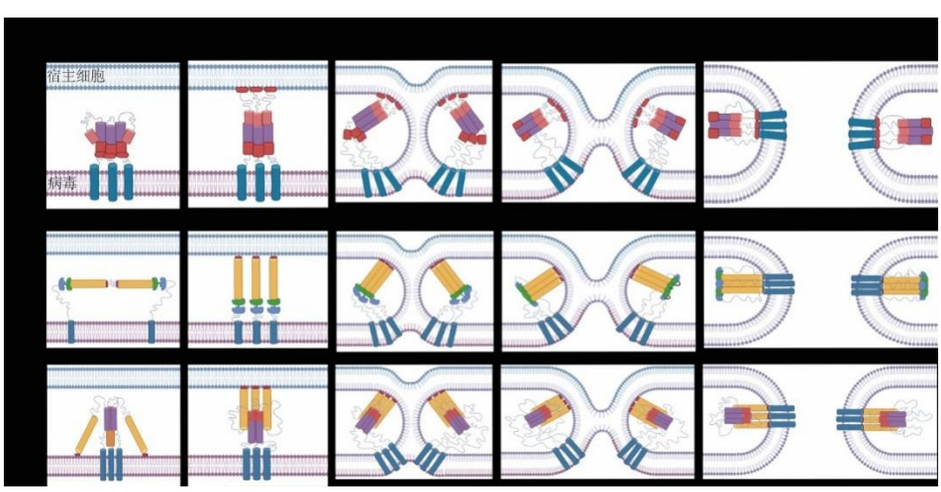


Fig 1　Structural modeling of key domains in three classes of viral membrane fusion proteins across distinct conformational states during fusion

图1　三类病毒膜融合蛋白在融合过程中不同状态下的关键结构域组成的病毒膜融合蛋白模型

膜融合蛋白经历了从预融合构象到半融合构象再到融合后构象的一系列构象转变过程。融合环或肽以深红色表示，跨膜结构域以蓝灰色圆柱表示，而环状区域以及不具有该类特征的区域则以灰色线条表示。（a） 在第一类膜融合蛋白中，长的中央盘绕结构域（紫色圆柱）通过连接短的α螺旋区域（粉红色圆柱）的环状区域的再折叠而延伸。融合环锚定后，在螺旋C端部分（深橙色圆柱体）的反折作用下，插入状态塌缩，形成6螺旋束。（b） 第二类病毒膜融合蛋白在pH值的影响下重新排列，在最终三聚体形成之前的插入过程中完成排列。融合环位于结构域II（浅橙色方框）β片状结构的顶端，而运动是由结构域III（较短的蓝色框）通过一个短铰链区围绕结构域I（绿色框）旋转驱动的。（c） 第三类病毒膜融合蛋白由类似于第一类的α螺旋核心（紫色圆柱体）定义，在插入过程中可能形成螺旋延伸，而融合环位于类似于第二类的β片状结构域（浅橙色方框）的顶端。

合蛋白在融合前为同源或异源二聚体，融合后则为同源三聚体。

2　三种病毒膜融合蛋白的特点

2.1　第一类膜融合蛋白

以HA为例[14]，其结构为同源三聚体，由中央三股螺旋区域和在融合后发夹构象中形成的反平行螺旋束组成[15]。HA的N端融合环连接到一个短α螺旋，该短螺旋通过一个长环（loop）区与中央长α螺旋相连，后者在三聚体中形成盘绕的线圈结构（图1a，预融合）。虽然融合前和融合后构象的结构已得到较为详尽的描述，但直到最近才从结构上揭示了融合过程中的中间状态[16]。在融合触发后，连接环区被蛋白酶裂解并释放，随后重新折叠成中心螺旋的一部分，扩展结构并形成通向宿主膜的桥梁。此时，位于顶端的融合环插入宿主细胞膜（图1a，融合域插入）。通过重新折叠中央α螺旋的C端部分，形成发夹构象，将两层膜拉近且自身形成反平行的螺旋束（图1a，融合后）。

类似的膜融合蛋白结构也在其他病毒中被发现，包括人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency viruses，HIV）糖蛋白gp41[17]、呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）F1[18]或埃博拉病毒（*Ebolavirus*）糖蛋白GP1[19]等。第一类膜融合蛋白通常依赖于受体结合来启动融合前到融合后构象的转变。不同病毒的受体种类各异，其相互作用形式多样，包括附着、内化或触发融合[20]。例如，流感病毒HA与宿主细胞糖萼中的唾液酸结合，进而协调其向内吞体的运输[21]，而埃博拉病毒GP1则需要低pH依赖性细胞蛋白酶的裂解，暴露出与受体特异性结合的口袋[22]。就RSV而言，已经提出几种候选受体蛋白，它们通过与RSV融合蛋白的相互作用来促进病毒的进入[23]。对这些膜融合蛋白的比较分析表明，前体蛋白的裂解是一个共同的功能特征，通常也是三类病毒膜融合蛋白激活的先决条件。

2.2　第二类膜融合蛋白

第二类病毒膜融合蛋白如登革病毒（dengue virus，DENV）[24]的膜融合蛋白E[25]和甲病毒（*Alpha viruses*）[26]的膜融合蛋白E1为例。其空间结构高度相似，主要由β折叠构成，并排列成3个相连的结构域（图2b）。不同于第一类病毒膜融合蛋白排列方式，第二类病毒膜融合蛋白的排列方向与膜平行[24]。

并且第二类病毒膜蛋白在融合过程中的结构重排机制与第一类相比有显著差异（图1b）。其融合肽的延伸是通过3个结构域的重新排列实现融合。在所有已知的第二类病毒膜融合蛋白中，融合过程的启动均由内吞体酸性环境中的pH值变化触发[27]。这种变化会导致组氨酸的质子化，从而引发一系列构象变化。具体而言，结构域III（图1b，蓝色框）围绕与结构域I（图1b，绿色框）的连接旋转，首先将位于结构域II（图1b，浅橙色圆柱）远端的融合环暴露在目标膜上。当融合环嵌入宿主膜后，蛋白质向后折叠形成发夹状结构，结构域I和II与结构域III及与跨膜螺旋连接的区域相互作用[28-29]。第二类膜融合蛋白在融合后形成同源三聚体，因此其从激活到形成发夹状结构的过程中，蛋白质需要重新解离并排列[28，30]。这种结构排列类似于第一类膜融合蛋白的螺旋发夹状结构，其中融合环最终靠近跨膜螺旋（图1b，融合后）。

2.3　第三类膜融合蛋白

当单纯疱疹病毒（herpes simplex virus 1，HSV-1）糖蛋白B[31]和水疱性口炎病毒（*Vesicular stomatitis virus*，VSV）糖蛋白[32-33]的空间结构被解析，它们显示出前两类病毒膜融合蛋白的结构特征，包括位于β片状结构域顶端的中央α螺旋线圈和内部融合环[34]（图1c）。这两种蛋白质之间的结构，与任何典型的第一类或第二类膜融合蛋白均存在显著差异，因此被归类为第三类病毒膜融合蛋白[35]。除了疱疹病毒糖蛋白gB以外还有更多膜融合蛋白具有类似的结构特征[36]，如伪狂犬病毒（pseudorabies virus，PRV）gB[37]水痘带状疱疹病毒（varicella-zoster virus，VZV）gB[38]、人巨细胞病病毒（human cytomegalovirus，HCMV）gB[39]和EB病毒（Epstein-Barr virus，EBV）[40]、杆状病毒（*Alphabaculovirus aucalifornicae*）的gp64[41-42]，由于它们与HSV-1 gB和VSV-G的融合后结构具有同源性，因此被归类为第三类病毒膜融合蛋白。

HSV-1 gB的外结构域可以分为5个亚结构域（结构域I、II、III、IV和V）[43]。结构域I（图1c，红色方框）被称为融合结构域，主要由β折叠构成，顶端包含融合环，与第二类膜融合蛋白相同。这些环携带可插入靶细胞膜的关键残基[34]。在融合后的构象中，融合环暴露在外，并位于三聚体结构的一端，紧邻结构域V的C端[44]。结构域I被嵌入到结构域II内的两个β链之间，在VSV G中结

构域II为PH结构域，PH结构域通常可作为磷脂或蛋白质配体的结合位点，这表明，第三类融合蛋白的结构域II可能与参与融合过程的其他蛋白相互作用，如 HSV-1 gB 与 gH/gL 形成复合物或与受体结合蛋白结合，从而触发蛋白质构象的转变。结构域II被嵌入到结构域III内，后者包含一个突出的中央α螺旋，这一螺旋在融合后构象的三聚化过程中起主要作用。结构域III被插入到结构域IV中，该结构域位于与结构域I及融合环相对的一端，结构域IV由β折叠组成，在大小和结构排列上具有高度无序性。结构域V是一段长的多肽链。

在病毒膜融合过程中，融合构象的转换发生于 HSV-1 gB 蛋白与靶细胞表面受体结合后。与第一类膜融合蛋白不同，第三类融合蛋白的构象转换不依赖于前体蛋白的蛋白酶裂解[15]。其构象转变可由低pH或受体结合触发，通过融合触发诱导前两个结构域发生翻转，从而释放并暴露融合环。并且在HSV gB 蛋白中，结构域V发生显著重构。具体而言：a. 三个α螺旋重新构象化，形成延伸的肽链，并插入相邻原聚体之间，扩大三聚体界面；b. C 端膜近端区（membrane-proximal region，MPR）前的α螺旋束由预融合构象中的紧密堆积转变为融合后构象中的漏斗状排列。结构域V的重新折叠促使膜嵌入区向融合环所在方向移动，使病毒膜与宿主膜靠拢并最终融合（图 1c，融合后）。此外，在 HSV-1 gB 发生构象转换过程中，还会伴随中央三聚体轴向的同步旋转，导致原三聚体之间发生螺旋缠绕。

狂犬病毒（rabies virus， RABV）糖蛋白G还可以在融合前和融合后构象之间进行转换，这是一种可逆的构象转变，使 RABV G与其他病毒膜融合蛋白区分开（图 2c）[45]。这些不同的构象存在于pH值热力学平衡中，随着pH值的降低，RABV G从预融合构象转变为融合后构象[46]。大多数病毒膜融合蛋白会在pH值降低时发生结构完全不可逆的转变[6，47]。这种结构转变的可逆性被认为是为了使 RABV G在通过高尔基体的运输后恢复到其原生的预融合构象。

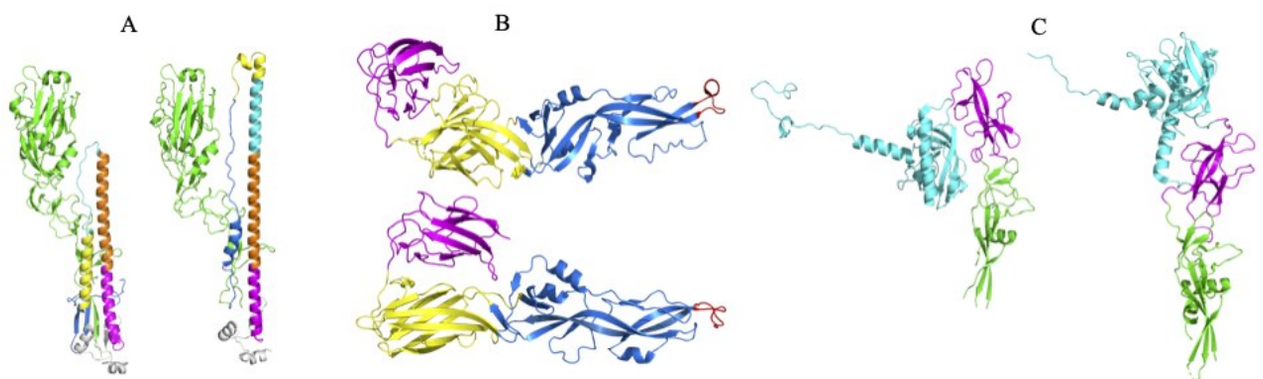


Fig2　Representative pre−fusion and post−fusion structural conformations of three classes of viral membrane fusion proteins

图2　三类病毒膜融合蛋白融合前和融合后结构举例

（a）第一类病毒膜融合蛋白（均以单体形式展示）：流感病毒血凝素（HA）融合前结构和融合后结构（蛋白质结构数据库，PDB：3S11）。绿色：HA1；青色：环（loop）；黄色、棕色、紫色：螺旋；蓝色：融合环。（b）第二类病毒膜融合蛋白：登革病毒膜融合蛋白E融合前结构（上图，PDB：4TUB），融合后结构（下图，PDB：1OK8），三个结构域分别显示为黄色、蓝色和紫色，红色：融合环。（c）第三类病毒膜融合蛋：狂犬病毒糖蛋白（G）融合前结构（左图，PDB：6LGX）和融合后结构（右图，PDB：6LGW），青色：褶皱同源结构域（PHD）；紫色：中心结构域（CD）；绿色：融合结构域（FD）。

3　病毒膜融合蛋白的医学意义

传统疫苗通常基于灭活病毒、减毒病毒或重组蛋白的构建，但存在免疫原性低或结构不稳定等问题，尤其重组蛋白疫苗难以诱导强效免疫反应。随着蛋白质结构生物学和计算机模拟技术的发展，疫苗开发进入了结构设计（structure-based design）时代。借助冷冻电镜、X射线晶体学及AlphaFold等工具[48]，研究者能够解析病毒蛋白质的三维结构，识别关键中和表位，从而通过蛋白质工程手段优化抗原构型，如稳定膜融合蛋白于预融合状态，以增强疫苗免疫原性。

膜融合蛋白由于其在病毒颗粒表面的存在及构象转变特性，是中和抗体和疫苗设计的重要靶标[49-50]。然而，某些表位仅在融合前或融合后状态中才能显现。以RSV的病毒膜融合蛋白F为例，预融合构象所暴露的表位被证明是最有效的中和抗体靶点，亚单位疫苗可以基于这一靶构象进行研发[51]。然而，这些蛋白质预融合构象固有的易变性，可能导致低表达率、错误折叠和蛋白质结构不稳定[52-53]，容易被过早触发形成融合后构象[54-55]。为了解决这些问题，科学家们通过多种方法增强膜融合蛋白预融合构象的稳定性，包括采用三聚体结构域替代膜锚、引入特定氨基酸突变等策略来稳定蛋白质构象。近年来，已经有许多成功稳定膜融合蛋白的案例，包括流感病毒的膜蛋白HA、RSV的F蛋白[56]和严重急性呼吸综合征冠状病毒2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）的S蛋白[57-58]。后者的稳定构建体已成功应用于亚单位疫苗[59]。RSV和新冠疫苗的成功经验表明，预融合构象的结构稳定化是提高疫苗效力的关键路径，也为其他病毒疫苗开发提供了有力参考。

近年来，cryo-ET技术在捕捉融合中间态方面的应用已成为这一领域的前沿发展方向之一。2024年的一项研究[11]通过时间分辨cryo-ET可视化了class I、II和III病毒融合蛋白驱动的膜重塑动态，揭示了紧密对接膜接触区作为通用中间态的存在，以及膜叶层不对称变形和半融合隔膜的形成。这些发现不仅深化了对融合力学和能学的理解，还为设计新型融合抑制剂提供了结构基础，例如靶向融合肽插入或膜曲率调控的药物，有潜力用于阻断新兴病毒感染如SARS-CoV-2变异株。

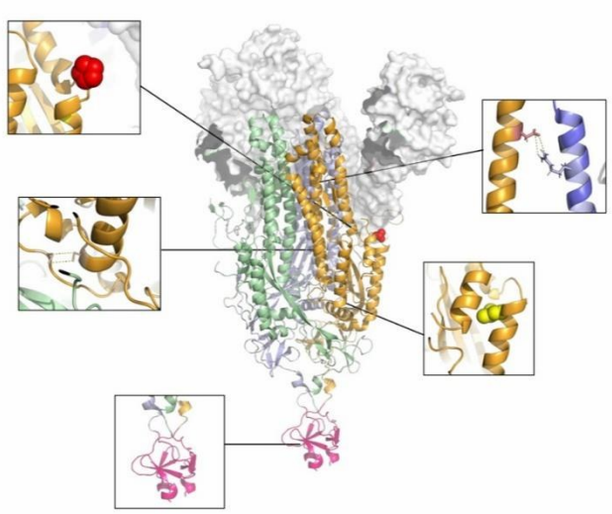


Fig3　Schematic diagram of stabilizing modifications

图3　稳定化修饰的示意图

SARS-CoV-2刺突蛋白稳定化的示例性替换，插图显示了每种稳定化的具体实例细节。三聚体SARS-CoV-2刺突蛋白胞外域融合前构象的侧视图（PDB ID：6VSB）。S1结构域以透明分子表面形式显示。每个单体的S2结构域以丝带图形式显示。每个插图对应5种稳定化修饰类型之一（脯氨酸、盐桥、二硫键、空腔填充、多聚体结构域）。插图中的侧链以红色球体（脯氨酸）、黄色棒状（二硫键）、红色和蓝色棒状（盐桥）、洋红色丝带（多聚体结构域）以及黄色球体（空腔填充）形式显示。

4　稳定膜融合蛋白的方法

近年来，许多病毒膜融合蛋白的结构被成功稳定在其预融合构象，以提高其在各种应用中的可用性。早期的研究通过诱导突变来稳定膜融合蛋白的结构，这些研究通常依赖于已有的结构信息[60]。进一步利用近似同源物的结构数据来识别合适的突变位点，扩展了这一方法的应用[61-62]。通过这些

稳定突变，科学家能够成功解析出第一个膜融合蛋白的稳定结构[61]。获得的结构信息不仅为研究提供了重要依据，也为设计更稳定的蛋白质结构以用于体外实验或免疫原设计提供了指导[63]。

当前用于稳定预融合构象的策略包括：引入人工多聚体结构域[64]、形成二硫键[65]（表1）、减弱电荷排斥[66]、填补疏水空腔以及采用脯氨酸替代（表2）等[67-68]。此外，通过增强三聚体结构域也可显著提升预融合构象的稳定性（表3）。

4.1 多聚体结构域

单纯表达膜融合蛋白的膜外结构域已被证明可以显著提高蛋白质的表达率[69]。然而，在某些情况下，膜融合蛋白的膜外结构域单体之间的相互作用较弱，无法在没有膜锚的情况下维持稳定的三聚体构象，导致蛋白质复合物解聚为单体[70]。为了使这些蛋白质以稳定的三聚体的形式存在，可引入人工多聚体结构域，例如，T4纤维蛋白三聚化结构域（ foldon ）（图3）或修饰的GCN4-pII异亮氨酸拉链结构域。foldon结构域由纤维蛋白C端的三个拷贝组成，包含30个氨基酸，形成一个类似于螺旋桨的结构，亚基之间有很强的相互作用[71-72]，从而增强三聚体的稳定性，并使膜融合蛋白的膜外结构域正确排列[73-74]。相比之下，经过修饰的GCN4-pII的异亮氨酸拉链结构域由3个33氨基酸长的α螺旋组成，形成平行的三股盘旋线圈[75]，从而促进了所附外延结构域的三聚体排列[76-77]。在某些情况下，在膜融合蛋白的膜外结构域 中加入一个人工三聚结构域就足以将融合蛋白稳定在预融合构象中，如副流感病毒的糖蛋白F[70]。虽然多聚化结构域是一种可行的结构稳定器，但是，当多聚化结构域用作亚单位疫苗的一部分时，可能会引起强烈的抗体反应。可以通过在其结构上进行糖基化修饰来避免额外的抗体反应。以GCN4为例，研究表明，通过在其结构域中引入4个潜在的N连接糖基化位点，可以有效减轻这种免疫反应[78]。

4.2 二硫键

引入二硫键的半胱氨酸连接策略被认为能够通过降低中间态的熵，从而提高预融合结构的构象稳定性[79]（图3）。这一方法有多种实施途径：其中一种是将二硫键用作稳定多聚体构象的连接桥，即在各单体之间引入半胱氨酸形成二硫键。例如，在HIV gp120/gp41[80]、拉沙病毒（Lassa virus，LASV）的糖蛋白1/2（GP1/GP2）[81]、RSV F蛋白[82]或流感HA[83]。此前研究发现，DENV包膜蛋白E通过抗体结合形成稳定的二聚体结构，基于这一结构特性，研究人员筛选并替换了二聚体界面中的潜在关键残基为半胱氨酸，从而增强了E蛋白二聚体的稳定性[84-85]，在此基础上，他们进一步在二聚体两端引入二硫键，构建出具有更高结构稳定性的半胱氨酸双突变体[85]。另一种策略是通过形成单体内二硫键来稳定融合过程中构象。例如，在亨德拉病毒F蛋白中，融合肽被固定在头部结构域的稳定残基上，以防止从融合前到融合后构象的全面转变[86]。另一应用实例是在麻疹病毒F蛋白的头部结构域与茎部结构域交界处引入二硫键[87]，或在副流感病毒的MPR引入二硫键[88]。尽管这一方法有效，但其成功实施依赖于对目标蛋白质详细结构的了解以及突变位点的筛选，所以需要通过细胞表面定位及构象特异性抗体识别等技术来进一步评估蛋白质空间结构的正确折叠及预融合构象稳定性[62]。

4.3 脯氨酸

脯氨酸的残基置换，也称为螺旋断裂突变，特别适用于第一类膜融合蛋白的结构稳定。由于脯氨酸包含一个五元环状结构，导致主链的φ和ψ二面角受到严格限制。这种环状结构缺乏氨基氢原子，阻碍了与临近羰基氧形成氢键，从而破坏α螺旋的连续性，赋予该区域局部刚性和不利于螺旋延伸的特性。这种突变是在连接中央长螺旋和短α螺旋的环状区域中引入的，野生型蛋白质的该区域在融合后重新折叠，成为中央长线圈区域的一部分（图3）；插入的脯氨酸残基通过增加局部刚性，限制了铰链区域的结构转变，从而抑制了融合后发夹构象的形成。流感病毒血凝素（hemagglutinin，HA）是最早利用此策略来稳定预融合构象的病毒融合蛋白之一[12]。通过对形成α螺旋的环区域两端设计脯氨酸突变（图2a），突变后的蛋白质功能受到抑制，同时增强了其预融合构象的稳定性。

这些突变不仅增强了预融合构象的稳定性，同时膜融合蛋白的热稳定性也得到提升，使其更适合用于疫苗设计和结构研究。这种方法已被扩展到其他病毒，如RSV F蛋白，通过在类似铰链位点引入脯氨酸或甘氨酸（另一种螺旋断裂氨基酸），成功稳定了三聚体预融合结构，提高了疫苗免疫原性。进一步的分子动力学（molecular dynamics， MD）模拟揭示，脯氨酸引入后，局部自由能景观发生变化，预融合构象成为能量较低状态，使融合后构象的能量壁垒升高，从而抑制了折叠过程。但这个策

略同样离不开目标蛋白质的详细结构以及突变位点的筛选。

4.4　疏水空腔

另一种策略是分析位于融合前和融合后构象不同区域的疏水空腔。通过用体积较大的疏水氨基酸侧链填充这些空腔，预融合构象中的自由能会因蛋白质核心的紧密结合而降低，而预融合构象的自由能会因疏水残基暴露到溶剂中而升高[89-90]（图3）。

机制上，疏水空腔通常由疏水氨基酸（如亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸）包围，形成一个非极性腔体。在病毒融合中，这些空腔可能参与融合肽的释放或螺旋的延伸。填充策略通过突变为更大侧链的非极性氨基酸（如从缬氨酸突变为苯丙氨酸）来占据空腔，增强范德华力相互作用。根据热力学原理，这种填充减少了溶剂可及表面积，降低了熵增效应，同时提高了蛋白质的热稳定性。例如，在尼帕病毒（Nipah virus，NiV） F蛋白中，研究人员识别出融合前构象中的一个中央空腔，通过引入疏水残基突变（如V207L、A259V等），显著提高了蛋白质的表达水平和熔点，并在小鼠模型中增强了免疫原性[91]。类似地，在HIV gp140中，空腔填充结合二硫键稳定，成功获得了高分辨率结构[92]。需要注意的是，空腔填充方法要求相关蛋白质具有高分辨率的结构信息，因此，更多适用于结构稳定和表达优化[63]。

4.5　电荷平衡

电荷修饰是稳定蛋白质结构的一种有效策略，通过避免两个带有同种电荷的氨基酸之间的电荷排斥作用。具体而言，将带电氨基酸突变为带有相反电荷或中性电荷的氨基酸，能够减少这种排斥力，进而稳定蛋白质的预融合构象（图3）。

机制上，病毒融合蛋白的预融合构象通常涉及多亚基界面或螺旋束，其中带电氨基酸（如赖氨酸、精氨酸的正电荷，或天冬氨酸、谷氨酸的负电荷）可能形成局部排斥相互作用，增加自由能使稳定性降低。通过电荷平衡突变，如将正电荷残基突变为负电荷，可以引入静电吸引，降低能量壁垒并稳定蛋白质。例如，在流感HA中，研究人员针对HA2亚基的螺旋区域引入电荷突变（如R106D），减少了同种电荷的排斥，提高了蛋白质的熔点并抑制了低pH诱导的构象变化。在SARS-CoV-2 S蛋白中，电荷修饰已被用于稳定S2亚基的三聚体核心，通过突变K986P结合电荷调整突变V987D，不仅增强了表达稳定性，还在疫苗如mRNA-1273中提高了免疫效力。类似地，在RSV F蛋白中，电荷平衡策略针对融合肽附近的电荷簇，突变后蛋白质的热稳定性增加15 ℃以上，并在动物模型中诱导更强的保护性抗体。

与空腔填充方法类似，电荷修饰策略也依赖于高分辨率的蛋白质结构信息，因此最适合在结构优化的后期阶段应用。该过程已被用于稳定流感病毒HA、SARS-CoV-2 S刺突蛋白[93]和RSVF蛋白[53]的预融合构象结构。

4.6　小分子融合抑制剂

近年来，针对不同病毒融合蛋白的小分子抑制剂的发现和开发取得了显著进展[94]。小分子融合抑制剂通过干扰病毒膜融合蛋白的构象转变、稳定病毒膜融合蛋白的预融合构象、靶向病毒-宿主受体相互作用界面和干扰膜间距和膜弯曲过程[95-96]。

小分子融合抑制剂常结合到融合蛋白的保守空腔或表位中，如在RSV F蛋白中，一类抑制剂绑定到预融合三聚体的中央三重对称空腔，连接各单体的易变区域，阻止融合过程中的重排[97]。该空腔位于融合肽下方，抑制剂通过氢键和疏水交互锁定结构，抑制低pH诱导的发夹形成。结构研究显示，抑制剂结合后，蛋白质的熔点升高，融合活性降低90%以上。在流感HA中，小分子Arbidol结合到HA2茎区，充当“胶水”阻止酸诱导的重构，抑制与内体膜的融合[98]。类似地，基于抗体表位的模拟，开发的小分子（如叔丁基氢醌（tert-butyl hydroquinone，TBHQ））靶向HA的融合亚域，稳定预融合构象并阻断病毒进入[99]。进一步的X射线晶体学和NMR光谱学揭示，这些抑制剂诱导局部构象变化，提高能量势垒，偏向预融合状态。

未来方向包括多靶点抑制剂设计，与疫苗结合使用，以应对变异病毒。总体而言，小分子融合抑制剂代表了精准抗病毒疗法的典范，推动了从机制洞察到药物转化的创新。

Table 1　Virus Membrane Fusion Proteins with Pre−fusion Conformation Stabilised via Disulphide Bond Engineering

表1　通过二硫键工程实现预融合构象稳定化的病毒膜融合蛋白

分类	病毒	蛋白质	突变位点	三聚化方式	PDB编号	参考文献
I	RSV	F	A149C， Y458C or N183C	foldon	-	［67］
I	HEV	F	I452C + G460C	-	-	［64］
I	PIV5	F	T481C + T482C	-	-	［72］
I	HIV	GP	A501C + TR605C	-	-	［68］
I	Influenza A	HA	HA1： 212C + 216C	-	-	［70］
II	DENV	E	A259C or A257C	-	-	［72］
II	DENV2	E	L107C+A313C	-	-	［73］
II	ZIKV	E	A264C	-	-	［74］
II	ZIKV	E	L107C， A264C， A319C， W101A	-	-	［75］

Table 2　Virus Membrane Fusion Proteins with Pre−Fusion Conformation Stabilised via Proline Mutations

表2　通过脯氨酸突变实现预融合构象稳定化的病毒膜融合蛋白

分类	病毒	蛋白质	突变位点	三聚化方式	PDB编号	参考文献
I	hMPV	F	A185P	foldon	5WB0	［50］
I	Influenza A	HA	V55P，S71P	_	_	［48］
I	MERS-CoV	S	V1060P，L1061P	foldon	5W9I	［56］
I	SARS-CoV-2	S	K968P，V969P，A942P，F817P，A892P，A899P	foldon	6XKL	［52］
I	SARS-CoV-2	S	A892P，A942P，V987P	foldon	7A4N，7AD1	［72］
III	HSV-1	gB	H516P	-	6Z9M	［80］

Table 3　Stabilisation of Pre−Fusion Conformation in Viral Membrane Fusion Proteins via Different Strategy Combinations

表3　通过不同策略组合实现预融合构想稳定化的病毒膜融合蛋白

分类	病毒	蛋白质	突变位点	三聚化方式	PDB编号	参考文献
I	Ebola	GP	T577P， K588F	-	6VKM	［71］
I	HIV	GP	T577P， K588F， T605C， T605C	-	-	［64］
I	HIV	GP	N651F， K655I， I535N	-	6CK9	［81］
I	LASV	GP	R207C， G360C， E329P	-	5VK2	［65］
I	NiV	F	S191P， L172F， L104C ， I114C	GCN4	-	［80］
I	RSV	F	S215P， N67I	foldon	5C6B，5C69	［83］
I	SARS-CoV	S	A892P， A942P， V987P， D614N， R682S， R685G	L110C， T127C， A140C， A147C，foldon	7A4N，7AD1	［82］

5　讨论

过去几年，随着重组蛋白质表达技术，特别是昆虫-杆状病毒表达系统在抗体和生物制药领域的快速推广，基因工程亚单位疫苗等新型疫苗因其良好的生物安全性和成熟的生产工艺，已成为疫苗研发领域的新趋势。然而，基因工程重组蛋白质表达技术移植到疫苗抗原设计研发领域面临两个关键的技术瓶颈。第一，基因工程表达的病毒表面抗原多以不稳定（labile form）和亚稳定（metastable form）形式存在。导致有效抗原浓度低。第二，由于缺乏天然立体构象或形成非理想聚合物形态，基因工程表达的蛋白质或多肽不具备免疫原性或免疫原性较弱。

构建稳定的病毒膜融合蛋白是一项挑战。科学家尝试了许多方法来稳定蛋白质的预融合构象。虽然主要用于稳定第一类病毒膜融合蛋白，但三类病毒膜融合蛋白具有一些共同特征，使得这些方法具有一定的通用性此外，计算机辅助设计推动稳定预融合构象突变设计的工程化。2024 年，一种通用计算方法通过稳定预融合构象，成功应用于I类融合蛋白的工程化，显著提升了免疫原稳定

性[100-101]。2025年，该研究进一步扩展到II类和III类融合蛋白，并揭示其在靶膜识别和重排中的结构机制，为设计新型融合抑制剂奠定基础。此外，AlphaFold3等AI驱动的结构预测工具有望预测融合中间态（fusion intermediates）。人工智能（artificial intelligence，AI）结构模拟可能揭示病毒入侵宿主细胞的动态机制，帮助设计抗病毒药物和疫苗，但结果需结合实验验证以避免偏差。

2024年针对III类融合蛋白的中间体的研究表明，通过抑制膜重塑（membrane remodeling），可开发病毒抑制剂，适用于新兴变异株如SARS-CoV-2衍生变体。2025年的一项研究报道了模拟病毒融合的脂质纳米颗粒，在H5N1疫苗中展示广谱保护潜力[83]。这些发现不仅可以优化疫苗设计（如稳定预融合三聚体作为免疫原），还可以扩展到抗病毒疗法中。通过多学科整合，推动从基础机制到临床转化的加速，最终实现对呼吸道合胞病毒（RSV）和冠状病毒等高致病性病毒的精准防控。

近年来，时间分辨冷冻电镜（time-resolved cryo-EM）已成为前沿工具[102]，例如2024年的一项研究[11]利用该技术可视化病毒膜融合的中间阶段，揭示了融合肽（fusion peptide）插入靶膜时的瞬时重塑过程，揭示了脂质-蛋白质相互作用在克服动力学势垒（kinetic barriers）中的作用。未来，通过整合多模态结构生物学技术，将进一步深化对融合动态的理解。

总之，病毒膜融合蛋白的预融合构象因其在病毒入侵过程中所处的功能关键状态，具有重要的医学价值。探索病毒膜融合蛋白的预融合构象稳定化方案，不仅有助于保留其天然抗原表位，还可为疫苗和抗病毒药物的开发提供理想的抗原模板。

参考文献

[1] Dessau M A, Modis Y. Protein crystallization for X-ray crystallography. J Vis Exp, **2011**(47): 2285

[2] Earl L A, Falconieri V, Milne J L, *et al*. Cryo-EM: beyond the microscope. Curr Opin Struct Biol, 2017, 46: 71-78

[3] Rowlinson B, Crublet E, Kerfah R, *et al*. Specific isotopic labelling and reverse labelling for protein NMR spectroscopy: using metabolic precursors in sample preparation. Biochem Soc Trans, 2022, **50**(6): 1555-1567

[4] Chernomordik L V, Kozlov M M. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. Annu Rev Biochem, 2003, 72: 175-207

[5] van Tilburg M, Hilbers P A J, Markvoort A J. On the role of membrane embedding, protein rigidity and transmembrane length in lipid membrane fusion. Soft Matter, 2023, **19**(9): 1791-1802

[6] Harrison S C. Viral membrane fusion. Virology, 2015, 479: 498-507

[7] Barrett C T, Dutch R E. Viral membrane fusion and the transmembrane domain. Viruses, 2020, **12**(7): E693

[8] Chernomordik L V, Frolov V A, Leikina E, *et al*. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. J Cell Biol, 1998, **140**(6): 1369-1382

[9] Chlanda P, Mekhedov E, Waters H, *et al*. The hemifusion structure induced by influenza virus haemagglutinin is determined by physical properties of the target membranes. Nat Microbiol, 2016, **1**(6): 16050

[10] Risselada H J, Grubmüller H. How proteins open fusion pores: insights from molecular simulations. Eur Biophys J, 2021, **50**(2): 279-293

[11] Kephart S M, Hom N, Lee K K. Visualizing intermediate stages of viral membrane fusion by cryo-electron tomography. Trends Biochem Sci, 2024, **49**(10): 916-931

[12] Wilson I A, Skehel J J, Wiley D C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 A resolution. Nature, 1981, **289**(5796): 366-373

[13] Zhu L, Wang X, Ren J, *et al*. Structure of human Aichi virus and implications for receptor binding. Nat Microbiol, 2016, **1**(11): 16150

[14] Zhu M, Anirudhan V, Du R, *et al*. Influenza virus cell entry and targeted antiviral development. J Med Virol, 2023, **95**(11): e29181

[15] Rey F A, Lok S M. Common features of enveloped viruses and implications for immunogen design for next-generation vaccines. Cell, 2018, **172**(6): 1319-1334

[16] Benton D J, Gamblin S J, Rosenthal P B, *et al*. Structural transitions in influenza haemagglutinin at membrane fusion pH. Nature, 2020, **583**(7814): 150-153

[17] Schiffner T, Phung I, Ray R, *et al*. Vaccination induces broadly neutralizing antibody precursors to HIV gp41. Nat Immunol, 2024, **25**(6): 1073-1082

[18] Roymans D, De Bondt H L, Arnoult E, *et al*. Binding of a potent small-molecule inhibitor of six-helix bundle formation requires interactions with both heptad-repeats of the RSV fusion protein. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, **107**(1): 308-313

[19] Vaknin A, Grossman A, Durham N D, *et al*. Ebola virus glycoprotein strongly binds to membranes in the absence of receptor engagement. ACS Infect Dis, 2024, **10**(5): 1590-1601

[20] Mercer J, Lee J E, Saphire E O, *et al*. SnapShot: enveloped virus entry. Cell, 2020, **182**(3): 786-786.e1

[21] Wu N C, Wilson I A. Structural biology of influenza hemagglutinin: an amaranthine adventure. Viruses, 2020, **12**(9): E1053

[22] Das D K, Bulow U, Diehl W E, *et al*. Conformational changes in the Ebola virus membrane fusion machine induced by pH, Ca^{2+}, and receptor binding. PLoS Biol, 2020, **18**(2): e3000626

[23] McCool R S, Musayev M, Bush S M, *et al*. Vaccination with

prefusion-stabilized respiratory syncytial virus fusion protein elicits antibodies targeting a membrane-proximal epitope. J Virol, 2023, **97**(10): e0092923

[24] Rey F A, Heinz F X, Mandl C, *et al*. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. Nature, 1995, **375**(6529): 291-298

[25] Zuzic L, Marzinek J K, Anand G S, *et al*. A pH-dependent cluster of charges in a conserved cryptic pocket on flaviviral envelopes. eLife, 2023, **12**: e82447

[26] Yang P, Li W, Fan X, *et al*. Structural basis for VLDLR recognition by eastern equine encephalitis virus. Nat Commun, 2024, **15**(1): 6548

[27] White J M, Whittaker G R. Fusion of enveloped viruses in endosomes. Traffic, 2016, **17**(6): 593-614

[28] Modis Y, Ogata S, Clements D, *et al*. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. Nature, 2004, **427**(6972): 313-319

[29] Gibbons D L, Vaney M C, Roussel A, *et al*. Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. Nature, 2004, **427**(6972): 320-325

[30] Li L, Jose J, Xiang Y, *et al*. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. Nature, 2010, **468**(7324): 705-708

[31] 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

[32] Roche S, Rey F A, Gaudin Y, *et al*. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. Science, 2007, **315** (5813): 843-848

[33] 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

[34] Backovic M, Jardetzky T S. Class III viral membrane fusion proteins. Curr Opin Struct Biol, 2009, **19**(2): 189-196

[35] Steven A C, Spear P G. Viral glycoproteins and an evolutionary conundrum. Science, 2006, **313**(5784): 177-178

[36] Fan Q, Hippler D P, Yang Y, *et al*. Multiple sites on glycoprotein H (gH) functionally interact with the gB fusion protein to promote fusion during herpes simplex virus (HSV) entry. mBio, 2023, **14** (1): e0336822

[37] Vallbracht M, Brun D, Tassinari M, *et al*. Structure-function dissection of pseudorabies virus glycoprotein B fusion loops. J Virol, 2018, **92**(1): e01203-17

[38] Oliver S L, Xing Y, Chen D H, *et al*. A glycoprotein B-neutralizing antibody structure at 2.8 Å uncovers a critical domain for herpesvirus fusion initiation. Nat Commun, 2020, **11**(1): 4141

[39] Chandramouli S, Ciferri C, Nikitin P A, *et al*. Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody. Nat Commun, 2015, **6**: 8176

[40] Backovic M, Longnecker R, Jardetzky T S. Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106**(8): 2880-2885

[41] Kadlec J, Loureiro S, Abrescia N G, *et al*. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. Nat Struct Mol Biol, 2008, **15**(10): 1024-1030

[42] Peng R, Zhang S, Cui Y, *et al*. Structures of human-infecting *Thogotovirus* fusogens support a common ancestor with insect baculovirus. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, **114**(42): E8905-E8912

[43] Dittmar T, Zänker K S. Cell fusion in health and disease. volume II: cell fusion in disease. introduction. Adv Exp Med Biol, 2011, 714: 1-3

[44] Si Z, Zhang J, Shivakoti S, *et al*. Different functional states of fusion protein gB revealed on human cytomegalovirus by cryo electron tomography with Volta phase plate. PLoS Pathog, 2018, **14**(12): e1007452

[45] Yang F, Zhai L, Yin K, *et al*. Molecular basis of two broad-spectrum antibodies neutralizing rabies virus and other phylogroup-I lyssaviruses by blocking structural transition between the pleckstrin-homology and fusion domains in the glycoprotein. Int J Biol Macromol, 2025, **308**: 142570

[46] Kedari A, Iheozor-Ejiofor R, Salminen P, *et al*. Structural insight into rabies virus neutralization revealed by an engineered antibody scaffold. Structure, 2024, **32**(12): 2220-2230.e4

[47] Gaudin Y. Reversibility in fusion protein conformational changes. The intriguing case of rhabdovirus-induced membrane fusion. Subcell Biochem, 2000, 34: 379-408

[48] Bakkers M J G, Ritschel T, Tiemessen M, *et al*. Efficacious human metapneumovirus vaccine based on AI-guided engineering of a closed prefusion trimer. Nat Commun, 2024, **15**(1): 6270

[49] Lee J E, Fusco M L, Hessell A J, *et al*. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. Nature, 2008, **454**(7201): 177-182

[50] Johnson S, Oliver C, Prince G A, *et al*. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent *in vitro* and *in vivo* activity against respiratory syncytial virus. J Infect Dis, 1997, **176**(5): 1215-1224

[51] Ngwuta J O, Chen M, Modjarrad K, *et al*. Prefusion F-specific antibodies determine the magnitude of RSV neutralizing activity in human sera. Sci Transl Med, 2015, **7**(309): 309ra162

[52] Krarup A, Truan D, Furmanova-Hollenstein P, *et al*. A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. Nat Commun, 2015, **6**: 8143

[53] Ghosh D K, Ranjan A. The metastable states of proteins. Protein Sci, 2020, **29**(7): 1559-1568

[54] Yin H S, Paterson R G, Wen X, *et al*. Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(26): 9288-9293

[55] Vitu E, Sharma S, Stampfer S D, *et al*. Extensive mutagenesis of the HSV-1 gB ectodomain reveals remarkable stability of its postfusion form. J Mol Biol, 2013, **425**(11): 2056-2071

[56] Ison M G, Papi A, Athan E, *et al*. Efficacy and safety of respiratory syncytial virus (RSV) prefusion F protein vaccine (RSVPreF3 OA) in older adults over 2 RSV SeasonsOpen access. Clin Infect Dis, 2024, **78**(6): 1732-1744

[57] Zhu Q, Liu P, Liu S, *et al*. Enhancing RBD exposure and S1 shedding by an extremely conserved SARS-CoV-2 NTD epitope. Signal Transduct Target Ther, 2024, **9**(1): 217

[58] Zhu L, Deng Y Q, Zhang R R, *et al*. Double lock of a potent human therapeutic monoclonal antibody against SARS-CoV-2. Natl Sci Rev, 2021, **8**(3): nwaa297

[59] Heinz F X, Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. NPJ Vaccines, 2021, **6**(1): 104

[60] Bykhovskaia M. Molecular dynamics simulations of the proteins regulating synaptic vesicle fusion. Membranes: Basel, 2023, **13** (3): 307

[61] Battles M B, Más V, Olmedillas E, *et al*. Structure and immunogenicity of pre-fusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. Nat Commun, 2017, **8**(1): 1528

[62] Pallesen J, Wang N, Corbett K S, *et al*. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, **114**(35): E7348-E7357

[63] Schweke H, Pacesa M, Levin T, *et al*. An atlas of protein homo-oligomerization across domains of life. Cell, 2024, **187**(4): 999-1010.e15

[64] Zhu J, Tao P, Chopra A K, *et al*. Bacteriophage T4 as a protein-based, adjuvant- and needle-free, mucosal pandemic vaccine design platform. Annu Rev Virol, 2024, **11**(1): 395-420

[65] Byrne P O, Blade E G, Fisher B E, *et al*. Prefusion stabilization of the hendra and Langya virus F proteins. J Virol, 2024, **98**(2): e0137223

[66] Froese J, Mandalari M, Civera M, *et al*. Evolution of SARS-CoV-2 spike trimers towards optimized heparan sulfate cross-linking and inter-chain mobility. Sci Rep, 2024, **14**(1): 32174

[67] Nelson A N, Shen X, Vekatayogi S, *et al*. Immunization with germ line-targeting SOSIP trimers elicits broadly neutralizing antibody precursors in infant macaques. Sci Immunol, 2024, **9**(98): eadm7097

[68] Pedenko B, Sulbaran G, Guilligay D, *et al*. SARS-CoV-2 S glycoprotein stabilization strategies. Viruses, 2023, **15**(2): 558

[69] Mascarenhas N M, Gosavi S. Understanding protein domain-swapping using structure-based models of protein folding. Prog Biophys Mol Biol, 2017, 128: 113-120

[70] Yin H S, Wen X, Paterson R G, *et al*. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. Nature, 2006, **439**(7072): 38-44

[71] Güthe S, Kapinos L, Möglich A, *et al*. Very fast folding and association of a trimerization domain from bacteriophage T4 fibritin. J Mol Biol, 2004, **337**(4): 905-915

[72] Tao Y, Strelkov S V, Mesyanzhinov V V, *et al*. Structure of bacteriophage T4 fibritin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. Structure, 1997, **5**(6): 789-798

[73] Chonira V, Kwon Y D, Gorman J, *et al*. A potent and broad neutralization of SARS-CoV-2 variants of concern by DARPins. Nat Chem Biol, 2023, **19**(3): 284-291

[74] Poumbourios P, Langer C, Boo I, *et al*. Enhanced stability of the SARS CoV-2 spike glycoprotein following modification of an alanine cavity in the protein core. PLoS Pathog, 2023, **19**(5): e1010981

[75] Hatlem D, Christensen M, Broeker N K, *et al*. A trimeric coiled-coil motif binds bacterial lipopolysaccharides with picomolar affinity. Front Cell Infect Microbiol, 2023, **13**: 1125482

[76] Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, *et al*. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. Science, 2015, **349**(6254): 1301-1306

[77] Walls A C, Tortorici M A, Bosch B J, *et al*. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. Nature, 2016, **531**(7592): 114-117

[78] Sliepen K, van Montfort T, Melchers M, *et al*. Immunosilencing a highly immunogenic protein trimerization domain. J Biol Chem, 2015, **290**(12): 7436-7442

[79] Mamathambika B S, Bardwell J C. Disulfide-linked protein folding pathways. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008, 24: 211-235

[80] Zhang P, Gorman J, Tsybovsky Y, *et al*. Design of soluble HIV-1 envelope trimers free of covalent gp120-gp41 bonds with prevalent native-like conformation. Cell Rep, 2024, **43**(8): 114518

[81] Hastie K M, Zandonatti M A, Kleinfelter L M, *et al*. Structural basis for antibody-mediated neutralization of Lassa virus. Science, 2017, **356**(6341): 923-928

[82] Joyce M G, Zhang B, Ou L, *et al*. Iterative structure-based improvement of a fusion-glycoprotein vaccine against RSV. Nat Struct Mol Biol, 2016, **23**(9): 811-820

[83] Kawai A, Shimizu T, Tanaka H, *et al*. Low-inflammatory lipid nanoparticle-based mRNA vaccine elicits protective immunity against H5N1 influenza virus with reduced adverse reactions. Mol Ther, 2025, **33**(2): 529-547

[84] Slon Campos J L, Marchese S, Rana J, *et al*. Temperature-dependent folding allows stable dimerization of secretory and virus-associated E proteins of Dengue and Zika viruses in mammalian cells. Sci Rep, 2017, **7**(1): 966

[85] Rouvinski A, Dejnirattisai W, Guardado-Calvo P, *et al*. Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop epitope. Nat Commun, 2017, **8**: 15411

[86] Wong J J, Paterson R G, Lamb R A, *et al*. Structure and stabilization of the Hendra virus F glycoprotein in its prefusion form. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, **113**(4): 1056-1061

[87] Lee J K, Prussia A, Snyder J P, *et al*. Reversible inhibition of the fusion activity of measles virus F protein by an engineered intersubunit disulfide bridge. J Virol, 2007, **81**(16): 8821-8826

[88] Zokarkar A, Connolly S A, Jardetzky T S, *et al*. Reversible inhibition of fusion activity of a paramyxovirus fusion protein by an engineered disulfide bond in the membrane-proximal external region. J Virol, 2012, **86**(22): 12397-12401

[89] Saito M, Kono H, Morii H, *et al*. Cavity-filling mutations enhance protein stability by lowering the free energy of native state. J Phys Chem B, 2000, **104**(15): 3705-3711

[90] Ji J, Shukla A D, Mandal R, *et al*. Nanoscale topography dictates

residue hydropathy in proteins. Langmuir, 2024, **40**(42): 22049-22057

[91] Loomis R J, Stewart-Jones G B E, Tsybovsky Y, *et al*. Structure-based design of Nipah virus vaccines: a generalizable approach to paramyxovirus immunogen development. Front Immunol, 2020, **11**: 842

[92] Rutten L, Lai Y T, Blokland S, *et al*. A universal approach to optimize the folding and stability of prefusion-closed HIV-1 envelope trimers. Cell Rep, 2018, **23**(2): 584-595

[93] Juraszek J, Rutten L, Blokland S, *et al*. Stabilizing the closed SARS-CoV-2 spike trimer. Nat Commun, 2021, **12**(1): 244

[94] Zhang M, Wang Y, He W, *et al*. Design, synthesis, and evaluation of novel enterovirus 71 inhibitors as therapeutic drug leads for the treatment of human hand, foot, and mouth disease. J Med Chem, 2020, **63**(3): 1233-1244

[95] Freidel M R, Armen R S. Research progress on spike-dependent SARS-CoV-2 fusion inhibitors and small molecules targeting the S2 subunit of spike. Viruses, 2024, **16**(5): 712

[96] Guo L, Lin S, Chen Z, *et al*. Targetable elements in SARS-CoV-2 S2 subunit for the design of pan-coronavirus fusion inhibitors and vaccines. Signal Transduct Target Ther, 2023, **8**(1): 197

[97] Song Q, Zhu H, Qiu M, *et al*. A new mechanism of respiratory syncytial virus entry inhibition by small-molecule to overcome K394R-associated resistance. mBio, 2024, **15**(9): e0138524

[98] Li Y Y, Liang G D, Chen Z X, *et al*. A small molecule compound targeting hemagglutinin inhibits influenza A virus and exhibits broad-spectrum antiviral activity. Acta Pharmacol Sin, 2024, **45**(11): 2380-2393

[99] Kadam R U, Wilson I A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, **114**(2): 206-214

[100] Gonzalez K J, Huang J, Criado M F, *et al*. A general computational design strategy for stabilizing viral class I fusion proteins. Nat Commun, 2024, **15**(1): 1335

[101] Poojari C S, Bommer T, Hub J S. Viral fusion proteins of classes II and III recognize and reorganize complex biological membranes. Commun Biol, 2025, **8**(1): 717

[102] Mao Y. Dynamics-based drug discovery by time-resolved cryo-EM. Curr Opin Struct Biol, 2025, **91**: 103001

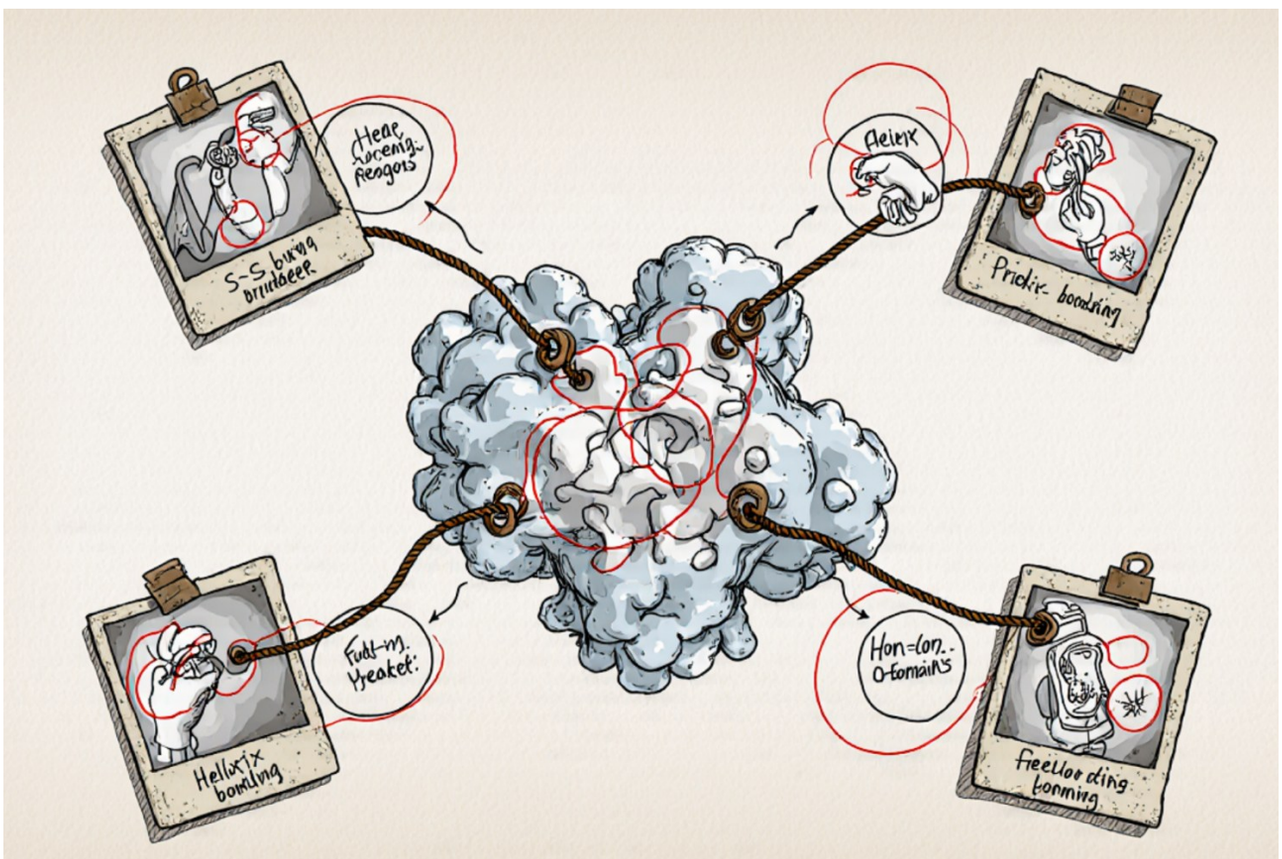
The Mechanism of Conformational Transition and Stabilisation Strategies of Viral Membrane Fusion Proteins*

XIE Chen-Yi[1)], DONG Xiang-Ge[2)], ZHAN Jiu-Yu[1)**], ZHU Hong-Wei[1,2)**], YU Xin[1,2)], LIU Yang[1,2)], YU Jia-Yu[1,2)], ZHANG Xing-Xiao[1,2)]

([1)]*School of Life Sciences, Ludong University, Yantai* 264025, China;

[2)]*Yantai Key Laboratory of Animal Pathogenic Microbiology and Immunology, Yantai* 264025, China)

Graphical abstract



Abstract　Viral membrane fusion proteins facilitate the fusion of viral and host cell membranes by undergoing a transition from a prefusion conformation to a post-fusion conformation, thereby enabling the transfer of viral nucleic acids into the cell interior. This transition process is characterized by peptide exposure, membrane insertion, and structural refolding. The prefusion configuration represents an optimal target for vaccine formulation and antiviral pharmacotherapy. However, the metastable nature of the prefusion conformation makes it prone to spontaneous conversion into the stable post-fusion conformation, thereby complicating structural analysis and vaccine design. Investigating the mechanisms of conformational change in these proteins and developing methods to stabilize their prefusion state remain challenging research topics. This review summarizes

the structural and functional differences among three classes of membrane fusion proteins: Class I proteins, which are predominantly composed of α-helices, form trimers, and rely on receptor binding or low pH to trigger fusion peptide release; Class II proteins, which are mainly β-sheet-rich, rearrange from dimers to trimers and activate fusion loops via low pH; and Class III proteins, which combine α-helices and β-structures, with mechanisms involving internal fusion loop insertion and membrane remodeling. It is evident that a comprehensive understanding of the mechanisms underlying viral membrane fusion is crucial for developing effective stabilization strategies for the prefusion conformation of these proteins. This paper presents several such methods that have been successfully employed in this endeavor, including: disulfide bond formation to stabilize domain-domain interactions; hydrophobic cavity filling to enhance core stability; proline substitution to restrict structural transitions in hinge regions; and multimer domains stabilizing the trimeric conformation. The stabilization strategies summarized and discussed herein have been validated in studies of multiple viral membrane fusion proteins and further applied in the design of vaccine antigens. Moreover, this paper highlights the potential applications of novel techniques, such as time-resolved cryo-EM, in capturing conformational intermediates and resolving dynamic transition processes. Such stabilization efforts, informed by structural insights, have yielded promising outcomes—for instance, prefusion-stabilized RSV F antigens that elicit potent neutralizing antibodies in clinical trials. Looking ahead, integrating computational modeling, such as AlphaFold predictions, with experimental data will further refine these approaches. Ultimately, these innovations promise to enable structure-guided therapeutics to combat emerging viral threats. This review provides a theoretical foundation for developing stable viral membrane fusion proteins, offering crucial insights for understanding viral membrane fusion mechanisms and advancing next-generation vaccines and antiviral drugs.

Key words viral membrane fusion protein, membrane fusion mechanism, pre-fusion conformation, post-fusion conformation,conformational stability

DOI：10.3724/j.pibb.2025.0284 **CSTR**：32369.14.pibb.20250284

* This work was supported by a grant from Yantai City School-Community Integration Development Project (2022).

** Corresponding author.

ZHAN Jiu-Yu. Tel：86-13001620978，E-mail：zhanjy@ldu.edu.cn

ZHU Hong-Wei. Tel：86-17852615790，E-mail：hwzhu@ldu.edu.cn

Received：June 11，2025 Accepted：October 28，2025