

综述与专论

囊膜病毒膜融合分子机制*

王晓佳¹⁾ 张卫红²⁾ 汪明¹⁾** 高福³⁾**⁽¹⁾ 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; ⁽²⁾ Oxagen Ltd. Oxfordshire, Oxford, UK;⁽³⁾ Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, UK)

摘要 囊膜病毒可能采用相似的病毒-宿主细胞膜融合机制, 即病毒表面糖蛋白结合到宿主细胞受体后, 启动了病毒融合蛋白的一系列构象变化, 根据囊膜蛋白构象变化特征, 囊膜病毒可采用两种以上的方式发生膜融合, 并据此分为两类: I 型病毒膜融合和 II 型病毒膜融合. II 型病毒膜融合以黄病毒为代表, 其分子机制与 I 型病毒膜融合不同, 但不很清楚. 而 I 型病毒膜融合中, 如艾滋病毒, 流感病毒等, 在囊膜蛋白变构形成稳定折叠的发夹三聚体结构时, 拉近了两膜之间的距离, 此过程释放出来的能量进一步促使两膜融合. 膜融合使病毒蛋白及病毒 RNA 基因组释放到宿主细胞内而感染宿主. 以上述研究为基础设计的 C 肽/N 肽小分子抑制子, 可以在病毒糖蛋白中间体构象形成的短时间内, 高效、特异地竞争结合其配体, 从而阻止糖蛋白的进一步折叠, 达到抑制病毒入侵的目的, 为病毒疾病的防治提供了新思路 and 策略. 针对艾滋病毒设计的 C 肽, 即 T20 或 Enfuvirtide 在临床应用效果很好. 以艾滋病毒和流感病毒为例, 主要对 I 型病毒膜融合的研究进展进行了讨论.

关键词 囊膜病毒, 病毒膜融合, 构象变化

学科分类号 Q6

近年来的研究发现, 脂质双层膜的融合在多种生物学过程中有着重要意义, 例如: 细胞膜运输、受精、肌肉的发育及病毒感染等过程. 由于抗病毒药物的急切需求, 目前, 有关囊膜病毒的囊膜与宿主细胞膜的融合过程研究已经成为当今脂质双层研究的热点之一. 当囊膜病毒感染宿主细胞时, 其囊膜与宿主细胞膜相互融合, 进而使病毒粒子侵入宿主细胞内 (病毒的遗传物质是以核衣壳的形式进入). 现已知道, 病毒的表面糖蛋白 (通过识别结合相应的特异性受体) 介导这一融合过程, 而这一融合过程是囊膜病毒侵染的第一道关口.

病毒侵染细胞的生命周期需要吸附、侵入、脱壳、病毒成分的合成、病毒粒子的装配与释放等一系列步骤. 病毒膜融合过程包括了吸附、侵入、脱壳的整个过程, 这是一个连续的过程, 当然这主要是针对带有囊膜的病毒而言. 可简单地按病毒外壳是否包裹着富含脂质的膜, 将病毒分为无囊膜病毒和有囊膜病毒两类. 无囊膜病毒主要是通过吞饮作用 (endocytosis) 在网格蛋白 (clathrin) 介导下进入被感染的细胞内^[1, 2]. 有囊膜病毒的侵入过程主要是病毒囊膜与宿主细胞膜的融合过程, 在系列分子作用机制下, 两个膜融合成为一个膜, 从而使病毒侵入, 完成其生命周期的第一个关键步骤. 在分子水平上研究这一过程, 既有助于我们认识病毒侵染

过程的本质, 又有利于找出其弱点, 从而攻之, 达到预防与治疗病毒病的目的^[3~9].

1 病毒的囊膜结构与囊膜蛋白

病毒囊膜的化学本质与细胞膜是一样的, 因为它源于宿主的细胞膜. 早期的研究发现, 病毒的囊膜与致病力相关, 用脂溶性溶剂溶解破坏囊膜后, 囊膜病毒即失去感染性, 因为囊膜上有一种或几种病毒基因所编码的囊膜蛋白, 它 (们) 与病毒的感染关系密切. 这些早期的观察, 后来已在分子与细胞水平得以证实: 电镜下观察到了镶嵌在囊膜表面的蛋白质, 分离了相应的蛋白质并分析了编码其基因的 DNA 序列等. 现已知道, 病毒囊膜表面的囊膜蛋白通常有 1~3 种, 这主要取决于不同的病毒科, 而且多数为糖基化的糖蛋白, 并且越来越多的证据表明, 糖修饰对病毒是极为有利的^[10]. 囊膜病毒分属于不同的科 (family), 不同科的病毒其基因组功能、生命周期以及病毒粒子放射学数据各不相同, 科是病毒分类最有意义的基本单元.

* 国家自然科学基金委员会海外青年学者合作研究基金资助项目 (30228025).

** 通讯联系人.

汪明 Tel: 010-62892840, E-mail: vetdean@cau.edu.cn

高福 Tel: 44-1865-228927, Fax: 44-1865-222901

E-mail: george.gao@ndm.ox.ac.uk, ggao66@yahoo.com

收稿日期: 2003-12-23, 接受日期: 2004-02-28

但它们也有共性,即所有囊膜病毒拥有共同的感染机制:病毒表面的重要功能结构糖蛋白介导病毒囊膜与宿主细胞膜之间的融合,使病毒的内容物(以核衣壳的形式)释放到宿主细胞中。目前对病毒囊膜蛋白结构(尤其是晶体结构)与功能的研究发现,在分子水平上,病毒的融合可以归纳为两类:一类以流感病毒和人艾滋病毒(HIV)为代表,它们的病毒粒子在电镜下可见到明显的“纤突”或“刺突”,此类归纳为Ⅰ型病毒融合;一类则以黄病毒为代表,称为Ⅱ型病毒融合,它们的表面糖蛋白不形成“纤突”,分子机制不如前者清楚^[11, 12]。目前还不清楚是否存在有Ⅲ型或更多的融合形式,但已知,至少有些囊膜病毒,并没有明显的特征证明它们会完全按照这两种融合方式进入细胞,需要进行进一步的研究。

在病毒囊膜上呈突起状的糖蛋白为典型的Ⅰ型(或Ⅱ型,较少见,如副黏病毒的HN)完整膜蛋白^[13],是由病毒本身编码、由被感染细胞所合成的,其被整合到宿主细胞膜上,最后再整合到处于出芽状态的病毒上,除了其在病毒膜融合中的作用以外,宿主的许多免疫反应靶向这些糖基化蛋白,因而是免疫与疫苗研究的主要靶点。不同囊膜病毒囊膜糖蛋白结构差异很大,如:流感病毒主要含有两种糖蛋白,即血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)。HA与NA共同介导病毒与宿主细胞的早期相互作用(即和受体唾液酸结合),其中HA具有诱发融合的功能^[14]。而人免疫缺陷病毒(HIV)的囊膜糖蛋白只有一种,为gp160,其由宿主细胞内的酶作用后裂解成共价键相结合的gp120及gp41, gp41也具有诱发融合的功能^[15]。副黏病毒囊膜表面糖蛋白主要有两种,即血凝素神经氨酸酶(HN)(或同工蛋白质H、G)及融合蛋白(F),对某些副黏病毒,HN对融合不是绝对必需的^[4]。融合蛋白(F)由前体形式(F_0)裂解产生有融合活性的 F_1 、 F_2 蛋白^[16]。纤丝病毒则只有一种囊膜蛋白,称为GP,由GP1和GP2两个亚单位组成^[17]。目前研究表明,与病毒融合有关的融合蛋白在其一级结构上含有多个明显的结构功能域(module或domain),很容易用简单的程序分析得出,如与受体结合的受体识别亚单位(HIV中的gp120),直接负责插入细胞的融合肽(fusion peptide),迫使病毒膜与细胞膜拉近的两个七肽重复区(heptad repeat, HR1和HR2)等^[4-8]。与融合有关的HIV病毒囊膜蛋白结构域见图1a,图1b显

示采用Kim等^[18]发明的LearnCoil-VMF程序(<http://nightingale.lcs.mit.edu/cgi-bin/vmf>)识别典型的七肽重复区。这种七肽重复序列极具特征性,在HR1和HR2中,大约各自有3~4个七肽重复,每个重复都有亮氨酸或异亮氨酸开始,现已开发出多种计算机程序用于预测这种结构。

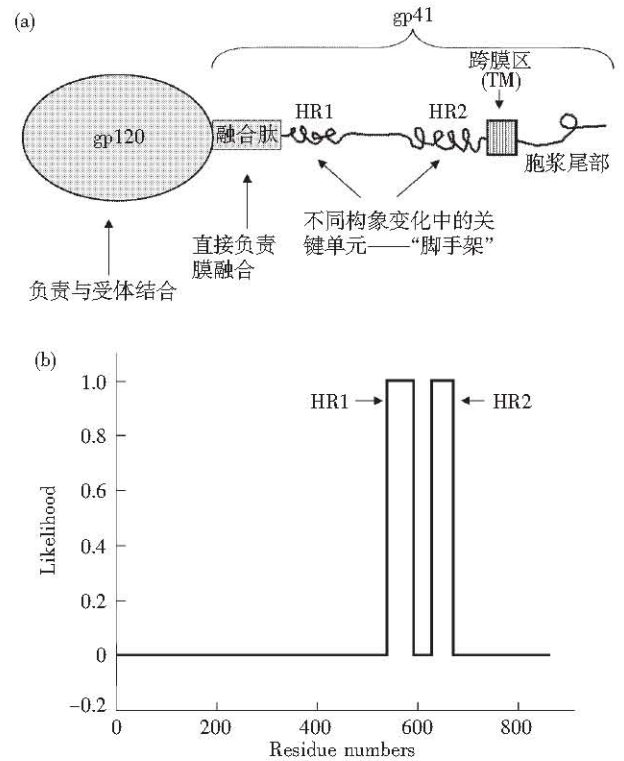


Fig. 1 Structural and functional modules/domains of HIV gp160

图1 与病毒膜融合密切相关的病毒融合蛋白中重要的结构与功能域

(a) HIV病毒gp160一级结构模式图。图中表示与病毒融合有关的主要结构域。融合蛋白gp160由两个亚基组成, gp120和gp41。gp120负责与受体及共受体结合, 位于gp41开端的融合肽负责插入细胞的脂质双层膜中, 从而锚定于细胞膜。七肽重复区HR1和HR2发生重要的构象变化, 在融合后构象中形成六螺旋束, 帮助拉近病毒与细胞膜; 跨膜区将融合蛋白锚定在病毒囊膜上; 胞浆尾部的功能不是十分清楚, 其HIV病毒长达150多个氨基酸。(b)用LearnCoil-VMF程序预测出典型的七肽重复区HR1和HR2的存在。图中示HIV病毒gp160的预测情况, 该程序可以准确地预测多种病毒融合蛋白之七肽重复区HR1和HR2。

1997年, Wiley和Kim研究组^[19, 20]在Lu等^[21]用生物化学与生物物理方法确认2个七肽重复区呈反平行方式组成一个六聚体的基础上, 用X

射线成像法确认了 2 个七肽重复区的六聚体结构(图 2a 和 2b), 即 3 个 HR1 (N-1) α 螺旋在中间形成这个六聚体之轴心, 周围包围了 3 个呈 α 螺旋结构的 HR2 (C-1), 此结构被称作六螺旋束 (6-helix bundle). 随后的研究发现, 这种结构在多

种病毒的融合蛋白中普遍存在^[7, 18], 包括我们对系列副黏病毒的研究^[22~25]. 再加上早先 Wiley 及其同事对流感病毒 HA 结构的研究, 一个比较清晰的 I 型病毒融合分子机制的假说应运而生. 以下我们将重点加以讨论.

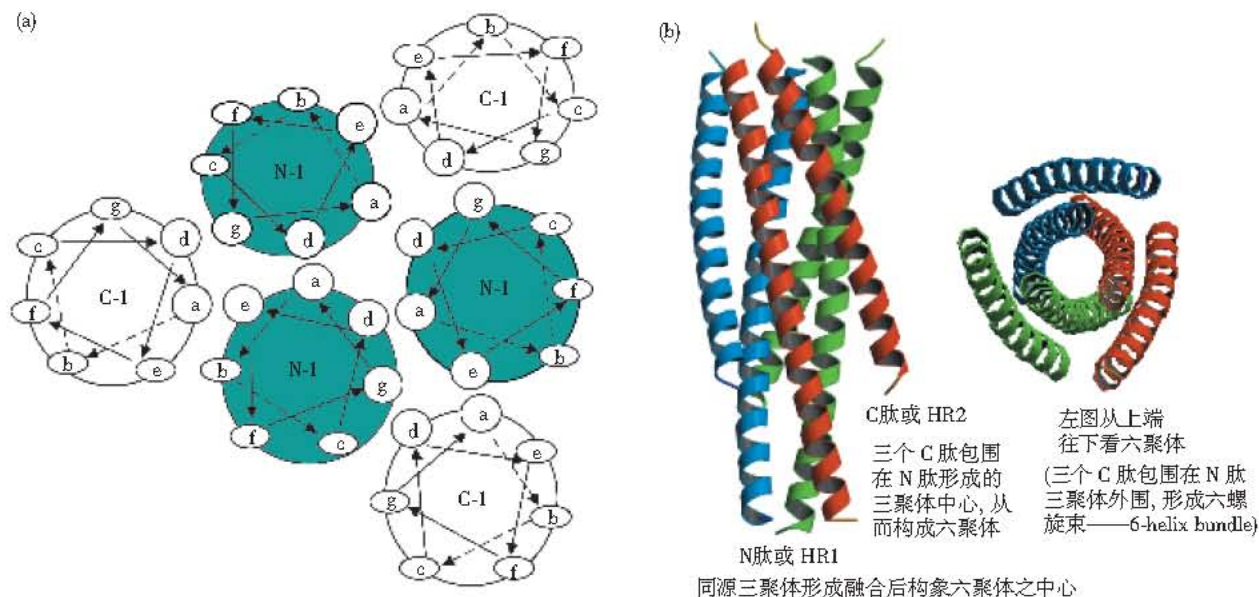


Fig. 2 Prediction of heptad repeat (HR1 and HR2) regions of HIV gp160 using LearnCoil-VMF

图 2 融合蛋白中七肽重复区 HR1 和 HR2 形成典型的螺旋卷曲结构 (Coiled-coil)

(a) 七肽重复区 HR1 (N-1) 和 HR2 (C-1) 形成的六螺旋束 α 螺旋轮状图. 示 HR1 中的 a、d 氨基酸相互作用形成三螺旋, HR2 的 a、d 位与 HR1 中的 e、g 位相互作用包裹在 HR1 三螺旋周围, 从而形成六螺旋束 (6-helix coiled-coil bundle).

(b) HIV 病毒 gp41 中七肽重复区形成的六螺旋束之晶体结构, N 肽形成的螺旋比 C 肽形成的螺旋要长.

2 囊膜病毒膜融合模式

大多数囊膜病毒从宿主细胞膜上出芽, 籍此获得细胞来源的脂质双层; 部分病毒从内质网一类的内质膜上出芽, 这类病毒只有在低 pH 条件下才能发生病毒-细胞膜 (或胞内体膜) 融合, 故称为 pH 依赖型病毒, 包括正黏病毒、披膜病毒、黄病毒、弹状病毒等. 从原生质膜上出芽的病毒在中性 pH 条件下可发生病毒-细胞膜融合, 故称为非 pH 依赖型病毒, 包括反转录病毒、副黏病毒、疱疹病毒、冠状病毒 (如新近出现的 SARS 病毒) 等^[1, 13, 14]. 目前对 pH 依赖型病毒研究最多的是正黏病毒科的流感病毒, 对非 pH 依赖型病毒研究最多的是反转录病毒科的免疫缺陷病毒. 本文则以此两种病毒为主要阐述对象, 即包括了在低 pH 条件下与胞内体 (endosome) 膜融合的流感病毒和在中性 pH 条件下与细胞膜融合的 HIV 病毒.

这两种病毒囊膜糖蛋白在宿主细胞内以前体蛋白形式被合成 (流感病毒 HA₀/HIV 病毒 gp160), 然后被蛋白酶裂解为两个亚单位: 表面亚单位 (HA₁/gp120) 及跨膜亚单位 (HA₂/gp41), 表面亚单位用于识别及结合到宿主细胞的特异性受体上, 而跨膜亚单位包括融合肽 (fusion peptide) 区 (N 端), 在病毒膜内通过疏水膜-跨螺旋结构 (TM) 而被锚定, 其为病毒融合的功能单位. 他们的共同特点是均形成同源三聚体复合物^[6, 8]. 现已知道, 这种三聚体结构对维系病毒囊膜蛋白的完整性, 尤其是“隐藏”融合肽十分重要^[26]. 其中, 流感病毒表面亚单位 HA₁ 以二硫键与跨膜亚单位 HA₂ 共价结合, HA₁ 结合到受体唾液酸后, 原本于中性 pH 条件下为紧闭“夹子”状结构的 HA₁ 区域, 在低 pH 条件下发生重排 (一般情况)^[14], 并逐步与 HA₂ 区解离, 这对于变构为 HA 融合激活状态意义非常, 其后流感病毒被胞吞 (endocytosis). 因

此, 流感病毒的膜融合是病毒囊膜与吞饮进细胞内的胞内体膜的融合, 不是细胞膜, 随后按照吞饮作用的系列变化而释放其遗传物质^[1, 2]. 值得提出的是, 流感病毒 HA 重排被启动后的构象变化可自主发生, 即 HA₂ 卷曲及最终融合构象 (六聚体) 的形成无需低 pH 条件. 而对于 HIV-1, gp160 被裂解为表面亚单位 gp120 及跨膜亚单位 gp41, 二者可能非共价结合, 在中性 pH 条件下, gp120 结合到细胞受体 CD4/辅助受体 CCR5/CXCR4 上以后, 病毒于细胞表面完成侵入宿主细胞的过程. 最近也有研究报道了 HIV 病毒在低 pH 条件下通过吞饮的融合^[27].

3 病毒膜融合的关键——融合蛋白的构象变化

蛋白质构象变化在蛋白质多样化功能中十分重要, 而且被证明是生命现象中较为普遍存在的. 这也从中解释了人类基因数量远远少于我们曾经估计的数量, 因为同一蛋白质的不同构象变化带来了不同的功能. 十几年前生物化学研究证明, 低 pH 条件可激活 HA 的膜融合, 诱导 HA 发生不可逆的构象变化 (一种构象转化为另一种构象). 相似地, HIV-1 的融合糖蛋白在与 CD4 这种融合激活信号结合反应时也发生构象变化, 整个分子结构发生了重排^[28], 生化表现为: 在暴露于融合激活状态 (对 HA 为低 pH, 对 gp160 为 CD4) 时, 两种病毒蛋白变得更疏水, 且都具有结合双-氨基萘磺酸疏水性荧光染料的功能^[13, 14]. 在蛋白质水解敏感性上 HA 及 gp160 都有变化. 圆二色谱 (CD) 实验指出, 病毒糖蛋白的 α 螺旋趋势变大^[14, 29]. 电子显微镜观察表明 HA 区发生了巨大变化, 发现分子球形顶部区域发生了部分解离, 对于 HIV-1 (实验室适应株), CD4 的暴露可引起 gp120 与 gp41 的解离、脱落. 突变 (尤其是亮氨酸到丙氨酸、色氨酸到精氨酸、天冬氨酸到亮氨酸的突变) 研究证实其存在不同的构象, 糖蛋白卷曲区域中的点突变可使病毒感染力及病毒糖蛋白诱导的膜融合能力降低 (突变可扰乱蛋白质融合激活状态, 但不扰乱非融合时蛋白质结构)^[14, 29]; 蛋白质表位的可接近性也发生变化, 例如, 与天然 HA 反应的单抗不能在低 pH 值诱导的构象变化后免疫沉淀 HA, 同时, 低 pH 激活 HA 时暴露出的位点为抗体特异性, 如抗氨基端融合肽的抗体不能免疫沉淀天然 HA^[14]. Wiley 及其同事已经对这两种不同构象的 HA 进行

了十分详细的晶体结构分析, 证明他们的构象确实差异很大^[26, 30, 31], 前者是处于一种亚稳定状态, 而后者结构非常稳定.

因此, 整个融合过程实际上就是病毒融合蛋白质构象变化的过程, 以下对变化各阶段的蛋白质构象分别进行阐述, 流感病毒与 HIV 病毒融合之模式图 (假说) 见图 3.

3.1 融合蛋白的天然构象

为了行文方便, 我们暂时将正常病毒表面的构象称为天然构象. 处于这种状态的融合蛋白, 是高度可溶蛋白质. 1981 年, Wilson 等^[30]发现可以用蛋白质结晶法确证 HA 的结构, 即先用蔡乙醚 (bromelain) 将 HA 从病毒表面分离, 他们称这种制备物为 BHA, 因为 BHA 缺乏可将 HA 锚向病毒膜的疏水区. 结果发现, HA 为长 13.5 nm 的三聚体, 由 HA₁ 组成的 3 个暴露的球状顶部区域用于结合到唾液酸, 球状区域的底部为茎区, 茎区由中心三聚体螺旋 (核心为 HA₂) 形成, HA₂ 的氨基端即是原为隐藏状态的融合肽, 融合肽距羧基端约为 3.5 nm, 距远末端 (靶膜) 约为 10 nm. 这与生化研究解析图一致. 随后, Bullough 等^[31]又将 HA 在低 pH 条件下的结构进行了解析, 此即为融合后构象. 最近, Wiley 又解出了 HA₀ 的结构, 最为突出的发现是, 在这种状态下融合肽等隐藏在一个小洞里^[26]. 对 HIV gp160 的天然构象研究尚无突破, 但估计有与 HA 相类似的情况.

3.2 负载弹簧模型 (Spring-loaded model)

十几年前, 计算机分析方法提出流感病毒的 HA₂ 蛋白内存在具有可形成卷曲并且有强特异性的区域 (氨基酸 54 ~ 81 位). 在对流感病毒 HA₀ 的 X 衍射晶体结构实验中发现, 大多数此区域保存有延长的环状构象 (氨基酸 55 ~ 75 位). 生物化学对于相应区域的位点研究认定, 此区域是一段可溶肽, 融合后可形成螺旋卷曲结构, 由此认为, 在由自然状态转变到融合低 pH 激活结构状态时, 残基的构象由环状转变为卷曲状, 此结构的重排延长了中心三聚体卷曲, 使融合肽向分子反向末端推进, 即融合肽距原状态下的位置移动了 10 nm, 离细胞膜更近了, 并与宿主细胞膜作用. 为此 Kim 等^[29]提出了负载弹簧机制. 即 HA₀ 中的一些多肽链 (负载弹簧区) 处在一种具有“预应力”的状态, 一经诱导即可弹出, 就像一个已经负载的弹簧, 随时可以弹出. 1994 年, 低 pH 值激活 HA 状态的 X 衍射晶体结构被解析, 也确证了动力学机制所阐明

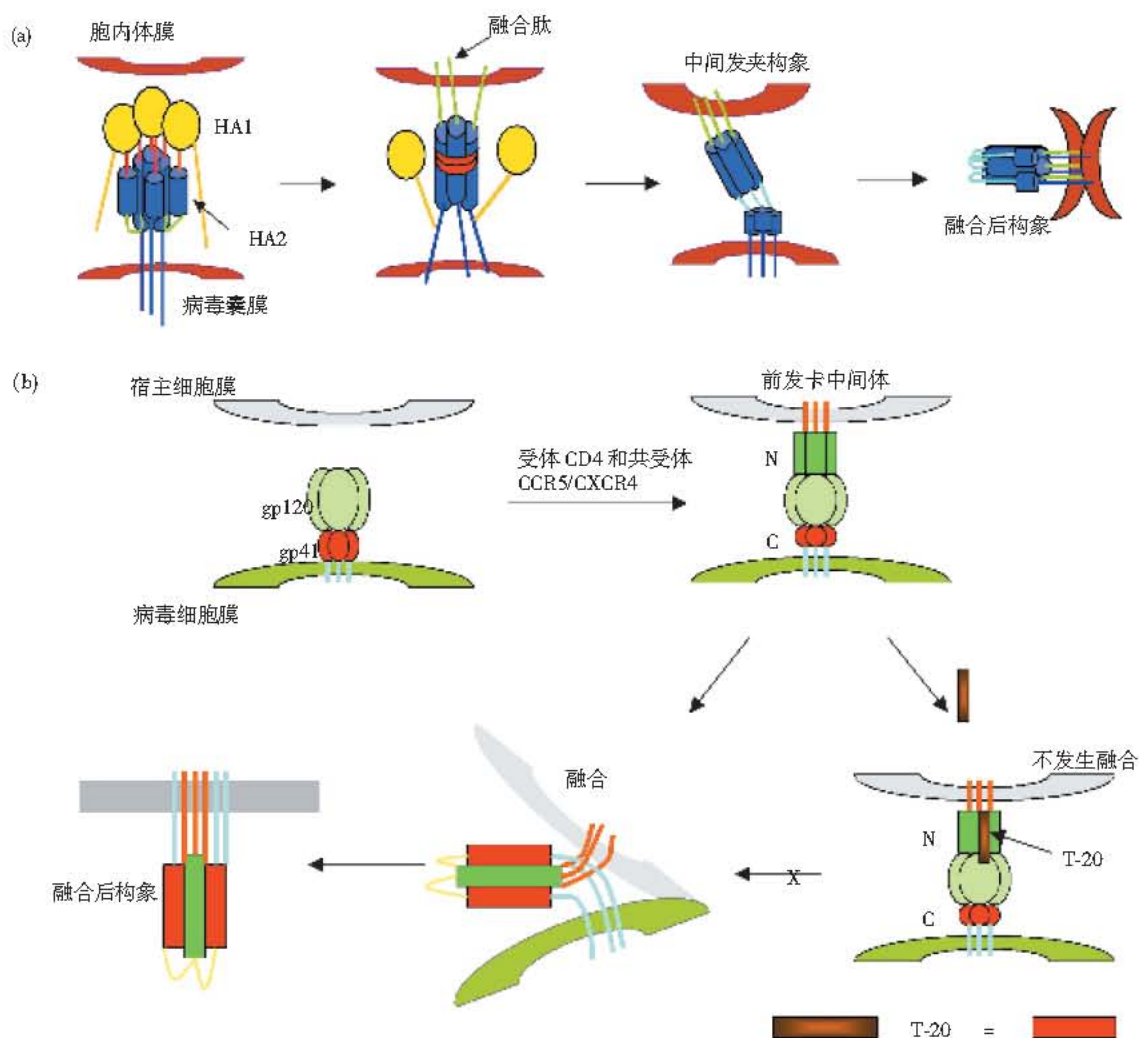


Fig. 3 Membrane fusion models of influenza virus and HIV

图3 流感病毒与 HIV 病毒膜融合之模式图

(a) 流感病毒融合模式图。流感病毒首先由吞饮作用进入细胞，它融合的是胞内体膜。流感病毒 HA₁ 和 HA₂ 在病毒囊膜表面形成稳定的复合物，在 NA 与细胞受体结合后，HA₁ 从紧密的结构中松出，暴露隐藏的融合肽，HA₂ 中负载弹簧弹出，α 螺旋结构增加，将融合肽推入胞内体膜，HA₁ 脱落，HA₂ 构象变为中间体发夹构象，由于 2 个七肽重复区同源物之间的高亲和力，趋向于形成稳定的六螺旋束结构，从而将 2 个膜拉向一起，二膜融为一体，病毒膜融合过程完成。(b) HIV 病毒融合模式图。HIV 病毒是直接和细胞膜融合。HIV 病毒囊膜蛋白 gp120 与受体 CD4 及共受体 CCR5 或 CXCR4 结合后，gp41 中的七肽重复区 HR1 (N) 和 HR2 (C) 发生构象变化，二者均暴露，此时融合肽插入细胞膜，由于 HR1 (N) 和 HR2 (C) 之间的高亲和力，趋向于形成稳定的六螺旋束结构，从而将 2 个膜拉向一起，二膜融为一体，病毒膜融合过程完成，此时的 gp41 形成了稳定的六螺旋束构象。在前发卡中间体过程中，若加入人工合成的 HR1 (N) 或 HR2 (C)，将竞争 gp41 自身的结构域，从而使得融合蛋白留在了中间体状态，抑制了病毒融合。图示临床成功用药的 T20 (HR2 同源物) 竞争结合了 HR1 (N)。

的结构特点^[31]。突变则减少了弹性负载区域的螺旋倾向，也减少了膜融合趋势，说明从环状到卷曲转变的重要性，如 55 和 71 位氨基酸置换为脯氨酸时（破坏 α 螺旋的形成），HA 保持表面表达及蛋白质水解活性，但无融合发生^[14]。有证据认为 HA 原前融合构象为亚稳定，由于动力障碍阻止其成为

融合状态，pH 变化使自然状态不稳定，使之容易克服动力障碍。但是，低 pH 值不是 HA 介导融合所必需的，在中性条件下，高温或化学变性剂都可能激活负载弹簧的构象变化，从而激活 HA 介导的膜融合。试验证明，HA 突变体在中性或高于中性 pH 条件下发生融合比天然 HA 蛋白所需要的温度

低 pH 值可引发 HA 构象变化,但在中性 pH 条件下,高温或化学变性剂激活同样会引起构象变化。HIV 是否也是以负载弹簧机制释放原隐藏状态的融合肽还未被确证,但蛋白质构象变化导致融合肽的暴露已被证实^[28]。

3.3 瞬间的融合中间体结构

中间体又称“前发夹结构”(pre-hairpin),形成于受体结合后、发夹三聚体形成前。在主要负责融合的跨膜亚单位中,如 HIV 的 gp41,有两个结构域非常重要,而且已证明这样的氨基酸序列存在于多种囊膜蛋白的跨膜亚单位中(图 1),即前面讨论的七肽重复(heptad repeat, HR),被称作 HR1 (α 螺旋结构)和 HR2 (本身非 α 螺旋结构,但与 HR1 结合后也形成 α 螺旋结构),有的文献也分别称其为 N 肽,HR-N,HR-A 和 C 肽,HR-C,HR-B^[4]。对 HIV 来说,此时病毒的 N 肽及 C 肽区域暴露出来,其中,单点突变可能影响其自身结构,最终复合物结构的 N 肽区域在受体(CD4/共受体 CCR5 或 CXCR4)存在时可自主地与合成的 C 肽结合。即 C 肽抑制子可在瞬间融合中间体状态下起竞争抑制作用。C 肽抑制的动力学认为,瞬间中间体状态可持续一段时间,从受体结合开始的构象变化发生在 1 min 内,但在暴露于受体后 15 min 以内 C 肽仍保持潜能^[8]。源于 HIV-1 病毒 gp41 的体外合成 N 肽也有抗 HIV-1 的活性,但比 C 肽的活性弱,其抑制机制可能是干扰变构融合激活构象,也可能是竞争性地抢占病毒蛋白本身的 C 肽结合位点^[8],然而,因为其有聚合的趋势(不知其形成是否先于与 C 肽结合),且可溶性差,因而抑制作用没有 C 肽强(图 3)。虽然还不知道流感病毒与 HIV-1 于形成瞬间发夹中间体是否应有相同的机制,但已有实验证明,与 HIV-1 的相同点是,HA 也有发生在负载弹簧机制后、发夹结构形成前的瞬间中间体状态^[28]。利用这种融合中间体结构模型,我们和其他研究人员在多种病毒观察到了七肽重复的抑制活性,间接说明这种中间体构象存在的可能性^[22, 25]。

3.4 融合后构象

为了获得 HIV-1 病毒 gp41 的更多构象信息,用无 N 端融合肽的重组 gp41 胞外区域蛋白来作蛋白质水解实验,此方法称蛋白质的剖析(用蛋白酶 K 进行水解)^[21],其可潜在地表现出蛋白质或蛋白质复合物的稳定亚区域。结果发现蛋白酶作用后 gp41 的三聚体螺旋亚单位由两个不连续的肽

N51 及 C43 组成,非常稳定,只是在极端温度下才解开螺旋,从 gp41 这两个区域来的肽通常分别称作 N 肽及 C 肽,因为它们相应由 gp41 胞外区域的氨基端及羧基端构成。这就是 1995 年 Lu 等所做的经典试验,从而证实了七肽重复相互作用的可能机制,后来被晶体结构所证实。生物物理学分析认为,三分子 N 肽以 a, d 位点相互结合形成中心三聚卷曲结构,三分子 C 肽的 a, d 位点与 N 肽的 e, g 位点分别结合在 N 肽卷曲外的环状区域,即一个 C 肽分子结合到由两个 N 肽分子形成保守的疏水凹里,最终组装成以三分子 N 肽为卷曲中心,三分子 C 肽环绕在外周的六聚体(异源三聚体)反平行结构(图 2)。猴爱滋病毒(SIV)的生物物理学分析也得出同样的异源三聚体结果^[8]。低 pH 激活的 HA₂ 分子也包含发夹三聚体结构^[31],此结构中包含的一段由原螺旋状 6 个氨基酸残基(氨基酸 106~112 位)演变成的环状结构,可使构象变化中的蛋白质分子在其中部发生折叠,形成发夹三聚体,此时原羧基端约 20 个氨基酸残基呈无序状态。HA 及 HIV-1 的最终融合结构非常稳定,且形成后折叠一般不会被解开,特异性突变可改变融合活性区域,这种改变使病毒融合激活结构发生另外一种构象变化,如,关键位点“a/d”处突变所形成的螺旋结构只有无突变情况下螺旋结构长度的一半,但这些突变并不能影响膜融合蛋白在细胞表面表达,因此不会本质上改变天然结构^[24]。可导致宿主细胞膜与病毒膜相互接近的发夹三聚体结构被认为是融合后结构:六螺旋束^[4, 5, 7, 8]。

综上所述, I 型囊膜病毒的融合机制如图 3 所示,在感染宿主过程中,病毒糖蛋白的构象变化是连续的。细胞被流感病毒或 HIV 病毒感染初期,病毒的囊膜糖蛋白作为稳定前体(HA₀/gp160)形式被表达,但不能发生融合,当前体被宿主细胞内蛋白酶水解后,蛋白质打破了稳定状态,被认为在病毒囊膜表面以亚稳定状态存在。在病毒与宿主细胞上的受体结合后(流感病毒为唾液酸, HIV 病毒为 CD4/CCR5/CXCR4),构象开始发生变化,即 HA1 区渐渐失去它们三聚体结构之间的关联,并一点点地从紧凑的糖蛋白结构中分离出来,融合肽也从深埋状态中解脱出来后,以负载弹簧模式推进到中心三聚体卷曲的 N 端,经历瞬间中间体状态后,三聚体底部转动方向在分子中部折叠,导致两膜相互接近。于 HIV-1 来说, gp120 与 CD4 的结合引起 gp120 的构象变化暴露 V3 环,使其接近共受

体, gp120 与 gp41 发生进一步的构象变化, 两者的相互作用减弱了, 并使先前深埋的融合肽 (位于 GP41 的 N 端) 被自由释放出来, 而后 gp41 的瞬间发夹中间体结构形成暴露出的 N 肽及 C 肽组装成的六聚体 (发夹三聚体), 拉近了宿主细胞膜与病毒囊膜之间的距离 (图 3)。由上可知, I 型病毒膜融合过程中不同病毒糖蛋白虽发生不完全一致的构象变化, 但最终是以融合糖蛋白自身变构成的发夹三聚体结构导致宿主与细胞膜相互接近, 两个膜融为一个膜。

从瞬间的中间体 (高能量状态) 到能量上“合算”的发夹三聚体 (低能量状态) 的构象变化, 可引起两个膜紧密接近 (HIV 为 1.5 nm), 形成此稳定结构所获得的能量, 克服了使两个脂质膜相互更紧密接近的“不合算”的“水合作用力”过程^[23], 进一步促使两个膜并列起来, 并保持两膜之间的相互联系, 此时融合糖蛋白发生倾斜并与两个膜都水平, 膜靠近区域的柔韧性可维持分子的倾斜, 最终糖蛋白的两个跨膜区占用同一个膜, 好似病毒膜与细胞膜变成了同一个膜^[13]。当然, 这是简单化的模型。电物理学实验指出, 流感病毒与宿主细胞膜之间的融合与病毒粒子释放到宿主细胞内所需的“微动毛孔”有关系^[32], 毛孔通过脂质中间体而形成, 中间体的外部单层先融合, 形成两个囊膜实体之间的搜索茎, 然后当内部单层融合时形成毛孔, HA 分子需要结合在融合位点上以促进毛孔形成, 促进或抑制茎/毛孔形成也可影响 HA 介导的融合, 融合过程的细节还需要从各个方面更深入地研究。

4 其他囊膜病毒

最近开始对其他一些反转录病毒、副黏病毒及纤丝病毒等囊膜病毒结构的研究, 并相继证明了这些病毒采用了如前所述相似的融合机制^[3-9]。较权威的研究, 从氨基酸一级结构预测病毒融合蛋白与病毒卷曲区域的 learncoil-VMF 软件数据库, 预测出副黏病毒及慢病毒的病毒膜糖蛋白中存在“N 和 C 螺旋”区域 (七肽重复区域 HR), 纤丝病毒及反转录病毒的病毒膜糖蛋白中存在 N 螺旋区域, 并预测大多数蛋白质融合后形成了似 HIV-1/SIV 的螺旋发夹三聚体, 这已被最近的 X 衍射晶体分析结果所证实。预测的哺乳动物 C 型反转录病毒莫洛尼鼠白血病毒糖蛋白及人 T-细胞白血病毒糖蛋白结构已被 X 衍射晶体结果所证实, 并被广

泛认为这些蛋白质仍保留发夹三聚体结构, 这些病毒 N 肽区域形成了与流感病毒 HA 相似的三聚体卷曲核心, 并且 C 肽包装在 N 肽核外周, 此结构促进了囊膜融合。最近对副黏病毒的研究充实了上述的膜融合模式, 并认为融合蛋白胞质区及亮氨酸链区都直接参与调节膜融合过程^[4]。此外, 已证明特异性抑制囊膜病毒入侵的 C 肽抑制子可抑制瞬间中间体变构为发夹三聚体构象^[4, 8, 22, 25]。我们最近几年对一些重要的副黏病毒研究得出了十分类似的结果^[22-24]。表 1 列出了一些主要病毒分子融合机制的研究情况。

SARS 病毒被证明为冠状病毒后, 据此设计的多肽对病毒的抑制活性也很高, 而且其 HR1 和 HR2 相互作用形成典型的六螺旋束。最近, Rottier 实验室对冠状病毒的另一个成员, 小鼠肝炎病毒 (MHV), 作了类似的分析, 也证明了高度稳定的六螺旋束结构的存在^[33], 进一步证明冠状病毒遵循 I 型病毒膜融合的共同机制。

5 结论与展望

囊膜病毒膜融合分子机制可归结为囊膜蛋白构象变化形成多聚体导致膜融合, 而其他一些生命现象如神经信号传递等也已被证明是依赖于膜蛋白形成多聚体发夹结构来介导完成的^[3], 故可推知, 囊膜蛋白的正确折叠可能是生物体内脂质双层膜融合的结构基础。囊膜病毒膜融合分子机制的研究同时也为抵御囊膜病毒感染提供了新的思路, 即上文所提到的 C 肽可作为病毒入侵的特异性抑制子。同时对 HIV 的研究发现, N 肽/C 肽可抑制多株 HIV, 包括实验室适应株及主要分离株, 而许多中和抗体只能中和相应的某些病毒株。最近, C 肽抑制子成为新的研究热点, 研究者们希望以此为基础研制出特异、高效并可口服的小分子抗病毒药物。根据 C 肽抑制子设计的 HIV 病毒多肽抑制药 (T20 或 enfuvirtide) 已成功地用于临床^[34]。

根据目前的工作假说, I 型病毒膜融合可能至少经历融合蛋白的 3 个不同构象: 天然构象、中间体构象和融合后六螺旋束构象。更多的晶体结构解析, 将有助于对这些构象的本质及其意义有更进一步的认识。而且, 进一步的研究也可能揭示出新的融合模式。

由于对病毒抑制剂的迫切需求, 今后对通用的融合抑制药物, 尤其是小分子药物的开发将会吸引更多的科学家来研究。对融合肽的病毒特异性尚无

Table 1 Characters of fusion proteins of enveloped viruses

表 1 囊膜病毒囊膜及其融合蛋白特性一览表

病毒科	代表病毒	融合模式	病毒糖蛋白	融合肽定位	糖蛋白结构/功能特征
Orthomyxoviridae (正黏病毒)	Influenza (HA)	低 pH (5.1) 温度 300 K	HA ₁ 、HA ₂	YES (HA ₂ 氨基端)	HA 三聚体结构# HA ₂ 融合后六聚体结构#
Togaviridae (披膜病毒)	Semiliki forest virus	低 pH (6.2 ~ 6.5) 似 HA 融合模式, 低 pH 时 E1 形成同源三聚体, 故结构延伸 20 nm	E ₁ 、E ₂ 、E ₃	YES (尚未准确定位)	E 蛋白二聚体结构#
Flaviviridae (黄病毒)	Tick-borne encephalitis virus	低 pH 特殊融合模式 (无 HR 区), 也包括 E 蛋白构 象变化	E、M	YES (E 蛋白中部)	E 蛋白无卷曲特征 二聚体结构已知#
Rhabdoviridae (弹状病毒)	Vesicular stomatitis virus	低 pH (≈6) 可能 HA 融合模式	G	YES (尚未准确定位)	G 蛋白呈三聚体结构
Arenaviridae (沙砾病毒)	LCMV	低 pH (<6.3)	G1、G ₂	YES (尚未准确定位)	NO
Bunyaviridae (布尼亚病毒)	Unkuniemi	低 pH (≈6.3)	G1、G ₂	NO	糖蛋白结构与功能未 完全确实
Herpesviridae (疱疹病毒)	Herpes simplex virus	中 pH	gA ~ gL (12 种) gB、gH	YES (尚未准确定位)	NO
Coronaviridae (冠状病毒)	Mouse nepatitis virus	中 pH	S1、S ₂	YES (尚未准确定位)	糖蛋白中含 HR 区域, 其结构正解析 *
Hepadnaviridae (嗜肝 DNA 病毒)	Hepatitis B	中 pH	L、M、S	YES (S 蛋白氨基端)	似副黏病毒融合糖蛋 白, 但结构未解析
Poxviridae (痘病毒)	Vaccinia	中 pH	30 种 14 ku、56 ku	YES (14 ku 蛋白 氨基端)	NO
Filoviridae (纤丝病毒)	Ebola	可能中 pH (HIV 融合模式)	GP1、GP ₂	YES (GP ₂ 氨基端)	融合后 HR1/HR2 六聚 体结构#
Retroviridae (反转录病毒)	Human/Simian immunodeficiency virus	中 pH (HIV 融合模式)	gp120、 gp41	YES (gp41 氨基端)	gp41 结构# 融合后六聚体结构# N/C 肽为抑制子
	Avian leucosis and sarcoma virus	中 pH (与成纤维细胞融 合需温度高于 20℃)	A、B、C、 D、E	YES (跨膜亚单位 氨基端)	NO
	Murine leukemia Virus	中 pH	5 个亚单位	YES (跨膜亚单位)	糖蛋白发夹三聚 (或 七肽重复六聚体) 结 构# R 肽为抑制子
	Human T cell leukemia virus (HTLV)	中 pH	GP64、GP ₂₁	YES (跨膜亚单位 氨基端)	GP ₂₁ 发夹三聚 (或七 肽重复六聚体) 结构#
Paramyxoviridae (副黏病毒)	Human parainfluenza virus	中 pH (HIV 相似融合模式)	HN、F	YES (F1 氨基端)	C 肽为抑制子
	Sendai virus	中 pH (HIV 相似融合模式)	HN、F	YES (F1 氨基端)	融合后六聚体结构 * # C 肽为抑制子
	Simian Virus 5	中 pH (HIV 相似融合模式)	HN、F、SH	YES (F1 氨基端)	融合后六聚体结构# N、C 肽为抑制子
	Mumps	中 pH (HIV 相似融合模式)	HN、F、SH	YES (F1 氨基端)	融合后六聚体结构 * #
	Newcastle disease virus	中 pH (HIV 相似融合模式)	HN、F	YES (F1 氨基端)	F 蛋白结构# 融合后六聚体结构 C 肽为抑制子
	Avian paramyxovirus 2-9	中 pH (HIV 相似融合模式)	HN、F	YES (F1 氨基端)	融合后六聚体结构 * C 肽为抑制子
	Measles virus	中 pH (HIV 相似融合模式)	HN、F	YES (F1 氨基端)	融合后六聚体结构# C 肽为抑制子
	Hendra virus/Nipah virus	中 pH (HIV 相似融合模式)	HN、F、G	YES (F1 氨基端)	融合后六聚体结构 * # C 肽为抑制子
	Respiratory syncytial virus	中 pH (HIV 相似融合模式)	G、F、SH	YES (F1 氨基端)	融合后六聚体结构# C 肽为抑制子

注: “病毒糖蛋白”栏中标有下划线的蛋白质为病毒融合功能蛋白。栏中标有“NO”字样的未有文章报道。栏中标有“*”符号的结果现未发表, 为我们正在进行的工作。栏中标有“#”符号的结构已用 X 衍射晶体分析结果证实。N、C 肽为 F1 糖蛋白的七肽重复区域。

明确的结论,今后对融合肽在病毒间的互换研究将可能会回答这个问题;七肽重复中 HR1 和 HR2 的相互作用具有很大的病毒特异性,但同时将 HR1 和 HR2 在病毒间互换,可能回答他们是否就是在起着“脚手架”的作用。

致谢 研究组的工作得到田波院士和饶子和院士的大力支持。高福为中国农业大学客座教授。由于篇幅所限,有些重要的原始研究文献未能列出,对有关作者表示抱歉。

参 考 文 献

- Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, **67** (2): 226 ~ 237
- Mousavi S A, Malerod L, Berg T, *et al.* Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J*, 2004, **377** (Pt 1): 1 ~ 16
- Skehel J J, Wiley D C. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell*, 1998, **95** (7): 871 ~ 874
- Lamb R A, Joshi S B, Dutch R E. The paramyxovirus fusion protein forms an extremely stable core trimer: structural parallels to influenza virus haemagglutinin and HIV-1 gp41. *Mol Membr Biol*, 1999, **16** (1): 11 ~ 19
- Weissenhorn W, Dessen A, Calder L J, *et al.* Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol*, 1999, **16** (1): 3 ~ 9
- Skehel J J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 531 ~ 569
- Bentz J. Membrane fusion mediated by coiled coils: a hypothesis. *Biophys J*, 2000, **78** (2): 886 ~ 900
- Eckert D M, Kim P S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 777 ~ 810
- Colman P M, Lawrence M C. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4** (4): 309 ~ 319
- Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, 1998, **280** (5371): 1884 ~ 1888
- Heinz F X, Allison S L. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res*, 2000, **55**: 231 ~ 269
- Heinz F X, Allison S L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4** (4): 450 ~ 455
- Hernandez L D, Hoffman L R, Wolfsberg T G, *et al.* Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, **12**: 627 ~ 661
- 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
- Freed E O, Myers D J, Risser R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (12): 4650 ~ 4654
- Lamb R A. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology*, 1993, **197** (1): 1 ~ 11
- Feldmann H, Volchkov V E, Volchkova V A, *et al.* The glycoproteins of Marburg and Ebola virus and their potential roles in pathogenesis. *Arch Virol Suppl*, 1999, **15**: 159 ~ 169
- Singh M, Berger B, Kim P S. LearnCoil-VMF: computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins. *J Mol Biol*, 1999, **290** (5): 1031 ~ 1041
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison S C, *et al.* Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 1997, **387** (6631): 426 ~ 430
- Chan D C, Fass D, Berger J M, *et al.* Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 1997, **89** (2): 263 ~ 273
- Lu M, Blacklow S C, Kim P S. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol*, 1995, **2** (12): 1075 ~ 1082
- Yu M, Wang E, Liu Y, *et al.* Six-helix bundle assembly and characterization of heptad repeat regions from the F protein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol*, 2002, **83** (Pt 3): 623 ~ 629
- Zhu J, Zhang C W H, Qi Y, *et al.* The fusion protein core of measles virus forms stable coiled-coil trimer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **299** (5): 897 ~ 902
- Zhu J Q, Zhang C W H, Rao Z, *et al.* Biochemical and biophysical analysis of heptad repeat regions from the fusion protein of Menangle virus, a newly emergent paramyxovirus. *Arch Virol*, 2003, **148** (7): 1301 ~ 1316
- Wang E, Sun X, Qian Y, *et al.* Both heptad repeats of human respiratory syncytial virus fusion protein are potent inhibitors of viral fusion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **302** (3): 469 ~ 475
- Chen J, Lee K H, Steinhauer D A, *et al.* Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, 1998, **95** (3): 409 ~ 417
- Fackler O T, Peterlin B M. Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol*, 2000, **10** (16): 1005 ~ 1008
- Saez-Cirion A, Nieva J L. Conformational transitions of membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1564** (1): 57 ~ 65
- Carr C M, Kim P S. A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell*, 1993, **73** (4): 823 ~ 832
- 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
- Bullough P A, Hughson F M, Skehel J J, *et al.* Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*, 1994, **371** (6492): 37 ~ 43
- Muller M, Katsov K, Schick M. A new mechanism of model membrane fusion determined from Monte Carlo simulation. *Biophys J*, 2003, **85** (3): 1611 ~ 1623
- Bosch B J, van der Zee R, de Haan C A, *et al.* The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*, 2003, **77** (16): 8801 ~ 8811
- Cuzin L, Alvarez M. Enfuvirtide for prophylaxis against HIV infection. *N Engl J Med*, 2003, **349** (22): 2169 ~ 2170

The Molecular Mechanism of Enveloped Virus-cell Membrane Fusion *

WANG Xiao-Jia¹⁾, GATHERINE W. H. ZHANG²⁾, WANG Ming¹⁾ **, GEORGE F. GAO³⁾ **

(¹⁾ College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

²⁾ Oxagen Ltd, 91 Milton Park, Oxfordshire, OX14 4RY, UK;

³⁾ Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, OX3 9DU, UK)

Abstract Recent studies have shown that enveloped virus might adopt a similar molecular mechanism of fusion in which two types have been proposed. In Type II, flavivirus is examples, its fusion mechanism is not similar with type I and is not understood enough. In Type I which is the subject of this review and HIV and influenza are its good examples, the attachment glycoprotein of virus binds receptor/s and triggers the conformational change of the fusion protein (attachment protein and fusion protein could be one with two subunits), finally, adopts its most stable fold, the trimer-of-hairpins. The membrane fusion process leads to the release of viral proteins and the RNA genome into the host cell, initiating an infection cycle. The fusion mechanism involves an intermediate conformational state that can be targeted by therapeutic strategies. Holding the fusion process in the middle would stop the virus entry. The potent and effective therapeutic interventions of virus entry should be possible from a recent clinical trial success of a peptide inhibitor for HIV, Enfuvirtide or T20.

Key words enveloped virus, fusion, conformational change

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30228025).

** Corresponding author.

WANG Ming Tel: 86-10-62892840, E-mail: vetdean@cau.edu.cn

George F Gao Tel: 44-1865-228927, Fax: 44-1865-222901, E-mail: george.gao@ndm.ox.ac.uk, ggao66@yahoo.com

Received: December 23, 2003 Accepted: February 28, 2004