

## A 型流感病毒 M2 膜蛋白两亲性螺旋 构象变化的 FRET 研究\*

李俊北 仇晓琰\*\*

(苏州大学药学院, 江苏省重大神经精神疾病诊疗技术研究重点实验室, 苏州 215000)

**摘要** A 型流感病毒膜质子通道 M2 是一个重要的抗流感药物靶点, 其通道功能与蛋白质构象变化紧密相关. M2 跨膜螺旋结构与功能的研究已经取得了显著进展, 但其膜内碳端两亲性螺旋的构象变化与 M2 功能的关系尚不明确. 在这个两亲性螺旋中引入能与跨膜域色氨酸形成福斯特共振能量转移(FRET)作用的非天然氨基酸 PheCN, 以便研究通道激活或抑制后 M2 蛋白膜内部分的构象变化. 在酸性环境通道激活的条件下, 两亲性螺旋与跨膜螺旋间的距离增大, 其增大幅度基本不受药物抑制通道活性的影响. 由此推测两亲性螺旋的构象变化与通道活性无关, 反而很可能与 M2 在病毒出芽过程中的作用相关.

**关键词** M2 质子通道, 两亲性螺旋, 构象变化, 荧光强度  
**学科分类号** Q5, R9

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2016.0078

A 型流感病毒的膜蛋白 M2 是 97 个氨基酸的多功能多结构域蛋白, 其膜内部分由一个跨膜螺旋和一个碳端的两亲性螺旋组成, 两者间的链接处于无规卷曲状态. 仅仅由跨膜螺旋形成的四聚体就已经具备质子通道功能<sup>[1]</sup>, 可以被酸性环境激活, 也是金刚烷胺(amantadine, amt)和金刚烷乙胺(rimantadine, rmt)的药物靶点<sup>[2]</sup>; 而两亲性螺旋在病毒出芽过程中起着关键作用<sup>[3]</sup>. 早期的 M2 结构研究集中在其跨膜螺旋部分, 这部分的构象随磷脂组成、pH 及药物结合的变化而改变<sup>[4-7]</sup>. 核磁共振和 X 射线衍射法提供了很多结构细节<sup>[8-11]</sup>, 却很难用于研究通道激活后处于快速平衡中的多个构象状态, 因此我们选择用荧光的方法进行构象研究.

福斯特共振能量转移(forster resonance energy transfer, FRET)技术是检测生物大分子纳米级距离和纳米级距离变化的有力工具, 其原理是基于荧光基团供体和受体间的能量转移. 发生 FRET 的必要条件是: a. 供体的发射光谱与受体的激发光谱需要足够的光谱重叠; b. 两个荧光基团间的距离在大约 10 nm 之内<sup>[12]</sup>. 当 FRET 发生之时, 供体与受体间的距离增加, 供体的发射荧光强度增加, 而受

体的发射荧光强度减弱.

M2 跨膜螺旋中的 W41 是高度保守的, 而非天然氨基酸对氰基苯丙氨酸(PheCN)既具有与 Phe 类似的理化性质, 又能够作为色氨酸的 FRET 供体. 两亲性螺旋上的单个氨基酸突变, 例如 54 位上的突变, 通常对 M2 功能全无影响<sup>[3, 13]</sup>. 54 位上的氨基酸侧链既可以是体积很大的带电荷基团, 也可以是体积很大的疏水性基团(图 1), 因此可以容忍从 Phe 到 PheCN 的突变. 核磁共振结构显示, F54 和距离最近的 W41 之间的 C $\alpha$  距离为 13Å, 而 PheCN-W 之间的  $R_0$  为 16Å<sup>[14]</sup>, 所以将 F54 突变为 PheCN 后, PheCN54 和 W41 可以发生很强的 FRET 效应. PheCN 的量子产率对于外界环境的影响相对不敏感<sup>[15]</sup>, 因此其荧光强度的变化可以直接反映跨膜螺旋和两亲性螺旋之间距离的变化.

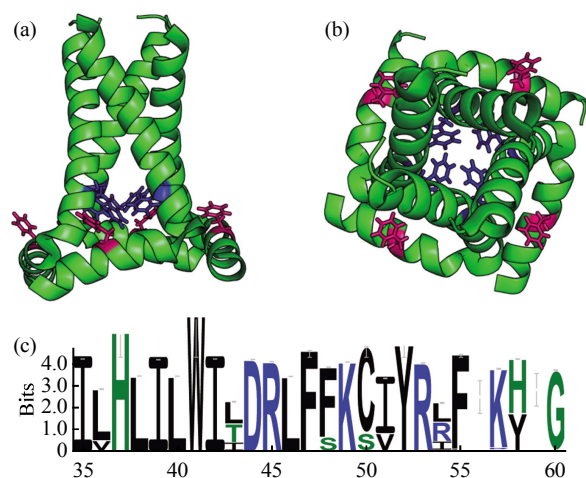
\* 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81402902).

\*\* 通讯联系人. Tel: 0512-65883325

仇晓琰. E-mail: xqiu@suda.edu.cn

李俊北. E-mail: 20134226002@suda.edu.cn

收稿日期: 2016-03-11, 接受日期: 2016-05-06



**Fig. 1 Structure of TM and cytoplasmic helix regions in influenza A M2 proton channel**

Side view (a) and top view (b) of AM2 TM and cytoplasmic helix regions (pdb code 2L0J), with W41 in blue and F54 in pink. AM2 is a tetrameric modular channel, with the transmembrane (TM) helix responsible for proton conductance, and the cytoplasmic amphipathic helix involved in cholesterol binding and virus budding. These two bilayer-interacting regions are linked by a short flexible hinge. (c) Conservation of W41 and variation of F54 are shown in the alignment of 13 759 human AM2 sequences.

## 1 材料与方法

### 1.1 多肽合成

采用固相多肽合成法中的 Fmoc 法合成多肽并以 ChemMatrix 树脂为固相载体. 野生型多肽的序列为: NDSSDPLVVAASHIIGILHLILWILDRLFFKSIYRFFEHLGLK; 合成 PheCN 多肽中, 使用 L-PheCN (试剂购买自 Bachem, USA) 替换 F54 合成 PheCN 多肽; 合成完成后, 使用反相 C4 色谱柱经高效液相色谱进行分离纯化多肽. 最后将多肽溶液冻干, 多肽粉末存储 $-80^{\circ}\text{C}$ , 多肽乙醇母液存储 $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2 样品制备

所有的荧光实验均在小单层脂质体中进行(与在大单层脂质体的结果相同). 磷脂的成分为 POPC : POPG : cholesterol (4 : 1 : 2 M : M), 样品制备过程中, 首先在玻璃瓶中用氮气将磷脂母液中的氯仿吹干, 再加入多肽的乙醇母液并用氮气吹干. 接着将磷脂 / 多肽薄膜放于冻干机中过夜, 以去除残余的溶剂. 然后加入 pH 7.5 的磷酸缓冲

液(20 mmol/L 磷酸钠和 100 mmol/L 氯化钠)水化. 最后涡旋、超声得到最终的样品. 如果样品中含有 rmt, 则在数据测量前 30 min 加入 10 mmol/L rmt 的水溶液.

### 1.3 FRET 测量

实验中, 使用 Fluorolog3 (Protein Technologies Inc., USA) 荧光光谱仪测量样品的发射光谱, 仪器激发波长为 240 nm, 发射波长为 260~460 nm. 样品为 2  $\mu\text{mol/L}$  通道四聚体溶解于 2.8 mmol/L 磷脂并手动加入 10% 醋酸调节 pH, 孵育 10 min 后测量.

### 1.4 数据拟合

数据使用以下方程进行非线性最小二乘拟合,  $Y = a_0 + a_1 * (X - 470) + (A_1 * \exp(-2.7726 * ((X - P_1) / W_1)^2) + A_2 * \exp(-2.7726 * ((X - P_2) / W_2)^2) + A_3 * \exp(-2.7726 * ((X - P_3) / W_3)^2) * A + (A_4 * \exp(-2.7726 * ((X - P_4) / W_4)^2) + A_5 * \exp(-2.7726 * ((X - P_5) / W_5)^2) + A_6 * \exp(-2.7726 * ((X - P_6) / W_6)^2)) * B$ , 其中  $a_0 + a_1 * (X - 470)$  是基线, PheCN 和 W 的发射光谱分别由 2 和 4 个高斯峰表示. 常数中  $a_0$ 、 $a_1$ 、 $A$  和  $B$  是局限性的, 而其他常数则是总体性的. 为了比较不同 pH 的荧光强度变化, 选择 pH 7.5 的峰强为基准进行归一化.

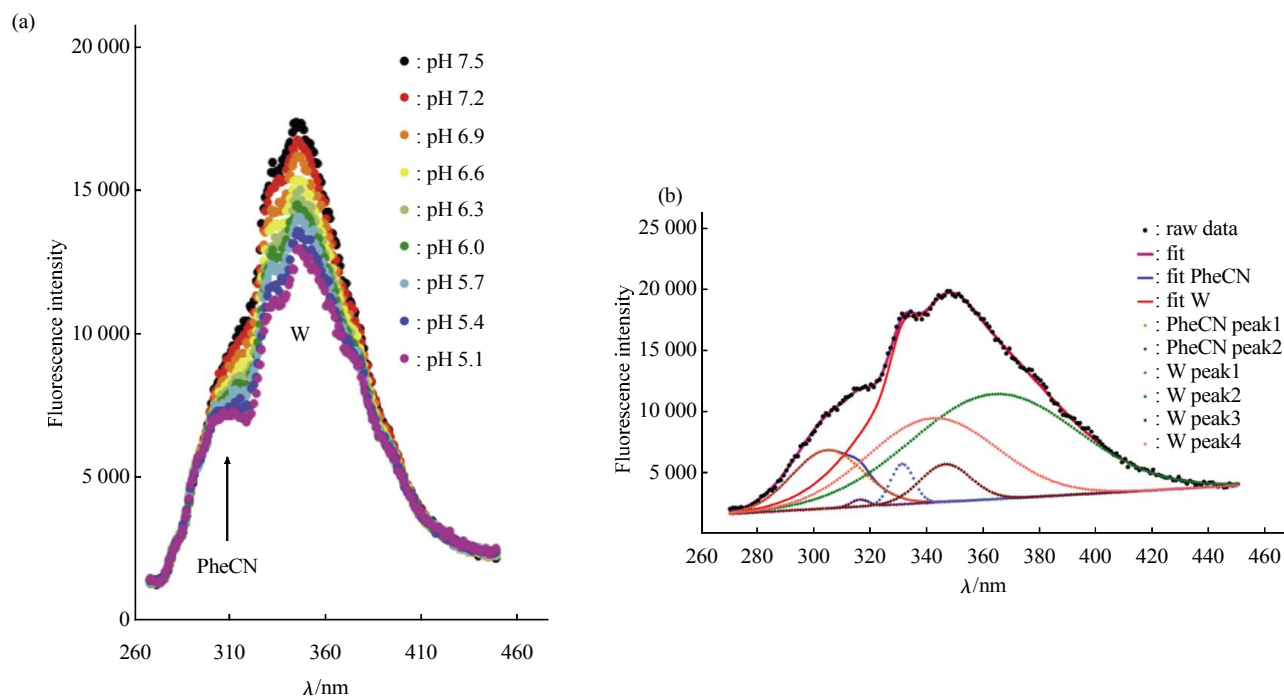
## 2 结果

PheCN 发射光谱和 W 发射光谱有显著重叠(图 2a), 因此荧光强度的定量需要用到多个高斯函数的全局拟合(图 2b). 为了便于比较不同批次的实验结果, 每次 pH 滴定中所有曲线的高斯函数峰面积都参照起始条件, 即 pH 7.5 曲线的峰面积进行归一化处理.

PheCN 的荧光强度随着 pH 降低而升高(图 3a), 意味着酸性条件下, 41 位和 54 位氨基酸之间的距离增加. 这种距离的增加不受药物抑制通道活性的影响, 当加入 100  $\mu\text{mol/L}$  rmt 时, 绝大多数通道已和药物结合<sup>[6]</sup>, 然而 PheCN 荧光强度的变化幅度基本与无药物作用条件下相同. 与 PheCN 结果一致的是 W41 的荧光强度随 pH 降低而降低(图 3b), 这个结果也符合酸性条件下 41 位和 54 位间距离变远的推测. 这个荧光强度的减弱幅度随药物结合而显著减小, 很大可能是由于通道激活后 W41 环境的亲水性增强, 从而进一步降低了色氨酸的荧光强度, 而药物结合恰恰抑制了环境亲水性的变化. 绝大多数通道在已和药物结合的情况下 W41 荧光强

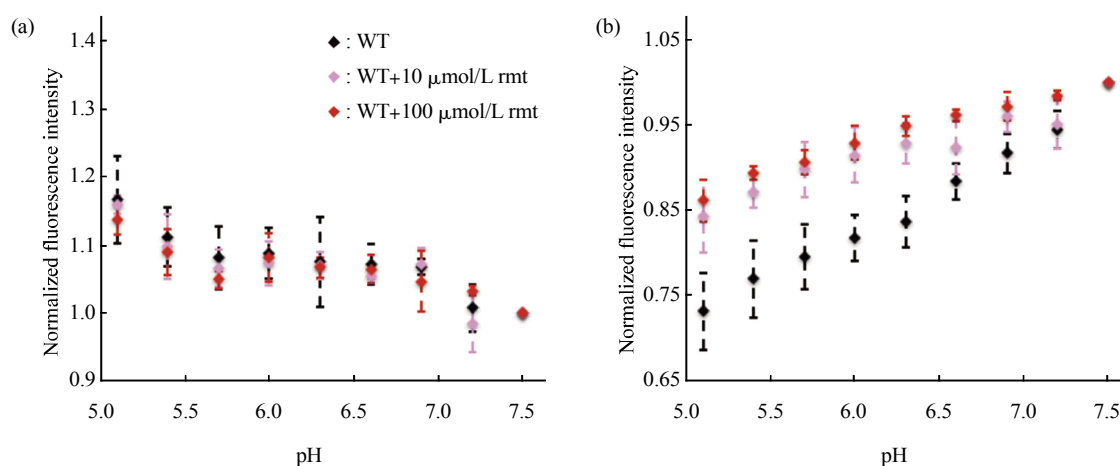
度的变化幅度才对应着 FRET 效应引起的荧光变化。总而言之，在酸性环境通道激活的条件下，两

亲性螺旋与跨膜螺旋间的距离增大，并且这种距离变化基本不受药物抑制通道活性的影响。



**Fig. 2 The fluorescence intensity of PheCN or W**

A typical set of FRET spectra for pH titration (a). The FRET profile had significant overlap between the PheCN and W emission. Emission intensity can be quantified *via* global fitting with multiple Gaussian peaks with two peaks for PheCN emission and four peaks for W emission (b). Emission intensity was calculated from the sums of peak area as for PheCN and W respectively. In order to compare different pH titration runs, all intensities were normalized to that of the starting condition, pH 7.5.



**Fig. 3 The distance between labels increased upon channel activation**

The normalized emission intensity of PheCN (a) or W (b) can be plotted as a function of pH. Up on channel activation in the acidic environment, PheCN emission increased and W emission decreased. Both are consistent with increased distance between residues 54 and 41. This activation associated distance increase was not affected by rmt binding.

### 3 讨 论

由于 M2 两亲性螺旋和跨膜螺旋间的距离变化基本不受药物与通道结合的影响, 两亲性螺旋随环境酸化的构象变化与 M2 的质子通道活性无关, 这与之前的通道功能仅由跨膜螺旋承担的研究成果<sup>[1]</sup>完全吻合. 前人的研究结果<sup>[17]</sup>表明, M2 的两亲性螺旋能够改变细胞膜的曲率, 并直接导致细胞膜出芽, 而两亲性螺旋的突变则阻止了细胞膜的断裂, 从而抑制病毒出芽, 这种作用与 M2 的质子通道活性无关, 不受药物结合的影响. 两亲性螺旋在病毒出芽中的作用机理尚不明确, 但已知能够改变细胞膜曲率的膜蛋白通常都伴随有显著的构象变化. 因此推测本实验中观察到的两亲性螺旋构象变化很可能与 M2 在病毒出芽中的作用相关.

综上所述, 我们通过引入能作为色氨酸 FRET 供体的非天然氨基酸 PheCN, 对 M2 蛋白的两亲性螺旋构象随环境 pH 的变化进行了研究, 研究结果进一步验证了两亲性螺旋与 M2 的质子通道功能无关, 并为两亲性螺旋在病毒出芽过程中的作用机理研究提供了新的检测方法.

### 参 考 文 献

- [1] Ma C, Polishchuk A L, Ohigashi Y, *et al.* Identification of the functional core of the influenza A virus A/M2 proton-selective ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(30): 12283–12288
- [2] Du J, Cross T A, Zhou H X. Recent progress in structure-based anti-influenza drug design. *Drug Discovery Today*, 2012, **17**(19–20): 1111–1120
- [3] Rossman J S, Jing X, Leser G P, *et al.* Influenza virus M2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *Journal of Virology*, 2010, **84**(10): 5078–5088
- [4] Hu F, Luo W, Cady S D, *et al.* Conformational plasticity of the influenza A M2 transmembrane helix in lipid bilayers under varying pH, drug binding, and membrane thickness. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, **1808**(1): 415–423
- [5] Duong-Ly K C, Nanda V, Degrado W F, *et al.* The conformation of the pore region of the M2 proton channel depends on lipid bilayer environment. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2005, **14**(4): 856–861
- [6] Li C, Qin H, Gao F P, *et al.* Solid-state NMR characterization of conformational plasticity within the transmembrane domain of the influenza A M2 proton channel. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1768**(12): 3162–3170
- [7] Yi M, Cross T A, Zhou H X. Conformational heterogeneity of the M2 proton channel and a structural model for channel activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(32): 13311–13316
- [8] Stouffer A L, Acharya R, Salom D, *et al.* Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*, 2008, **451**(7178): 596–599
- [9] Cady S D, Schmidt-Rohr K, Wang J, *et al.* Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*, 2010, **463**(7281): 689–692
- [10] Acharya R, Carnevale V, Fiorin G, *et al.* Structure and mechanism of proton transport through the transmembrane tetrameric M2 protein bundle of the influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(34): 15075–15080
- [11] Sharma M, Yi M, Dong H, *et al.* Insight into the mechanism of the influenza A proton channel from a structure in a lipid bilayer. *Science (New York, NY)*, 2010, **330**(6003): 509–512
- [12] Fernandes F, Coutinho A, Prieto M, *et al.* Electrostatically driven lipid-protein interaction: Answers from FRET. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, **1848**(9): 1837–1848
- [13] Stewart S M, Pekosz A. Mutations in the membrane-proximal region of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail have modest effects on virus replication. *Journal of Virology*, 2011, **85**(23): 12179–12187
- [14] Tucker M J, Tang J, Gai F. Probing the kinetics of membrane-mediated helix folding. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, **110**(15): 8105–8109
- [15] Serrano A L, Troxler T, Tucker M J, *et al.* Photophysics of a fluorescent non-natural amino acid: p-cyanophenylalanine. *Chemical Physics Letters*, 2010, **487**(4–6): 303–306
- [16] Czabotar P E, Martin S R, Hay A J. Studies of structural changes in the M2 proton channel of influenza A virus by tryptophan fluorescence. *Virus Research*, 2004, **99**(1): 57–61
- [17] Rossman J S, Jing X, Leser G P, *et al.* Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 2010, **142**(6): 902–913

## Studies of Conformational Exchange of The C-Terminal Amphipathic Helix of The Influenza A M2 Protein by FRET\*

LI Jun-Bei, QIU Xiao-Yan\*\*

(Jiangsu Key Laboratory of Translational Research and Therapy for Neuro-Psycho-Diseases and College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215000, China)

**Abstract** The influenza A virus M2 proton channel, is the target of anti-flu medications, amantadine and rimantadine. The functions of M2 is closely related to its conformation changes. While extensive progresses have been made regarding the structure-function relationship for the transmembrane helix, there have been much fewer studies for the other membrane associated segment, the C-terminal amphiphilic helix. We carried out FRET experiments by introducing into the amphiphilic helix an unnatural amino acid, PheCN, as the donor for the W residue located in the transmembrane helix. This allowed us to study the global conformation change of these membrane associated structures under channel activation or drug inhibition. The distance between amphipathic helix and transmembrane helix increased upon channel activation in the acidic environment. The degree of this distance increase was not affected by drug inhibition. Therefore we speculate that the conformation change of amphipathic helix is not related to the proton channel activity, but is more likely associated with the protein's role in virus budding.

**Key words** M2 proton channel, C-terminal amphipathic helix, conformational exchange, fluorescence intensity

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2016.0078

---

\* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81402902).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-512-65883325

QIU Xiao-Yan. E-mail: xqiu@suda.edu.cn

LI Jun-Bei. E-mail: 20134226002@suda.edu.cn

Received: March 11, 2016 Accepted: May 6, 2016