

丙型肝炎病毒融合蛋白及融合机制

秦照玲 鞠鹤鹏 戚中田

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 属于黄病毒科、肝病毒属, 是有包膜的单正链RNA病毒, 其包膜糖蛋白E1、E2均位于病毒颗粒外表面, 主要参与子代病毒颗粒的形成 (如组装) 及病毒新一轮感染 (如细胞黏附、受体结合以及膜融合等过程)。目前研究认为, 有包膜病毒均通过一个共同机制——膜融合将自身基因组输送至靶细胞, 然后进行复制、转录与翻译、子代病毒组装与释放。经受体结合 [如 I 型人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV-1)]、pH 改变 [如流感病毒、登革病毒 (dengue virus, DENV) 和塞姆利基森林病毒 (Semliki forest virus, SFV)] 或二者兼具 (如鸟类肉瘤病毒、白血病毒) 的方式, 与细胞膜或内体 (endosome) 膜发生融合^[1]。本文将对近年来HCV E1、E2所介导的膜融合研究作一综述。

一、病毒融合蛋白的概念、分类及融合特征

由病毒编码、能介导膜融合反应的蛋白称为融合蛋白 (fusion protein)。该类蛋白具有一些共性: ①为 I 型整合膜蛋白, 由大的胞外域、跨膜 (transmembrane, TM) 域和小的C-端胞内域组成; ②末端含信号序列, 定位于内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 后被剪切; ③形成寡聚体并呈高密度分布于病毒表面; ④含特异的疏水融合肽/环/片^[2]。受低pH和 (或) 受体结合诱导, 融合蛋白构象发生重排, 暴露出融合肽/环/片, 插入靶膜, 再折叠形成发夹状结构, 从而驱动病毒包膜 (由TM结构域介导) 和靶膜 (由融合肽/环/片介导) 发生融合。简言之, 从融合前到融合后融合蛋白的结构转变均伴随着稳定发夹构象的三聚体形成, 即TM和融合肽结构域转位于发夹结构的同一末端。

根据融合后构象的结构模序特点, 可将融合蛋白分为3大类: I、II、III。其中 I 类融合蛋白再折叠形成高度稳定的、中心为一个三聚化的 α -螺旋卷曲样的杆状结构, 如流感病毒的血凝素HA和HIV gp41蛋白。HA前体含一个HA₁组成的大的球形头部和一个长的 α 螺旋卷曲样茎部。低pH刺激使球形头部解离, 使埋于下面的HA₂多肽链由环状变成螺旋状, 暴露出融合肽, 并向靶膜方向转动约100Å, 插入内体膜, 形成“前发夹中间

体”; 然后, HA₂的C-末端采取“V”字形折回, 使病毒膜附近的HA₂片段方向逆转, 并以反平行的方式与N-末端三聚化的卷曲样沟状结构相互作用, 最终形成稳定的发夹三聚体结构^[3]。II类融合蛋白形成高度稳定的、富含 β 二级结构的发夹三聚体, 如TBE病毒 (tick-borne encephalitis virus, TBEV)、DENV的E蛋白和SFV E1蛋白。TBEV E蛋白在融合前呈亚稳定状态, 即其胞外域以头对尾的方式形成同源二聚体, 每个单体含三个 β -片层状结构域 (DI、DII、DIII), 融合环位于DII顶端, 包埋于E-E中。低pH刺激使E-E胞外域发生可逆性解离, 使融合环暴露并与靶膜结合, 通过DIII向DI/DII方向折叠, 从而将C-末端带向融合环, 形成稳定的发夹三聚体^[4]。III类融合蛋白形成复杂型发夹三聚体, 即结构中部的含有一个与 I 类融合蛋白相似的 α -螺旋三聚体核心, 而每个融合结构域中的细长形 β 片层顶端又暴露出融合环, 这又与 II 类融合蛋白很相似^[5], 如水疱性口膜炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) G蛋白、1型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus 1, HSV-1) gB蛋白。

二、HCV融合蛋白的研究与鉴定

HCV E1、E2蛋白形成异二聚体, 位于病毒表面, 均为 I 型膜蛋白, N-端为胞外域, C-端含TM域和一个小的胞内域, TM中含有ER定位的信号序列, 因此, 二者都符合作为融合蛋白的基本条件。但由于二者高度糖基化、折叠动力学效率低等特殊的生物学性质, 很难获得晶体结构, 所以对于HCV融合蛋白是E1还是E2这一问题仍存在争议。

1. HCV E1作为候选融合蛋白的研究: Pérez-Berná等^[6]采用不同脂质体膜对HCV E1、E2的18-mer肽文库进行膜整合性渗漏、半融合和融合诱导实验, 发现E1 TM (aa 331-381) 之前的aa 310-331区域与膜去稳定性、融合孔形成与放大有关; 除C-末端的TM之外, E1内部还含有一个潜在的、呈多嗜性的跨膜结构域 (aa 270-291)。

前期研究显示, 第262~290位氨基酸残基与蛋白分泌有关, 进一步分析发现, 该区域含一个相对高度保守的疏水结构域, 氨基酸组成在不同基因型中的变化也具有规律性; 与黄病毒E蛋白序列进行比对, 发现二者都含有2个完全保守的半胱氨酸、1个天冬氨酸和3个保守的甘氨酸, 且这3个甘氨酸分布于多肽的第3、7、13位, 与副黏病毒F蛋白 (位于第3、7、12位) 类似, 后者对于维持副黏病毒F蛋白融合肽的结构至关重要。由此推测, 这几个保守氨基酸对于HCV融合、入侵也很关键。利用遗传

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.033

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30900066; 81171564); 上海市重点学科建设项目资助 (No. B901)

作者单位: 200433 上海市, 第二军医大学微生物学教研室, 上海市医学生物防护重点实验室

通讯作者: 戚中田, Email: qizt@smmu.edu.cn

突变技术,将1a型HCV假病毒颗粒(HCVpp)相应区域中保守的半胱氨酸和甘氨酸置换成丙氨酸或脯氨酸后,HCV侵入Huh7细胞的效率显著下降,其原因是部分突变破坏了E1/E2间的相互作用,导致HCVpp装配效率降低,另一部分突变虽不影响病毒颗粒组装及CD81结合,但影响膜融合效率,说明该区域的确与HCV膜融合有关^[7]。化学合成E1候选融合肽(E1_{FP}, aa 274-291),体外进行脂质体膜互补实验,发现E1_{FP}位于膜中阴影部位,能增加膜的无序性,稳定非层状(non-lamellar)结构,但不改变膜厚度,具有胆固醇依赖的脂混合能力^[8]。

由于多数病毒融合肽是由16~26个相对疏水的氨基酸残基组成,鉴于E1与其他病毒融合肽间的相似性,可认为HCV E1是融合蛋白,且融合肽位于第262~296位氨基酸残基。

2. HCV E2作为候选融合蛋白的研究: E2蛋白介导的膜融合研究主要分为细胞-细胞融合、体外脂质体融合两种。前者广泛应用于逆转录病毒、棒状病毒、疱疹病毒等入侵研究,其策略是将病毒包膜蛋白表达在一种细胞表面,同时引入T7 RNA聚合酶基因,然后在另一种细胞表面表达病毒受体,并转入含T7启动子及其下游荧光素酶或荧光蛋白等报告质粒,将两种细胞共孵育,经pH处理后,通过酶学或镜检法测定报告基因表达或观察胞体形成情况。如Takikawa等^[9]将HCV E1、E2蛋白的胞外域与VSV G蛋白的跨膜、胞浆结构域构建成嵌合质粒,与T7 RNA聚合酶共转染细胞,然后与表达荧光素酶的受体细胞共培养,通过荧光素酶的表达量来反映细胞融合活性大小。但这种融合实验受蛋白表达丰度、靶膜脂质组成以及融合检测方式的影响。

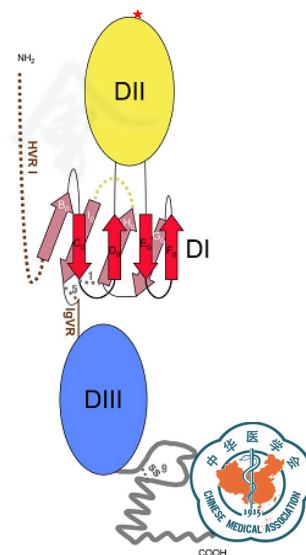
用HCV E1、E2的18-mer肽文库进行脂质体融合实验,发现E2含有4个嗜膜区,分别是aa 423-453、aa 455-489、aa 525-565和aa 603-634,其中后者的膜趋向性最强,与蛋白折叠有关,通过一个高度保守序列(aa 675-699)与TM区(aa 718-746)相连。体外合成这条多肽(又称为E2融合肽,E2_{FP}),发现其与CD81结合、E1-E2和E2-E2二聚化有关,进一步分析其与脂双层膜结合能力及结合后的结构变化,结果发现,E2_{FP}能与带负电荷的磷脂相互作用,调节膜磷脂的多态相,与磷脂膜的亲和力强,位于膜中阴影位置,提示E2_{FP}可能在膜中进行了融合所需的寡聚化。最近,Liu等^[10]用E1-E2重叠肽文库对HCVpp入侵进行抑制筛选实验,发现位于E2 TM区、由16个氨基酸残基组成的一条多肽能有效抑制HCV入侵,还能与抗-CD81发挥协同抑制作用,进一步对其结构进行分析,发现该肽抗病毒活性依赖于其L-型构象、序列组成和疏水特性,说明E2蛋白C-端不同结构域间存在利于HCV入侵的相互作用。

以上是在多肽水平取得的结果,在病毒水平上,利用HCVcc进行的脂质体融合实验,发现HCV膜融合依赖于pH、病毒载量和靶膜的脂质组成;抗-E2能以剂

量依赖的方式抑制融合;不同密度的病毒颗粒融合活性存在差异,密度低融合活性更高^[11],提示游离和(或)与脂蛋白耦联形式的脂质均能促进病毒入侵、融合及感染,这可能与载脂蛋白及SR-BI受体有关,因为低密度的HCVcc含有低和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)组份,如载脂蛋白B和E,而SR-BI介导的高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)脂转移会增加脂膜的胆固醇含量,从而增强HCV受体复合物的内化、膜重排和融合能力。此外,SR-BI还可通过与E2高变区1(hypervariable region 1, HVR1)、HDL间的相互作用来调节与VLDL耦联的载脂蛋白ApoC-I活性,增强HCV融合效率。

支持E2作为融合蛋白最直接的证据是由法国巴斯德研究所的Rey课题组率先测定的E2蛋白的三维结构(见图1)^[12]。在果蝇S2细胞中表达HCV H77株E2蛋白胞外域,用色谱法分离出单体,然后利用圆二色性结合红外光谱法获得了II类融合蛋白相似的三维结构,由DI、DII、DIII三个结构域组成,其中融合环位于DII的远端,为HCV膜融合研究提供了重要的结构生物学信息和参考指标。

3. HCV膜融合的可能机制:属于虫媒病毒目的黄病毒科还包括黄热病毒(yellow fever virus, YFV)、DENV、TBEV、西尼罗河病毒(West Nile virus, WNV)。黄病毒的两个包膜蛋白(E和prM)在成熟和膜融合时会产生一系列构象变化^[13]。首先,prM-E与病毒核心组装成病毒颗粒后从ER出芽,在成熟分泌过程中被蛋白酶水解成M蛋白并与E蛋白解离,后者形成E-E同源二聚体,平行排列在成熟病毒表面。进入新一轮感染的内吞途径后,反平行的E-E二聚体在低pH条件下解离



注:其中红色、黄色和蓝色分别代表DI、DII和DIII;灰色代表与TM区相连的茎状区域;DI由8个 β -片层组成;红色五角星表示融合环所在位置,在一级结构中位于DOE0之间

图1 HCV H77株E2蛋白胞外域(E2e)的三维结构图

成单体(属Ⅱ类融合蛋白),然后通过D I、D II、D III间的相互作用,形成同源三聚体,暴露出融合环,从而驱动融合。

HCV呈经典的二十面体结构,E1-E2异二聚体平行锚着在病毒表面,这与Ⅱ类融合蛋白在病毒结构中的排列方式一致。尽管序列比对和蛋白模拟分析都鉴定出E1蛋白中含有一个融合肽,并提出基于TBE E蛋白的结构模型,但E1在病毒入侵中的确切功能仍不清楚;另一种观点认为E2中含有一个与TBEV、SFV相似的融合肽,并测定出类似于Ⅱ类融合蛋白的三维结构,但生物学实验显示,非共价结合且构象正确的E1-E2异二聚体是病毒融合、入侵所必需的。无独有偶的是,副黏病毒融合需要F和凝集素-神经氨酸酶(hemagglutinin neuraminidase, HN)蛋白共同参与;SFV融合由E1、E2及外周糖多肽E3共同介导;瘟病毒感染起始于E^{ms}和E2间的相互作用;风疹病毒低pH诱导的细胞融合也需E1蛋白内部疏水区的参与。因此,HCV虽是独立的一个属,但与黄病毒和甲病毒类似,膜融合受内体中低pH诱导,可能也是由E1、E2蛋白共同介导,且不排除人CD81、糖胺或其他分子参与。机制可能是在受体与pH的双重诱导下,HCV E1、E2发生构象转变,暴露出融合肽/环,插入靶膜,引发多重构象重排,形成融合诱导型同源三聚体,驱动病毒包膜与内体膜发生融合。

三、结语

尽管近年来HCV膜融合研究取得较大进展,但融合蛋白构象如何转变、融合中间体如何形成以及膜融合的触发机制仍不清楚。从目前的研究结果看,HCV膜融合是E1、E2共同参与、涉及一系列受严格调控的蛋白构象转变的复杂过程,至于E1、E2如何协同作用、采取何种作用模式、又有哪些宿主因子参与等问题还有待进一步研究,但不容置疑的是,膜融合是HCV入侵机制的关键环节,也是目前抗病毒治疗的有效靶标。

参考文献

- Weissenhorn W, Hinz A, Gaudin Y. Virus membrane fusion. *FEBS Lett*,2007,581(11):2150-2155.
- Da Poian AT, Carneiro FA, Stauffer F. Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? *Braz J Med Biol Res*,2005,38(6):813-823.
- Kielian M, Rey FA. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol*,2006,4(1):67-76.
- Stiasny K, Kössl C, Lepault J, et al. Characterization of a structural intermediate of flavivirus membrane fusion. *PLoS Pathog*,2007,3(2):e20.
- Roche S, Bressanelli S, Rey FA, et al. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*,2006,313(5784):187-191.
- Pérez-Berna AJ, Moreno MR, Guillén J, et al. The Membrane-active regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins. *Biochemistry*,2006,45(11):3755-3768.
- Russell RS, Kawaguchi K, Meunier JC, et al. Mutational analysis of the hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles. *J Viral Hepat*,2009,16(9):621-632.
- Pérez-Berná AJ, Pabst G, Laggner P, et al. Biophysical characterization of the fusogenic region of HCV envelope glycoprotein E1. *Biochim Biophys Acta*,2009,1788(10):2183-2193.
- Takikawa S, Ishii K, Aizaki H, et al. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol*,2000,74(11):5066-5074.
- Liu R, Tewari M, Kong R, et al. A peptide derived from hepatitis C virus E2 envelope protein inhibits a post-binding step in HCV entry. *Antiviral Res*,2010,86(2):172-179.
- Haid S, Pietschmann T, Pécheur EI. Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles. *J Biol Chem*,2009,284(26):17657-17667.
- Krey T, d'Alayer J, Kikuti CM, et al. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog*,2010,6(2):e1000762.
- Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*,2011,3(2):160-171.

(收稿日期:2013-04-23)

(本文编辑:孙荣华)