

° 专论与综述 °

呼肠病毒基因组片段 S1 编码蛋白的研究进展^{*}

宋立华 端 青

(军事医学科学院病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘要: 呼肠病毒共有 3 个血清型, 不同型之间 S1 片段编码蛋白的同源性小于 26%, 其它 9 个片段编码蛋白的同源性都在 86% 以上。S1 片段是双顺反子, 编码 $\sigma 1$ 和 $\sigma 1s$ 这两个蛋白决定了呼肠病毒的感染性、致病性和毒力。本文综述了 $\sigma 1$ 、 $\sigma 1s$ 的结构与功能的研究进展。

关键词: 呼肠病毒; signal 蛋白; signal s 蛋白

Research Progress of Proteins Encoded by Reovirus S1 Genome Segment

SONG Li-hua, DUAN Qing

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology,

Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

ABSTRACT: Reovirus includes 3 serotypes. Homology of proteins encoded by S1 genome segment was less than 26% between serotypes, while that of viral proteins encoded by other 9 segments was all more than 86%. Reovirus infectivity and pathogenicity were determined by $\sigma 1$ and $\sigma 1s$ encoded by segment S1. Structure and function of the two proteins were also reviewed in this paper.

Key words: Reovirus; Signal protein; Signal s protein

呼肠病毒(reovirus)也称哺乳动物呼肠病毒(mammalian reovirus), 在自然界广泛分布, 可感染多种哺乳动物, 一般认为对人无致病性, 但也有多例呼肠病毒致人死亡的报道^[16]。呼肠病毒属于呼肠病毒科(Reoviridae family)正呼肠病毒属(Othoreovirus genus), 无包膜, 有双层衣壳, 呈 20 面体对称, 基因组由 10 条分节段的 dsRNA 组成。呼肠病毒科共有 10 个属, 正呼肠病毒属的功能蛋白与本科其它属的功能蛋白之间没有同源性。通过抗血清中和试验和红血球凝集试验, 至少可将正呼肠病毒属分成 3 个血清型, 不同型之间 S1 片段编码蛋白的同源性小于 26%, 其它 9 个片段编码蛋白的同源性都在 86% 以上。S1 片段是双顺反子, 编码 $\sigma 1$ 和 $\sigma 1s$ 这两个蛋白决定了呼肠病毒的感染性和致病性。本文主要综述了 $\sigma 1$ 的结构与功能的研究进展。

1 $\sigma 1$ 的组成及结构1.1 S1 及 $\sigma 1$ 的序列多态性

由于呼肠病毒的复制率高、基因组 RNA 的稳定性比 DNA 差及 RNA 聚合酶易出错等性质^[14], 产生了 S1 片段及 $\sigma 1$ 的序列多态性^[5]。Gregory 等人^[17]的研究表明, 在呼肠病毒传代中 S1 及 $\sigma 1$ 的序列就会发生变异, $\sigma 1$ 的突变率很高。Campbell 等人^[1]对 3 株标准株和 10 株野生株的 $\sigma 1$ 进行序列比对, 发现只有极少数保守的氨基酸。

不同型之间 S1 片段的长度略有差异, 在 1400—1500 碱基

之间。S1 的末端保守^[5], 5' 端都为 gCUA, 3' 端都为 UCAUC。不同型之间 $\sigma 1$ 的氨基酸数目也不同, 在 450—480 个氨基酸之间, 同型中 $\sigma 1$ 的氨基酸数目最相近。呼肠病毒 1、2、3 型的标准株分别为 type 1 Lang(T1L)、type 2 Jones(T2J)、type 3 Dearing(T3D)。以标准株为例, 不同血清型之间的 $\sigma 1$ 的组成及物理性质见表 1, 由于同型 $\sigma 1$ 的物理性质通常最相近, 该表具有代表意义。

1.2 $\sigma 1$ 的结构

对 $\sigma 1$ 结构与功能之间关系的分析多集中在对 T3D $\sigma 1$ 的研究上。T3D 有神经毒性, 是研究无包膜病毒致病机理的理想模型。对 1 型 $\sigma 1$ 的研究仅限于对 T1L 的少数报道。获得 $\sigma 1$ 蛋白的常用方法有直接从病毒粒子中分离 $\sigma 1$ 蛋白, 或通过原核、真核表达系统表达纯化。目前对 $\sigma 1$ 的结构已经有了比较详细的了解。

1.2.1 $\sigma 1$ 的形态及不同结构域

$\sigma 1$ 是由细长的丝状尾巴和圆球形头部构成的三聚体^[1,7], 位于 20 面体的 12 个顶角上, 所以一个病毒粒子共含有 36 拷贝 $\sigma 1$ 单体。N 端尾巴与 $\lambda 2$ 蛋白形成六角转头结构插入病毒粒子的衣壳中, C 端头部区伸出粒子表面, 位于病毒粒子的最远端^[8]。预测的 $\sigma 1$ 的二级结构及结构域见图 1。根据距病毒粒子表面的相对距离, 将 $\sigma 1$ 尾部结构域依次分为 4 个区域, T(i), T(ii), T(iii), T(iv)。前两个区由 α 螺旋状卷曲螺旋形成, 后两个区由 β 片层和转角构成, T(ii) 区域起到稳定 3 聚体稳定性的作用。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30471555); 军事医学科学院创新启动基金项目(No. 200408183)

作者简介: 宋立华, 男, (1979—), 在读博士生, 主要从事分子微生物学研究

Tel: 010-66948669, E-mail: songlihua@gmail.com.

(收稿日期: 2006-03-15 接受日期: 2006-04-07)

表 1 预测的不同型σ1 的物理性质

σ1	position(nt)	peptide length(aa)	estimated MW(kD)	pI	hydropho- bicity(%)	hydrophi- licity(%)	charge (+)(%)	charge (-)(%)
T1L	14~1270	470	51.48	4.8	31.10	52.10	8.50	9.80
T2J	14~1213	462	50.48	5.0	32.30	50.00	9.50	10.40
T3D	13~1380	455	49.11	5.0	31.20	49.00	9.00	9.90

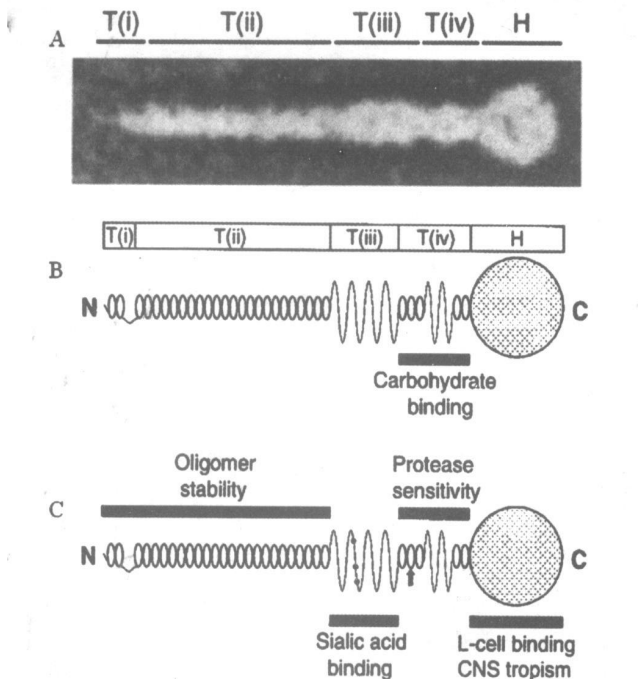


图 1 呼肠病毒吸附蛋白σ1^[1,3] (A)计算机处理过的σ1 电泳图显示 5 个区; (B)预测的 1 型σ1 二级结构及结构域; (C)预测的 3 型σ1 二级结构及结构域(箭头指示是肠蛋白酶切割位点)

T3D σ1 有 2 个受体结合区域, 一个位于头部, 与联接黏附分子(Junctional Adhesion Molecule, JAM)结合, 另一个位于尾部, 与 α 链接唾液酸(α-linked sialic acid)结合; T1L 和 T2J σ1 只有 JAM 结合域, 没有唾液酸结合域。在 T3D σ1 中, 这 2 个结构域可以通过肠蛋白酶(胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶)处理解离开来。胰蛋白酶解离的羧基端产物包括部分尾和整个头部结构, 包含了可以与 JAM 亲和结合的所有序列。氨基端产物包含了与唾液酸结合的所有必需序列。Chappell 等人^[3]通过表达 σ1 截断突变和由 T1L、T3D 构建的嵌合分子, 证明 3 型 σ1 的唾液酸结合域位于 T(iii)区内, 约为 65 个氨基酸。T3D σ1 的 T(iii)区介导血凝, 其序列多态性决定了不同分离株与唾液酸结合及感染鼠红白血病细胞(MEL)的能力; T1L σ1 不与唾液酸结合, 但通过与糖结合也能介导血凝, 其糖基结合位点定位于 T(iv)区, 该糖基的性质仍然未知, 最新的研究表明该糖基有可能也是唾液酸^[9]。另外头部哪些氨基酸与 JAM 结合仍然是个谜, 进一步阐明 σ1 结构与功能之间的关系需要对 σ1-JAM 复合物进行高分辨率结构分析。

1.2.2 σ1 的晶体结构

2002 年, Chappell 等人^[4]解析了 T3D σ1 部分片段的晶体结构(mmdbId: 18327, 见图 3A), 为进一步研究 σ1-JAM-A 相互作用提供了一个平台。结晶的 σ1 片段是 σ1 的胰酶消化产物, 不包含 N 端前 245 个氨基酸, 该片段在溶液中可以形成三聚

体且可以与 JAM 结合, 但不能与唾液酸结合。σ1 单体有细长的尾巴和紧密的头部组成, 这两部分都参与三聚体的形成。246-309 位氨基酸构成尾巴, 剩余残基形成头部。

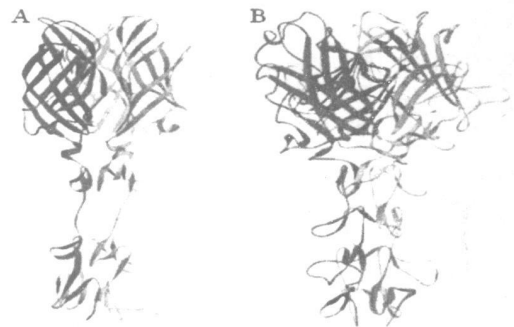


图 3 呼肠病毒σ1 和腺病毒 fiber 的结构对比^[4,12] (A)呼肠病毒σ1 三聚体结构; (B)腺病毒 fiber 的三聚体结构

对 σ1 的结构分析发现, 呼肠病毒的 σ1 与腺病毒的吸附蛋白触须样纤维(fiber)在结构与功能上有很多相似之处^[13]。呼肠病毒和腺病毒都是无包膜的 20 面体结构, 二者的衣壳及其它组成都有很大区别, 重要的是前者的基因组是 dsRNA, 而后者的基因组是 dsDNA。但两种病毒都通过位于 20 面体顶端的纤维状蛋白与细胞受体发生相互作用, 另外最近对呼肠病毒-JAM-A 相互作用的生化研究^[9]表明, σ1 与 JAM-A 单体结合, 且与 JAM-A 二聚体界面临近的残基接触, 这种受体结合策略与腺病毒极为相似。以上表明这两种病毒的受体结合策略有进化联系。

尽管不同型不同分离株的 σ1 的同源性非常低, 但他们具有相同的二三四级结构。依据已知的 T3D σ1 的晶体结构, 可以通过生物信息学软件来预测其它呼肠病毒株 σ1 的晶体结构。如瑞士蛋白质分析专家系统(www.expasy.org/tools), 将其它呼肠病毒 σ1 的序列及 T3D σ1 作为模板蛋白输入 Swiss-PdbViewer 进行初步的拟合并制成 project 文件, 将该文件以 E-mail 方式发送至 SWISS-MODEL 服务器完成最后的同源建模。

2 σ1 的主要生物学功能

通过体外实验已发现的 σ1 受体有 JAM-A 和唾液酸, σ1 与受体的相互作用决定了呼肠病毒在宿主体内的扩散途径、组织嗜性及不同致病力, 其生物学功能主要有以下几点。第一, σ1 可能通过选择性识别细胞表面不同的受体, 导致不同的病症。呼肠病毒感染小鼠是研究病毒对中枢神经系统(简称 CNS)致病机理的重要模型, 其中一个很重要的现象就是 T1L 和 T3D 感染乳鼠后侵入 CNS 的途径不同, 且会引起型特异性病症。T1L 通过循环系统进入 CNS, 导致非致死性脑积水; T3D 主要通过神经元途径进入 CNS 并感染神经元, 引起致死性脑炎。虽然已经解析了 σ1 和 JAM-A 的晶体结构并鉴定了相应的结合域, 但对它们具体的作用方式仍然还不了解, 还不能证明这种型特异性扩散途径是因为与 JAM 受体的不同结合方

式,而不是与其它可能的受体的结合。第二, $\sigma 1$ 在诱导凋亡中起重要作用。呼肠病毒在体外或体内都可引起凋亡的生化及形态特征。但不同分离株诱导细胞凋亡的程度不同,它们之间的主要区别就是 $\sigma 1$ 或者说是S1片段的差异造成了众多差异。第三, $\sigma 1$ 决定了呼肠病毒的组织嗜性。与侵袭途径类似,组织嗜性也是因为 $\sigma 1$ 与受体的选择性结合。决定组织嗜性的受体应该是蛋白质性质的受体,因为糖基在细胞中广泛表达,很难想象是唾液酸类物质赋予病毒精密特异的组织嗜性。到目前为止发现的蛋白质性质受体只有JAM-A,而JAM-A是通用受体,既可以与1型结合,也可以与3型结合,所以推测JAM-A不可能是呼肠病毒中枢神经系统趋向性的唯一因素,可能还存在其它的蛋白质性质受体。

3 $\sigma 1$ s 的主要生物学性质

$\sigma 1$ s是非结构蛋白, $\sigma 1$ s ORF在目前已经鉴定的所有S1片段中都存在,其氨基酸长度从119—125不等。不同分离株的 $\sigma 1$ s的同源性很低,对来自三个标准株的 $\sigma 1$ s比对发现,只有18个相同的氨基酸。对 $\sigma 1$ s的研究较少,近两年开始引起了人们的注意。Rodgers等人^[13]的体外实验表明, $\sigma 1$ s对呼肠病毒的复制和病毒诱导凋亡的能力都没有影响。

但最新的体内实验表明, $\sigma 1$ s在体内可以与宿主发生相互作用并在病毒致病性上起重要作用。

3.1 $\sigma 1$ s 影响心脏和中枢神经系统的凋亡动力学^[11]

目前对病毒杀死宿主细胞并最终导致疾病的机理了解很少。随接种位点和毒株型别的差异,呼肠病毒感染幼鼠可引起不同的致死性脑炎或心肌炎。呼肠病毒诱导的凋亡是导致组织损伤和心脑致病的主要机制,不同呼肠病毒株诱导细胞凋亡的能力是由S1片段决定的。在体外实验中 $\sigma 1$ 蛋白是主要的决定因素。在体内实验中 $\sigma 1$ s也是一个毒力影响因素。Hoyt等人通过分析比较接种 $\sigma 1$ s缺失型病毒($\sigma 1$ s-)和正常型病毒($\sigma 1$ s+)之间病毒的复制和致病力发现,虽然 $\sigma 1$ s对病毒的复制没有影响,但是病毒诱导的细胞凋亡蛋白酶激活和相应的组织损伤,不论在心脏还是脑内,感染 $\sigma 1$ s-的都明显减轻。这些表明 $\sigma 1$ s是呼肠病毒诱导心脑细胞凋亡的另一个决定因素,也能影响呼肠病毒的致病性和毒力。

3.2 将 $\sigma 1$ s转入细胞核会导致细胞凋亡^[10]

病毒的复制通常会干扰细胞核的功能。呼肠病毒在细胞浆内复制,也可能通过向细胞核转入病毒蛋白来干扰细胞核功能。Hoyt等人发现,将 $\sigma 1$ s基因引入细胞核后,会导致核孔复合物及核层纤蛋白的重新分布,形成髓核突出。这是一种新发现的机制,病毒复制虽然在胞浆内进行,但会通过这些髓核突出干扰细胞核结构,引起细胞凋亡,并最终导致感染宿主发病。该小分子蛋白对毒力的重要作用及致病机理值得进一步详细研究。

4 结语

S1片段决定了呼肠病毒的感染性、致病性和毒力,其多态性造就了不同的血清型和不同的分离株。 $\sigma 1$ 是病毒吸附蛋白,也是S1片段编码的最重要的蛋白,深入了解 $\sigma 1$ 与受体的相互作用机制对研究无包膜病毒的致病机理有普遍意义,相信以后会有更多的研究围绕 $\sigma 1$ 及其受体展开; $\sigma 1$ s虽然对呼肠病毒的复制没有影响,但在体内可能会参与一系列的生理活动,具体有哪些分子参与了这个过程及详细的反应机制还有待于进一步研究,这个小分子可能决定了不同呼肠病毒分

离株之间的毒力差异,这对揭示病毒与宿主之间的相互作用关系有重要意义。

参考文献

- [1] Barton E.S, Chappell J.D, Connolly J.L, et al. Reovirus receptors and apoptosis [J]. *Virology*, 2001, 290(2): 173—180
- [2] Campbell J.A, Schelling P, Wetzel J.D, et al. Junctional adhesion molecule 1 serves as a receptor for prototype and field-isolate strains of Mammalian reovirus [J]. *Virology*, 2005, 339(13): 7967—7978
- [3] Chappell J.D, Duong J.L, Wright B.W, et al. Identification of carbohydrate-binding domains in the attachment proteins of type 1 and type 3 reoviruses [J]. *Virology*, 2000, 274(18): 8472—8479
- [4] Chappell J.D, Prot A.E, Demody T.S, et al. Crystal structure of reovirus attachment protein signal reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber [J]. *Embo J*, 2002, 21(1—2): 1—11
- [5] Demody T.S, Nibert M.L, Bassett-Duby R, et al. Sequence diversity in S1 genes and S1 translation products of 11 serotype 3 reovirus strains [J]. *J Virol*, 1990, 64(10): 4842—4850
- [6] Forrest J.C, Campbell J.A, Schelling P, et al. Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1. Implications for the mechanism of reovirus attachment [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(48): 48434—48444
- [7] Fraser R.D, Furlong D.B, Turs B.L, et al. Molecular structure of the cell-attachment protein of reovirus: correlation of computer-processed electron micrographs with sequence-based predictions [J]. *J Virol*, 1990, 64: 2990—3000
- [8] Furlong D.B, Nibert M.L, Fields B.N. Sigma 1 protein of mammalian reoviruses extends from the surfaces of viral particles [J]. *J Virol*, 1988, 62(1): 246—256
- [9] Helander A, Silvey K.J, Mantis N.J, et al. The viral sigma 1 protein and glycoconjugates containing alpha2—3-linked sialic acid are involved in type 1 reovirus adherence to M cell apical surfaces [J]. *J Virol*, 2003, 77(14): 7964—7977
- [10] Hoyt C.C, Bouchard R.J, Tyler K.L. Novel nuclear hemiation induced by nuclear localization of a viral protein [J]. *J Virol*, 2004, 78(12): 6360—6369
- [11] Hoyt C.C, Richardson-Burns S.M, Goody R.J, et al. Nonstructural protein sigma 1 is a determinant of reovirus virulence and influences the kinetics and severity of apoptosis induction in the heart and central nervous system [J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2743—2753
- [12] Prot A.E, Campbell J.A, Schelling P, et al. Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5366—5371
- [13] Rodgers S.E, Connolly J.L, Chappell J.D, et al. Reovirus growth in cell culture does not require the full complement of viral proteins: identification of a sigma 1-null mutant [J]. *J Virol*, 1998, 72(11): 8597—8604
- [14] Spinner M.L, Di Giovanni G.D. Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 3016—3020
- [15] Sethele T, Demody T.S. Structural similarities in the cellular receptors used by adenovirus and reovirus [J]. *Viral Immunol*, 2004, 17(2): 129—143
- [16] Tillotson J.R, Lemer A.M. Reovirus type 3 associated with fatal pneumonia [J]. *N Engl J Med*, 1967, 276(19): 1060—1063
- [17] Wilson G.J, Wetzel J.D, Puryear W, et al. Persistent reovirus infections of L cells select mutations in viral attachment protein signal that alter oligomer stability [J]. *J Virol*, 1996, 70(10): 6598—6606