226—234 417(5) 维普资讯 http://www.cqvip.com

第8卷 第3期 中国病毒学 Vol. 8 No. 3
1993年9月 VIROLOGICA SINICA Sept. 1993

辛德毕斯病毒6K蛋白在病毒成熟释放中的作用*

梁凤霞 丁明孝
(北京大学生物学系,北京,100871)

Q939.4

提 要 应用多种细胞生物学技术,对辛德毕斯病毒(Sindbis Virus,SbV)的6K蛋白在细胞中的分布和转运动态及在病毒释放过程中的作用进行了探讨,结果表明:6K蛋白不仅存在于成熟病毒粒子中,而且在粗面内质网合成后及在向细胞质膜的转运过程中均与囊膜蛋白E2形成复合物。对6K蛋白酰基化位点突变株的研究结果表明,它与E2突变株在病毒形态发生方面有惊人的相似之处,说明SbV的出芽释放过程不仅仅是靠E2蛋白C端与病毒核衣壳的相互作用,6K蛋白的酰基化修饰可能在这个过程中也起着十分重要的作用。根据6K蛋白的二级结构的预测及综合上述实验结果,对SbV出芽释放的模式提出了新的补充。

关键词: 辛德毕斯病毒 病毒的成熟与释放 辛德毕斯病毒的6K蛋白

成熟、释放、病毒、蛋白

辛德毕斯病毒(Sindbis virus,简称SbV)是一种有囊膜的正链RNA病毒,属于披盖病毒科,甲病毒属。成熟的病毒粒子中含有三种结构蛋白,即衣壳蛋白(C)和两种病毒特异的囊膜蛋白(E1和E2)[1]。最近发现一种分子量为6K的病毒蛋白也存在于成熟的病毒粒子中[2]。6K蛋白结构上的特征是在它的中部有4个作为酰基化位点的半胱氨酸残基,可与4个软脂酸结合。关于6K蛋白生物学功能特别是与病毒成熟释放的关系尚不清楚。为此,我们从6K蛋白在细胞内的分布及转运动态入手,通过研究6K蛋白与其它结构蛋白之间的关系以及对用定点突变技术获得的6K蛋白突变株与野生型的毒株在病毒装配和成熟过程中的形态特征的比较,显示了6K蛋白对病毒成熟释放的重要作用,同时对SbV出芽释放的模式提出了新的补充。

材料与方法

1 细胞与病毒的培养

本实验所用SbV,SBV 6K蛋白突变株,SbV E2蛋白C端突变株,SbV的cDNA及兔抗SbV的6K蛋白、E2蛋白抗体均由美国华盛顿大学医学院Schlesinger教授实验室提供。

培养病毒所用细胞为BHK-21传代细胞系(由中国兽医药监察所细胞室提供)。培养细胞所用培养基为E-MEM培养基(日本制药株式会社生产)。

2 病毒粒子中蛋白成份的检测

SbV感染细胞4小时后,用终浓度为40μCi/ml的^{35}S-甲硫氨酸(^{35}S-Met,NEN公司生产,比强1000μCi/mmol)标记细胞2小时并追踪3小时,将释放到维持液中的病毒粒子(滴度为3.0×10^{9}PFU/ml)在Backman L8-80M离心机上用SW40转头离心4小时(40 000r/m),取沉淀并加入少量缓冲液(20mmol/L Hepes-NaOH,pH7.4,100mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA)悬浮,加入电泳样品溶解液,在10%—20%的梯度胶上进行SDS-

* 本文于1992年9月22日收到,12月30日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

PAGE与放射自显影分析，并割下相应的电泳条带进行液闪计数，同时对X光片的相应条带扫描以测定成熟病毒粒子中结构蛋白的成份及其相对含量。

3　放射免疫沉淀与免疫共沉淀技术

病毒感染4小时后，用终浓度为50μCi/ml的^{35}S-甲硫氨酸脉冲标记20分钟，分别追踪10分钟或40分钟。冷PBS洗涤后加入裂解液(20mmol/L Hepes-NaOH，pH7.4，100mmol/L NaCl，1mmol/L EDTA，1% NP-40)于冰浴中裂解细胞15分钟。吸取上清，分别加入免抗SbV 6K蛋白抗体或免抗SbV E2蛋白抗体，参照Anderson等人的方法[3]进行放射免疫沉淀，并依据Laemmili的方法[4]进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影分析。

4　用蔗糖密度梯度离心技术分析病毒蛋白复合物

SbV感染细胞4小时后，用终浓度为40μCi/ml的^{35}S-甲硫氨酸标记细胞1小时，然后加入1%NP-40裂解液裂解细胞(同方法3)，取上清在5%—30%的蔗糖连续梯度中离心4小时(Backman L8-80M离心机，SW40转头，40 000r/m)用蠕动泵小心收集样品各组份，然后在LKB 1209Rackbeta全自动液体闪烁仪上直接测定各组份的CPM，并据此绘制CPM(counts per minute)分布曲线，选出CPM值较高的组份进行SDS-PAGE电泳与放射自显影分析。根据所得结果，用抗E2蛋白抗体对相应的组份进行放射免疫沉淀分析。

5　定点突变技术

用常规定点突变技术改变SbV cDNA(SbV cDNA由C. Rice教授惠赠)上相应的核苷酸序列[5]，然后在体外以突变的病毒cDNA为模板合成病毒的RNA，进而用DEAE-dextron方法[6]获得SbV的6K突变株(Cys38→Ser)。

6　免疫荧光技术

在病毒感染后2、4和6小时，用免抗SbV囊膜蛋白E2抗体或免抗SbV 6K蛋白抗体室温下作用1小时，以研究上述病毒蛋白在细胞表面的分布；或者在固定后用0.1% Triton X-100处理细胞10分钟，再进行抗体反应，以研究病毒蛋白在细胞内部的分布。

7　超薄切片及冰冻蚀刻样品的制备

病毒感染BHK-21细胞，约50%的细胞出现病变(CPE)后，迅速用1.5%冷戊二醛Hank's液固定。按常规方法[6]在Balzer's BAF-400D冰冻蚀刻仪上进行冷冻断裂、复型。

超薄切片样品经1.5%戊二醛-1%锇酸双固定后，用2%醋酸双氧铀水溶液块染1小时，按常规方法制样。

所有电镜样品均于JEM-100CX或JEM-200CX电镜下观察。

结　果

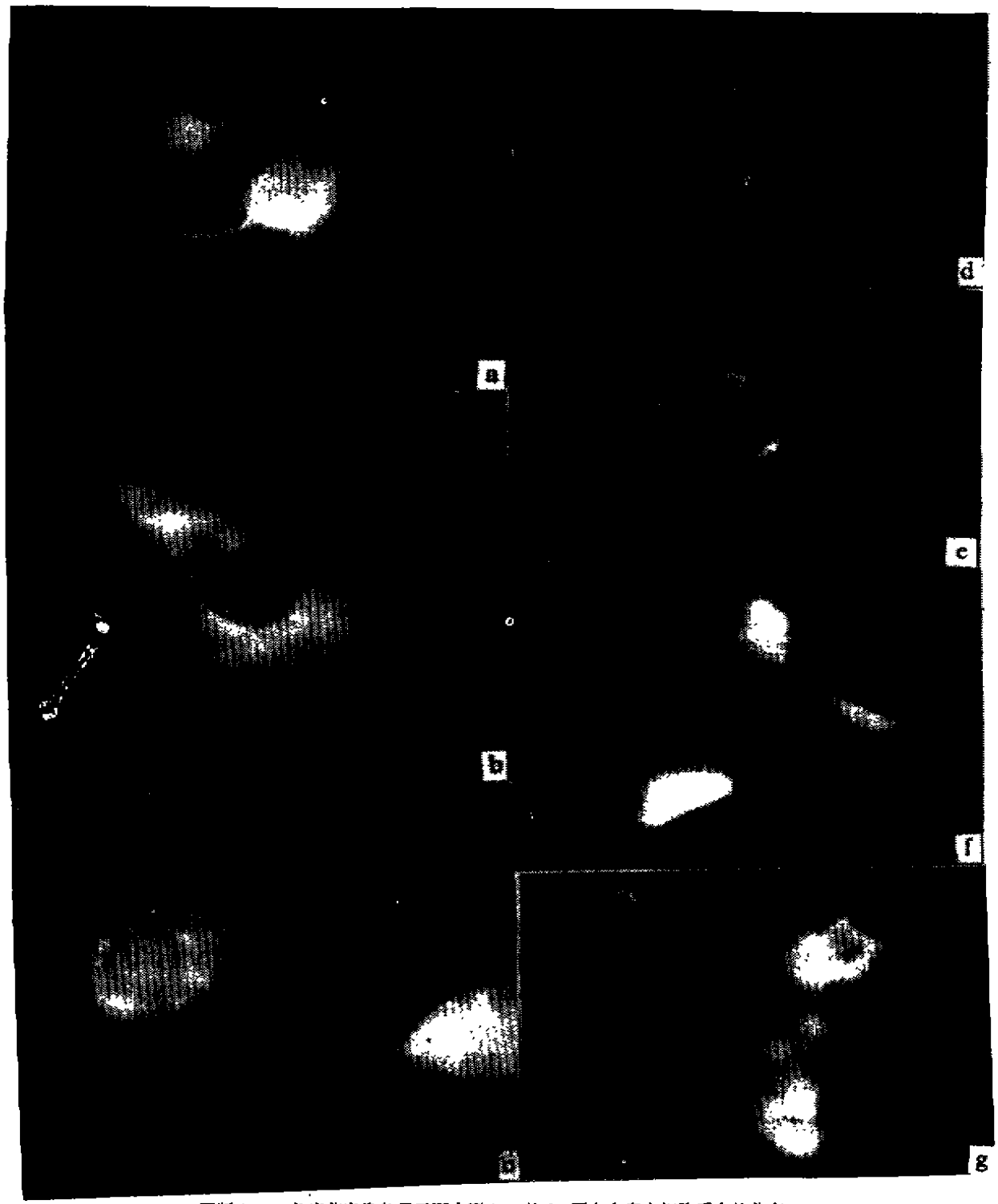
1　6K蛋白存在于成熟的病毒粒子中

用超速离心的方法浓缩^{35}S-甲硫氨酸标记的病毒粒子，再经SDS-PAGE及放射自显影分析，结果显示，在BHK-21细胞繁殖的成熟病毒粒子中含有6K蛋白，对电泳条带进行液闪计数或对相应X光片进行扫描，再根据蛋白质中的半胱氨酸残基的数目，推算出病毒粒子中结构蛋白的分子比为(E1+E2)：C：6K=1.0：1.05：0.25。

2　6K蛋白在宿主细胞中的分布及变化动态

间接免疫荧光方法对6K蛋白在BHK-21细胞内的分布情况的研究结果表明，在病毒感染后2小时、4小时和6小时的细胞表面均呈阴性反应。进而用TritonX-100处理细胞再进行免疫荧光标记，结果发现在病毒感染后2小时，靠近核区的细胞质呈较强的阳性反应，某些区域6K蛋白的分布似乎与细胞骨架纤维的走向有关(图版1a)。感染后4小时，6K蛋白在细胞质某些区域形成团块，且趋向于细胞质膜(图版1b)。感染后6小时，团块状的分布更加显著，更加集中(图版1c)。6K蛋白在细胞内的分布及变化趋势与E2蛋白类似。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图版 1a—c.免疫荧光染色显示野生型 SbV 的 6K 蛋白在宿主细胞质中的分布

a,b,c 分别为感染后 2,4 和 6 小时的细胞

1a:x 2 100;1b,1c:x 3 300

维普资讯 http://www.cqvip.com

1d—f. 免疫荧光染色显示野生型SbV(e,g)及SbV 6K突变株(d,f)的E2蛋白在宿主细胞质膜的分布

d,e:SbV感染后2小时；×2 100

f,g:SbV感染后4小时；×3 300

Plate 1a—c. Immunofluresecent staining of wild-type SbV-infected BHK-21 cells with anti-6K antibody demonstrated the cytoplasmic distribution of 6K protein

a:2 h p.i.;b:4 h p.i.; c:6 h p.i.

1a:×2 100; 1b,1c:×3 300

1d—1f. Immunofluorescent staining demonstrated the distribution of E2 protein on host cell membrane of wild-type (e.g.) or 6K mutant (d,f) SbV-infected cells

d,e:at 2 h p.i.; ×2 100

f,g:at 4 h p.i.; ×3 300

3　6K蛋白与E2形成复合体

在SbV感染4小时后，用^{35}S-甲硫氨酸标记细胞，分别追踪10分钟和40分钟，小心裂解细胞，并用抗E2蛋白抗体及抗6K蛋白的抗体进行放射免疫共沉淀的研究。结果表明，无论追踪10分钟还是40分钟，用E2抗体都能将6K蛋白沉淀下来。反过来，用6K的抗体有时也可将E1E2复合物沉淀下来(图1)。这说明6K蛋白在合成后不久，即在粗面内质网内就与囊膜蛋白E2结合在一起，而且在后来经高尔基体及运输小泡向细胞质膜的转运过程中，仍与囊膜蛋白结合在一起。

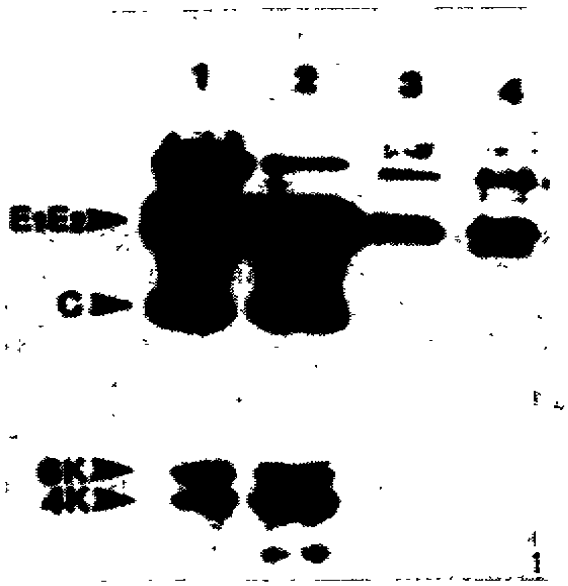


图1　SbV感染BHK-21细胞4小时后，用^{35}S-甲硫氨酸脉冲标记20分钟，分别追踪10分钟(lane 1，lane 3)或40分钟(lane 2，lane 4)，并用抗E2抗体(lane 1和lane 2)，抗6K抗体(lane 3和lane 4)进行免疫沉淀分析。

Fig. 1　At 4 h p.i.,BHK-21 cells infected with SbV were pulse-labeled with ^{35}S-methionine for 20 min followed

维普资讯 http://www.cqvip.com

by a 10-min(lane1 and 3) or 40-min chase (lane 2 and 4). Then the cells were lyzed and subjected to immunoprecipitation analysis with anti-E2 antibody (lane 1 and 2) and anti-6K antibody (lane 3 and 4).

我们用蔗糖密度梯度离心技术对^{35}S-甲硫氨酸标记的感染细胞裂解物进行分离(图 2),再经 SDS-PAGE 以及用 E2 的抗体进行放射免疫沉淀分析,结果清楚地证明,E2 蛋白复合物与衣壳蛋白存在于不同的组份中,从而排 除了 E2-6K-C 这一复合物存在的可能性。

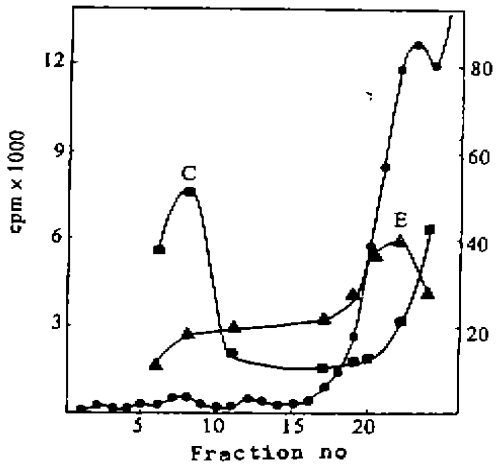


图 2 SbV 感染 BHK-21 细胞 4 小时后,用^{35}S-甲硫氨酸标记细胞 1 小时,裂解细胞,进行蔗糖梯度离心。分别收集各组份,液闪计数,测定各组份中^{35}S 的含量。据此绘出图中曲线(—·—)。同时对各组份进行 SDS-PAGE 及放射自显影分析,通过对 X 光片中相应囊膜蛋白 E2 与衣壳蛋白 C 的条带进行扫描分析,绘制出图中曲线 E(—▲—)和 C(—■—)。

Fig 2 At 4 h after SbV infection, infected cells were labeled with ^{35}S-methionine for 1 h. The labeled cells were then lyzed and the lysates were subjected to sucrose gradient centrifugation. Each fraction was collected and subjected to liquid scintillation counting, SDS-PAGE and autoradiography. Relative amounts of E2 (—▲—) and C (—■—) proteins were evaluated by densitometric tracing of the exposed X-films.

4 6K 蛋白突变株的生物学特性

A、用 E2 抗体分别对 6K 突变株感染的细胞进行免疫标记,结果表明,在病毒感染后 2 小时,细胞表面呈阳性反应的斑区较野生型病毒弱(图版 1d,e)。病毒感染后 4 小时,呈强阳性反应区域反而比野生型病毒更为集中,区域性更强(图版 1f,g),对突变株蛋白合成的研究结果表明,结构蛋白 E1E2 及 C 的合成量均低于野生型病毒(图 3,lane3),而且病毒的滴度也低于野生型病毒,这些都与超微形态学上观察的结果相吻合。

维普资讯 http://www.cqvip.com

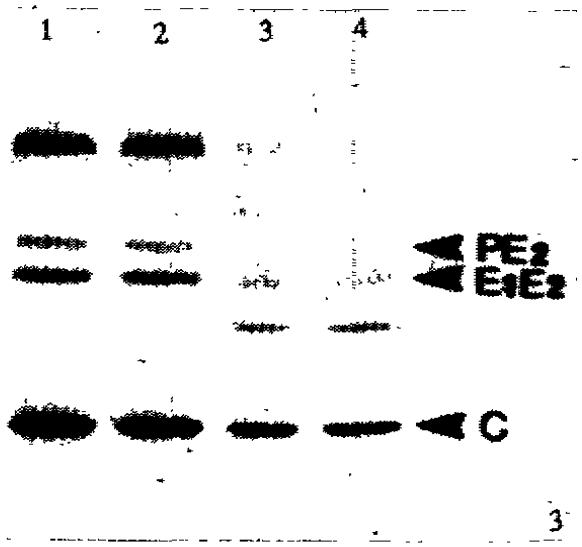


图3　SbV感染BHK-21细胞，感染后4小时和6小时，分别用^{35}S-甲硫氨酸脉冲标记15分钟并进行SDS-PAGE及放射自显影分析。

lane 1-2：为野生型SbV感染后4小时和6小时的样品

lane 3：6K突变株Ⅰ感染后4小时的样品

lane 4：E2突变株Ⅰ感染后4小时的样品

Fig. 3　At 4 or 6 hrs after SbV infection, the cells were respectively labeled with ^{35}S-methionine for 15 min and then subjected to SDS-PAGE and autoradiography analyses.

lane 1-2: wild-type SbV (4 h p. i. and 6 h p. i.)

lane 3: 6K mutant Ⅰ SbV (4 h p. i.)

lane 4: E2 mutant Ⅰ SbV (4 h p. i.)

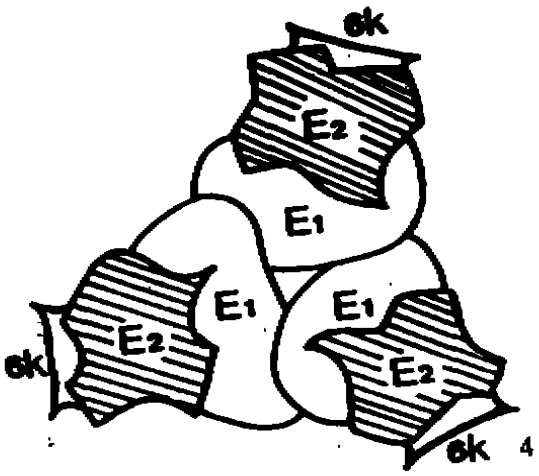
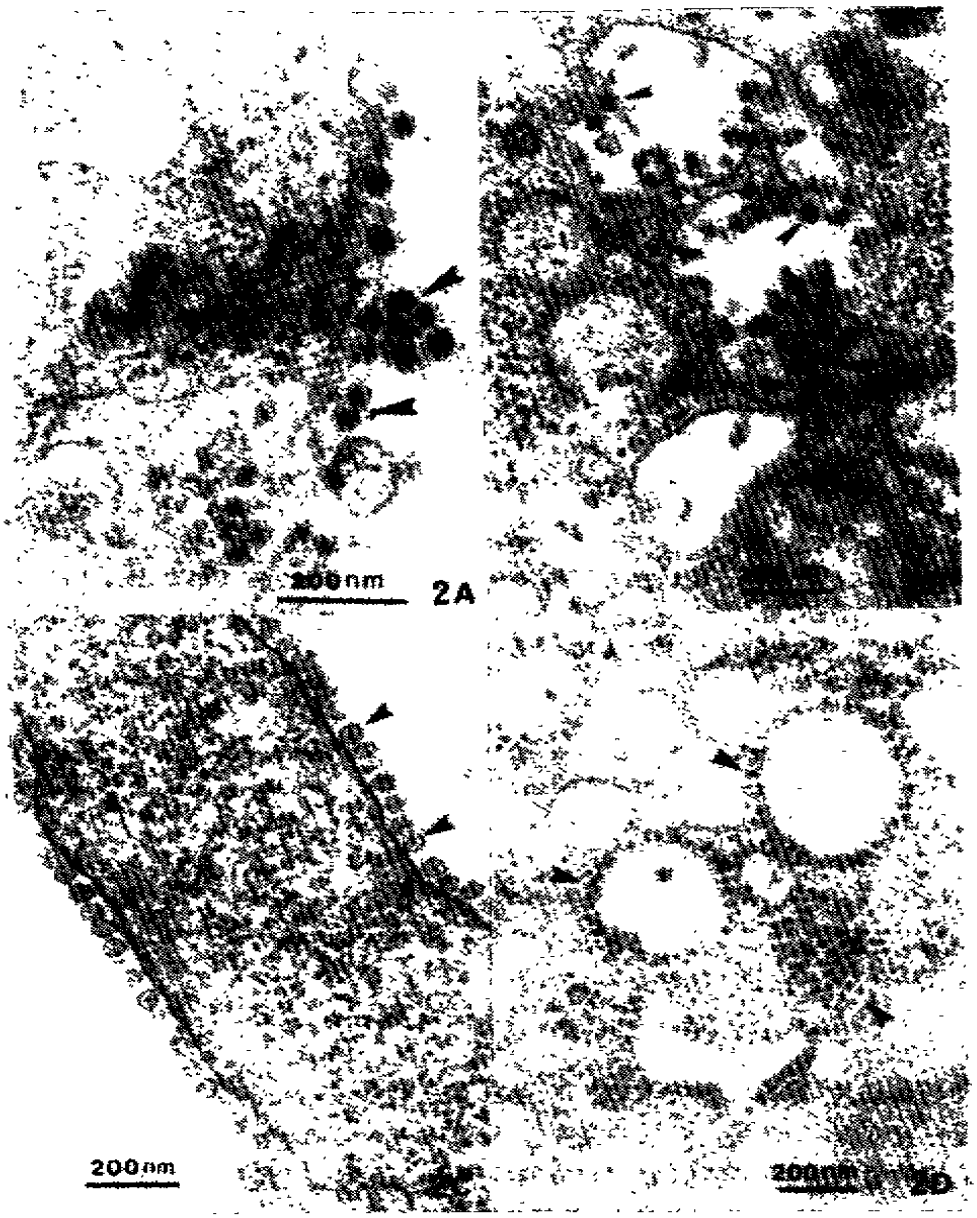


图4　SbV囊膜蛋白E2，E1与6K蛋白空间关系的模式图。每三个E2-E1异二聚体形成一个复合物，6K蛋白可能通过E2将相邻的复合物联系在一起。

Fig. 4　Spatial organization of SbV E2, E1 and 6K proteins on cell membrane. Every three E2-E1 heterodimers form a complex, and the E2-binding 6K proteins bind the neighbouring complexes together.

B. 用超薄切片，冰冻蚀刻技术，对6K蛋白酰基化位点改变的突变株进行了观察，结果发现，6K蛋白突变株与E2蛋白C端的突变株(Ser419→Cys，Schlesinger教授提供)有很多区别于野生型病毒的显著的共同特征，如：(1)成熟的病毒粒子大量聚集在宿主细胞周缘；(2)出现一些直径可达100—130nm的畸形病毒，超薄切片显示病毒囊膜中含有2—3个核衣壳；(3)病毒向细胞质空泡出芽成熟的几率明显增多；(4)常常观察到一些不规则的内部电子致密度较低的细胞质膜或细胞内空泡膜突起；(5)在细胞质更多地观察到大量核衣壳聚集在一些囊泡的周围，有些呈类似于晶格状排列(图版2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图版 2. SbV 6K 突变株(Cy38→Ser)及 E2 突变株(Ser419→Cys)感染 BHK-21 细胞的超薄切片图片

2A. 6K 突变株中的多衣壳的畸形病毒粒子(箭头)

2B. E2 突变株中病毒向细胞质空泡中出芽释放及多衣壳病毒(箭头)

2C. 6K 突变株宿主细胞周缘的不规则的病毒粒子(箭头)

2D. 6K 突变株在细胞质中大量的病毒核衣壳聚集在一些囊泡的周围，有些呈类晶格排列(箭头)

Plate 2. Ultrasection Microscopy of 6K mutant (Cys38→Ser) and E2 mutant (Ser419→Cys) SbV-infected BHK-21 cells.

维普资讯 http://www.cqvip.com

2A. Viral particles with mutile nucleocapsids in 6K mutant SbV-infected cells (arrow)

2B. A large number of E2 mutant viruses bud through the vesicle membrane in cytoplasm (arrow)

2C. Irregular 6K mutant virions on the cell membrane (arrow)

2D. In the cytoplasm there are a large number of nucleocapsids aroud the vesicles and some of them aggregate to crystalline-like array (arrow)

讨 论

6K蛋白一度被认为是SbV的非结构蛋白[1],直至最近才被证明在鸡胚细胞中繁殖的成熟病毒粒子中含有6K蛋白[2],但关于6K蛋白在细胞内的分布及确切功能尚不清楚[7]。我们的实验结果进一步证明6K蛋白存在于BHK-21细胞内产生的成熟病毒粒子中,虽然在宿主细胞中全部病毒结构蛋白都是由一条26S的RNA编码的蛋白质前体经剪切而成,亦即E1∶E2∶C∶6K的分子比理论上是1∶1∶1∶1,但从我们的结果中可以看出,仅有1/4的6K蛋白装配到成熟的病毒粒子中,这与前人的结果基本一致。

近年来的工作表明Semliki森林病毒(SFV)衣壳蛋白与囊膜蛋白E2的细胞质结构域(C末端)的相互作用是病毒出芽释放的主要动力[8-10]。我们对6K蛋白突变株的研究结果发现,改变6K蛋白酰基化位点的病毒突变株对病毒的成熟释放有很大的影响,说明SbV的6K蛋白在病毒出芽过程中也起着十分重要的作用,而这种作用很可能与6K蛋白的酰基化有关。根据6K蛋白氨基酸序列[1],我们做了它的二级结构预测,结果表明,6K蛋白可能形成两段α螺旋结构,其间的35、36、38、39四个位置的半胱氨酸残基的酰基化位点上分别连有4个软脂酸链[2]。

最近发现,E1E2是以异二聚体的形式存在的,在细胞质膜上每三个E1E2异二聚体形成一个复合结构,其中E1与E2之间在内部互相交联,E2在其外部[11]。我们用放射免疫共沉淀的方法显示出,6K蛋白在细胞的粗面内质网合成后就与病毒的囊膜蛋白E2结合在一起,形成PE2-E1-6K复合物,然后在以后的转运出粗面内质网,经高尔基体加工以及转运到细胞质膜的过程中,仍以复合物的形式存在。这与Garoff等人关于SFV的E1E2蛋白与6K蛋白相结合的报道是一致的[10]。综上分析,我们认为6K蛋白可能位于相邻的E2蛋白之间,其中的四个半胱氨酸残基连接的4个软脂酸链插入脂双层中,增加E1E2异二聚体形成的复合结构的精确性与稳定性(图4),这种稳定复合体的形成既有利于囊膜蛋白在细胞质中的正常转运,又可促进E2的C端与衣壳蛋白更紧密的结合,从而保证了病毒的正常出芽过程,根据这个模式,SbV出芽释放的过程不是靠每一个E2蛋白与每一个衣壳蛋白之间的相互作用,而是靠每三个E1E2异二聚体形成的复合物与核衣壳表面的衣壳蛋白复合物之间的相互作用,其作用力的大小在很大程度上是依赖于复合物精确的空间构象。在由粗面内质网至细胞表面的运输过程中,复合物中的分子比可能为E1∶E2∶6K=1∶1∶1,但在病毒出芽过程中,6K分子与相邻的复合物中E2的相互作用,可能有助于膜的弯曲。与此同时,2/3以上多余的6K分子离开复合物,有助于缩小复合物之间的距离,加强复合物与C蛋白之间的相互作用。6K蛋白酰基化位点的改变,无疑会影响6K蛋白乃至整个复合物的空间构象,改变4个酰基化位点比改变一个酰基化位点影响更大,这在我们以前的实验结果已明显显示出来。而E2蛋白C端一个氨基酸位点的改变则产生更直接的影响,最终均引起子代病毒的滴度下降[7]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参考文献

1 Schlesinger S and Schlesinger M J. The Togaviridae and Flaviviridae. New York and London: Plenum Press, 1986, 21—32.

2 Gaedigh-Nitschko K and Schlesinger M J. The Sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. Virol, 1990, 175: 274—281

3 Anderson D J and blobel G. In: Method Enzymol, Vol. 96, New York: Academic Press, 1983, 111

4 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Lind.), 1970, 277: 680—685

5 Gaedigh-Nitschko K, Ding M. and Schlesinger M J. Site-directed mutants in the SbV 6K protein reveal site for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virion structure. Virol, 1990, 175: 282—291

6 Moor H and Muhlerhaler. Fine structure in frozen-etched yeast cells. J. Cell Biol, 1963, 17: 609

7 Gaedigh-Nitschko K and Schlesinger M J. Site-directed mutations in Sindbis viurs E2 glycoprotein's cytoplasmic domain and 6K protein lead to similar defects in viurs assembly and budding. Virol, 1991, 183: 206—214.

8 Fuller S D. The T=4 encelope of Sindbis virus if organized by interactions with a complementary T=3 capsid. Cell, 1987, 48: 923—934

9 Vaux D J T., Helenius A and Mellman I. Spike-nucleocapsid interaction in Semliki Forest virus reconstructed using network antibodies. Nature, 1988, 336: 36—42

10 Metsikko K and Garoff H. Ligomers of the cytoplasmic domian of the P62. E2 membrane protein of Semliki Forest virus bind to the nucleocapsid in vitro, J. Virol, 1990, 64: 4678—4683

11 Anthony R P and Brown D T. Protein—protein interactions in an alphaviurs membrane, J. Virol, 1991, 65: 1187—1194

The Effect of 6K Protein of Sindbis Virus on Viral Maturation and Release

Liang Fengxia Ding Mingxiao

(*Department of Biology, Peking University, Beijing*, 100871)

A small hydrophobic polypeptide of 55 amino acids, noted as the 6K protein, could be detected in purified preparations of Sindbis virions (SbV). 6K proteins become associated to the E2 protein after their synthesis in the endoplasmic reticulum (ER) and during their transport process from ER to the cell surface. The morphogenetical characteristics of 6K mutant (Cys38→Ser) of SbV with acylation site replacement in the 6K protein showed that the behavior of 6K mutant is very similar to the E2 mutant of SbV with amino acid replacement (Ser419→Cys) in the cytoplasmic domain of the E2 protein. It suggests that the release of SbV not only requires specific interaction between cytoplasmic domains of E2 protein and nucleocapsid, but the 6K protein also play an important role. A modified model is presented here to demostrate the possible interaction among E2, C and 6K protein of SbV during budding process on the basis of 6K sequences and the results metioned above.

Key words: Sindbis virus Sindbis virus 6K protein Virus maturation and release