维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 4期
2002年11月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(4):377-380
November 2002

分子伴侣与病毒糖蛋白*

万 崎[1], 章晓联[1**], 陈新文[2]
(1.武汉大学医学院免疫学教研室, 湖北武汉 430071;2.中国科学院武汉病毒研究所,湖北武汉 430071)

Molecular Chaperones and Virus Glycoproteins

WAN Qi[1], ZHANG Xiao-Lian[1**], CHEN Xin-wen[2]
(1. *Department of Immunology, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan* 430071, *China*;
2. *Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430071, *China*)

关键词: 分子伴侣;内质网;糖蛋白;病毒
中图分类号: Q813 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)04-0377-04

分子伴侣(molecular chaperone)的概念由 Lasky 于1978年首先提出[1],真核细胞内质网中的分子伴侣是由多种蛋白质组成,它们可以介导新合成蛋白质的正确折叠与装配,并在真核生物的细胞中广泛存在。

细胞内蛋白质的折叠是一个复杂的、易于出错的过程,细胞内质量控制系统(quality control system)等机制能确保新合成的蛋白在适当位置折叠以获得正确的结构。内质网中新合成可溶性的膜连接蛋白时,寡聚多糖则以共价键连接到这一初生态多肽链的天门冬酰胺残基上[2]。分子伴侣,如膜蛋白钙结合素(calnexin, CNX)或钙网素(calreticulin, CRT)主要通过在内质网内与新生的糖蛋白上的N-连接的寡糖 $Glc_1Man_{5-9}GlcNAc_2$ 部分相结合而帮助蛋白的折叠与成熟[3~5]。

病毒是细胞内寄生物。病毒糖蛋白的折叠、寡聚多糖装配和定向分配近几年研究较多。尽管许多病毒糖蛋白具有复杂的三级、四级结构,但是它们仍能在宿主细胞中迅速有效地折叠、装配成熟成合适的构象。大量研究表明病毒糖蛋白的折叠、装配与成熟均依赖于宿主细胞内质网中的分子伴侣。近几年有关病毒糖蛋白与分子伴侣之间的相互作用有大量的报道,其中包括:丙肝病毒(Hepatitis C Virus, HCV)E1/E2与calnexin之间[6,7]、风疹病毒(Rubella Virus, RV)E2与CNX/CRT之间[8]、塞姆利基森林脑炎病毒(Semliki forest virus, SFV)P62/E1和分子伴侣免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chain binding protein, BiP)及CNX/CRT之间[3]、乙肝病毒(Hepatitis B Virus, HBV)多聚酶与calnexin之间[9,10]、人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)gp160与calnexin和BiP之间[11]、疱疹性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus, VSV)G蛋白和BiP、calnexin之间的相互作用[12]。另外,布尼亚病毒(Bunyviridae)家族中的一员 Unkuniemi 病毒[13] G1/G2、非洲猪热病毒(African swine fever virus, ASFV)[14]衣壳蛋白、人类T细胞白血病病毒-1(Human T cell leukemia virus type I)[15] Tax蛋白、仙台病毒(Sendai virus)[16]的F/HN、流感病毒[3,17]HA、巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)B糖蛋白等与分子伴侣的作用也有一些报道。这些文献描述了内质网中分子伴侣与病毒糖蛋白的折叠、装配以及成熟之间的关系。现就目前的研究进展综述如下。

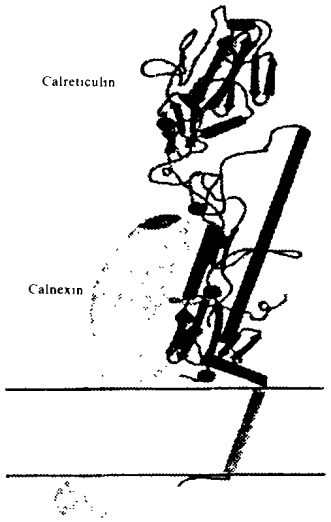
1 分子伴侣的种类和功能

真核细胞内质网中的分子伴侣主要由calnexin, calreticulin, BiP和蛋白质二硫异构酶(protein

收稿日期:2002-01-14,修回日期:2002-03-25
* 基金项目:教育部国家教委留学回国人员科研启动基金(301152033);中国科学院武汉病毒研究所与荷兰农业大学病毒系开放课题基金;武汉大学科技创新基金,青年博士基金;湖北省重点科技攻关项目(2002AA301B15)。
作者简介:万 崎(1978-),女,硕士研究生.
** 通讯作者:章晓联(1965-),女,博士,教授,从事微生物及免疫学,糖蛋白生化及分子生物学。
Correspondence author. Tel:87331681 E-mail: zhangxl65@hotmail.com

维普资讯 http://www.cqvip.com

disulfide isomerase, PDI) ERp57 等组成[3]。它们能与不同蛋白的折叠中间体相作用，以帮助多肽链的正确折叠和装配，阻止蛋白的凝集，抑制错误二硫键的形成，抑制未成熟蛋白的降解和滞留于内质网中，以起到质量控制功能。Calnexin 是一种非糖基化作用的 I 型膜蛋白(65Kda, 573 个氨基酸)，它与底物结合的区域是在内质网腔内，calnexin 胞质区有 89 个磷酸化的残基，其 C 端的 RKPRRE 序列是作为其内质网内的定位信号。Calreticulin 是与 calnexin 序列相似的可溶性分子伴侣(46Kda, 400 个氨基酸)，calreticulin 有一个 KDEL 序列，在其 C 端有带大量负电荷的区域，此区域是钙离子的结合部位以及 calreticulin 在内质网中的定位部位[2]。Helenius A 等[2]最初用糖基化抑制剂作用于组织培养细胞，并通过实验来证明 calnexin 选择性地与糖蛋白的折叠中间体相结合；进一步用糖苷酶抑制剂作用后发现，CNX/CRT 特异性地与单糖基化的糖蛋白中的 N－糖苷相结合；采用分离的寡糖做生化分析得出，CNX/CRT 是一种凝集素(lectin)，能结合到新生多肽链上的单葡萄糖基化的核心聚糖($Glc_1Man_{5-9}GlcNAc_2$)上，它们不与具有 2 或 3 个葡萄糖的多聚糖($Glc_{2-3}Man_{5-9}GlcNAc_2$)或没有葡萄糖的多聚糖($Man_{5-9}GlcNAc_2$)相结合。同时进一步的实验证明 CNX/CRT 还可直接与糖蛋白上的多肽结合。因而他们提出 CNX/CRT 与糖蛋白之间的作用有两种模式：(1)凝集素模式(lectin－only model)，即 CNX/CRT 与糖蛋白上的糖或碳水化合物($Glc_1Man_{5-9}GlcNAc_2$)结合；(2)双相模式(duel－model)，即 CNX/CRT 不仅具有凝集素功能，还能直接与糖蛋白上的多肽相作用。两种模式的选择取决于特异性的糖蛋白底物的性质和复杂性。Calnexin 与 calreticulin 虽然有许多功能相似处，但它们也有不同的功能之处，如 calnexin、calreticulin 与流感病毒 HA 的结合具有不同的底物特异性，calreticulin 与 HA 的顶部(top)和铰链(hinge)处的三个糖苷相结合，而 calnexin 是与 HA 的主干(stem)处的四个糖苷相结合[2](图 1)。另一种分子伴侣 BiP 是 HSP70 家族中的一员，它存在于内质网中，能直接与各种新合成的未折叠蛋白质中的多肽结合[7]，此分子伴侣与寡糖连接的亲和力大小以及连接位点的数目尚还未知。而蛋白质二硫异构酶 ERp57[18]，则仅仅作用于 N－连接的糖基化蛋白，且需 calnexin 或 calreticulin 的介导才能帮助蛋白质的二硫键的形成与折叠。



· 图 1 calnexin 和 calreticulin 与流感病毒的糖蛋白 HA 的结合部位

Fig.1 Mapping of calnexin－and calreticulin－binding domains on influenza haemagglutinin(HA). The location of N－linked glycans plays a role in differential calnexin and calreticulin binding to HA, suggesting spatial constraints in determining chaperone specificity. (from Helenius A, Trombetta ES. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends in Cell Biology*, 1997, 7:193－200.)

2 分子伴侣和病毒糖蛋白的相互作用

糖蛋白上的寡糖或多肽链可直接或间接地与内质网中的 calnexin、calreticulin、BiP 等相互作用，这对蛋白的有效折叠、装配，还有随后的分泌都是十分重要的，它是糖蛋白成熟的关键步骤[2]。糖蛋白在新生链初形成时就可以和分子伴侣相互作用，这种作用可持续不同的时间段——从几分钟到几小时。HCV 有三个结构蛋白：核心蛋白 C，糖蛋白 E1，E2[19]以及一些非结构蛋白 NS(NS2, 3, 4, 5)[20]，糖蛋白 E1, E2 是在宿主信号肽酶的切割作用下，从病毒的多聚链前体中释放出来，并且相互作用形成异二聚体[6]。Dubuisson J[7]等发现 E2 的折叠是在前体 E2－NS2 断裂的基础上依赖于二硫键的形成而快速发生的，在合成早期能与 calnexin 之间相互作用(5min 以后就可以探测到)，与之相反，E1 的折叠、合成则较慢(＞1h)，这主要与它在内质网中和 calnexin 之间的相互反应有关。另外，E1 和 E2 以非共价键相互作用得到稳定的异二聚体的过程也是很慢的。HCV 的糖蛋白合成后不久，E1 和 E1E2 复合体都连接在 calnexin 上，开始是 calnexin 和 E1 结合，随后转换成 E1E2－NS2 与 calnexin 连接，最终形成 E1E2 复合体[7]；Nakhasi HL[8]等提出 CNX/

维普资讯 http://www.cqvip.com

CRT与RV的糖蛋白的糖苷化作用也是时间依赖性的,RV中的E2和分子伴侣延时地结合会导致病毒装配的减慢,因此,也会减慢病毒的生长速度。野生型蛋白缓慢地折叠及成熟能解释人类风疹病毒77(Human Rebulla virus 77, HRV77)疫苗的低毒性:这是因为缺失了E2蛋白糖苷化作用的位点,缺乏calnexin的作用,因而病毒的糖蛋白不能正确的折叠,所以,病毒失去了它的嗜性和感染性;Knarr G等[11]的实验得出HIV-1的包膜糖蛋白gp160既与BiP相作用,又与CNX/CRT相作用。HIV-1的包膜糖蛋白gp160在进入内质网的时候就与BiP相互作用,所有已证实的与BiP的结合位点都位于gp160的恒定区,同时也提示了BiP在gp160的折叠过程中较为恒定的作用。HIV-1的包膜蛋白gp160一旦新合成后就与calnexin相互作用,缓慢折叠成双活性构象[21]。大多数与calreticulin结合的gp160都与calnexin结合,而只有一部分与calnexin结合的gp160与calreticulin结合[22];再者,Unkuniemi病毒的跨膜糖蛋白G1和G2的折叠速度也有不同,G1(65kD)折叠快,而G2(70kD)折叠慢。在糖蛋白的折叠过程中,和G2相比而言,G1与BiP暂时结合的效率更低,结合时间也更短。总而言之,糖蛋白进入到内质网中以中间体的形式存在,然后和分子伴侣相互作用,并在其帮助下折叠、装配,最后释放[2]。

3 与病毒糖蛋白相作用时,不同分子伴侣的选择

为什么一些病毒的糖蛋白在转运到内质网过程中与CNX/CRT结合,而另一些与BiP结合?事实上,有一些糖蛋白最初是和BiP作用,然后再和CNX/CRT作用;另一些是与CNX/CRT作用,却不和BiP结合;还有一些糖蛋白是既与CNX/CRT又与BiP结合。人们发现糖蛋白与分子伴侣的这个作用是取决于蛋白形成中的初生多肽链中寡聚糖的位置,如果蛋白质的NH-端N-糖苷化的多聚糖位于50个氨基酸以内时,糖蛋白就会直接与CNX/CRT反应而不会先与BiP结合。为了了解折叠过程中分子伴侣的选择,Maurizio M和Helenius A[3](2000)曾在中国大白鼠卵巢细胞中分析SFV中两个糖蛋白E1和p62的成熟过程,发现E1首先与BiP结合,氧化成晚期相(E1ox2)继而释放出来,E1ox2随即与CNX/CRT结合。新生态链的p62的中间产物直接与CNX/CRT结合并折叠,当加入抑制剂二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)或α-葡萄糖苷酶I抑制剂castanospermine阻断CNX/CRT的作用时,p62和E1都与BiP结合;洗去抑制剂时,糖蛋白就迅速转移到CNX/CRT上。由此得出:BiP不和p62结合的原因不是因为缺乏结合位点,而是因为CNX/CRT的限制而阻止其相互作用,糖蛋白p62的N-糖苷化的多聚糖靠近NH-端,可直接进入CNX/CRT途径而不会优先与BiP的连接;另外,Craig Hammond等[12]提出VSV的G蛋白(含有2个N-连接的糖基化的多聚糖),它能与calnexin结合,但不与calreticulin相结合。G蛋白和分子伴侣的免疫共沉淀实验表明:在折叠的初期,大多数的G蛋白分子和BiP结合,calnexin随后结合在已部分折叠的蛋白分子上。分析得出,这是由于G蛋白的寡糖序列更靠近COOH-端,因而优先与BiP结合;Nakhasi HL等[8]研究发现RV的糖蛋白E2与calnexin相作用的结合强度远远高于与calreticulin的结合力;又如:Unkuniemi病毒的跨膜糖蛋白G1、G2既能和calnexin又能和calreticulin结合。G1和G2形成的异二聚体可同时和BiP、calnexin及calreticulin结合。新合成的G1、G2也能和分子伴侣BiP以及PDI结合。由此可见,Unkuniemi糖蛋白G1、G2在内质网中的折叠至少是由四种不同的分子伴侣或折叠因子催化的[13]。

4 分子伴侣在病毒糖蛋白成熟中的重要性

分子伴侣的作用提高了糖蛋白在内质网中的有效折叠。当特异性糖蛋白连接到分子伴侣的过程被抑制时,不难找到一些病毒蛋白质错误折叠并最终滞留于内质网的证据。加入葡萄糖苷酶抑制剂会导致许多糖蛋白低速及无效的折叠、分泌以及随后的表达受到抑制。HCV的E1/E2中N-糖苷化的多聚糖与calnexin的相互作用可被α-葡萄糖苷酶抑制剂[N-butyl-deoxynojirimycin (NB-DNJ)和N-nonyl-DNJ (NN-DNJ)]阻断,从而导致糖蛋白的错误折叠,并使其滞留在内质网中[23];在RV病毒感染的反应体系中,如果用N-糖苷化抑制剂衣霉素(tunicamycin, TM)或葡萄糖苷酶Ⅰ、Ⅱ抑制剂亦会导致蛋白的错误折叠而使其滞留在内质网中[8]。糖蛋白一旦正确折叠了,就不需要再糖基化作用,而且离开分子伴侣循环,如果糖蛋白不完全折叠或错误折叠,就会在UDP-葡萄糖糖蛋白葡糖基

维普资讯 http://www.cqvip.com

转移酶(UDP - glucose: glycoprotein glucosyltransferase, UGGT)等的作用下再被糖基化,并继续与CNX/CRT相结合而再进入分子伴侣循环[24]。因此,若没有分子伴侣的作用,病毒蛋白质就会滞留于内质网中,并随后凝集或降解于细胞质中。

5 结论与展望

综上所述,分子伴侣在病毒糖蛋白的折叠、成熟过程中起到非常重要的作用。目前在研究糖蛋白在折叠过程中与分子伴侣的相互影响和关系以及分子伴侣的选择上取得了一定进展。calnexin和calreticulin主要能结合到单葡萄糖基化的核心聚糖($Glc_1Man_{5-9}GlcNAc_2$)上,说明分子伴侣与糖蛋白的结合需要蛋白糖基化作用;并且如果糖蛋白(如SFV的p62)的NH-端N-糖苷化的多聚糖结合的位置约在50个氨基酸以内时,会直接与CNX/CRT作用而不会优先考虑与BiP的结合,如果其聚糖位置比较靠近COOH-端时(如SFV的E1、VSV的G蛋白),则蛋白会优先与BiP结合。当特异性糖蛋白连接到分子伴侣的过程被抑制时,可以探测到病毒蛋白质的错误折叠并最终滞留于内质网。但目前对于calnexin上特异结合基团、分子伴侣与寡糖连接的亲和力大小以及连接位点的数目尚还未知,分子伴侣与病毒糖蛋白结合的具体作用机制、及这些病毒糖蛋白糖苷化作用对于它们相互作用的影响以及分子伴侣的其他作用还不是很清楚,对于这些问题的解答还需要进行深入的研究。

参考文献

[1] Hartl F U, Marin J. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. Curr Opin strcut Biol, 1995, 5:92-102.

[2] Helenius A, Trombetta E S. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins [J]. Trends in Cell Biology, 1997, 7:193-200.

[3] Maurizio M, Helenius A. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum [J]. Science, 2000, 288: 331-336.

[4] Ellgaard L, Helenius A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level [J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13:43-47.

[5] Helenius A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum[J]. Mol Biol Cell, 1994, 5:253-265.

[6] Merola M, Brazzoli M, Cocchiarella F, *et al*. Folding of hepatitis C virus E1 glycoprotein in a cell-free system[J]. J Virol, 2001, 75:11205-11217.

[7] Dubuisson J, Rice C M. Hepatitis C virus *glycoprotein* folding: disulfide bond formation and association with Calnexin [J]. J Virol, 1996, 778-786.

[8] Nakhasi H L, Ramanujam M, Atreya C D, *et al*. Rubella virus glycoprotein interaction with the endoplasmic reticulum calreticulin and calnexin [J]. Arch Virol, 2001, 146:1-14.

[9] Kim S S, Shin H J, Cho Y H, *et al*. Expression of stable hepatitis B viral polymerase associated with GRP94 in *E. coli* [J]. Arch Viro, 2000, 145:1305-1320.

[10] Cho G, Sub S W, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of Hsp90beta [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274: 203-211.

[11] Knarr G, Modrow S. BiP-binding sequences in HIV gp160 implication for the binding specificity of bip[J]. J Biol Chem, 1999, 274:29850-29857.

[12] Craig Hammond, Helenius A. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin [J]. Science, 1994, 266:456-458.

[13] Veijola J, Pettersson R F. Transient association of calnexin and calreticulin with newly synthesized G1 and G2 glycoproeins of unkuniemi virus(Family Bunyaviridae)[J]. J Virol, 1999, 73: 6123-6127.

[14] Cobbold C, Windsor M, Wileman T. A virally encoded chaperone specialized for folding of the major capsid protein of African swine fever virus [J]. J Virol, 2001, 75:7221-7229.

[15] Cheng Hua, Cenciarelli Carlo, Shao zhiping, *et al*. Human T cell leukemia virus type I Tax associates with a molecular chaperone complex containing hTid-1 and Hsp70[J]. Cur Biol, 2001, 11:1771-1775.

[16] Tomita Y, Yammashita T, Sato H, *et al*. Kinetics of interactions of sendai virus envelope glycoproteins, F and HN, with endoplasmic reticulum-resident molecular chaperones, BiP, calnexin, and calreticulin [J]. J Biochem (Tokyo), 1999, 126: 10090-10100.

[17] Tatu U, Hammond C, Helenius A. Folding and oligomerization of influenza hemagglutinin in the ER and the intermediate compartment [J]. EMBO J, 1995, 14:1340-1348.

[18] Oliver J D, van der Wal F J, Bulleid N J, *et al*. Interaction of the thiol-dependent Reductase ERp57 with nasent glycoproteins [J]. Science, 1997, 275:868-888.

[19] Martire G, Viola A, Lodice Li, *et al*. Hepatitis C virus structure protein reside in the endoplasmic reticulum as well as in the intermediate compartment/cis-Golgi complex region of stably rransfect cells [J]. Virol, 2001, 280:176-182.

[20] 张东伟,梁布峰,祁自柏,等.HCVE2区基因的分子克隆及序列分析[J]. 中国病毒学,2001,16:40-44.

[21] Yan li, Lizhong Luo, Thomas David Y, *et al*. The HIV-1 env protein signal sequence retarts its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding [J]. Virol, 2000, 272:417-428.

[22] Otteken A, Moss B. Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin[J]. J Biol Chem, 1996, 271:97-103.

[23] Zitzmann N, Mehta A S, Carrouee S, *et al*. Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhea virus, a pestivirus model of hepatitis C virus: implication for the development of broad spectrum anti-hepatitis virus agents [J]. Natl Acdd Sci USA, 1999, 96:11878-11882.

[24] Chevet E, Jakob C A, Thomas D Y, *et al*. Calnexin family members as modulators of genetic diseases[J]. Cell & Devel Biol, 1999, 10:473-480.