



偏肺病毒 G 蛋白：一个多变蛋白的多重角色

刘晓瑜¹, 魏永伟^{1,2*}

¹绍兴文理学院医学院, 浙江 绍兴 312000

²宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

摘要: 偏肺病毒包括人偏肺病毒和禽偏肺病毒, 是感染人和禽的一种重要病原。G 蛋白是偏肺病毒粒子表面的一种糖蛋白, 属 II 型跨膜蛋白。不同种偏肺病毒 G 蛋白的大小和同源性差异巨大, 发挥的生物学功能也显著不同, 如在病毒的吸附过程、病毒介导的细胞融合、对病毒在体内外的复制能力影响以及免疫保护作用都有很大不同。同时, 偏肺病毒 G 蛋白在免疫抑制和免疫逃避中也起着重要作用。目前国内开展的相关研究较少, 本文对偏肺病毒 G 蛋白的最新研究成果和进展进行了综述和讨论, 并对未来的相关研究进行了展望。

关键词: 偏肺病毒, G 蛋白, 蛋白结构, 病毒复制, 免疫

偏肺病毒包括人偏肺病毒 (human metapneumovirus, hMPV) 和禽偏肺病毒 (avian metapneumovirus, aMPV)。hMPV 主要感染儿童^[1], 亦可感染成年人, 尤其老人和肿瘤患者^[2], hMPV 感染后引起呼吸道疾病, 严重的引起支气管炎和肺炎^[1-3]。aMPV 主要感染鸡和火鸡, 引起鸡或火鸡的呼吸道疾病, 产蛋下降, 给养殖业带来很大危害^[4-5]。G 蛋白是偏肺病毒粒子表面的一种糖蛋白 (Glycoprotein), 由于早期认为该蛋白与病毒的吸附相关, 故称之为吸附蛋白 (attachment protein), 也有学者将其译为黏附蛋白。不同病毒吸附蛋白

命名有所不同。如禽腮腺炎病毒属的吸附蛋白具有血细胞凝集和唾液酸苷酶活性 (hemagglutinin neuraminidase activity), 简称为 HN 蛋白; 麻疹病毒属的吸附蛋白只具有血细胞凝集活性而不具有唾液酸苷酶活性, 简称为 H 蛋白。偏肺病毒属的吸附蛋白既不具有血细胞凝集活性也不具有唾液酸苷酶活性, 简称为 G 蛋白。近几年研究发现偏肺病毒 G 蛋白与其他副粘病毒的吸附蛋白的生物学功能显著不同, 目前国内开展的相关研究较少, 本文旨在对该蛋白的最新研究成果和进展加以综述和讨论, 以期对我国的相关研究有所借鉴。

基金项目: 国家自然科学基金(31402218); 浙江省自然科学基金(LY14C180001); 教育部留学回国人员启动基金(511500040); 宁波市自然科学基金(2017A610281)

*通信作者。Tel: +86-574-88345839; E-mail: 1071246652@qq.com

收稿日期: 2017-06-28; 修回日期: 2017-09-07; 网络出版日期: 2017-11-10

1 偏肺病毒分类及结构特征

偏肺病毒属于副粘病毒科(*Paramyxoviridae*), 肺炎病毒亚科(*Pneumovirinae*), 偏肺病毒属(*Metapneumovirus*)。偏肺病毒属包括 hMPV 和 aMPV。hMPV 于 2001 年在荷兰首次发现, 从患有下呼吸道疾病儿童的呼吸道分泌物中分离得来^[6]。根据基因序列和抗原性特征, hMPV 分为 A 和 B 两个基因型, A 和 B 两个基因型又可进一步分为 A1、A2、B1 和 B2 四个亚型^[7-8]。aMPV 于 20 世纪 70 年代在南非的火鸡中首次发现, 后来发现在鸡和鸟类中也广为感染, 该病毒现已遍布世界各地, 分为 A、B、C 和 D 四个基因型, 其中 C 型与 hMPV 进化关系较近^[9-12]。

偏肺病毒是囊膜病毒, 病毒粒子直径约 100–500 nm, 基因组全长约 13–14 kb。基因组包括 8 个阅读框, 共编码 9 种蛋白, 包括位于病毒粒子表面的吸附蛋白 G、融合蛋白 F 和小疏水蛋白 SH, 位于病毒粒子内侧的基质蛋白 M 和位于病毒粒子内部的核蛋白 N、磷蛋白 P 和大聚合蛋白 L, 以及由 M2 基因(包含 2 个阅读框)编码的两种小分子蛋白质 M2-1 和 M2-2^[13]。

2 偏肺病毒 G 蛋白结构特征

偏肺病毒 G 蛋白氨基酸序列长度差异巨大, 同源性也较低。hMPV G 蛋白由 217–241 个氨基酸组成, 同型之间的同源性相对较高, 最低的也有 60%, 但 A 型和 B 型之间同源性较低, 距离较大的同源性不足 30%^[14-17]。最近, 在日本分离到的 A 型 hMPV G 蛋白有基因重复插入现象, 即其 G 基因有 180 bp 序列在 ORF 内连续重复出现, 最终导致多编码 60 个氨基酸^[18]。A 型 aMPV G

蛋白由 391 个氨基酸组成, B 型 aMPV G 蛋白由 414 个氨基酸组成, D 型 aMPV G 蛋白由 389 个氨基酸组成^[11]。C 型 aMPV 不同分离株的 G 蛋白大小差异很大。目前发现的来源于火鸡、鹅和番鸭的 C 型 aMPV 较大的 G 蛋白由 585 个氨基酸组成, 其中火鸡源的 C 型 aMPV 还有由 435、252 或 251 个氨基酸组成的 G 蛋白。分离自韩国的野鸡源的 C 型 aMPV G 蛋白由 264 个氨基酸组成^[19-20]。aMPV G 蛋白各型之间的同源性极低, 仅有 5%–10%, 在同种病毒之间氨基酸差异性如此之大是非常罕见的。Byung-Whi Kong 将 C 型 aMPV 分别在 TT-1 细胞和 Vero 细胞中进行传代培养, 当在 Vero 细胞连续传代 15 次时, C 型 aMPV 发生了 G 基因缺失现象, 传代病毒 G 蛋白由 585 个氨基酸缺失为只剩下 122 bp 的小片段, 并且不再转录出任何 G 基因的 mRNA^[21]。

偏肺病毒 G 蛋白包含大量糖基化位点, 成熟的 G 蛋白被高度糖基化。将 hMPV 感染 LLC-MK2 细胞, 用 G 蛋白的抗血清检测病毒感染细胞内 G 蛋白的表达情况, 在感染第 8 天才能检测到表达。在变性胶条件下可看到 40、45、48 kDa 三条带, 在非变性胶条件下除上述三条带外还可以检测到 80–90 kDa 的条带。利用质粒表达系统在细胞内表达 G 蛋白(236 个氨基酸)可以得到同样的结果, 只是由于在 G 的末端加了 8 个 His 的标签使分子量分别变为了 45、50、53 (变性胶)和 97 kDa (非变性胶)。进一步的实验表明小分子量的 G 蛋白是 N-糖基化, 大分子量的 G 蛋白是 O-糖基化^[22]。在非修饰状态下, G 蛋白的理论值是 26 kDa。通过真核表达系统表达的 C 型 aMPV G 蛋白(252 个氨基酸)与上述 hMPV 结果类似, 也是得到了三条较小的条带 42、45、58 kDa, 以及 90–110 kDa 的较大

条带。生化特性分析亦是小蛋白是 N-糖基化, 大分子量的条带是 O-糖基化^[23]。通过杆状病毒表达系统在 SF21 细胞中表达的 G 蛋白与在 LLC-MK2 细胞中表达的相比偏小, 可能是由于在不同细胞内糖基化差异引起的^[24]。

偏肺病毒 G 蛋白为 II 型跨膜蛋白, 在一级结构中, G 蛋白主要包括质膜区、跨膜区和胞外区, 胞外区又可进一步分为颈部区(stalk)和头部区(head)。偏肺病毒 G 蛋白大小差异巨大, 这种差异主要是胞外区氨基酸序列长度的不同所导致, 各种不同大小的 G 蛋白其质膜区和跨膜区氨基酸所包含的氨基酸个数较为一致。副粘病毒的吸附蛋白单体之间以二硫键的方式结合形成二聚体, 2 个二聚体间通过共价键形成四聚体的高级结构。目前还没有任何偏肺病毒 G 蛋白的四级晶体结构被解析。

3 G 蛋白在病毒吸附中的作用

囊膜病毒的侵染通常分两步进行, 首先是病毒粒子吸附到靶细胞表面, 这一步通常是非特异性的、可逆的。病毒粒子吸附到细胞表面之后, 病毒表面的糖蛋白介导病毒囊膜与细胞膜之间相互融合, 进而将病毒的核酸物质释放到细胞质中以启动病毒基因组的复制和病毒蛋白质的合成, 或者病毒粒子与靶细胞接触后病毒粒子通过内吞途径形成内吞小体, 病毒粒子再与内吞小体膜相互融合后将病毒核酸释放到细胞质中^[25-26]。偏肺病毒 G 蛋白在吸附过程中能与细胞表面的葡萄糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)结合。研究发现 GAG 在 B2 型 hMPV 吸附过程中发挥着重要作用, 用 GAG 酶去除细胞表面的 GAG 可显著阻止 hMPV 和重组 G 蛋白对细胞的吸附。对 G 蛋白的

定点突变研究表明, 第 149-155 位的“EKKKTRA”和 159-166 位的“QRRGKGKE”2 个带正电荷的富含碱性氨基酸的功能域在与 GAG 的结合中起着关键作用^[27]。Penelope Adamson 等对四种不同亚型的 hMPV G 蛋白(A1、A2、B1 和 B2)与 GAG 的相互作用情况进行了进一步研究, 发现 A1 型 hMPV G 蛋白也能与 GAG 相互作用, 但 A2 型和 B1 型 hMPV G 蛋白不能与 GAG 结合。序列分析显示 A1、A2 和 B1 型 hMPV G 蛋白均不含“EKKKTRA”和“QRRGKGKE”这样的功能域, 但 A1 型在同位置区域附近含较多的带正电的碱性氨基酸, 并且对 A1 型 hMPV G 蛋白的缺失研究发现其与 GAG 相互作用的位置也正在这一区域^[28]。

在研究 hMPV G 蛋白与 GAG 的相互作用时不同基因型之间表现出了巨大差异, 但当直接用 hMPV 粒子与 GAG 相互作用时不同基因型的 hMPV 粒子均能吸附 GAG^[27,29]; 研究表明病毒表面的 F 蛋白也能直接与 GAG 作用^[30], F 蛋白在不同基因型之间高度保守^[15], F 蛋白在病毒的吸附过程中起着决定性作用^[31], 所以 G 蛋白只是发挥辅助吸附作用。

4 G 蛋白在细胞融合中的作用

细胞融合是很多囊膜病毒感染靶细胞所引起的一种重要现象, 通常由病毒表面的糖蛋白所介导。对于副粘病毒而言, 介导细胞融合的是病毒粒子表面的 F 蛋白和吸附蛋白。这些副粘病毒科成员的糖蛋白在介导细胞融合时都是由 F 蛋白发生一系列结构变化, 由融合前结构变为融合后结构进而将相邻的细胞膜拉近并发生融合^[32]。对于多数副粘病毒而言, 上述这一融合过程需要借助吸附蛋白的共同参与才能完成^[26,33-34]。对于偏肺

病毒, A型和B型hMPV的F蛋白在细胞内均可单独介导细胞融合, 无需G蛋白的参与^[35]。对于aMPV而言, 其A、B和C型F蛋白也可在没有G蛋白的参与下介导细胞融合(有关D型aMPV糖蛋白介导的细胞融合特征还未见报道), 有趣的是, 我们的研究发现A型和B型aMPV G蛋白可抑制其F蛋白介导的细胞融合^[36], 其机制是什么目前还不清楚。

由上述G蛋白在细胞融合中的作用特征可见, G蛋白在偏肺病毒复制过程中并不起主导作用, 或者说是可有可无的蛋白。通过反向遗传学技术拯救出的缺失G基因的hMPV和aMPV重组病毒也表明G基因是非必需的^[31,37-38]。但拯救的缺失G基因的A型aMPV重组病毒在细胞内形成的合胞体大于野生型病毒, 这一点与我们在蛋白水平上研究A型aMPV G蛋白对F蛋白介导细胞融合的影响是一致的, 说明A型aMPV G蛋白无论在蛋白水平还是重组病毒中均可抑制细胞融合。

副粘病毒科成员均为囊膜病毒, 病毒基因组编码6-10种蛋白, 其中2-3个蛋白位于病毒粒子表面, 负责病毒侵染。侵染过程通常由病毒粒子表面的吸附蛋白和F蛋白共同完成。在介导膜融合过程中, F蛋白发生一系列结构变化, 通过结构变化释放能量进而将细胞膜和病毒囊膜拉近并发生融合。对于副粘病毒亚科中各个属的病毒而言, 如新城疫病毒、副流感病毒、麻疹病毒和尼帕病毒等的F蛋白介导融合时都需要借助吸附蛋白的参与才能完成^[26,34]。肺病毒属的呼吸道合胞病毒以及偏肺病毒属的hMPV和C型aMPV则与上述副粘病毒不同, 这些病毒的F蛋白均可单独介导融合, 无需吸附蛋白的参与^[25,39]。而A型和B型aMPV G蛋白对融合有抑制作用。由此我们不难看出一个大致脉络, 即由副粘病毒亚科成员到肺病

病毒亚科成员其吸附蛋白对融合的影响是“必需→不需→抑制”。这是一种非常有趣的生物学现象, 这种影响的梯次关系有何生物学意义? 这在副粘病毒的整个进化史中有什么意义? 这些都有待进一步深入研究。

5 G蛋白与宿主免疫系统的关系

病原体引起宿主发病实际上是病原与宿主共同作用的结果。与野毒株相比, 缺失G蛋白的重组hMPV在体内的致病性弱于野毒株。重组病毒能使细胞产生大量的趋化因子和I型干扰素, 而野生型毒株编码的G蛋白可抑制相关因子的表达进而与G基因缺失株相比表现出较强的毒力。其机制是G蛋白通过与RIG-I相互作用, 抑制下游基因的转录和表达, 进而抑制宿主的先天免疫反应^[40]。进一步研究发现G蛋白的质膜区通过与RIG-I N端的“CARD”功能域相互作用。G蛋白与RIG-I的相互作用抑制RIG-I和ER-MAM回转到线粒体, 进而抑制RIG-I/MAVS通路(RIG-I/MAVS通路是宿主抗病毒反应的重要途径)。对G蛋白的突变研究表明, 其质膜区N端第二位的谷氨酸和第三位的缬氨酸在发挥免疫抑制功能中起着关键作用^[41]。

除了免疫抑制, 有研究表明偏肺病毒G蛋白在免疫逃避中起着重要作用, 在疫苗压力下G蛋白易发生变化^[42-44], 这与G蛋白多变的特性也相吻合, 快速变异的特性可以逃避疫苗的捕获。除了自身通过变异逃避抗体捕获之外, G蛋白和F蛋白的结构分析预测显示, F蛋白在胞外区的高度分别为13 nm(融合前结构)和17 nm(融合后结构), 而G蛋白在胞外区的高度为23 nm。在病毒粒子的表面, G蛋白的这种结构就像一把“保护

伞”一样保护 F 蛋白免受抗体捕获从而达到免疫逃避^[45]。

6 G 蛋白在疫苗开发中的应用

开发疫苗是病毒学研究的重要目的和内容, 利用偏肺病毒 G 蛋白开发疫苗主要有 2 个途径。一是直接利用 G 蛋白开发重组蛋白疫苗, 二是在病毒基因组中删除 G 基因获得致弱的重组病毒, 开发弱毒活疫苗。

通常情况下, 病毒粒子表面的蛋白都能够作为免疫保护性抗原, 然而偏肺病毒的 G 蛋白作为病毒粒子表面的重要蛋白成分并没有免疫保护作用。在真核细胞中表达 A1 型 hMPV G 蛋白的胞外区, 表达的重组蛋白免疫棉鼠(cotton rat)能产生高滴度的抗体, 该抗体既可识别重组的 G 蛋白, 亦可识别 hMPV 感染细胞后表达的野生型 G 蛋白, 然而体外的病毒蚀斑中和试验显示该抗体并不能中和感染性的病毒粒子。进一步攻毒试验也表明重组蛋白免疫棉鼠后并不能起到免疫保护作用^[46]。将 hMPV G 蛋白整合到人副流感病毒 1 或甲病毒的基因组中, 利用这些重组病毒表达的 hMPV G 蛋白同样没有免疫保护作用^[47-48], 这表明 hMPV 的 G 蛋白不具备免疫保护作用。利用重组的新城疫病毒表达 aMPV (C 型)的 G 蛋白在火鸡内同样不能很好地保护 aMPV 野毒株的攻击^[49]。而用同样的重组新城疫病毒共表达 aMPV (C 型)的 G 蛋白和 F 蛋白时能够对 aMPV 野毒株的攻击起到很好的保护作用^[50], 这说明 aMPV 的 G 蛋白同样没有很好的免疫保护作用。

反向遗传学是病毒学研究的强大工具, 人们可以应用该技术对病毒基因组进行修饰和改造。目前 hMPV 和 aMPV 均已建立了反向遗传系统。

将偏肺病毒全基因组中的 G 基因在 cDNA 水平上删除, 通过反向遗传技术拯救出不含 G 蛋白的重组病毒仍能在体内外复制。将 hMPV 剔除 G 基因后拯救的重组病毒在体外细胞内的复制能力没有显著变化, 但在仓鼠呼吸道内的复制能力下降 40 倍, 这种致弱的重组病毒能够刺激仓鼠产生抗体并对野毒的攻击起到很好的保护作用^[37]。该研究小组对重组病毒在非洲绿毛猴内的进一步实验显示, 缺失 G 基因的重组 hMPV 在呼吸道内的复制能力下降 3200 倍, 并且具有很好的免疫原性和对野毒攻击的保护作用^[51]。然而, 将 aMPV (A 型)剔除 G 基因后拯救的重组病毒在体外细胞内的复制能力下降, 在火鸡内的复制能力下降更为显著, 并且在体内产生的抗体水平也较低^[52], 这与缺失 G 基因的 hMPV 显著不同。同时, aMPV (A 型)疫苗株在 SH 基因的 GE (gene end)序列发生一个碱基突变会影响下游 G 蛋白的表达, 进而使疫苗株失去免疫保护作用^[53]。上述不同研究结果说明 A 型 aMPV G 蛋白在病毒的复制和免疫保护中有着不同作用和机制。

由上述研究文献可见, 偏肺病毒 G 蛋白本身虽有免疫原性, 但 G 蛋白并没有免疫保护作用, 所以直接利用重组的 G 蛋白开发疫苗的路径是不可行的。但是, 通过反向遗传系统拯救缺失 G 基因的 hMPV 重组弱毒疫苗具有很好的前景。

7 未来研究展望

病毒学研究不是目的, 只是手段, 病毒学研究的最终目标是预防、控制和消灭病毒。偏肺病毒 G 蛋白的研究也是围绕这一目标开展基础研究和应用研究。

在基础研究方面, 人们已经比较清楚偏肺病

毒 G 蛋白多变的一级结构特征和多重的生物学功能。与其他病毒的吸附蛋白相比, 偏肺病毒 G 蛋白生物学特性有着明显差异, 即便同属偏肺病毒, 不同种的 G 蛋白其功能也有很大不同。然而, 目前人们对引起这种生物学功能差异的背后机制还不清楚。蛋白结构的解析对于解释和阐明蛋白的生物学作用具有重要意义。偏肺病毒 G 蛋白与其他类别吸附蛋白有着显著差异, 那么偏肺病毒 G 蛋白在结构上与其他副粘病毒科成员的吸附蛋白是不是也有很大的差异, 解析偏肺病毒 G 蛋白的晶体结构将有利于揭示引起这些不同类型吸附蛋白差异的微观基础。由于偏肺病毒的 G 蛋白不仅同源性低, 蛋白分子的大小也有着巨大差异, 这种多样性给研究带来了很大困难, 只有将这些不同的吸附蛋白结构全部解析才能真正解开谜团。目前还没有任一类型偏肺病毒的 G 蛋白晶体结构被解析, 这是将来研究有待解决的一个重要问题。

在应用研究方面, 针对偏肺病毒 G 蛋白的研究重点是疫苗开发, 目前已经在实验室开发出缺失 G 基因的偏肺病毒弱毒疫苗, 并取得了初步进展, 但后续的临床试验还有待进一步研究。

总之, 偏肺病毒的 G 蛋白与其他副粘病毒科成员的吸附蛋白相比有着显著差异, 在偏肺病毒属内部不同成员之间也存在着巨大差异, 人们对这种差异的原因及其多重的生物学功能机制还知之甚少, 相关研究还任重道远。

参考文献

- [1] Howard LM, Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Szilagyi PG, Staat MA, Payne DC, Williams JV. Clinical features of human metapneumovirus infection in ambulatory children aged 5–13 years. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 2017. doi: 10.1093/jpids/pix012
- [2] El Chaer F, Shah DP, Kmeid J, Ariza-Heredia EJ, Hosing CM, Mulanovich VE, Chemaly RF. Burden of human metapneumovirus infections in patients with cancer: risk factors and outcomes. *Cancer*, 2017, 123(12): 2329–2337.
- [3] Yan XL, Li YN, Tang YJ, Xie ZP, Gao HC, Yang XM, Li YM, Liu LJ, Duan ZJ. Clinical characteristics and viral load of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection. *Journal of Medical Virology*, 2017, 89(4): 589–597.
- [4] Hartmann S, Sid H, Rautenschlein S. Avian metapneumovirus infection of chicken and turkey tracheal organ cultures: comparison of virus-host interactions. *Avian Pathology*, 2015, 44(6): 480–489.
- [5] Jirjis FF, Noll SL, Halvorson DA, Nagaraja KV, Shaw DP. Pathogenesis of avian pneumovirus infection in turkeys. *Veterinary Pathology*, 2002, 39(3): 300–310.
- [6] van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RAM, Osterhaus ADMG. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Medicine*, 2001, 7(6): 719–724.
- [7] Kim II JI, Park S, Lee I, Park KS, Kwak EJ, Moon KM, Lee CK, Bae JY, Park MS, Song KJ. Genome-wide analysis of human metapneumovirus evolution. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152962.
- [8] Chow WZ, Chan YF, Oong XY, Ng LJ, Nor'E SS, Ng KT, Chan KG, Hanafi NS, Pang YK, Kamarulzaman A, Tee KK. Genetic diversity, seasonality and transmission network of human metapneumovirus: identification of a unique sub-lineage of the fusion and attachment genes. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27730.
- [9] Sugiyama M, Ito H, Hata Y, Ono E, Ito T. Complete nucleotide sequences of avian metapneumovirus subtype B genome. *Virus Genes*, 2010, 41(3): 389–395.
- [10] Toquin D, Guionie O, Jestin V, Zwengelstein F, Allee C, Etteradossi N. European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes*, 2006, 32(1): 97–103.
- [11] Brown PA, Lemaitre E, Briand FX, Courtillon C, Guionie O, Allée C, Toquin D, Bayon-Auboyer MH, Jestin V, Etteradossi N, Samal SK. Molecular comparisons of full length metapneumovirus (MPV) genomes, including newly determined French AMPV-C and -D isolates, further supports possible subclassification within the MPV Genus. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102740.
- [12] Bāyon-Auboyer MH, Arnauld C, Toquin D, Etteradossi N.

- Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *Journal of General Virology*, 2000, 81(11): 2723–2733.
- [13] Broor S, Bharaj P. Avian and human metapneumovirus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1102: 66–85.
- [14] Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, Lintao LD, Liem A, Chu M, Williams JV. Human metapneumovirus G protein is highly conserved within but not between genetic lineages. *Archives of Virology*, 2013, 158(6): 1245–1252.
- [15] Papenburg J, Carboneau J, Isabel S, Bergeron MG, Williams JV, de Serres G, Hamelin ME, Boivin G. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *Journal of Clinical Virology*, 2013, 58(3): 541–547.
- [16] Ishiguro N, Ebihara T, Endo R, Ma X, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K. High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(8): 3406–3414.
- [17] Bastien N, Liu L, Ward D, Taylor T, Li Y. Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(8): 3532–3537.
- [18] Saikusa M, Kawakami C, Nao N, Takeda M, Usuku S, Sasao T, Nishimoto K, Toyozawa T. 180-Nucleotide duplication in the G gene of *Human metapneumovirus* A2b subgroup strains circulating in Yokohama city, Japan, since 2014. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 402.
- [19] Bennett RS, LaRue R, Shaw D, Yu QZ, Nagaraja KV, Halvorson DA, Njenga MK. A wild goose metapneumovirus containing a large attachment glycoprotein is avirulent but immunoprotective in domestic turkeys. *Journal of Virology*, 2005, 79(23): 14834–14842.
- [20] Govindarajan D, Yunus AS, Samal SK. Complete sequence of the G glycoprotein gene of avian metapneumovirus subgroup C and identification of a divergent domain in the predicted protein. *Journal of General Virology*, 2004, 85(12): 3671–3675.
- [21] Kong BW, Foster LK, Foster DN. Species-specific deletion of the viral attachment glycoprotein of avian metapneumovirus. *Virus Research*, 2008, 132: 114–121.
- [22] Liu L, Bastien N, Li Y. Intracellular processing, glycosylation, and cell surface expression of human metapneumovirus attachment glycoprotein. *Journal of Virology*, 2007, 81(24): 13435–13443.
- [23] Luo LZ, Nishi K, Liu L, Sabara MI, Li Y. Characterization of the biosynthesis and cell surface expression of avian metapneumovirus attachment glycoprotein. *Virus Research*, 2010, 147(2): 189–194.
- [24] Luo LZ, Nishi K, MacLeod E, Sabara MI, Li Y. Analysis of expression and glycosylation of avian metapneumovirus attachment glycoprotein from recombinant baculoviruses. *Virus Research*, 2010, 153(2): 244–249.
- [25] Liu XY, Zhang XD, Wei YW. Metapneumovirus expands the understanding of paramyxovirus cell fusion—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(4): 376–382. (in Chinese) 刘晓瑜, 章晓栋, 魏永伟. 偏肺病毒对副粘病毒细胞融合的新注释. *微生物学报*, 2014, 54(4): 376–382.
- [26] Palgen JL, Jurgens EM, Moscona A, Porotto M, Palermo LM. Unity in diversity: shared mechanism of entry among paramyxoviruses. *Progress in Molecular Biology Translational Science*, 2015, 129: 1–32.
- [27] Thammawat S, Sadlon TA, Hallsworth PG, Gordon DL. Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. *Journal of Virology*, 2008, 82(23): 11767–11774.
- [28] Adamson P, Thammawat S, Muchondo G, Sadlon T, Gordon D. Diversity in glycosaminoglycan binding amongst hMPV G protein lineages. *Viruses*, 2012, 4(12): 3785–3803.
- [29] Klimyte EM, Smith SE, Oreste P, Lembo D, Dutch RE. Inhibition of human metapneumovirus binding to heparan sulfate blocks infection in human lung cells and airway tissues. *Journal of Virology*, 2016, 90(20): 9237–9250.
- [30] Chang A, Masante C, Buchholz UJ, Dutch RE. Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. *Journal of Virology*, 2012, 86(6): 3230–3243.
- [31] de Graaf M, Schrauwen EJ, Herfst S, van Amerongen G, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Fusion protein is the main determinant of metapneumovirus host tropism. *Journal of General Virology*, 2009, 90(6): 1408–1416.
- [32] Colman PM, Lawrence MC. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4(4): 309–319.
- [33] Dutch RE. Entry and fusion of emerging paramyxoviruses. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(6): e1000881.
- [34] Jardetzky TS, Lamb RA. Activation of paramyxovirus membrane fusion and virus entry. *Current Opinion in Virology*, 2014, 5: 24–33.

- [35] Herfst S, Mas V, Ver LS, Wierda RJ, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Melero JA. Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *Journal of Virology*, 2008, 82(17): 8891–8895.
- [36] Wei YW, Feng K, Yao XJ, Cai H, Li JA, Mirza AM, Iorio RM, Li JR. Localization of a region in the fusion protein of avian metapneumovirus that modulates cell-cell fusion. *Journal of Virology*, 2012, 86(21): 11800–11814.
- [37] Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang LJ, Lamirande EW, Tran KC, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Recombinant human metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *Journal of Virology*, 2004, 78(23): 12877–12887.
- [38] Naylor CJ, Brown PA, Edworthy N, Ling R, Jones RC, Savage CE, Easton AJ. Development of a reverse-genetics system for *Avian pneumovirus* demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *Journal of General Virology*, 2004, 85(11): 3219–3227.
- [39] Liu XY, Wei YW. Research progress in membrane fusion of the respiratory syncytial virus. *Chinese Journal of Virology*, 2015, 31(5): 565–572. (in Chinese)
刘晓瑜, 魏永伟. 呼吸道合胞病毒膜融合机制的研究进展. *病毒学报*, 2015, 31(5): 565–572.
- [40] Bao XY, Liu TS, Shan YC, Li K, Garofalo RP, Casola A. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(5): e1000077.
- [41] Bao XY, Kolli D, Ren JP, Liu TS, Garofalo RP, Casola A. Human metapneumovirus glycoprotein G disrupts mitochondrial signaling in airway epithelial cells. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62568.
- [42] Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani M, Naylor CJ. Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary Microbiology*, 2010, 146(1/2): 24–34.
- [43] Catelli E, Lupini C, Cecchinato M, Ricchizzi E, Brown P, Naylor CJ. Field avian metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity. *Vaccine*, 2010, 28(4): 916–921.
- [44] Padhi A, Verghese B. Positive natural selection in the evolution of human metapneumovirus attachment glycoprotein. *Virus Research*, 2008, 131(2): 121–131.
- [45] Leyrat C, Paesen GC, Charleston J, Renner M, Grimes JM. Structural insights into the human metapneumovirus glycoprotein ectodomain. *Journal of Virology*, 2014, 88(19): 11611–11616.
- [46] Ryder AB, Tollefson SJ, Podsiad AB, Johnson JE, Williams JV. Soluble recombinant human metapneumovirus G protein is immunogenic but not protective. *Vaccine*, 2010, 28(25): 4145–4152.
- [47] Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Amaro-Carambot E, Surman SR, Collins PL, Murphy BR. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology*, 2006, 345(2): 492–501.
- [48] Mok H, Tollefson SJ, Podsiad AB, Shepherd BE, Polosukhin VV, Johnston RE, Williams JV, Crowe JE Jr. An alphavirus replicon-based human metapneumovirus vaccine is immunogenic and protective in mice and cotton rats. *Journal of Virology*, 2008, 82(22): 11410–11418.
- [49] Hu HX, Roth JP, Estevez CN, Zsak L, Liu B, Yu QZ. Generation and evaluation of a recombinant Newcastle disease virus expressing the glycoprotein (G) of avian metapneumovirus subgroup C as a bivalent vaccine in turkeys. *Vaccine*, 2011, 29(47): 8624–8633.
- [50] Hu HX, Roth JP, Zsak L, Yu QZ. Engineered Newcastle disease virus expressing the F and G proteins of AMPV-C confers protection against challenges in turkeys. *Scientific Reports*, 2017, 7: 4025.
- [51] Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *Journal of Virology*, 2005, 79(19): 12608–12613.
- [52] Ling R, Sinkovic S, Toquin D, Guionie O, Eterradossi N, Easton AJ. Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame. *Journal of General Virology*, 2008, 89(Pt 2): 525–533.
- [53] Naylor CJ, Ling R, Edworthy N, Savage CE, Easton AJ. Avian metapneumovirus SH gene end and G protein mutations influence the level of protection of live-vaccine candidates. *Journal of General Virology*, 2007, 88(6): 1767–1775.

The G protein of metapneumovirus: a variable protein with multiple roles

Xiaoyu Liu¹, Yongwei Wei^{1,2*}

¹ Medical School, Shaoxing University, Shaoxing 312000, Zhejiang Province, China

² School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China

Abstract: Metapneumovirus, including human metapneumovirus and avian metapneumovirus, is an important pathogen in human and avian infections. The attachment protein is one type of glycoprotein on the surface of metapneumovirus particles, which belongs to type II transmembrane protein. Compared with other paramyxoviruses, the length of the amino acid sequence, the homology and the biological functions (such as the attachment of the virus, the mediation of cell fusion, the influence of viral replication in cell culture and *in vivo*, and the immuno-protective effect) of the G proteins of metapneumovirus are different. Meanwhile, the G protein of metapneumovirus plays an important role in immunosuppression and immune evasion. At present, few related research has been carried out in China. The aim of this paper is to review and discuss the latest research and progress in the study of the attachment proteins of metapneumoviruses. The future research direction is prospected.

Keywords: metapneumovirus, G protein, protein structure, virus replication, immunity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31402218), by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY14C180001), by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (511500040) and by the Natural Science Foundation of Ningbo City of China (2017A610281)

*Corresponding author. Tel: +86-574-88345839; E-mail: 1071246652@qq.com

Received: 28 June 2017; Revised: 7 September 2017; Published online: 10 November 2017