

流感病毒血凝素的结构与功能

王 懋 梁

(湖北省医学科学院, 武汉)

血凝素是流感病毒的主要表面抗原之一, 它有二种重要的作用: (1) 流感病毒依靠血凝素结合在靶细胞含唾液酸的受体上; (2) 血凝素参与膜融合过程, 使病毒核衣壳进入细胞质

而引起感染。流感的反复流行与血凝素结构及其抗原性的改变密切相关。为研究血凝素的作用机理, 现已用X线衍射技术以 $3\text{ \AA}$ 分辨率确定了 1968 年流行的香港流感病毒 (A/Aichi/

1/68) 血凝素的三维结构^[1]。对流感病毒血凝素三维结构的认识为研究免疫系统对病毒抗原的识别提供了极为有用的模型,也成为研究生物大分子结构与功能关系的成功范例。

(一) 流感病毒血凝素的结构

流感病毒血凝素是作为一条肽链合成的。

香港流感病毒由 550 个氨基酸组成。病毒成熟时第 329 位精氨酸被除去,血凝素(HA)被裂解成由二硫键连接的二条肽链 HA1 (由 328 个残基组成)和 HA2 (由 221 个残基组成),链间二硫键位于 HA1 的第14位残基与 HA2 的第 137 位残基之间(图 1)。

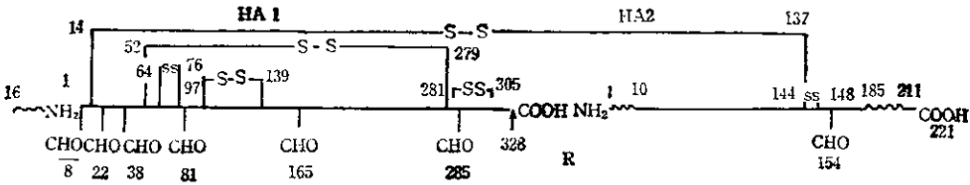


图 1 血凝素的一级结构。曲线处示血凝素生物合成的早期产物中三个重要的疏水性序列: (1) 16 个残基组成的氨基末端“信号序列”; (2) 去除一个精氨酸后发生溶蛋白裂解,产生 HA2 的氨基末端,并增强融合活性; (3) 与病毒膜相连的 HA2 羧基末端。图中已标出糖基化的门冬氨酸及二硫键的位置。

流感病毒血凝素是由 HA1 和 HA2 构成的三聚体(图 2)^[1]。它呈圆柱形,从病毒膜表面到血凝素顶端长135 Å。其横切面近似三角形,其半径约 15—40 Å。血凝素单体结构可分为二部分,即(1)从病毒膜向远中延伸的纤维干部及其(2)顶端的球部。球部只含 HA1 残基,而纤维干部包括一部分 HA1 和全部 HA2 的残基。HA1 的氨基端起始于血凝素膜端的“信号肽链”,然后沿血凝素分子的长轴向远中约延伸 96 Å(63 个氨基酸),作为纤维干部的一部分。再向远中方向即为分子顶端的球状区,由呈反平行 β 折叠的 8 条肽链组成,该区构成唾液酸结合部位(流感病毒的细胞受体)的骨架。HA1 的其余部分又折回纤维干部,终止于离病毒膜 30 Å 左右的部位。HA2 的氨基端约距离 HA1 的羧基端 22 Å,说明血凝素 HA1 和 HA2 肽链裂解时一定发生过构型改变。HA2 的氨基端是非常保守的疏水性肽段,含很多甘氨酸残基,与膜融合有关,故称“融合肽链”。HA2 主要由二条沿分子长轴的反平行的 α 螺旋组成,为血凝素纤维干部的骨架。一条 α 螺旋长 29 Å,由 18 个氨基酸组成,从血凝素的膜端向远中延伸,通过一个环状结构与另一条 α 螺旋相连接。另一条 α 螺旋约长 76 Å,由 50 个氨基酸组成,最后折回于病毒膜。HA2 羧基末

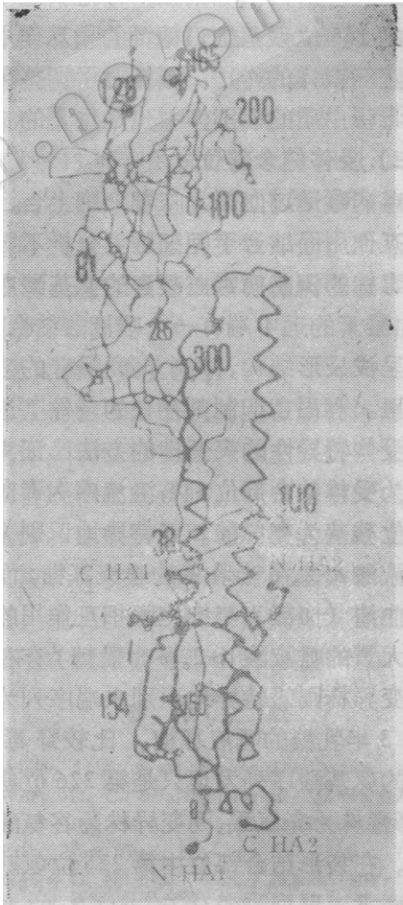


图 2 血凝素单体的三维结构图^[1]。细线为 HA1,粗线为 HA2。小圆点表示几种甲型流感病毒和一种乙型流感病毒的氨基酸变异部位。图中已标明受体结合部位和融合肽。

端第 185—211 位残基构成中性疏水肽段,并插入病毒膜内,血凝素分子借此肽段固定在病毒膜上。HA2 的 212—221 位残基在病毒膜的内侧,可能与病毒的“芽生”过程有关。用菠萝蛋白酶消化血凝素,可去除 HA2 羧基端的 47 个残基,使血凝素的其余部分作为一种可溶性糖蛋白(BHA)被释放出来。

(二) 糖链附着部位^[1,2]

香港流感病毒血凝素有 7 个寡糖链附着部位,均位于血凝素分子的表面。其中在 HA1 上有 6 个附着部位,分别是第 8、22、38、81、165 和 285 位残基;HA2 上有 1 个附着部位,即第 154 位残基。不同病毒株的血凝素的糖基化部位是不同的。糖链可能保护血凝素不受酶的降解,在香港病毒中可能有 7 个糜蛋白酶和胰蛋白酶裂解部位被寡糖链所覆盖。血凝素三个单体的 165 位残基上,糖链的相互作用可能起到稳定三聚体的作用。糖链对于调整免疫系统对病毒蛋白质的识别作用也是重要的。

(三) 受体结合部位

流感病毒通过血凝素与靶细胞上含涎酸的受体相互作用而结合于靶细胞。分析不同亚型及不同毒株的流感病毒血凝素的氨基酸序列后提出,血凝素的远中端有一个唾液酸结合部位,其表面呈浅袋形结构,几个高度保守的残基集中在那里。利用在抑制剂存在的条件下选择具有不同受体特异性的突变株的方法已证实此袋形结构为受体结合部位。香港流感病毒血凝素第 226 位残基为亮氨酸,能特异地识别末端序列为唾液酸 α -2, 6 半乳糖的唾液寡糖;而在非免疫马血清(血凝素与细胞膜相互作用的抑制剂,含大量的唾液酸 α -2, 6 半乳糖)存在时所选择的变异株则能特异地识别末端序列为唾液酸 α -2, 3 半乳糖的唾液寡糖。比较野毒株与变异株的氨基酸序列发现只是第 226 位氨基酸不同,野毒株为亮氨酸,而变异株为谷氨酸。由此表明,在袋形结合部位中第 226 位氨基酸的改变与病毒表现型改变有关。

(四) 膜融合^[4,5]

流感病毒结合于细胞膜上,经细胞的吞噬

作用进入细胞,并进入核内体(endosome)。流感病毒引起膜融合时最佳 pH 值是 5.0—5.5,也是核内体的 pH 值。核内体的低 pH 环境激发病毒膜与核内体膜融合,使病毒基因组转移到细胞质内。

流感病毒血凝素是参与膜融合的唯一蛋白质,其融合活性只有在血凝素被裂解成 HA1 和 HA2 时才能表现出来。流感病毒血凝素的融合肽链是血凝素中最长的高度保守的肽段,其中有一部分被包埋在三聚体的界面中。在 pH 5.0—5.5 的环境中,血凝素的构象发生改变,BHA 发生凝集,并对蛋白酶的消化作用非常敏感。构象改变后,HA2 的氨基末端被暴露,使血凝素与核内体膜更加靠近,但是血凝素参与膜融合的确切机理仍不清楚。

(五) 血凝素的抗原部位

对流感病毒的中和抗体都是针对血凝素的,流感病毒通过改变血凝素的抗原性来逃避免疫系统中循环抗体的中和作用。血凝素的抗原变异引起流感的反复流行。从 1933 年首次分离到流感病毒(H1 亚型)以来,1957 年和 1968 年又分别发生 H2 和 H3 亚型的大流行。大流行病毒株的血凝素的抗原性发生明显改变,即抗原转移,由病毒基因组与某种动物流感病毒基因组重组所产生。血凝素基因点突变的积累则引起流感的反复小流行,即抗原飘流。其表现为血凝素分子表面的氨基酸序列的改变。分析 1968—1975 年流行的现场突变株^[6]和用单克隆抗体实验选择的抗原变异株的血凝素氨基酸序列后认为^[7],血凝素分子表面的某些部位与抗体相互作用,并在抗原变异时发生氨基酸取代。这些部位的氨基酸被取代后可影响抗体的结合。现已在血凝素分子表面识别出 5 个抗原结合区(图 3)^[8]。A 区集中在 HA1 第 140—146 位残基构成的环状突起及其邻近的表面上;B 区由 HA1 第 155—160 位氨基酸残基的环状结构及远中端第 187—198 位残基所组成。最近分析用单克隆抗体选择的突变株发现,B 区又可分为 B₁ 和 B₂ 两个区,它们是部分重叠的。C 区是血凝素三级结构中的膨大部

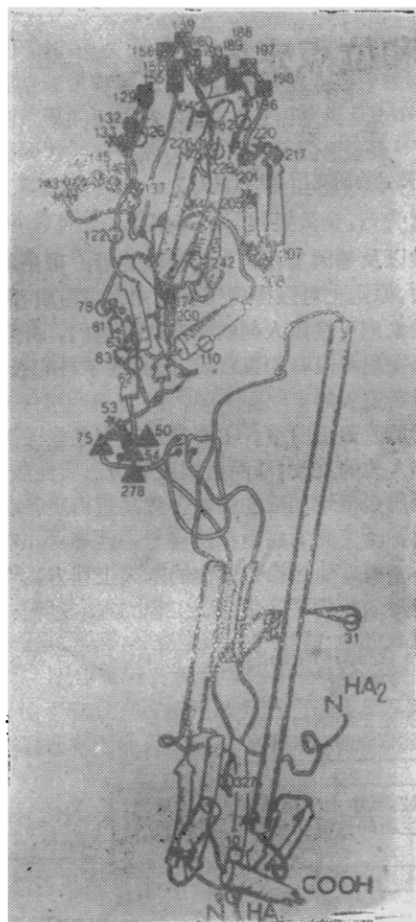


图3 1968年香港病毒血凝素单聚体示意图。标明1968—1979年流行株和实验室变异株的血凝素氨基酸变异部位。
●抗原区A, ■抗原区B, ▲抗原区C, ◆抗原区D, ▼抗原区E。

位,位于球状区的下方。D区由血凝素单体之间的某些表面残基所组成。1975年以后流行的病毒可能存在另一个抗原区,即E区^[9]。此外,也发现一个单克隆抗体选择的E区突变株,其HA1的第63位门冬氨酸被门冬酰胺所取代,而引入一个新的糖链附着部位。用能抑制血凝素糖基化的膜霉素(tunicamycin)选择的变异株,不能被原先能与此变异株结合的单克隆抗体所识别,说明改变糖链结构有可能影响抗原性。

各抗原区中氨基酸残基的替代可引起电荷性质和空间结构的改变,并影响抗体的结合作用。能引起流感流行的病毒,其血凝素各抗原区中至少有一个残基发生突变,否则不能避免病毒被中和,因此抗原性改变是引起流行的必

要条件^[9]。当然,病毒的其它特点,例如传播性和毒力,也是引起流行的重要因素。

人免疫血清中的抗体对流感的反复流行有重要作用。尚不清楚是否血凝素的所有抗原区均能被人免疫血清中的大部份抗体所识别。有人认为其中一个或几个抗原区可能比较重要,某些环状结构可能有利于高亲和性抗体的形成,通过抗原选择而产生免疫显性部位。例如,抗原区A易为抗体所接近,似适宜于亲和抗体的结合,也易发生氨基酸取代,而不影响血凝素分子的基本结构。

(六) 不同亚型血凝素分子结构的比较

H3亚型和H1亚型流感病毒血凝素基因的核苷酸序列具有同源性,在HA1为35%,HA2为53%,链间二硫键也是保守的,因此H3和H1亚型的结构大体上是相似的。

分析单克隆抗体筛选的H1亚型(A/PR8/34)变异株的血凝素基因的核苷酸序列,发现单克隆抗体在H1亚型血凝素结构上所识别的抗原区与H3亚型的抗原区大体相似,但略有不同。例如,在H1亚型血凝素上第165、166、167位氨基酸残基是B区的扩展部分;而在H3亚型血凝素上这些残基被寡糖链所覆盖,而不能被抗体所识别^[10]。

(七) 合成寡肽疫苗

最近合成疫苗已成功地在动物体内产生抗多肽抗体。现已根据血凝素主要抗原性的氨基酸序列合成相应的多肽,并在动物体内产生相应的抗体。这些抗体可与完整的血凝素和病毒发生反应,在实验动物中对流感病毒感染有保护作用,说明合成寡肽在与抗体发生反应时采取类似于在血凝素分子中的构型^[11,12]。

参 考 文 献

- [1] Wilson, I. A. et al: *Nature* (Lond.) 289: 366, 1981.
- [2] Wiley, D. C. et al: *Biological Macromolecules and Assemblies*, Vol. I. ed. by A. McPerson, John Wiley Press. New York, 1984, pp 299—336.
- [3] Rogers, G. N. et al: *Nature* (Lond.) 304: 76, 1983.
- [4] Skehel, J. J. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 968, 1982.
- [5] Daniels, R. S. et al: *J. Gen. Virol.* 64: 1657, 1983.

(下转第254页)

(上接第269页)

- [6] Laver, W. G. et al: *Nature* (Lond.) **283**: 454, 1980.
- [7] Laver, W. et al: *Virology*, **98**: 226, 1979.
- [8] Wiley, D. C. et al: *Nature* (Lond.) **289**: 373, 1981.
- [9] Skehel, J. J. et al: *Bull. WHO.* **61**: 671, 1983.
- [10] Caton, A. J. et al: *Cell*, **31**, 417, 1983.
- [11] Green, N. et al: *Cell*, **28**: 477, 1982.
- [12] Niman, H. I. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 4949, 1983.