

新城疫病毒 HN 蛋白结构及其生物学活性研究进展

王三虎¹, 李杰², 王选年², 杭柏林¹, 王丽荣¹, 姚四新³

(1. 河南科技学院动物科学学院, 河南新乡 453003; 2. 河南省动物免疫学重点实验室, 河南郑州 450002; 3. 中国农业大学动物医学院, 北京 100083)

摘要 新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV) HN 糖蛋白位于病毒囊膜表面, 与病毒的毒力及致病性密切相关, 因此在 NDV 的研究中具有重要的意义。从 HN 蛋白的 1 级结构、空间结构分析了与其相应的受体结合能力、神经氨酸酶活性和促膜融合活性等生物学活性。

关键词 HN 蛋白; 空间结构和功能; 神经氨酸酶活性; 生物学活性

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)23-6213-02

Research Advance in the Structure and Biologic Activity of the Hemagglutinin Neuraminidase Protein of Newcastle Disease Virus

WANG San-hu et al (College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract The hemagglutinin neuraminidase protein of Newcastle disease virus is a surface glycoprotein, and plays a major role in the virulence and pathogenicity of the virion. Analysis of the first structure and the three-dimensional structure of Newcastle disease virus (NDV) HN protein revealed the biologic activities including the attachment to receptors containing sialic acid, neuraminidase (NA) activity and the promotion of membrane fusion.

Key words HN protein; Three-dimensional structure and function; NA activity

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV) 属于副粘病毒科腮腺炎病毒属, 含有 1 条单股、负链 RNA, 基因组全长 15 186 个核苷酸(bp), 可编码 6 种结构蛋白, 即核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶(HN) 及大蛋白(L)。HN 糖蛋白位于病毒囊膜表面, 与病毒的毒力及致病性密切相关, 因此在 NDV 的研究中具有重要意义。

1 HN 的基因

HN 基因全长 2 001 或 2 002 个核苷酸(bp), 其转录起始信号(第 1~10 bp) 和终止信号序列高度保守, 蛋白翻译的起始密码子位置亦完全相同, 即都在第 92~94 bp, 但不同毒株蛋白翻译的终止密码子的位置不尽相同, 有的位于 1 805~1 807 bp, 有的位于 1 823~1 825 bp, 还有的位于 1 940~1 942 bp, 因此, NDV HN 蛋白的编码长度可以分为 3 种, 即 1 713、1 731、1 848 bp, 编码长度较短的 HN 基因显然是由编码长度较长的 HN 基因在 C 末端发生变异而产生的。

2 HN 蛋白的结构

2.1 HN 蛋白的 1 级结构 不同 NDV 毒株的 HN 蛋白 1 级结构的长度不同。Sakaguchi 等^[1] 研究发现, 依 HN 多肽长度的不同可以将 NDV 毒株分成 A、B、C 3 组。A 组病毒 HN 多肽长 616 个氨基酸, 该种多肽实际上是无活性的前体, 需经宿主细胞的蛋白分解酶作用才能转化为有生物活性的蛋白, 相应的毒株都是无毒株; B 组病毒 HN 多肽长 577 个氨基酸, 相应的毒株既有无毒株又有强毒株; C 组病毒 HN 多肽长 571 个氨基酸, 相应的毒株全是典型的强毒株。因此, HN 蛋白结构与 NDV 的毒力有关。

2.2 HN 蛋白的空间结构和功能 成熟的 HN 是一种四聚体寡聚蛋白, 亚单位之间通过二硫键形成二聚体, 2 个二聚体再以非共价方式结合成四聚体^[2,3]。

2.2.1 HN 蛋白的膜外区与 HN 生物学活性的关系。 不同 NDV 毒株 HN 蛋白从第 76 位氨基酸到 C 末端的整个胞外区氨基酸序列差异较小。

和多数囊膜蛋白不同, HN 蛋白以其 N 末端插入病毒囊膜, C 末端则暴露于表面^[4,5]。在空间结构上, HN 蛋白的膜外区可以分为近膜区的柄部和与柄部相连的球状区。从目前的报道^[6] 来看, 柄部包含膜外区的第 49~146 位残基, 147 位及其随后残基构成 HN 蛋白的球状区。

NDV HN 蛋白膜外区有 12 个完全保守的半胱氨酸(C) 残基, 分别位于 172、186、196、238、247、251、344、455、461、465、531 和 542 位氨基酸处。这些 C 残基对 HN 蛋白的成熟起着重要作用。Migmes 等^[7] 以 Western 免疫印迹、免疫荧光和蔗糖密度梯度沉淀等方法, 对以上各个位点 C 残基突变的蛋白进行分析, 结果发现不同的 C 残基突变, 可以分别阻断 HN 蛋白成熟的不同阶段。此外, HN 蛋白还含有一些非保守的 C 残基^[6], 一些无毒株, 例如 D26/76, Qre/66, Us/67, 因其 HN 蛋白长 616 个氨基酸, 故在第 596 位还有 1 个 C 残基。

据报道^[1], HN 蛋白有 6 个潜在的糖基化位点, 即 NXT/S 结构, 分别位于 119、341、433、481、508 及 538 位氨基酸。前 4 个位点可以被糖基化, 后 2 个位点不能被糖基化。

2.2.1.1 HN 蛋白的球状区与 HN 生物学活性的关系。 Langedijk 等^[8] 推断出 HN 蛋白球状区的三维结构模型, 他们认为球状区形成 -propeller 结构, 其包含 6 个反向平行的 -折叠, 每个折叠反复 4 次; 6 个 -折叠所对应的区域可能为 1(175~228 位残基)、2(237~288 位残基)、3(316~396 位残基)、4(401~433 位残基) 和 5(472~515 位残基)。

HN 蛋白的大多数功能位点如受体结合位点和神经氨酸酶活性位点等主要位于球状区。目前, 受体结合活性和神经氨酸酶活性已经可以用点突变^[9] 和单抗功能抑制^[10] 等手段明确区分, 但两者在 HN 蛋白上的定位还未完全明确。

有报道认为, 受体结合位点和神经氨酸酶活性位点在 HN 蛋白上是相互独立的^[11], 并认为受体结合位点位于 C 末端 1/3 的多肽范围^[12]。

Iorio 等^[10] 在用单克隆抗体与 HN 蛋白反应时发现, HN 蛋白分子在球状区有 7 个连续且有部分重叠的抗原位点, 用这 7 个位点的单克隆抗体进行血凝抑制试验和神经氨酸酶抑制试验, 其中针对 1、2、12、14、23 共 5 个位点的单克隆抗体能通过阻断细胞受体与病毒粒子结合而中和 NDV 的感染

基金项目 河南科技学院资助项目。

作者简介 王三虎(1962-), 男, 河南武陟人, 教授, 从事动物微生物学与免疫学研究。

收稿日期 2006-09-10

性,2、12 和23 位点的单克隆抗体还能明显抑制神经氨酸酶活性。这一结果提示 NDV HN 蛋白的血凝活性和神经氨酸酶活性在分子结构上有部分重叠,而针对其余2 个位点(3、4)的单克隆抗体既不能抑制血凝活性,也不能抑制神经氨酸酶活性。Iorio 等根据这些单抗对应的氨基酸序列,推测 HN 蛋白上可能有5 个与受体结合有关的区域,即第193~201、345~351、494、513~521 及569 位氨基酸,其中第193~201 位氨基酸同时具有受体结合及神经氨酸酶2 种活性。

Iorio 等^[13] 鉴定了球状区对于 NDV HN 蛋白 NA 活性有重要影响的氨基酸位点。Sheehan 等^[14] 经过比较发现,NDV HN 蛋白存在一段保守序列^[17] GCTRIPSF^[178],并且第175 位氨基酸及其附近区域对于 NA 位点的完整性至关重要。

也有报道认为,HN 蛋白受体结合位点是位于234~239 位氨基酸之间的一段寡肽 X R K S C S,神经氨酸酶活性位点大致位于 HN 蛋白的中心部位,而血凝素位点则靠近 HN 蛋白的 C 末端^[6]。

Connarish 等^[15] 则于2002 年报道,402 位 E、416 位 K 和526 位 Y 3 个残基与 HN 受体结合活性密切相关,提出了 HN 蛋白的单一位点模型,他们认为 HN 蛋白具有单一的唾液酸识别位点,该位点可以在受体结合与神经氨酸酶催化状态之间进行转换。这些不尽一致甚至相互矛盾的报道表明,HN 蛋白球状区各种活性位点的定位远未完成,同时也强烈暗示这些位点属于空间构象位点,而非线性位点。

Sergel 等^[16] 研究发现,NDV HN 蛋白第398 位残基附近,存在一段保守序列 G(A, S) EGR(I, L, V),该段序列对 HN 蛋白的分子折叠至关重要。

2.2.1.2 HN 蛋白的柄状区与 HN 生物学活性的关系。1999 年 Hulslander 等^[17] 分析发现,在 HN 蛋白柄部含有2 个七肽重复序列(heptad repeat region, HR)。HR 中每隔7 个残基出现1 个疏水性氨基酸,该序列能形成 α -螺旋, α -螺旋间可形成 coiled 卷曲,进而介导蛋白与蛋白的相互作用。NDV HN 蛋白柄部的 HR 位于第74~110 位残基内,中间含7 个残基的间隔区;2 个 HR 内单个氨基酸突变后,HN 蛋白吸附红细胞的能力不变或增强,NA 活性为野生型蛋白的14.0%~15.7%,在半数以上的突变 NA 活性略微降低或保持不变,但 HN 蛋白的促融合活性显著下降,其中 L74A 或 V81A 的突变使促融合活性完全丧失;另外 L74A、V81A、L96A、L97A 及 I102A 的突变结果表明,HR 内一些特殊氨基酸对于 HN 蛋白的促融合作用是必需的。

Deng 等^[16] 发现 HN 蛋白柄部第49~143 位氨基酸范围内存在1 个能促进 F 蛋白融合活性的区域。HN 蛋白柄部的这种特性具有病毒特异性,即促融合活性只有在相同血清型病毒(禽副粘病毒)的 HN 蛋白及 F 蛋白之间才能发生。并且确定了决定促融合作用特异性所对应的 HN 蛋白的区域,确定其不在球状区,也不在胞内区,而在跨膜区和柄部范围内:在 NDV,这一区域包含第20~141 位残基,占总残基数的21.4%。

除了促融合活性外,柄部结构还选择性地影响 HN 蛋白的 NA 活性。Wang 等^[18] 发现,柄部一些氨基酸位点的突变能影响 HN 蛋白的神经氨酸酶活性,但不影响受体识别。

2.2.2 HN 蛋白的跨膜区和胞质区及其生物学活性。HN 蛋白的疏水区主要集中于 N 端,且蛋白的转运无信号肽切除过程。N 端包括了 HN 蛋白的胞质区(第1~26 位氨基酸)、跨膜区(第27~48 位氨基酸)和胞外区27 个氨基酸(第49~75 位氨基酸)。

对许多 NDV 毒株的比较表明,跨膜区是 HN 蛋白保守性最小的区域^[19]。所有 NDV 在该区域都含有1 个 HR,其中分布3 个保守的 L 残基,该 HR 亦形成 α -螺旋并在 HN 蛋白与膜的相互作用中发挥作用^[20]。有证据表明,跨膜区和胞质区都参与 HN 蛋白四聚体的形成,这2 个区域缺失后只能形成二聚体蛋白。

McGinnes 等^[21] 将 HN 蛋白跨膜区保守的 L 残基(第30、37、44 位氨基酸)逐一或同时突变为丙氨酸(A),所有突变蛋白都能形成二聚体,但44 位 L 置换后,HN 蛋白不能形成四聚体,而30 位 L、37 位 L 突变后能形成不稳定的四聚体。这一结果表明,跨膜区对 HN 蛋白四聚体结构形成起重要作用。这些突变也影响 HN 蛋白的生物学活性,第44 位 L 突变后,HN 蛋白受体结合能力显著下降,NA 活性也有所改变,但其他2 个位置突变后,HN 蛋白的受体结合能力及 NA 活性与野生型蛋白相当。另外,上述突变还使促融合活性下降,其中第44 位 L 突变或30、37 位 L 同时突变后,下降最为显著。

3 结语

对蛋白质结构的研究是现代分子生物学的基础之一,如今,对 NDV 囊膜糖蛋白的分子生物学研究取得了较大进展,为研究新城疫的抗原免疫机制提供了材料,为研发新城疫表位疫苗奠定了基础。

参考文献

- [1] L W MCGINNES, T G MORRISON. The role of individual cysteine residues in the formation of the native, antigenic HN protein of Newcastle disease virus [J]. *Virology*, 1994, 200: 470 - 483.
- [2] P L COLLINS, G MOTTET. Homologous oligomerization of the hemagglutinin neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3 occurs before the acquisition of correct intramolecular disulfide bonds and native immunoreaction [J]. *Journal of Virology*, 1993, 65: 2362 - 2371.
- [3] A MMRZA, J P SHEEHAN, L WHARDY, et al. Structure and function of a membrane anchor-less form of the hemagglutinin neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 21425 - 21431.
- [4] NLANGO, L E COLLIGAN, R C JAMBAU, et al. Human parainfluenza type 3 virus hemagglutinin neuraminidase glycoprotein: Nucleotide sequence of mRNA and limited amino acid sequence of CNBr peptides of the purified protein [J]. *Journal of Virology*, 1986, 57: 481 - 489.
- [5] E D JORGENSEN, P L COLLINS, P T LOMEDICO. Cloning and nucleotide sequence of Newcastle disease virus hemagglutinin neuraminidase mRNA: identification of a putative sialic acid binding site [J]. *Virology*, 1987, 156: 12 - 24.
- [6] TORUTAKIMOTO, GARRY L TAYLOR, HELEN C CONNARIS, et al. Role of the hemagglutinin neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus cell membrane fusion [J]. *Virology*, 2002, 76(24): 13028 - 13033.
- [7] L W MCGINNES, T G MORRISON. The role of individual cysteine residues in the formation of the native, antigenic HN protein of Newcastle disease virus [J]. *Virology*, 1994, 200: 470 - 483.
- [8] J P MLANGEDJUK, F J DAUS, J T VAN OSCHOT. Sequence and structure alignment of paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin [J]. *Journal of Virology*, 1997, 71: 6155 - 6167.
- [9] T SERGEL, L W MCGINNES, ME PEEPLES, et al. The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin neuraminidase glycoprotein can be separated from fusion promotion by mutation [J]. *Virology*, 1993, 193(2): 717 - 726.

(上接第6214 页)

- [10] R MIORIO, R L GLICKMAN, A MREEL, et al . Functional and neutralization profile of seven overlapping antigenic sites on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus : nonodonal antibodies to some sites prevent attachment [J] . *Virus Research*, 1989, 13 :245 - 262 .
- [11] G WSMITH, L E HIGHTOWER. Revertant analysis of a temperature sensitive mutant of Newcastle disease virus with defective glycoprotein : implication of the fusion glycoprotein in cell killing and isolation of neuraminidase-deficient hemagglutinating virus [J] . *Journal of Virology*, 1982, 42 :659 - 668 .
- [12] B BLUMBERG, C GIORGI, L ROUX, et al . Sequence determination of the Sendai virus HN gene and its comparison to the influenza virus glycoproteins [J] . *Cell*, 1985, 41 :269 - 278 .
- [13] R MIORIO, R J SYDDALL, R L GLICKMAN, et al . Identification of amino acid residues important to the neuraminidase activity of the HN glycoprotein of Newcastle disease virus [J] . *Virology*, 1989, 173(1) :196 - 204 .
- [14] J P SHEEHAN, R MIORIO. A single amino acid substitution in the hemagglutinin neuraminidase of Newcastle disease virus results in both functions [J] . *Virology*, 1993, 189(2) :778 - 781 .
- [15] H CONNARIS, T TAKIMOTO, R RUSSEL, et al . Probing the sialic acid binding site of the hemagglutinin neuraminidase of Newcastle disease virus : identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis, and fusion [J] . *Journal of Virology*, 2002, 76(4) :1 816 - 1 824 .
- [16] DENG R, WANG Z, MIRZA M, et al . Localization of a domain on the paramyxovirus attached protein required for the promotion of cellular fusion by its homologue fusion protein spike [J] . *Virology*, 1995, 209 :457 - 469 .
- [17] J S HUSLANDER, T G MORRISON. Mutational analysis of heptad repeats in the membrane-proximal region of Newcastle disease virus HN protein [J] . *Journal of Virology*, 1999, 73(5) :3 630 - 3 637 .
- [18] ZHYU WANG, R MIORIO. Amino acid substitutions in a conserved region in the stalk of the Newcastle disease virus HN protein spike impair its neuraminidase activity in the globular domain [J] . *The Journal of General Virology*, 1999, 80 :749 - 753 .
- [19] T SAKAGUCHI, T TOYODA, B GOTOH, et al . Newcastle disease virus evolution I . Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin neuraminidase gene [J] . *Virology*, 1999, 169 :260 - 272 .
- [20] S T SINGER. The structure and insertion of integral proteins in membranes [J] . *Cell*, 1990, 6 :247 - 296 .
- [21] L MCGINNIS, T SERGEI, T MORRISON. Mutations in the transmembrane domain of the HN protein of Newcastle disease virus affect the structure and activity of the protein [J] . *Virology*, 1993, 196 :101 - 110 .