

领域前沿 · 中国



周界文, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所、国家蛋白质科学中心研究员、博士生导师, 国家“千人计划”(B类)获得者。1993年毕业于美国密西根大学物理系。1999年获得哈佛大学生物物理学博士。2000至2003年在美国国家卫生研究院完成博士后工作。2003年在美国哈佛大学医学院任助理教授, 2008年提升为副教授, 2012年提升为正教授(终身)。曾获得美国Pew学者、Genzyme杰出科学家等荣誉。2011年6月起任生物化学与细胞生物学研究所研究员。周界文研究组主要研究方向为蛋白质的结构与功能, 用生物物理方法检测膜蛋白结构与动态特性, 理解它们的功能与机制。至今已研发了一整套先进液体核磁共振与生物化学技术, 实现了人们长期以来想用液相核磁方法来测膜蛋白的结构与动态特性的愿望, 并用这些技术解决了相关细胞跨膜受体和病毒跨膜蛋白的一系列重要问题。

HIV包膜蛋白跨膜区的结构对疫苗设计的意义

周界文^{1,2*} 傅青山² 刘志军¹

(¹中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 国家蛋白质科学中心(上海), 上海 201210;

²哈佛大学医学院, 生物化学与分子药理学系, 波士顿 02115)

摘要 人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)包膜蛋白(envelope protein, Env)是一个跨膜蛋白, 其作用是介导病毒和细胞膜的融合, 帮助病毒进入细胞。Env作为病毒粒子表面上的唯一抗原, 是目前HIV疫苗设计的主要目标。近年来, 关于这个包膜蛋白的胞外区的结构信息有很多研究报道, 但是关于跨膜区(transmembrane domain, TMD)的结构机制还不清楚。我们利用最新建立的一整套高效的膜蛋白核磁技术, 在类似磷脂膜的双分子Bicelle环境中, 首次解析了HIV-1Env跨膜区的高分辨空间结构。结果表明, TMD形成有序的三聚体结构, 保护埋在膜内保守的精氨酸残基。N-端卷曲螺旋和C-末端的亲水核心一起稳定这个三聚体, 而后者可以在结构上连接到胞质区尾巴。生物学功能实验证明, 一些氨基酸突变可以破坏TMD三聚体的稳定性, 而这些突变也减弱了成熟Env对抗体的敏感性。也就是说, 如果TMD不能形成稳定的三聚体, 原本可以通过稳定Env三聚体而达到广泛中和病毒的抗体, 也不能有效识别HIV-1Env抗原。因此, 我们得出结论, Env的TMD对于维持整个Env的天然构象稳定性非常重要。也许可以通过考虑TMD对Env胞外区影响的分子机理, 为针对艾滋病病毒的疫苗设计提供新的思路。

关键词 HIV包膜蛋白; 跨膜区; 核磁结构; 免疫原设计

The Structure of HIV-1 Membrane Anchor and Its Implication to Vaccine Design

*通讯作者。Tel: 021-54921084, E-mail: james_chou@hms.harvard.edu

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921084, E-mail: james_chou@hms.harvard.edu

网络出版时间: 2016-07-25 15:36:30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160725.1536.014.html>

Chou James J^{1,2*}, Fu Qingshan², Liu Zhijun¹

⁽¹⁾National Center for Protein Science Shanghai, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology,
Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

⁽²⁾Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA)

Abstract HIV (human immunodeficiency virus) envelope spike (Env) is a transmembrane protein that mediates fusion of viral and cell membranes. As the sole antigens on the HIV virion surface, the mature HIV envelope protein has been the primary target of vaccine development. A vast amount of structural information is available for the ectodomain of Env, the primary target by the host immune system, but much less is known about its transmembrane domain (TMD) in the context of lipid bilayer. We used the latest NMR technologies and determined the structure of the TMD of HIV-1Env reconstituted in bicelles that mimic a lipid bilayer. It forms a well-ordered trimer that protects a conserved arginine, buried in the membrane. An N-terminal coiled coil and a C-terminal hydrophilic core stabilize the trimer; the latter is structurally coupled to the cytoplasmic domain. Functional studies showed that mutations destabilizing the TMD trimer severely attenuated the sensitivity of the functional Env to trimer-specific antibodies. Specifically, the trimer-specific broadly neutralizing antibody, which neutralize by stabilizing the native trimeric conformation of Env, do not recognize the Env spike when its TMD has been destabilized. We thus conclude that the TMD plays an important role in maintaining the native conformation of Env and that the influence of TMD on the Env ectodomain is an important consideration for HIV immunogen design.

Keywords HIV envelope protein; transmembrane domain; NMR structure; immunogen design

1 HIV疫苗开发的挑战性

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV), 即艾滋病[获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)]病毒, 是造成人类免疫系统缺陷的一种病毒。1983年, 人类免疫缺陷病毒由法国和美国的实验室首次发现^[1-2]。HIV通过破坏人体的T淋巴细胞, 进而阻断细胞免疫和体液免疫过程, 导致免疫系统瘫痪, 从而致使各种疾病在人体内蔓延, 最终导致艾滋病。虽然小分子药物已能有效地遏制病情, 但是至今仍无政府批准的预防性疫苗, 因此每年仍有大约两百万人被感染^[3]。HIV极其迅速的变异给疫苗研发带来很大的麻烦。自从1987年由美国国立卫生研究院实行的第一次HIV疫苗临床实验到目前, 已经有过30多次不同的临床试验, 但是都没有达到预期的效果。理想情况下, HIV疫苗会诱发两种免疫反应对抗HIV-T细胞激活和B细胞分泌抗体, 这些免疫反应会阻止病毒侵染和蔓延, 降低病毒对患者的免疫系统破坏。然而, 至今还没有一种疫苗能够有效激活这两种类型的应答。迄今为止, 研究人员只在实验阶段做到HIV疫苗刺激T细胞产生微弱应答, 而刺激B细

胞产生抗体来对抗各种HIV病毒株时却遇到巨大的困难。这个问题的根源在于我们缺乏对艾滋病毒免疫原的认识, 那就是什么样的HIV病毒蛋白的片段作为实验疫苗可以引起免疫反应, 并在实际遭遇病毒和抵抗艾滋病的过程中起到有效作用。

2 HIV包膜蛋白作为疫苗开发策略的主要对象

HIV包膜蛋白(Env; gp160三聚体)是病毒粒子表面上的唯一抗原, 因此也是目前疫苗设计的主要目标^[4-5]。Env的作用是, 通过与宿主细胞受体发生相互作用帮助病毒进入细胞^[6]。成熟的Env(gp160), 被酶切后成(gp120/gp41)₃, 是由三个gp120和三个gp41亚单元组成的三聚体。其中, gp41是跨膜蛋白, gp120位于表面, 并与gp41通过非共价作用结合。在病毒入侵过程里, gp120结合细胞表面受体CD4和复合受体CCR5或CXCR4, 触发Env巨大的构象变化, 然后gp41膜融合蛋白又通过一连串的大范围的蛋白质重折叠, 最终导致病毒与宿主细胞的膜融合^[7-9]。由于Env的胞外区是病毒入侵宿主时最先被识别的区域, 科学家的疫苗开发策略主要以Env胞外区作为

免疫原。正因如此,关于Env的胞外区的结构信息有很多研究报道,包括胞外区的高分辨率晶体和电镜结构^[9-12]。可惜的是,众多以Env胞外区三聚体为主的免疫原在临床试验中都无法诱导强烈的免疫应答,这让大家非常困惑^[13-14]。

3 难以捉摸的HIV gp41跨膜区也许是解决问题的关键

去年,哈佛医学院和波士顿儿童医院的Bing Chen课题组在《Science》报道了一个出乎意料的结果。他们发现,对HIV-1 Env胞内区的改变居然严重影响了Env胞外区的抗原性质^[15]。更具体地说,剪切gp41的胞内区可以让(gp120/gp41)₃在膜另一端的胞外区对之前被鉴定的广泛中和抗体,(如PG16和PGT145等),完全失去灵敏度。对此结果的唯一解释就是,Env作为跨膜蛋白的胞外、跨膜和胞内区的构象与动态特征是相互偶联的。也就是说,改变胞内区的结构会破坏跨膜区的结构,而跨膜区的结构对胞外区的三聚体组装结构又起到稳定性的作用。所以,胞内区的变异破坏了Env跨膜蛋白的整体结构协同效应,间接地导致了胞外区结构的不稳定。根据以上推测,我们认为,获得gp41跨膜区的结构信息对于设计一个稳定的(gp120/gp41)₃胞外区作为抗原非常关键。然而,长期以来,病毒膜融合蛋白的跨膜区和近膜区域的结构解析一直是困扰结构生物学家的难题。

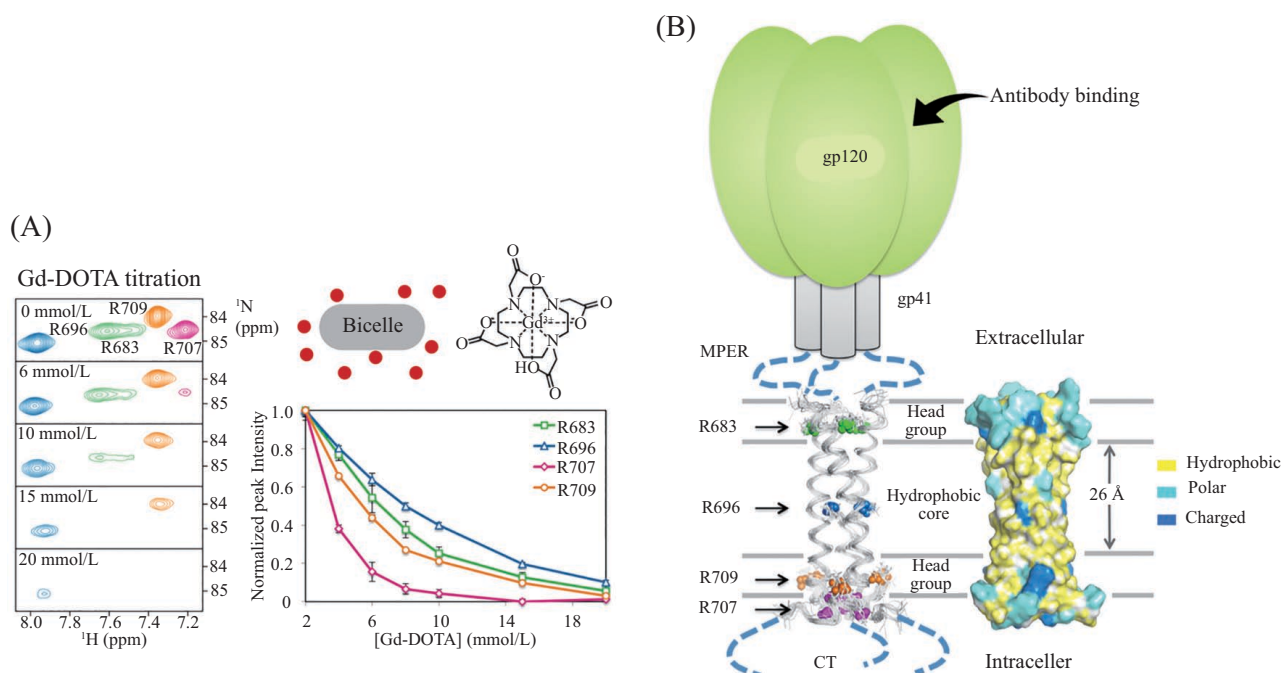
4 HIV-1 gp41跨膜区的核磁结构解析

结构研究需要大量均一的蛋白样品。但是由于膜融合蛋白的跨膜区的疏水性非常强,给样品制备带来了很大的麻烦。我们的解决办法包括系统性筛选跨膜区域构建和在细菌里做定向包含体表达。此外,跨膜区比其他内在膜蛋白小很多,它们往往需要在磷脂双层的环境里形成稳定的多聚体结构。而这些条件与传统的结晶、液相核磁等方法是不相容的。我们的研究手段是把gp41跨膜区重构到bicelle里。Bicelle是一种由磷脂酰胆碱脂质(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC)和短链的脂质(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC)自组装成的脂质/两亲性分子的混合物,用于模拟生物膜的环境。首先,我们发现,由bicelle重构的gp41跨膜

区果然形成一个非常稳定的三聚体,和胞外区的三聚体构想是吻合的。然后,我们利用近期建立在上海蛋白质设施的核磁系统的一整套高效的膜蛋白核磁技术^[16-17],采集原子之间的结构约束。虽然gp41跨膜区是重构在相当大的bicelle里(直径约为10 nm),高度优化的多维液相核磁实验,加上高场高灵敏度的核磁仪器,使得高分辨率结构解析成为可能。同时,因为蛋白是被包含在bicelle的磷脂双层部分,我们通过最新研发的顺磁探针滴定方法测定了gp41跨膜区在膜里的精确位置。

结果表明,HIV-1 gp41跨膜区域形成有序的二聚体结构^[18],保护埋在膜内保守的精氨酸残基(图1)。N-端卷曲螺旋和C-末端的亲水核心一起稳定这个三聚体,而后者可以在结构上联接到胞内区。和我们之前的猜测一致的是,跨膜区在膜环境里形成非常明确的三聚体结构,说明它完全有能力使Env的胞外区三聚体结构更加稳定。我们没有想到的是,跨膜区的三聚体结构里在膜的核心疏水部位藏有三个带有正电荷的精氨酸残基。这个氨基酸在病毒里非常保守,意味着跨膜区三聚体在膜里含有很大的潜能,其在病毒入侵时的作用有待进一步研究。但是我们有理由猜测,这些能量很有可能在膜融合过程中被释放。我们认为,gp41跨膜区的结构对HIV疫苗开发的意义是为设计新一代更稳定的Env胞外区免疫原提供引导性信息。因为此结构是在磷脂双层的环境里测定的,所以它应该比较准确的反映Env在膜里是怎样保持三聚体状态的。获得结构后,Bing Chen课题组和我们进行了非常彻底的基于结构的功能突变研究。就如我们猜测的那样,可分解gp41跨膜区三聚体的氨基酸突变同时也改变了成熟Env对抗体的敏感性。

最后,我们的结构和功能数据首次证实了gp41跨膜区域形成的有序三聚体结构,不仅对Env的膜锚定和膜融合起关键作用,而且对于整个HIV包膜蛋白的结构稳定性非常重要。下一个有针对性的问题显然是,怎样去模拟跨膜区结构,设计出稳定的Env抗原。不过,在解决这个问题之前还有进一步的结构信息有待解决。那就是,连接Env胞外区和跨膜区的一段叫MPER的极其保守的序列。我们希望能够利用新建立的核磁体系继续研究,填补这方面的结构空白。



A: 利用液体核磁共振的顺磁探针Gd-DOTA, 测量四个精氨酸残基在磷脂双层内的不同膜埋深度; B: HIV-1包膜刺突的gp41跨膜区三聚体核磁结构示意图。

A: probing membrane immersion depth of the four Arg side chains by solvent paramagnetic agent Gd-DOTA; B: NMR structure of the transmembrane domain of HIV-1 gp41 trimer in the context of the presumed lipid bilayer.

图1 HIV-1包膜蛋白的跨膜区结构及膜内的定位(根据参考文献[18]修改)

Fig.1 Structure and transmembrane partition of the transmembrane domain of HIV-1 envelope protein (modified from reference [18])

参考文献 (References)

- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220(4599): 865-7.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220(4599): 868-71.
- Gottlieb GS, Eholié SP, Nkengasong JN, Jallow S, Rowland-Jones S, Whittle HC, *et al.* A call for randomized controlled trials of antiretroviral therapy for HIV-2 infection in West Africa. *AIDS* 2008; 22(16): 2069-72; discussion 73-4.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003; 422(6929): 307-12.
- Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 4144-9.
- Harrison SC. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15(7): 690-8.
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997; 89(2): 263-73.
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 1997; 387(6631): 426-30.
- Pancera M, Zhou T, Druz A, Georgiev IS, Soto C, Gorman J, *et al.* Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. *Nature* 2014; 514(7523): 455-61.
- Julien JP, Cupo A, Sok D, Stanfield RL, Lyumkis D, Deller MC, *et al.* Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 2013; 342(6165): 1477-83.
- Lyumkis D, Julien JP, de Val N, Cupo A, Potter CS, Klasse PJ, *et al.* Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 2013; 342(6165): 1484-90.
- Lee JH, Ozorowski G, Ward AB. Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 2016; 351(6277): 1043-8.
- Sodora DL, Allan JS, Apetrei C, Brenchley JM, Douek DC, Else JG, *et al.* Toward an AIDS vaccine: Lessons from natural simian immunodeficiency virus infections of African nonhuman primate hosts. *Nat Med* 2009; 15(8): 861-5.
- Crispin M, Doores KJ. Targeting host-derived glycans on enveloped viruses for antibody-based vaccine design. *Curr Opin Virol* 2015; 11: 63-9.

- 15 Chen J, Kovacs JM, Peng H, Rits-Volloch S, Lu J, Park D, *et al.* HIV-1 ENVELOPE. Effect of the cytoplasmic domain on antigenic characteristics of HIV-1 envelope glycoprotein. *Science* 2015; 349(6244): 191-5.
- 16 Fu Q, Fu TM, Cruz AC, Sengupta P, Thomas SK, Wang S, *et al.* Structural basis and functional role of intramembrane trimerization of the Fas/CD95 death receptor. *Mol Cell* 2016; 61(4): 602-13.
- 17 Oxenoid K, Dong Y, Cao C, Cui T, Sancak Y, Markhard AL, *et al.* Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2016; 533(7602): 269-73.
- 18 Dev J, Park D, Fu Q, Chen J, Ha HJ, Ghantous F, *et al.* Structural basis for membrane anchoring of HIV-1 envelope spike. *Science* 2016; doi: 10.1126/science.aaf7066.