

领域前沿 · 中国



高福, 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室主任, 中国科学院微生物研究所研究员, 中国科学院北京生命科学研究院副院长, 中国疾病预防控制中心副主任。先后在山西农业大学和北京农业大学获得学士和硕士学位, 1995年在英国牛津大学获得博士学位, 相继在英国牛津大学、加拿大卡尔加里大学、美国哈佛大学从事博士后研究工作。2001-2004年在英国牛津大学任讲师、实验室主任、博士生导师。2004年入选中科院“百人计划”, 2005年获“国家杰出青年基金”资助, 2005、2011连续两次担任国家973项目“病毒跨种间传播机制”的首席科学家, 是国家基金委“病原微生物与宿主互作”创新研究群体带头人。2006年起任国际抗病毒联盟(International Consortium of Anti-Virals, ICAV)国际执委会委员。2010年起被聘为英国牛津大学客座教授(Visiting professor)。在多个国际杂志编委会任职。2012年获得发展中国家科学院(TWAS)基础医学奖。2013年获年度科技创新人物。2013年当选中国科学院院士。

高福研究员长期从事病原微生物与免疫学领域研究, 整合分子生物学、流行病学、结构生物学等研究手段, 针对病原跨种传播机制, 特别是在病原与宿主界面的相互识别和相互作用、免疫细胞与感染细胞(靶细胞)的相互识别机制研究方面进行了系统性和创新性工作。MERS-CoV的疫情在中东地区暴发后, 高福研究员带领课题组逯光文等迅速开展研究, 破译了这种新型冠状病毒的受体识别过程和膜融合机制(Lu *et al.* Nature, 2013)。高福研究员在包括Nature、Science、The Lancet、NEJM、PNAS等在内的SCI杂志发表论文260余篇。

高致病性中东呼吸综合征冠状病毒识别 细胞受体分子机制的破译

逯光文 吴莹 高福*

(中国科学院微生物研究所, 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101)

冠状病毒属巢状病毒目(Order: *Nidovirales*)冠状病毒科(Family: *Coronaviridae*)冠状病毒属(Genus: *Coronavirus*), 为一类具囊膜的RNA病毒^[1]。在电镜下, 冠状病毒呈现为球形或卵圆形, 病毒粒子直径通常在100~160 nm之间; 粒子内部为单股正链的RNA基因组, 大小可达26~32 Kb; 粒子外部的囊膜中含有刺突蛋白, 因其覆盖表面而使得整个病毒粒子在电镜下如日冕一般, 因而得名冠状病毒。

人们对冠状病毒的认识最早可追溯到上世纪

30年代, 研究人员从鸡身上分离得到了第一个冠状病毒——传染性支气管炎病毒; 随后若干冠状病毒被陆续发现, 包括可引起人类疾病的人类冠状病毒OC43、229E等, 但这些冠状病毒通常只引起感冒等普通的呼吸系统疾病^[1]。2003年, 一场突如其来的非典疫情在全球造成了超过8 000例的感染病例和逾800例的死亡病例^[2], 而其致病原正是被称作重症急性呼吸综合征病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)的冠状病毒, 这使得人们开始重新认识这些“温和”的致病原, 它们一旦跨越种间屏障, 可以造成严重的人类疾病和人群感染。这也是人们对新出现的高致病性中东呼

*通讯作者。Tel: 010-64807688, E-mail: gaof@im.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807688, E-mail: gaof@im.ac.cn

网络出版时间: 2014-01-02 11:15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.9001.html>

吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronaviurs, MERS-CoV)如此关注的原因。

2012年9月23日,英国健康保护局通报了一例严重的呼吸系统疾病患者,这位49岁的卡塔尔人在7~8月曾到沙特阿拉伯旅行,9月初发病后,病情恶化而转至英国治疗,经实验室确诊为感染了一种新型的冠状病毒^[3]。在此之前,一位沙特阿拉伯男性已经被证实感染了同样的冠状病毒而死亡^[4];而在此之后,越来越多的实验室确诊病例相继在不同国家和地区被报道。截至2013年7月29日,世界卫生组织已累计通报了91例该新病毒的感染病例,其中46例死亡,病死率超过50%;病毒已扩散到多个中东和欧洲国家,包括约旦、卡塔尔、沙特阿拉伯、阿拉伯联合酋长国、法国、德国、意大利、突尼斯和英国等^[5]。更有切实的证据表明,这一新型冠状病毒具备一定的人际传播能力^[6]。一时间,其高病死率、人传人的能力以及向其他国家蔓延的趋势引起各方重视和担忧。尽管早先该病毒曾被称作hCoV-EMC(human coronavirus-erasmus medical center),2012年5月15日,国际病毒分类委员会正式将该病毒命名为MERS-CoV^[7]。

为了更有效地应对MERS-CoV对公共卫生安全所造成的严重威胁,认识并解析其致病机理是重中之重。MERS-CoV感染引起的临床症状与SARS-CoV非常相似,包括高烧、呼吸急促、呼吸困难、急性呼吸窘迫综合征等,并有很高几率伴发急性肾衰竭^[8-9]。但全基因组序列分析表明,MERS-CoV不同于SARS-CoV。依据目前的分类原则,冠状病毒包括 α -、 β -和 γ -冠状病毒属^[1]。SARS-CoV与MERS-CoV虽同属 β -冠状病毒属,在进化上却隶属于不同的亚群,前者为2b亚群的成员,而后者属于2c亚群,与冠状病毒蝙蝠分离株HKU4和HKU5等亲缘关系最近^[10-11]。这也提示我们,MERS-CoV很可能来源于蝙蝠。在组织嗜性上,与目前已知的其他人类冠状病毒相比,MERS-CoV表现出更广泛的感染能力^[12];更有证据表明,MERS-CoV的复制周期快于SARS-CoV^[13]。这些特征很可能与这一新型冠状病毒的极高致死率密切相关。此外,MERS-CoV还表现出更广泛的种属选择性。有研究显示,MERS-CoV在灵长类、猪、兔、果子狸和蝙蝠来源的细胞系内均能有效复制^[12]。在宿主的免疫应答方面,MERS-CoV感染并不会有效诱导干扰素和促炎性因子的产生;与之对应的,I型干扰素可以有效抑制该病毒在体外

培养的肺组织中的复制^[14]。

上述研究开启了人们认识MERS-CoV致病机理的大门。但作为囊膜病毒,MERS-CoV识别何种宿主细胞分子作为受体,如何介导病毒的黏附和侵入从而起始感染,是致病机理研究中不可或缺的一环。虽然新近的研究显示,SARS病人的康复期血清对MERS-CoV存在一定的交叉反应^[15],提示我们两者的表面刺突蛋白可能存在一定的相似性,但MERS-CoV并不能利用SARS-CoV的受体血管紧张素转换酶2(angiotension converting enzyme 2, ACE2)侵入细胞^[16]。2013年3月14日,一个荷兰的研究小组首先鉴定了MERS-CoV在宿主细胞的功能性受体^[17]。研究人员发现,MERS-CoV的刺突蛋白可以特异性地与人二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase 4, DPPIV, 又称CD26分子)相互作用;人为表达CD26分子可以使非敏感细胞对MERS-CoV变得易感;而CD26的抗体能够有效阻断病毒的感染^[17]。这一工作极大地深化了人们对该病毒致病性和宿主范围的认识,但更深层的问题随之而来,MERS-CoV识别该受体分子的分子机制为何?这一问题的研究对于解析MERS-CoV的侵入机制和有效药物靶点的发现都具有重要意义。

为了解决这一问题,首先需要鉴定病毒的刺突蛋白中与CD26分子发生特异相互作用的部分,即病毒的受体结合域(receptor binding domain of MERS-CoV, MERE-RBD)。与其他的冠状病毒类似,MERE-CoV的刺突蛋白(spike, S)在宿主细胞中也会被加工成S1和S2两个亚基^[18],其中S1负责结合宿主的受体分子,而S2含有典型的七肽重复区,通过形成六螺旋簇结构而介导病毒与宿主细胞的膜融合^[19]。根据前人的研究,冠状病毒的S1亚基又可以进一步分成N-端和C-端两个结构域:有些冠状病毒,如鼠肝炎病毒^[20],利用N-端结构域结合受体分子;而目前已知的更多的冠状病毒,包括SARS-CoV^[21]、人冠状病毒NL63^[22]等,则通过C-端结构域识别受体。据此,我们分别制备了MERS-CoV刺突分子的S1、N-端和C-端蛋白,并通过流式分析测定各蛋白对于细胞表面CD26分子的结合。结果显示,MERS-CoV刺突的C-端蛋白(367-606位氨基酸)能够识别CD26^[23]。进一步的结合动力学研究表明,这一C-端蛋白特异性结合CD26分子,两者的亲和力(K_d)高达16.7 nmol/L;但对于SARS-CoV的受体ACE2则没有任何互作(图1A)。

受体结合域的成功鉴定为我们进一步剖析

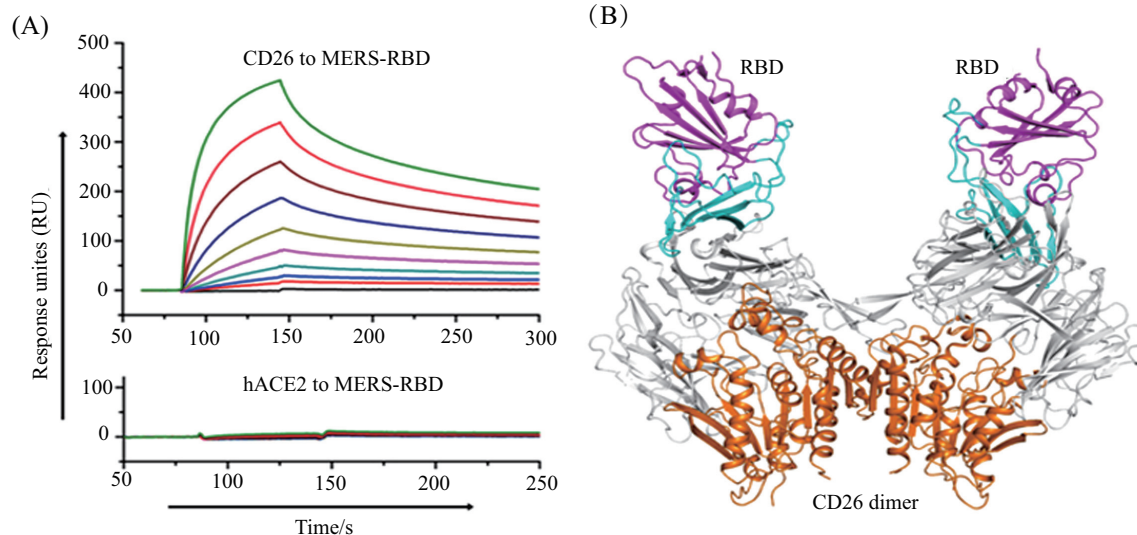
MERS-CoV识别CD26的分子机制奠定了基础。我们的目标是通过结构生物学手段,在分子层面直接“观察”MERS-RBD结合CD26的互作细节。我们首先解析了MERS-RBD的高分辨率晶体结构。整体上,MERS-RBD可分为“核心”和“外部”两个亚结构域。前者为 α/β 结构,包括一个由5个反向平行的 β -折叠片形成的片层,以及围绕在片层两侧的4个 α -螺旋、2个 3_{10} -螺旋和2个短 β -折叠片等二级结构元件;在这一“核心”的内部存在3对二硫键,对于其结构的稳定性起着关键作用。而后者是一个 β -折叠为主的结构,主体为3个长折叠片和一个短折叠片以反向方式排列所形成的片层。这一片层的一侧接触“核心”亚结构域,而另一侧则几乎完全暴露于溶剂^[23]。

我们进一步解析了MERS-RBD与CD26的复合物晶体结构。与之前对CD26的结构研究一致,在我们所解析的结构中,该受体分子由两个结构域组成,包括一个 α/β 催化结构域和一个由8-桨叶片(blade I-VIII)所组成的“ β -螺旋桨”样结构域;MERS-RBD识别CD26分子的IV、V桨叶片。在宿主细胞表面,CD26以同源二聚体的形式存在,而MERS-RBD结合在CD26分子的远膜端,形成类似U-型的分子结构(图1B)。

位于蛋白的“外部”亚结构域中,MERS-RBD利用上述提到的片层中暴露于溶剂的一侧结合受体。细致的分析表明,MERS-RBD与CD26的结合在两分子中的包埋面积均超过 $1\ 100\ \text{\AA}^2$,这从分子层面揭示了两者间高亲合力的结构基础;在病毒配体识别受体的过程中,侧链基团形成的氢键和盐桥等亲水相互作用至关重要。与这一结合模式相一致,当我们将RBD中的关键氨基酸突变后,该病毒配体即失去结合CD26分子的能力^[23]。

有趣的是,虽然MERS-CoV与SARS-CoV的刺突蛋白在一级序列上同源性很低,但两者的RBD结构却存在一定的相似性^[21,23]。结构比对显示,两种冠状病毒RBD的“核心”亚结构域高度同源;但“外部”亚结构域则差异显著。这提示我们,前者很可能作为结构支架而在进化中被保留;后者由于趋异进化而形成完全不同的结构域,以实现一些病毒特异的致病过程,如受体识别。

通过上述结构和功能研究,我们成功破译了MERS-CoV识别细胞受体的分子机制。这一新型冠状病毒对公共卫生安全的潜在威胁亟需特异、高效的抗病毒药物。阻断病毒的结合和侵入,防患于未然,是最有效的抗病毒手段之一。在分子层面上



A: 表面等离子共振的结果。MERS-RBD以高亲和力与CD26分子相互作用,但不结合SARS-CoV的受体hACE2; B: MERS-RBD与CD26的复合物晶体结构。CD26以二聚体形式存在于细胞表面,MERS-RBD结合于CD26分子的远膜端,形成U形的分子结构。

A: an SPR assay. MERS-RBD can specifically bind to CD26, but not to the SARS-CoV receptor ACE2, with high affinity; B: the complex structure between MERS-RBD and CD26. CD26 is present on the cell surface as homodimers. MERS-RBD locates at the distal-tip of the receptor dimer, forming an overall “U”-shaped structure.

图1 MERS-CoV与宿主受体分子CD26的相互作用特征(根据参考文献[23]修改)

Fig.1 Characterization of the interaction between MERS-CoV and its cellular receptor CD26 (modified from reference [23])

对病毒配体/受体互作细节的分析, 为我们设计靶向病毒侵入的小分子药物提供了重要的参考。同时功能性RBD蛋白的成功表达和制备, 也为疫苗设计奠定了基础。上述研究还为我们更深入了解MERS-CoV的致病机制指出了新的研究方向。比如我们发现, MERS-RBD与腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)在CD26分子中的识别位点完全重叠^[23-24], 这意味着病毒蛋白结合CD26后, 将竞争性地抑制ADA对该受体分子的结合。有研究表明, ADA/CD26的互作是T细胞活化中非常重要的共刺激信号^[25]。因此, MERS-CoV很可能通过竞争ADA对CD26的结合而对宿主的免疫应答进行“操纵”。

参考文献 (References)

- Lai MM, Perlman S, Anderson LJ. *Coronaviridae* in Fields Virology (Knipe DM, ed.), 2007, 1305-36.
- World Health Organization. Cumulative Number of Reported Probable Cases of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). <http://www.who.int/csr/sars/country/en/>.
- United Kingdom Health Protection Agency. Acute respiratory illness associated with a new virus identified in the UK. <http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2012PressReleases/120923acuterespiratoryillnessidentified/>.
- International Society for Infectious Diseases. NOVEL CORONAVIRUS-SAUDI ARABIA: HUMAN ISOLATE. <http://www.promedmail.org/direct.php?id=20120920.1302733>.
- World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)-update. http://www.who.int/csr/don/2013_07_29/en/index.html.
- Breban R, Riou J, Fontanet A. Interhuman transmissibility of Middle East respiratory syndrome coronavirus: Estimation of pandemic risk. *Lancet* 2013; 382(9893): 694-9.
- de Groot RJ, Baker SC, Baric RC, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, *et al.* Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the coronavirus study group. *J Virol* 2013; 87(14): 7790-2.
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012; 367(19): 1814-20.
- Birmingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, *et al.* Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill* 2012; 17(40): 20290.
- van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, *et al.* Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio* 2012; 3(6): e00473-12.
- Lu G, Liu D. SARS-like virus in the Middle East: A truly bat-related coronavirus causing human diseases. *Protein Cell* 2012; 3(11): 803-5.
- Chan JF, Chan KH, Choi GK, To KK, Tse H, Cai JP, *et al.* Differential cell line susceptibility to the emerging novel human betacoronavirus 2c EMC/2012: Implications for disease pathogenesis and clinical manifestation. *J Infect Dis* 2013; 207(11): 1743-52.
- Kindler E, Jónsdóttir HR, Muth D, Hamming OJ, Hartmann R, Rodriguez R, *et al.* Efficient replication of the novel human betacoronavirus EMC on primary human epithelium highlights its zoonotic potential. *MBio* 2013; 4(1): e00611-12.
- Chan RW, Chan MC, Agnihotram S, Chan LL, Kuok DI, Fong JH, *et al.* Tropism of and innate immune responses to the novel human betacoronavirus lineage C virus in human *ex vivo* respiratory organ cultures. *J Virol* 2013; 87(12): 6604-14.
- Chan KH, Chan JF, Tse H, Chen H, Lau CC, Cai JP, *et al.* Cross-reactive antibodies in convalescent SARS patients' sera against the emerging novel human coronavirus EMC (2012) by both immunofluorescent and neutralizing antibody tests. *J Infect* 2013; 67(2): 130-40.
- Müller MA, Raj VS, Muth D, Meyer B, Kallies S, Smits SL, *et al.* Human coronavirus EMC does not require the SARS-coronavirus receptor and maintains broad replicative capability in mammalian cell lines. *MBio* 2012; 3(6): e00515-12.
- Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Müller MA, Dijkman R, *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 2013; 495(7440): 251-4.
- Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Krämer-Kühl A, *et al.* The spike-protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2 and is targeted by neutralizing antibodies. *J Virol* 2013; 87(10): 5502-11.
- Gao J, Lu G, Qi J, Li Y, Wu Y, Deng Y, *et al.* Structure of the fusion core and inhibition of fusion by a heptad repeat peptide derived from the S protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2013; 87(24): 13134-40.
- Peng G, Sun D, Rajashankar KR, Qian Z, Holmes KV, Li F. Crystal structure of mouse coronavirus receptor-binding domain complexed with its murine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(26): 10696-701.
- Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 2005; 309(5742): 1864-8.
- Wu K, Li W, Peng G, Li F. Crystal structure of NL63 respiratory coronavirus receptor-binding domain complexed with its human receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(47): 19970-4.
- Lu G, Hu Y, Wang Q, Qi J, Gao F, Li Y, *et al.* Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature* 2013; 500(7461): 227-31.
- Weihofen WA, Liu J, Reutter W, Saenger W, Fan H. Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J Biol Chem* 2004; 279(41): 43330-5.
- Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: A multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2001; 54(3): 249-64.