

病毒感染因子在 APOBEC3G 抗病毒中的拮抗作用

王运华 张耀洲*

(浙江理工大学生命科学院, 生物化学研究所, 杭州 310018)

摘要 病毒感染因子(virion infectivity factor, Vif)是人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的6个辅助蛋白之一,是病毒进行有效复制所必需的。由于Vif功能的复杂性以及对相应复合体系的不了解,一直以来,对Vif的研究进展缓慢。直到2002年发现载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽样蛋白3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G, APOBEC3G)是存在于细胞内的一种天然抗病毒因子后,Vif的功能才被逐步阐明。APOBEC3G主要通过嘧啶脱氨基活性使HIV-1的负链DNA在逆转录过程中发生致死性超突变,从而起到抗病毒作用。HIV-1基因编码Vif来拮抗APOBEC3G,二者在宿主细胞内达到动态平衡。Vif通过介导APOBEC3G降解、减少在胞内的表达、阻碍其向病毒粒子的包装以及促使其装配成无活性的高分子质量复合体等多种途径起到中和作用。对Vif/APOBEC3G相互作用及其调节机制的进一步研究,将为新型抗HIV-1病毒药物的研制与开发提供理论依据。

关键词 人免疫缺陷病毒;病毒感染因子;载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽样蛋白3G

病毒感染因子(virion infectivity factor, Vif)是人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的6个辅助蛋白之一,由192个氨基酸组成,分子量约为23 kDa。该蛋白质由基因组单剪接mRNA翻译,在病毒感染后期聚集,具有高保守性^[1]。除马传染性贫血病毒(equine infectious anemia virus, EIAV)和一些简单的逆转录病毒外,Vif广泛存在于包括HIV-1在内的很多逆转录病毒中。在很长的一段时间内,人们对Vif的功能知之甚少,直到发现载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽样蛋白3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G, APOBEC3G)的天然抗病毒作用后,Vif的功能才被逐步阐明。宿主体内固有的APOBEC3G为一种胞苷脱氨酶,可有效阻断HIV-1病毒复制^[2],而HIV-1基因则编码Vif来拮抗APOBEC3G的抗病毒作用^[3],二者在体内处于动态平衡。

1 APOBEC3G的发现

很早以前,人们就发现Vif缺陷型的HIV-1在体内无法复制,但在一些肿瘤细胞系中却可以进行。根据HIV-1在细胞中的复制是否依赖于Vif,将细胞分为允许性细胞和非允许性细胞^[4]。2002年,Sheehy等^[2]利用差减杂交法分析非允许性细胞系CEMR和允许性细胞系CEM2ss的cDNA文库,发现非允许性

细胞系中存在一种特异的细胞因子,并将其命名为CEM15。后来证实CEM15就是APOBEC3G。更重要的是,在允许性细胞系中过表达APOBEC3G,细胞系转变成非允许性,恢复了对Vif缺失型HIV-1的抑制作用^[2]。这些结果表明,APOBEC3G是非允许性细胞系抑制Vif缺失型HIV-1复制的决定因素^[5]。

2 APOBEC3G的抗病毒机制

APOBEC3G是一种核酸编辑酶——胞嘧啶脱氨酶家族的成员。这个蛋白质家族是一类病毒复制的天然抑制物,除APOBEC3G外,还包括APOBEC3B、APOBEC3F等^[6-10]。它们通过嘧啶脱氨基活性和知之甚少的非催化机制起到抗病毒作用^[11,12]。

APOBEC3G的脱氨基作用研究的比较清楚。病毒出芽时,APOBEC3G包裹到子代病毒,随子代病毒感染进入宿主细胞,从而影响病毒复制^[3,11](图1a,图1b)。病毒复制过程中,病毒基因组RNA逆转录产生cDNA负链,这时,APOBEC3G诱发负链上的胞嘧啶(C)大量脱氨基突变为尿嘧啶(U),即C→U突变,继

收稿日期: 2007-11-19 接受日期: 2008-02-21

国家重点基础研究发展规划(973计划)(No.2005CB121006)、国家科技支撑计划项目(No.2006BAI01B04)、国家自然科学基金(No.30740015, No.30600323, No.30670447)和浙江省自然科学基金重点项目(No.Y205449, Y304122)资助

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-86843198, E-mail: yaozhou@chinagene.com

而导致以负链为模板的 cDNA 正链大量鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A), 即产生 G → A 超突变^[13-16]。C → U 的转变可能会导致以下结果: (1) 宿主尿嘧啶 DNA 糖基化酶(uracil-DNA glycosylase, UDG)识别并降解新合成病毒 DNA 链中的尿嘧啶, 产生无嘌呤-无嘧啶核酸内切酶作用下被分割和降解^[17]; (2) 含有尿嘧啶的负链 cDNA 在合成正链时受阻; (3) 若反转录过程逃过上述机制, 合成了含有尿嘧啶的双链 cDNA, DNA 修复机制启动, 将 U 变为 T, 那么在正链 cDNA 上就会形成 G → A 超突变, 大量 G → A 超突变可造成病毒基因终止密码子出现的频率大大增加^[18], 使所合成的蛋白质功能丧失或降低, 以致病毒活性丧失。

最近的研究表明, APOBEC3G 的抗病毒能力并非与脱氨酶活性直接相当, APOBEC3G 还存在着非催化机制来起到抗病毒作用。Kate 等^[19]将人源的 APOBEC3G 和 APOBEC3F 进行嵌合, 嵌合蛋白保留了脱氨基能力, 但抗 HIV-1 活性却被严重削弱了。

3 Vif 对 APOBEC3G 的中和作用

HIV-1 基因编码 Vif 来拮抗 APOBEC3G 的抗病毒作用(图 1c)。实验发现 APOBEC3G 在野生型病毒粒子中的含量较 Vif 缺失型病毒要少 100 倍^[3,11,20-23], 将 Vif 和 APOBEC3G 的编码基因转染到人或猴的细胞中进行瞬时表达, 结果显示 APOBEC3G 的蛋白质水平较没有 Vif 时低了 3~10 倍^[3,11,20-25]。活性位点缺失的 Vif 突变体能和 APOBEC3G 在细胞内广泛共表达, 同时 Vif 突变体细胞中 APOBEC3G 的表达水平没有发生明显变化。免疫共沉淀实验进一步说明 Vif 与 APOBEC3G 能相互结合或通过共同媒介物发生相互作用^[3,11,20,21,23]。

Vif 对 APOBEC3G 的中和作用表现在多个方面。首先, Vif 能直接导致 APOBEC3G 的降解, 这是 Vif 生物功能的关键机制。脉冲分析显示 Vif 能导致 APOBEC3G 的迅速降解, 将其半衰期缩短至 2 min^[23], 也有报道称 Vif 存在时 APOBEC3G 的半衰期为 0.5~4 h^[3,21,22,24]。其次, Vif 能阻碍 APOBEC3G 包装到子代病毒。Vif 可以屏蔽 APOBEC3G 上的病毒结合区域^[24-27], 从而将 APOBEC3G 排除在病毒粒子之外。第三, Vif 能下调 APOBEC3G mRNA 的翻译, 进一步减少了细胞中 APOBEC3G 的蛋白质水平^[3,20-22,24,25]。此外, APOBEC3G 在未有效降解的情况下, Vif 也能对其起到中和作用。Vif 可以促进细胞内以低分子质量

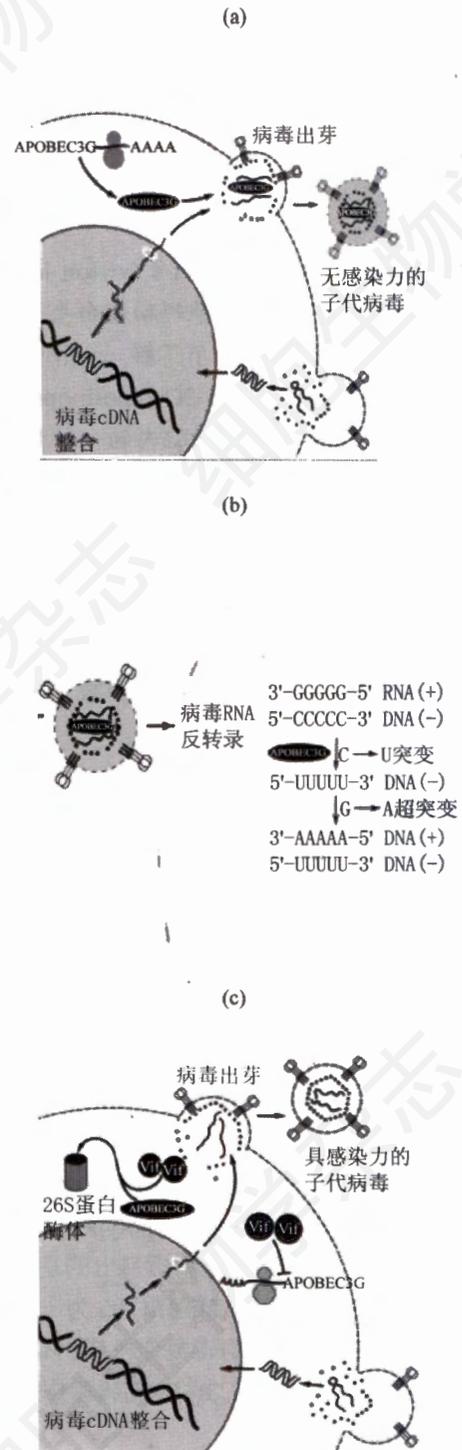


图1 APOBEC3G 的抗病毒机制及 Vif 对 APOBEC3G 的中和作用^[11,12]

a、b: Vif 缺陷型 HIV-1 感染细胞; c: Vif 野生型 HIV-1 感染细胞。

(low molecular mass, LMM)形式存在的内源性 APOBEC3G 装配成高分子质量 (high molecular mass, HMM)的 APOBEC3G 复合体^[28], 其抗病毒活性也随之失去。HMM APOBEC3G 复合体是一类核糖核蛋白复

合体, 虽然 Vif 可促进 HMM 复合体的形成, 但并不是 HMM 复合体的组成部分^[28], 其分子机制仍不清楚。

4 Vif 介导 APOBEC3G 降解的作用机制

Vif 介导的 APOBEC3G 降解是通过泛素途径实现的 (图 2)。Yu 等^[24,27]报道 Vif 特异性结合 elonginB、elonginC、Cullin5、Rbx-1 以及 APOBEC3G。突变形成研究表明, Vif 至少包括两个决定性的功能域。一个为 N 端结构域, 参与和 APOBEC3G 的结合^[23,25]; 另一个是 C 端结构域, 含有保守的 SLQ (Y/F) LA $\phi\phi\phi\phi$ (ϕ 为疏水氨基酸) 模体, 与细胞因子信号抑制物 (suppressors of cytokine signaling, SOCS) 的 BC-box 区十分相似, 该模体的功能是连接 elonginB、elonginC、Cullin5 及 Rbx-1 等泛素连接酶 E3 复合物。SLQ (Y/F) 模体的突变将导致 elonginB、elonginC、Cullin-5 从复合体上解离, 从而使 APOBEC3G 不能被降解, 但对 Vif 与 APOBEC3G 的结合没有影响^[24,27]。进一步的研究发现, Vif 还存在一个 Zn²⁺ 结合的 H-X(5)-C-X(17-18)-C-X(3-5)-H 模体, 选择性招募 Cullin5^[29,30]。HCCH 模体内 Cys、His 的位点分布高度保守^[29,30], 极小的改变都会使 Vif 失去选择性招募 Cullin5 的功能。最新的观点认为, Vif 用病毒特异性的 SLQ (Y/F) LA 模体招募 elonginB、elonginC, 而 HCCH 模体选择性招募 Cullin5 及 Rbx-1, 形成 E3 泛素连接酶复合物, 最终使 N 端连接的 APOBEC3G 多泛素化后进入 26S 蛋白酶体降解^[24,27,29,30]。

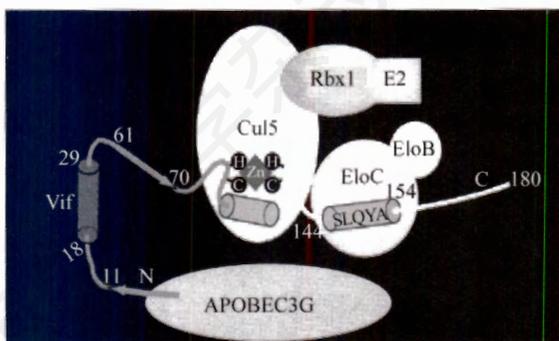


图 2 Vif 通过泛素-蛋白酶体途径降解 APOBEC3G^[24,27,29,30]

5 Vif 研究的应用前景

Vif 与 APOBEC3G 相互作用机制的阐明, 为艾滋病的治疗与预防指明了新的方向^[31]。HIV-1 和其他逆转录病毒依靠其极高的遗传突变率来逃避宿主细

胞的免疫系统。这种突变率已达到维持其成活的阈值, 更多的突变将影响到病毒的成活。因此, Vif 介导的 APOBEC3G 泛素降解途径的阻断, 甚至是轻微受阻都将有效增加病毒突变, 降低病毒的适应性, 达到阻止病毒复制的效果。干扰 Vif 和 APOBEC3G 的相互作用构成了抗病毒药物开发的理论基础^[31], 原则上可以开发出一类小分子的蛋白酶体抑制物, 选择性地阻断 Vif 与 APOBEC3G 的相互作用。也可特异性阻断 Vif 上的保守性模体与 elonginB/elonginC、Cullin5 的相互作用, 从而恢复 APOBEC3G 的抗病毒活性^[5,12]。此外, 也可试图增加存在于细胞内的 APOBEC3G 水平^[31]。那些对 APOBEC3G 的表达起调节作用的相关因子以及那些限制 APOBEC3G 进入子代病毒的因子都可作为提高 APOBEC3G 抗病毒活性的研究目标。

参考文献(References)

- [1] Lee SK *et al. Blood*, 2005, **106**: 818
- [2] Sheehy AM *et al. Nature*, 2002, **418**: 646
- [3] Stopak K *et al. Mol Cell*, 2003, **12**: 591
- [4] Strebel K *et al. Nature*, 1987, **328**: 728
- [5] Rose KM *et al. Trends Mol Med*, 2004, **10**: 291
- [6] Bishop KN *et al. Curr Biol*, 2004, **14**: 1392
- [7] Liddament MT *et al. Curr Biol*, 2004, **14**: 1385
- [8] Zheng YH *et al. J Virol*, 2004, **78**: 6073
- [9] Wiegand HL *et al. EMBO J*, 2004, **23**: 2451
- [10] Doehle BP *et al. Virology*, 2005, **339**: 281
- [11] Mariani R *et al. Cell*, 2003, **114**: 21
- [12] Chiu YL *et al. Trends Immunol*, 2006, **27**: 291
- [13] Harris RS *et al. Cell*, 2003, **113**: 803
- [14] Mangeat B *et al. Nature*, 2003, **424**: 99
- [15] Lecossier D *et al. Science*, 2003, **300**: 1112.
- [16] Zhang H *et al. Nature*, 2003, **424**: 94
- [17] Schrofelbauer *et al. J Virol*, 2005, **79**: 10978
- [18] Yu Q *et al. Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11**: 435
- [19] Bishop KN *et al. J Virol*, 2006, **80**: 8450
- [20] Sheehy AM *et al. Nat Med*, 2003, **9**: 1404
- [21] Mehle A *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 7792
- [22] Kao S *et al. J Virol*, 2003, **77**: 11398
- [23] Marin M *et al. Nat Med*, 2003, **9**: 1398
- [24] Yu X *et al. Science*, 2003, **302**: 1056
- [25] Conticello SG *et al. Curr Biol*, 2003, **13**: 2009
- [26] Liu B *et al. Virology*, 2004, **78**: 2072
- [27] Yu Y *et al. Genes Dev*, 2004, **18**: 2867
- [28] Goila-Gaur R *et al. Virology*, 2008, **372**: 136
- [29] Luo K *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 11444
- [30] Xiao Z *et al. J Mol Biol*, 2007, **373**: 541
- [31] Soros VB *et al. Curr HIV/AIDS Dis Rep*, 2007, **4**: 3

Antagonistic Effect of Virion Infectivity Factor and APOBEC3G in the Intrinsic Antiretroviral Defense

Yun-Hua Wang, Yao-Zhou Zhang*

(*Institute of Biochemistry, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tec University, Hangzhou 310018, China*)

Abstract The virion infectivity factor (Vif) is one of the six human immunodeficiency virus (HIV) accessory proteins. It is essential for efficient viral replication. For a long time, the progress in Vif function is limited because the complexity of its function and correspondingly complex systems are not clear. Until 2002, some studies have revealed the apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is a potent intrinsic inhibitor of retroviral replication. Vif function has been rapidly elucidated. APOBEC3G blocks the productive infection of HIV-1 mainly through cytidine deaminase activity. APOBEC3G effectively halts HIV replication by lethal dC to dU editing and dG to dA hypermutation during the reverse transcription. Retroviruses have evolved Vif to counter the antiretroviral action of APOBEC3G. Firstly, Vif can directly induce APOBEC3G rapid degradation via the ubiquitin-proteasomal pathway. Secondly, Vif inhibits the translation of APOBEC3G mRNA, further reducing the enzyme within the cell. In addition, Vif might promote the transition of APOBEC3G from low molecular mass (LMM) to high molecular mass (HMM) conformations, thereby defeats the antiviral activity of APOBEC3G. The further research on the reaction of Vif/APOBEC3G will provide the theoretical basis for the antiviral drug development.

Key words human immunodeficiency virus; virion infectivity factor; apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G

Received: November 19, 2007 Accepted: February 21, 2008

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2005CB121006), the National Key Technologies R&D Program (No.2006BAI01B04), the National Natural Science Foundation of China (No.30740015, No.30600323, No.30670447), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y205449, No.Y304122)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86843198, E-mail: yaozhou@chinagene.com