

分子伴侣在病毒感染中的作用

刘菲¹, 程安春¹, 曾智勇² (1. 四川农业大学 动物科技学院 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 动物科技学院 动物生物技术中心四川省重点实验室, 四川 雅安 625014)

关键词: 分子伴侣; 病毒; 感染

中图分类号: Q 939.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-4545(2006)01-0106-05

随着蛋白质研究技术的不断发展, 数以百种的蛋白质三维结构已研究得较为清楚, 但对于这些蛋白质折叠成天然构象的途径和机制所知甚少。通常认为蛋白质的一级结构决定了蛋白质的三级和四级结构, 但近年来研究表明, 在很多蛋白质的折叠与装配过程中, 有其他蛋白质或酶的参与, 其中分子伴侣就是目前研究得最多、最热的一种。病毒是细胞内寄生物, 分子伴侣与病毒的增殖过程密切相关, 从病毒基因组复制的起始、转录的进行、翻译的完成到病毒粒子的装配成熟, 甚至病毒成分在宿主体内的转运都有分子伴侣的参与。随着病毒与分子伴侣相互关系研究的深入, 产生了抗病毒的又一个可能的途径。

1 分子伴侣概念与种类

分子伴侣 (molecular chaperones) 是一类在进化上非常保守的蛋白质家族, 它能与结构、大小、定位和最终功能都不相同的蛋白质非特异性结合, 催化介导这些蛋白质特定构象的形成, 在生物体内起着稳定新生蛋白质、辅助其他蛋白质正确折叠、组装、转运甚至降解的作用, 对蛋白质功能的发挥具有重要意义。分子伴侣的概念是由 Laskey 于 1978 年首先提出并使用的, 他在研究非洲爪蟾核小体形成时发现, 在 DNA 与组蛋白结合形成核小体的过程中, 必须依赖一种酸性核蛋白 (nucleoplasmin) 的参与才能完成其核小体的装配^[1]。体外试验表明, 组蛋白只有与过量的酸性核蛋白混合后, 才能与后加入的 DNA 自我组装形成核小体结构, 但最终形成的核小

体中并没有酸性核蛋白。当仅把 DNA 与组蛋白混在一起时, 并不能自我组装成核小体结构, 而是形成沉淀。

这一概念的提出, 使经典的蛋白质折叠“自组装”学说受到挑战, 从而产生了蛋白质折叠的“辅助性组装”学说, 即新生肽链折叠并组装成有功能的蛋白质并非都能自发完成, 在相当多的情况下需要其他如分子伴侣和折叠酶等辅助蛋白质的帮助, 进而使人们对蛋白质在折叠途径或折叠识别、组装问题上的认识得到了进一步的完善。

分子伴侣存在于细胞内的各个部位, 在序列上没有相关性, 能辅助和参与细胞内蛋白质的正确折叠、组装、分解和跨膜运动, 影响蛋白质点阵、病毒的复制及转录活性等。应激情况下, 有些分子伴侣可阻止蛋白质降解, 促进蛋白质的复性, 稳定未折叠的蛋白质中间物, 阻止蛋白质聚集物的形成。分子伴侣本身并不包括控制正确折叠所需的构象信息, 只是阻止非天然多肽链内部的或相互间的非正确相互作用, 因而它们能提高折叠反应的产率而不一定能提高其速率^[2]。迄今为止发现的大多数的分子伴侣属于热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 的范畴, 大致可主要分为伴侣素家族 (chaperonin, Cpn), 热休克蛋白 70 家族 (HSP 70 family), 热休克蛋白 90 家族 (HSP 90 family) 3 类非常保守的蛋白家族。

1.1 伴侣素家族 (Cpn) Cpn 家族具有独特的双层 7~9 元环状结构的寡聚蛋白, 它们以 ATP 依赖方式促进体内正常和应激条件下蛋白质折叠^[3]。Cpns 又可分为 GroEL (Hsp60) 家族和 TrC 家族。GroEL 蛋白由双层相对分子质量为 60 000 的 7 个亚基形成圆环组成, 在一种辅助因子 (如 *E. coli* 中的 GroEs) 的协同作用下, 在体内与非天然的多肽结合并辅助其重折叠。ATP 酶的循环使 GroEL 的底物结合面在亲水型和疏水型之间转化, 从而使 GroEL 蛋白发挥不同的功能。除叶

收稿日期: 2004-10-25

基金项目: 四川省重点建设学科资助项目 (SZD0418)

作者简介: 刘菲 (1971-), 男, 讲师, 博士。

Effects of Cysteamine Supplementation in Ration of Broilers on Carcass Performance

GU You-fang, CHEN Hui-liang, ZHAO Yan (Anhui Technical Teachers College, Fengyang, Anhui 233100, China)

Abstract One hundred and forty four of 1 day-old broilers were selected and divided into 4 groups at random of 36 broilers each. Cysteamine (CS) was added at 0, 50, 100, 150 mg/kg in basic ration separately. Then the broilers were slaughtered at 2, 4, 6, 8 weeks. Results: (1) The supplementation of CS decreased the palatability of the feeds. (2) The percentage of dressed weight, percentage of half eviscerate yield and percentage of eviscerated yield increased with the dosage. (3) At the sixth weekend and eighth weekend, the daily gain and feeds efficacy in 50 mg/kg BW group were all the best, the daily gain increased by 22.9%, 17.8% and the ratio of meat to feeds decreased by 15.7%, 3.5%, respectively.

Key words: basic ration; cysteamine; carcass performance; broilers

绿体中的类似物外, GroEL 蛋白是由应激反应诱导的。Trc 型存在于古细菌和真核细胞质中, 由双层相对分子质量 55 000 的 8 或 9 个亚基形成圆环组成, 没有类似 GroES 的辅助因子, 可以直接与细胞骨架蛋白质如 α β γ 微管蛋白、肌动蛋白及角蛋白结合, 在应激情况下, 只有古细菌中的成员能诱导产生 Trc 蛋白^[4]。

1.2 热休克蛋白 70 家族 该家族是一类相对分子质量约为 70 000, 进化上高度保守的 ATP 酶, 广泛存在于原核和真核细胞中, 包括 *E. coli* 胞浆中的 DnaK/DnaJ, 高等生物内质网中的 Bip、Hsp1、Hsp2、Hsp4 或 Hsp70, 脑浆中的 Hsp70、Hsp68 和 Ssa14p, 线粒体中的 Ssc1p、Hsp70 等^[5]。在细胞应激和非应激条件下, 它在蛋白质的从头折叠、跨膜运输、错误折叠多肽的降解及蛋白质活性的调控过程中发挥着重要的作用。在体内, Hsp70 家族成员的主要功能是以 ATP 酶的方式结合未折叠多肽链的疏水区以稳定蛋白质的未折叠状态, 再通过有控制的释放帮助其正确的折叠。

1.3 热休克蛋白 90 家族 热休克蛋白 90 家族^[6], 其相对分子质量为 90 000 左右, 包括 *E. coli* 胞浆中的 HtpG, 酵母胞浆中的 Hsp83, 果蝇胞浆中的 Hsp83, 哺乳类细胞胞浆中的 Hsp90 和内质网中的葡萄糖调节蛋白 (GRP94/ERP90) 或内质网素等。Hsp90 主要与细胞中不稳定的非活化蛋白结合, 促进其迅速活化或阻止其降解, 还可以与胞浆中的类固醇受体结合, 以封闭其 DNA 结合域, 阻碍其对基因转录调控区的激活作用, 使之保持在天然的非活性状态, 同时也使受体保持着对激素配体的高亲和力。此外, Hsp90 还通过与 Ras 信号途径中许多信号分子的结合与解离, 介导这些分子的活性与非活性形式之间的转化。

除以上 3 类非常保守的蛋白家族外, 还有如 T 受体结合蛋白、核质素、*E. coli* 的 SecB 和触发因子及 PapD、噬菌体编码的支架蛋白等。分子伴侣不仅与胞内蛋白的折叠、组装、转运、定位或分泌密切相关, 而且还与信号传导中的信号分子的活性状态与活性行为密切相关, 在细胞中发挥了重要的生理作用。

2 分子伴侣与病毒增殖的关系

细胞内蛋白质的折叠是一个复杂、易于出错的过程。病毒是细胞内寄生物, 在其增殖过程中, 伴随着大量病毒蛋白的折叠、装配和定向分配等修饰过程, 尽管许多病毒蛋白具有复杂的三级、四级结构, 但是它们仍能在宿主细胞中迅速有效地折叠、装配成适合的构象。随着研究的不断深入, 人们发现分子伴侣在病毒的不同生活周期中如病毒感染的感染、病毒基因组的复制、基因的表达、病毒糖蛋白的折叠与成熟、病毒粒子的装配等过程中起着非常重要的作用。许多真核、原核宿主的病毒可直接利用宿主细胞中的伴侣分子, 或借助宿主细胞编码病毒的伴侣分子以及一些功能蛋白, 以完成病毒增殖的许多相关过程。

2.1 分子伴侣与病毒感染发生的关系 病毒对细胞的感染既需要病毒和细胞成分的共同参与, 如病毒表面的特异蛋白和宿主细胞表面的特异性受体的相互作用, 也需要细胞和(或)病毒表面的一些非特异性的相关辅助因子的参与。Speth 等^[7]发现位于新分离的人单核细胞以及已经建立的单核细胞系和 T 细胞系表面的 Hsp60 样蛋白能与 HIV 的 gp41 蛋白结合, 这种结合可以加速病毒的感染。Sagara 等^[8]发现在人类

的 I 型亲 T 淋巴细胞病毒诱导的合胞体形成中, Hsc70 是病毒感染的受体, 是鼠成纤维细胞系和人 T 细胞系表面的病毒感染的促进因子。Hewish 等^[9]证实轮状病毒进入细胞过程中, 病毒表面的 VP4 和 VP7 蛋白在细胞的分子伴侣的作用下发生构象的变化, 这种构象的变化对病毒的感染是必需的。Guerrero 等^[10]鉴定出 Hsc70 蛋白是轮状病毒的受体蛋白之一, 针对此蛋白的抗体可阻断轮状病毒对细胞的感染, 功能性的轮状病毒受体是多个细胞表面分子包括 Hsc70 组成的复合体。但是 Hsc70 并不是在此过程中发挥作用的唯一的分子伴侣, 其他分子伴侣如 $\alpha 2$, $\alpha 4$, αv , β 整合素蛋白以及未被发现的分子伴侣参与了此过程。人的 3 型副粘病毒是通过空气传播的病原, 主要感染人的肺上皮细胞(从顶部的胞浆膜区域), Bose 等^[11]发现在细胞表面表达的核仁素是 HPV-3 进入人肺上皮细胞 A 549 细胞的必需的辅助因子, 针对核仁素的单抗或用核仁素预处理 HPV-3 可严重抑制病毒的复制。

2.2 分子伴侣与病毒 DNA 复制的关系 在病毒 DNA 的复制过程中, 除需要自身所编码蛋白质的参与外, 还要自身编码或依赖宿主细胞中如 Hsp70 (Hsc70)、DnaK、Hsp40 (DnaJ)、Hsp60 (GroEL)、Hsp90 (HtpG、Grp)、Hsp100 (C1P) 等分子伴侣的参与。DnaK、DnaJ 就是 λ 噬菌体 DNA 复制所必需的。Zylicz 等^[12]通过一定的体外研究系统得到一模型, 在模型中, 由 λ 噬菌体和大肠杆菌编码的蛋白组成了一个多组分的复制前起始复合体, 该复合体在 DnaJ 的辅助下, 排列在 λ 噬菌体 DNA 的复制起始区。接着 DnaK 与该复合体协作, 水解 ATP, 松弛多蛋白复合体, 蜗牛酶 B 发挥作用使 DNA 解旋, 从而使复制得以进行。

T 抗原分子伴侣是一类大的、多结构域、多功能的蛋白质, 在病毒感染的早期表达, 可直接参与 DNA 的复制^[13]。多瘤病毒家族的成员如多瘤病毒 (polyomavirus) 和 SV 40, 均能编码 T 抗原分子伴侣。T 抗原含有一个 J 功能域, 其主要功能是结合 Hsc70 并激活其 ATP 酶活性, T 抗原的 J 功能域突变, 将导致病毒 DNA 复制的缺陷^[14]。

Liu 等^[15]研究证明, 乳头瘤病毒复制起始蛋白中的蜗牛酶 E1 结合到复制起始位点是由细胞内的 Hsc70 伴侣分子和 Hsp40 所激发的。将上述这些分子伴侣与无细胞体系的乳头瘤病毒复制系统孵育, 可提高整个系统的复制效率。Nanda 等^[16]通过超转移和 Western-blot 分析证实线粒体内的乌头酸酶和 3 个另外的蛋白线粒体 HSP70 (mtHSP70)、HSP60、HSP40 蛋白与鼠肝炎病毒 (MHV) RNA 的 3 末端的 42 个核苷酸特异性结合, 形成一个稳定的 RNA-蛋白复合物。共免疫沉淀实验证实即使 MHV RNA 不存在, 这 4 个 MHV RNA 结合蛋白是联系在一起的, 因此这几个蛋白参与了 MHV 基因组复制的起始^[16]。

2.3 分子伴侣在病毒转录中的作用 同病毒 DNA 复制一样, 某些病毒在转录过程中也需要分子伴侣的参与。SV 40 这方面的研究较多, 也研究得较为清楚。SV 40 的大 T 抗原与细胞内的转录抑制复合体 pRB-E2F 结合并介导其松弛, 使宿主细胞的转录得以顺利进行。转录因子 E2F 能反式激活许多进入细胞周期 S 期所需的基因, 从而启动转录; 但当 E2F 与 pRB (或相关蛋白 p130 或 p107) 结合形成后, 其启动转录的功能受到阻遏, 使得转录无法进行。因此大 T 抗原是衰减 pRB 对 E2F 的阻遏作用而使细胞转型所必需的分子伴侣^[17]。Sullivan 等^[18]认为, 大 T 抗原功能的发挥是在另一个分子伴侣 Hsp70 的辅助下完成的, E2F 从 pRB 或相关蛋白的解离是受

到 Hsp70 介导的 ATP 水解作用促进的。

麻疹病毒(MV)和犬瘟热病毒(CDV)是负链 RNA 病毒,病毒 RNA 聚合酶以核糖核蛋白 RNP(由核衣壳蛋白对病毒基因组的包裹形成)为模板,启动 RNA 的转录,Oglesbee 等^[19-20]发现热休克蛋白 HSP72 以依赖 ATP 的方式通过与 MV 和 CDV 的 RNP 的可逆性结合,提高了病毒 RNA 的转录水平。传染性软疣是一种 DNA 痘病毒,其基因编码的 MC013L 与 DnaJ 具有高度同源性,因而可能具有 DnaJ 样蛋白的功能。Chen 等^[21]利用体外结合和报告试验,发现 MC013L 与糖皮质激素和维生素 D 的报告基因相互作用而调控该病毒的转录活动。流感病毒进行初始转录时至少需要由病毒的 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白组成的核糖核蛋白复合物(vRNP),但是从病毒中分离的 vRNP 复合物并不能催化转录反应,流感病毒基因组的转录和复制依赖于宿主来源的分子。Momoose F 等^[22]应用体外 RNA 合成系统,纯化和鉴定出做为刺激流感病毒 RNA 聚合酶活性的宿主因子之一的 Hsp90。Hsp90 通过其氨基端的分子伴侣区域和高酸性的中间区域与 vRNP 复合物的 PB2 结合,使 vRNP 显现 RNA 聚合酶活性,并且 Hsp90 的高酸性中间区域还具有加强 vRNP 的 RNA 聚合酶活性的作用。Kaustubha 等^[23]通过免疫亲和柱层析,从水疱性口炎病毒感染的乳苍鼠肾细胞中纯化了 2 个 RNA 聚合酶复合物:转录酶和复制酶,发现转录酶是多蛋白复合物,包含病毒编码的 RNA 聚合酶 L 和 P, 2 个细胞蛋白-转录延长因子 1 和分子伴侣 HSP60,以及细胞 mRNA 鸟苷酰转移酶。而复制酶仅仅包含 NP、P 和 L,可见分子伴侣在病毒的转录中是必不可少的。

2.4 分子伴侣在病毒翻译中的调节作用 除了利用分子伴侣调节病毒基因转录外,一些病毒也利用分子伴侣来调节翻译。蛋白激酶(PKR)是干扰素诱导的细胞防病毒感染的机制的一部分,它通过对蛋白质合成的起始因子 eIF-2 的磷酸化而停止蛋白质的合成。流感病毒的感染可导致一种细胞蛋白-P58(IPK)的产生,P58 作为辅助分子伴侣,与 hsp/Hsc70 和 hsp40 等在内的多种分子伴侣组成复合物,通过对 PKR 蛋白的折叠而抑制其活性^[24]。Kim 等^[25]发现,在热应激条件下,HSP 蛋白促进了脑心肌炎病毒和 C 型肝炎病毒的蛋白质的翻译,这种机制对病毒在应激条件下的生存和繁殖是非常关键的,但是这种机制对脊髓灰质炎病毒是无效的。

C 型肝炎病毒的膜蛋白 E2 蛋白是一个内质网结合蛋白,与 PKR 和其作用底物转录起始因子 2(eIF2)有一段同源性很高的区域(PePHD),因此 E2 可以作为 PKR 的底物或假底物,抑制 PKR 对正常细胞翻译起始因子的抑制作用。Pavio 等^[26]发现,PKR 样的存在于 ER 内的激酶 PEKR 也与 E2 结合,并受到 E2 蛋白的抑制,病毒可通过克服细胞的 ER 应激反应而提高持续性感染的能力。

HCV 的 NS5A 蛋白能抑制细胞干扰素诱导的蛋白激酶 R(PKR)。痘苗病毒的 E3L 蛋白是 PKR 的强有力的抑制剂,E3L 缺陷的痘苗病毒(VV E3L)感染 IFN 处理过的 HeLa S3 细胞后,将导致 PKR 和 eIF2 α 的磷酸化水平的升高,He 等^[27]将痘苗病毒的 E3L 位点替代为 HCV 的 NS5A 基因后组建重组痘病毒,并感染 IFN 处理过的 HeLa S3 细胞后,将导致 PKR 和 eIF2 α 的磷酸化水平的下降。作者也观察到将 VV E3L 感染 IFN 处理的细胞后,导致 P38 有丝分裂原激活的蛋白激酶活性和 Cap-依赖的翻译起始因子 4E(eIF4E)的磷酸化水平的上升,但当细胞感染 VV NS5A 后,这种效果在下

降。因此,NS5A 除抑制 PKR 外,还抑制 p38-eIF4E 蛋白翻译途径,HCV 在感染的早期和晚期都有特定的机制维持病毒 mRNA 的翻译。

2.5 分子伴侣在病毒粒子装配中的作用 HBV 的组装需要先以其 RNA 为模板生成核蛋白复合物(RNP),包括病毒聚合酶和一段前基因组 RNA 片段 epsilon。Hu 等^[28]的研究表明,鸭的 HBV 的 RNP 的形成与细胞因子 Hsp90、p23 等的参与有关。纯化的细胞因子与病毒的反转录酶在体外能构建出有活性的 RNP 复合物。Hu 等^[29]也证实 HBV 的 RNP 的合成需要宿主细胞的一些成分参与,包括 Hsp90、p23 等。

宿主细胞编码的 HP68 蛋白是一种 RNase L 抑制剂,Concepcion 等^[30]通过在哺乳动物细胞中的显性失和在无细胞系统中的缺失以及电镜观察,发现 HP68 选择性地结合人类免疫缺陷病毒的 3 种糖蛋白 Gag、Gag-Pol 和 Vif,协助它们完成病毒粒子的装配。同时,因发现 Hsc70 包被于该病毒粒子中,而认为 Hsc70 也可能在 HIV 粒子的组装中发挥着重要作用。

大肠杆菌编码的 GroES and GroEL 是 λ 噬菌体和 T4 噬菌体的许多蛋白质的正确折叠的分子伴侣,但是 T4 噬菌体和 pRB49 噬菌体也能分别编码它们自己的 GroES 同系物 Gp31 和 CoCo。虽然这 2 个蛋白在氨基酸水平上与 GroES 仅具微弱的同源性(Gp31 仅 14% 的同源性),但结构和功能研究显示,Gp31 及 CoCo 能代替 GroES,作为 GroEL 的辅伴侣分子促进噬菌体的某些蛋白质如衣壳蛋白的组装^[31]。但这些病毒为何编码其自身的 GroES 同系物,目前仍不十分清楚,可能是 Gp31 和 CoCo 能在噬菌体的主要衣壳蛋白 Gp23 的正确折叠中帮助 GroEL,而宿主细胞编码的 GroES 却不能完成此功能^[32]。

烟草花叶病毒(TMV)的正确装配需要分子伴侣的参与,Hwang 等^[33]研究表明,细胞中的 GpE 和 GroEL/GroES 复合物促进了 TMV 的膜蛋白(CP)蛋白正确折叠和组装进病毒的核衣壳蛋白中。在 GpE 突变菌株中,可溶性 CP 的数量以及组装好的 TMV 样病毒粒子的产量比对照组低。共表达 GroEL 和 GroES 导致可溶性 TMA CP 上升 2 倍,组装好的 TMV 样病毒粒子上升 4 倍。多瘤病毒的膜蛋白 VP1 蛋白在添加钙粒子的情况下,在体外能自我组装进多形性的衣壳样结构,但多瘤病毒在体内是受到严格调控的,以便具有相同大小的病毒粒子仅仅在细胞核中形成。Chromy 等^[34]试验表明,hsc70 蛋白在调节多瘤病毒衣壳蛋白的组装中发挥作用,在病毒感染过程中,Hsc70 蛋白在翻译后紧密结合 VP1,并与 VP1 一起定位于核内。在大肠杆菌中表达的 VP1 能与原核的 Hsp70 分子伴侣 DnaK 一起被纯化出来,DnaK 与 VP1 的稳定结合在体外能抑制钙离子诱导的组装,在 ATP 存在的情况下,由 DnaK、DnaJ 和 GpE 组成的 Hsp70 系统在没有钙的情况下能进行 VP1 的组装。在猿猴病毒 40 的大 T 抗原的 J 功能域的辅助下,分子伴侣诱导的组装同样被真核细胞的 hsc70 蛋白所催化,因此应用原核或真核 hsp70 系统,多瘤病毒的衣壳蛋白的组装可以高保真性地重新起始,揭示了细胞因子在调节细胞内病毒组装中的作用。

2.6 分子伴侣在病毒粒子转运和传播中的关系 甜菜黄化病毒(BYV)编码的 p65 蛋白是一个病毒移动蛋白(MP),对 BYV 的有效传播是很重要的,也是 Hsp70 样的细胞分子伴侣类似物。Agranovsky 等^[35]通过异源互补试验,将 BYV 的 p65 基因克隆进 1 个含有 35S 启动子质粒中,并与含有报告基因

GU S 基因的转移缺陷型马铃薯 X 病毒突变株一起显微注射入烟草植物中,表达 GU S 报告基因的细胞数显著上升,说明质粒瞬间表达的 p65 蛋白显著增强了突变株在细胞中移动。将 BYV 的 p65 基因插入到大麦病毒的基因组中以代替其 MP 基因,转染植物后出现了无症状的感染,表明 BYV 的 p65 能代替马铃薯 X 病毒或大麦病毒的 MP 蛋白,在植物线形病毒的移动和传播中发挥作用。

将病毒基因组组装进病毒粒子中是植物病毒生活周期中的一个关键步骤,决定病毒是在植物内移动还是水平传播到其他的植物中。线形病毒的组装是通过 1 个主要的膜蛋白和 1 个相关的小膜蛋白完成的。线形病毒是唯一编码细胞分子伴侣类似物 HSP70h 的病毒家族, Satyanarayana 等^[36]发现 HSP70h, p61 和 2 个膜蛋白对柑橘速衰病毒(CTV)的有效组装是必需的,膜蛋白的缺失可导致病毒粒子变小,不能在原生质体中连续传代, HSP70h 和或 p61 的缺失或突变可显著降低病毒的传代次数和完整的病毒粒子的形成率,影响病毒在细胞内的运动。

病毒在植物细胞内的传播方式包括通过细胞间局部运动和通过脉管的长距离运输。甜菜黄化病毒(BYV)在细胞之间的局部移动是通过 Hsp70 的类似物(Hsp70h)介导的。应用酵母双杂交系统,体外的共免疫沉淀实验和植物共表达实验, Prokhnovsky 等^[37]发现, Hsp70h 与 BYV 的另外一个蛋白 p20 蛋白相互作用, p20 对病毒的组装和病毒在细胞之间的局部移动无关,但是对病毒的长距离运输是必要的。

B 型肝炎病毒的大 L 蛋白在内质网内运用一个新的折叠途径而获得一个双重跨膜结构。这个过程涉及与翻译同步的膜整合作用和紧接着的翻译后的转位作用,将前 S 亚区转到内质网中, Lambert 等^[38]证实 L 蛋白形态和功能上的多样性依赖于分子伴侣的作用。运用共免疫沉淀技术,观察到在哺乳动物细胞中 L 蛋白和胞液中的 Hsc70, Hsp40 以及内质网内存在的 Bip 的相互作用。当前 S 亚区的转位作用被人为的转变为共翻译模式时, L 和 Hsc70 形成的复合物将解体。意味着 Hsc70 可以作为前 S 折叠的催化剂,控制部分前 S 翻译后的转位作用。过量表达 Hsc70-刺激分子 H_{sp} 导致被包裹在内质网的胞液面的前 S 区的增加,而负调节因子 Bag-1 具有相反的作用,表明分子伴侣为蛋白质的转位调节提供了一种产生结构和功能多样性的方式。也为哺乳动物细胞的内质网在处理共翻译和翻译后底物的转位机制的动态本质提供了启示。

3 结论与展望

关于分子伴侣与病毒之间的相互作用,尚有很多问题没有研究清楚,特别是病毒是如何利用细胞中分子伴侣的机制等问题,病毒为何要广泛利用分子伴侣机制?其原因之一可能是有些病毒在进化选择压力下为保持其基因组足够小,需要利用伴侣分子帮助其完成复杂的功能。

分子伴侣疫苗已经在肿瘤免疫和治疗的基础研究方面取得了很大的进展。分子伴侣-抗原肽复合物疫苗已经被广泛用于小鼠肝癌、肺癌、黑色素瘤等的免疫治疗研究,具有较强的治疗和预防作用。

开展病毒与分子伴侣的相互关系的深入研究可能为病毒病的防控提供新的途径。Ciupitu 等^[39]将 LCMV 的 CTL 表位与 HSP70 混合免疫小鼠,诱导了有效的抗病毒免疫和产生多肽特异性 CTLs 反应。用 LCMV 攻击后,攻毒组的病毒滴度比对照组低 10~100 倍,诱导的 CTL 记忆细胞在 LCMV 感

染后可以被重新激活。该结果也表明 hsp70 可以作为佐剂和 DNA 载体,将 CTL 表位提供给抗原呈递细胞。Kum araguru 等^[40]将 HSP70 与单纯疱疹病毒(HSV)的优势免疫多肽 SSIEFARL 偶联在一起,免疫 C57BL/6 鼠后,能诱导 CD8⁺ T 细胞反应。虽然诱导的免疫反应的持续时间比 V_gB 和 HSV 低,而且免疫记忆反应也低。但是免疫后一段时间内对 HSV 的攻击能提供较高的保护。此外,现在也有人用一些小分子阻遏物作用于病毒特有的分子伴侣而达到病毒病的防治的目的,现在已有几种针对病毒特异的分子伴侣的小分子化学阻遏剂被分离^[41]。因此分子伴侣在病毒病防治上有较大的应用前景。

参考文献:

- [1] Hartl F U, Marin J. Molecular chaperones in cellular protein folding[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, 5: 92-102
- [2] Hart F U. Molecular chaperones in cellular protein folding[J]. *Nature*, 1996, 381(6 583): 571-580
- [3] Hwmm ingsen S M, Woolgotd C, Vies S M, *et al* Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly[J]. *Nature*, 1988, 333(6 171): 330-334
- [4] Liang P, MacRae T H. Molecular chaperones and the cytoskeleton[J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(13): 1 431-1 440
- [5] Ohtsuka K, Hata M. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40[J]. *Int Hyperthermia*, 1998, 123(3): 326-331
- [6] Cstuka P, Schnaider T, Soti C. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical application. A comprehensive review [J]. *Pharmacol Therap*, 1998, 79(2): 129-168
- [7] Speth C, Proh ázka Z, Mair M, *et al* A 60 kD heat-shock protein-like molecule interacts with the HIV transmembrane glycoprotein gp41[J]. *Mol Immunol*, 1999, 36: 619-628
- [8] Sagara Y, Ishida C, Inque Y, *et al* 71-Kilodalton heat shock cognate protein acts as a cellular receptor for syncytium formation induced by human T-cell lymphotropic virus type 1[J]. *J Virol*, 1998, 72: 535-541
- [9] Hewish M J, Takada Y, Coulson B S. Integrins α 2b1 and α 4b1 can mediate SA 11 rotavirus attachment and entry into cells[J]. *J Virol*, 2000, 74: 228-236
- [10] Guerrero C A, Bouyssouade D, Z árate S, *et al* Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry[J]. *J Virol*, 2002, 76(8), 4 096-4 102
- [11] Santanu Bose, Mausumi Basu, Amiya K B. Role of nucleolin in human parainfluenza virus Type 3 infection of human lung epithelial cells[J]. *J Virol*, 2004, 78(15): 8 146-8 158
- [12] Zyliz M, Ang D, Liberek K, *et al* Initiation of lambda DNA replication with purified host and bacteriophage-encoded proteins: the role of the dnaK, dnaJ and gpE heat shock proteins[J]. *EMBO J*, 1989, 8(5): 1 601-1 608
- [13] Brodsky J L, Pipas J M. Polyomavirus T antigens: Molecular chaperones for multiprotein complexes[J]. *J Virol*, 1998, 72(7): 5 329-5 334
- [14] Campbell K S, Makhov A M. DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV 40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(9): 1 098-1 110
- [15] Liu J S, Kuo S R, Makhov A M, *et al* Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11

- E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(46): 30 704-30 712
- [16] Nanda S K, Johnson R F, Liu Q, *et al* Mitochondrial HSP70, HSP40 and HSP60 bind to the 3' untranslated region of the Murine hepatitis virus genome[J]. *Arch Virology*, 2004, 149(1): 93-111.
- [17] DeCaprio J A. The role of the domain of SV 40 large T in cellular transformation[J]. *Biologicals*, 1999, 27(1): 23-28
- [18] Sullivan C S, Cantalupo P, Ppas J M. The molecular chaperone activity of simian virus 40 large T antigen is required to disrupt Rb-E2F family complexes by an ATP-dependent mechanism [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(17): 6 233-6 243
- [19] Oglesbee M J, Kenney H, Kenney T, *et al* Enhanced production of morbillivirus gene-specific RNAs following induction of the cellular stress response in stable persistent infection [J]. *Virology*, 1993, 192(2), 556-567.
- [20] Oglesbee M J, Liu Z, Kenney H, *et al* The highly inducible member of the 70kDa family of heat shock proteins increases canine distemper virus polymerase activity[J]. *J Gen Virology*, 1996, 77: 2 125-2 135
- [21] Chen N, Baudino T, MacDonald P N, *et al* Selective inhibition of nuclear steroid receptor function by a protein from a human tumorigenic poxvirus[J]. *Virology*, 2000, 274(1): 17-25
- [22] Momose F, Naito T, Yano K, *et al* Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45 306-45 314
- [23] Kaustubha R Qanungo, Daniel S, Manjula M, *et al* Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA [J]. *PNAS*, 2004, 101(16): 5 952-5 957.
- [24] Melville M W, Tan S L, Wambach M, *et al* The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(6): 3 797-3 803
- [25] Kim Y K, Jang S K. Continuous heat shock enhances translational initiation directed by internal ribosomal entry site[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(2): 224-231.
- [26] Paviou N, Romano P R, Graczyk T M, *et al* Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase PERK [J]. *J Virology*, 2003, 77(6): 3 578-3 585
- [27] Yupeng He, Seng-Lai Tan, Semih U Tareen, *et al* Regulation of mRNA translation and cellular signaling by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A [J]. *J Virology*, 2001, 75(11): 5 090-5 098
- [28] Hu J, Toft D O, Seeger C. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids[J]. *EMBO J*, 1997, 16(1): 69-78
- [29] Hu J, Anselmo D. *In vitro* reconstitution of a functional duck hepatitis B virus reverse transcriptase: posttranslational activation by Hsp90[J]. *J Virology*, 2000, 74(24): 11 447-11 455
- [30] Concepcion Z, Kevin C, Patti K, *et al* Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids[J]. *Nature*, 2002, 415(1): 88-92
- [31] Ang D, Keppel F, Klein G, *et al* Genetic analysis of bacteriophage-encoded cochaperonins[J]. *Annu Rev Gen*, 2000, 34: 439-456
- [32] Marusich E L, Kurochkina L P, Mesyanzhinov V V. Chaperones in bacteriophage T4 assembly[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 1998, 63(4): 399-406
- [33] Hwang D J, Tumer N E, Wilson T M. Chaperone protein GrpE and the GroEL/GroES complex promote the correct folding of tobacco mosaic virus coat protein for ribonucleocapsid assembly *in vivo* [J]. *Arch Virology*, 1998, 143(11): 2 203-2 214
- [34] Chromy L R, Pipas J M, Garcea R L. Chaperone mediated *in vitro* assembly of polyomavirus capsids[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(18): 10 477-10 482
- [35] Agransky A A, Folimonov A S, Folimonova S, *et al* Beet yellow closterovirus HSP70-like protein mediates the cell-to-cell movement of a potexvirus transport-deficient mutant and a hordeivirus-based chimeric virus [J]. *J Gen Virology*, 1998, 79: 889-895
- [36] Satyanarayana T, Goeda S, Mawassi M, *et al* Closterovirus Encoded HSP70 Homolog and p61 in Addition to Both Coat Proteins Function in Efficient Virion Assembly[J]. *Virology*, 2000, 278(1): 253-265
- [37] Prokhnevsky A I, Perenyuslov V V, Napuli A J, *et al* Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of Beet yellow virus [J]. *J Virology*, 2002, 76(21): 11 003-11 011
- [38] Lambert C, Prange R. Chaperone action in the posttranslational topological reorientation of the hepatitis B virus large envelope protein: Implications for translocational regulation [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5 199-5 204
- [39] Ciupitu A M, Petersson M, O'Donnell C L, *et al* Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes[J]. *J Exp Med*, 1998, 187(5): 685-691.
- [40] Kum araguru U, Gierynska M, Norman S, *et al* Immunization with chaperone-peptide complex induces low-avidity cytotoxic T lymphocytes providing transient protection against herpes simplex virus infection[J]. *J Virology*, 2002, 76(1): 136-141.
- [41] Fewell S W, Day B W, Brodsky J L. Identification of an inhibitor of hsc70-mediated protein translocation and ATP hydrolysis[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(2): 910-914