朊病毒的基因及其蛋白质结构生物学的研究

韩生成 田 波
(中国科学院微生物学研究所, 北京 100080)

摘要 朊病毒是一种只含有蛋白质而不含有核酸的蛋白侵染颗粒, 能造成哺乳动物的脑部病变. 它是由正常形式的蛋白错误折叠成致病蛋白而组成的. 两种结构异型的蛋白 PrP^{C} 和 PrP^{Sc} 来源于同一基因, 具有相同的氨基酸序列和共价修饰, 但是在三维结构有很大的差异. 朊病毒的繁殖是通过正常形式蛋白转变为致病形式而完成的. 朊病毒疾病的传播具有种属特异性和病毒株系特异性的特点, 这是由于其一级结构的差异而在三维结构上形成不同的构象而引起的.

关键词 **朊病毒 基因 蛋白质结构 构象转变**

英国的疯牛病事件和美国的 Prusiner 博士因朊病毒的发现获得 1997 年诺贝尔生理和医学奖使朊病毒研究受到各方面的重视. 朊病毒是一种新型的蛋白感染因子, 能够引起人和动物的可转移性神经退化疾病, 如人的震颤病, 克雅氏病(CJD), 吉斯综合征(GSS) 和致死性家族失眠症(FFI) 以及动物的羊瘙痒病, 牛海绵脑病(俗称疯牛病) 和鹿、猫、水貂等的海绵脑病. 这些疾病的共同特征是使动物和人产生认知和运动功能的严重衰退直至死亡, 其临床和病理特征表现为脑组织的海绵体化、空泡化、星形胶质细胞和微小胶质细胞的形成以及致病蛋白的积累. Prusiner 等人的一系列实验证明这种疾病是由于正常细胞蛋白的错误折叠形成的致病蛋白 ——朊病毒(Prion) 在脑中积累而引起的. 国际病毒分类和命名委员会把朊病毒、类病毒和卫星病毒归入亚病毒, 以示与病毒的区别. 这也是我们[1] 将 Prion(或 Virino) 译为朊病毒的原因.

1 蛋白质致病假设

朊病毒的早期认识多源于羊瘙痒病的研究. 朊病毒疾病的传染性和滤过性特点曾被认为是由慢病毒引起的. 但同大多数病毒不同, 福尔马林溶液并不能完全消除其传染性. Alper 等人[2] 也观察到一定剂量的 254 nm 紫外线不能使其失活, 相反它对 237 nm 紫外线却非常敏感, 这些特征使作者认为感染因子可能是一种不含有核酸的蛋白质. 随后 Griffith 等人[3] 提出蛋白质致病假设, 认为感染因子是由正常细胞蛋白经修饰后形成的.

1982 年 Prusiner 和他的同事[4, 5] 利用生化手段从感染羊瘙痒病的金黄地鼠中纯化出此类感染因子, 并分别经过核酸酶和蛋白酶消化、紫外线以及其他化学试剂的处理, 认为羊瘙痒病的感染因子可能是一种不含有核酸的蛋白质, 并取名为朊病毒蛋白(Prion Protein), 简称 PrP.

致病的朊病毒蛋白(PrP^{Sc}) 具有抗蛋白酶 K 有限水解的能力, 它特异地出现在被感染的动物脑组织中, 呈淀粉样形式存在. 经有限酶解后, 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示其分子量为 27~30 ku(称 $PrP_{27\sim30}$), $PrP_{27\sim30}$ 仍保留其感染活性. 基于此蛋白质的部分氨基酸序列, 对其基因和正常细胞蛋白(PrP^{C}) 的基因进行了克隆和序列分析. 结果表明这两种蛋白基因的核苷酸序列完全一致, 它们来源于同一个基因[6]. 这使得人们认识到 PrP 具有两种形式, 即 PrP^{C} 和 PrP^{Sc}. PrP^{C} 分子量 33~35 ku, 含有 1 对二硫键和 2 个 N 型复合寡糖链, 二硫键和糖基化的

残基都在 PrP 的 C 端. N 端含有由 22 个氨基酸残基组成的信号肽序列, C 端含有由 23 个氨基酸组成的糖基磷酸肌醇锚受体结合位点(GPI)[7]. 说明 PrP^{C} 是一种膜蛋白, 已证明它是定位于细胞膜的穴样内陷类结构域(CLDs)[8]. PrP^{Sc}同 PrP^{C} 具有下列不同的生化特性: (1) 在非变性去污剂中 PrP^{Sc}是不溶的[9]; (2) PrP^{Sc}具有相对的抗蛋白酶水解特性[10]; (3) PrP^{C} 和 PrP^{Sc}都依赖 GPI 附着在细胞膜表面, 经磷酸肌醇磷脂酶 C(PIPLC) 酶解后 PrP^{C} 从膜上释放出来而 PrP^{Sc}不释放, 用 TritonX_114 进行相分配后, PrP^{C} 处于水相而 PrP^{Sc}处于 TritonX_114 相中[11]; (4) 特异的抗体只与 PrP^{Sc}有血清反应, 而与 PrP^{C} 无反应, 证明两者含有不同的构象表位[12]. 这些实验为蛋白质致病假设提供了有力支持.

2 朊病毒基因的结构和转录调控

朊病毒蛋白是由宿主染色体基因编码的. 人的 PrP 基因定位于 20 号染色体的短臂上, 鼠的 PrP 基因也定位于第 2 号染色体的短臂上. PrP 基因是单拷贝的, 这意味着 PrP 基因在哺乳动物物种分化时已经存在[13, 14].

朊病毒蛋白 mRNA 并不是由一个外显子组成, 但整个开放阅读框包含在一个单一的外显子中, 这消除了各种结构异型体的 PrP 是由于 RNA 的拼接形成的. 但并不排除存在像 RNA 编辑及蛋白质的拼接等机理的存在[14]. 鼠、牛和羊的 PrP 基因是由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 而人的 PrP 基因是由 2 个外显子和 1 个内含子组成. 以前认为地鼠 PrP 基因是由 2 个外显子组成, Li 等人[15] 发现在地鼠基因组中还存在 1 个新的外显子, 它的序列同鼠的外显子 2 有 83% 同源性, 而与牛和羊的外显子 2 具有 76% 同源性. 此外显子在调节细胞表达 PrP 方面起作用. 大鼠的完整 PrP 基因为 16 kb, 其中外显子 1, 2, 3 分别由 19~ 47, 98bp 和 2kb 组成, 间隔 2 个 2.2 和 11kb 的内含子. 外显子 1 和 2 是非编码区, 而外显子 3 编码 5′ 非翻译区、PrP 基因完整开放阅读框以及 3′ 非翻译区[16]. 在大鼠 5′ 端启动子区可能含有富含 G+ C 区以及 Sp1, Ap_1 和 Ap_2 结合位点, 但没有 TATA box 位点. 这说明 PrP 基因可能是一个持家基因[16].

最初有人认为 PrP 在成年动物脑组织中是组成型表达的, 而在发育过程中可能是受调控表达. 对其 cDNA 5′ 端进行分析发现其 mRNA 在不同位点起始, Nouthern 杂交也说明鼠的不同组织中 PrP mRNA 水平各不相同, 最高表达量在脑部和胎盘[16]. 原位杂交实验进一步证明, 在鼠脑组织中 PrP mRNA 主要存在于海马组织的锥形细胞、丘脑和新大脑皮层的大神经元以及蒲肯野氏细胞; 在胎盘组织中, 高水平 PrP mRNA 不只定位于蜕膜细胞, 同时也在卵黄囊的羊膜和中胚层中表达. 而且 PrP mRNA 也在子宫肌层和精巢的精细管中表达, 但在肺、脾以及肝和其他胎儿组织中没有检测到, 这说明 PrP 的表达是组织依赖型的[17].

3 朊病毒蛋白的一级结构

经克隆和序列分析, 目前已获得了近 40 个物种的 PrP 核苷酸序列及由此推断出的氨基酸序列. 整个开放阅读框的氨基酸序列同源性为 70%, 而成熟的蛋白质 $PrP_{23\sim 231}$序列同源性为 76%. 在患病的人中, 已发现在 PrP 序列中有 12 个残基位置发生点突变而在 3 个位置发生氨基酸残基的多态性变化. 另外在 53~ 90 位的八肽重复区发现有 2~ 9 个八肽插入及 1 个八肽重复的缺失突变(图 1). 这些突变都是非保守性替代, 它们同人的散发性、遗传性及传染性朊病毒疾病相关.

大多数 CJD 和一部分 GSS 以散发形式存在. 在这些病人中, PrP 基因没有发生突变. 目前也不知道在人体中致病的蛋白怎样以散发形式出现, 有人曾推测可能是由于患病的动物和人的水平传播、PrP 基因的自身突变以及 PrP^{C} 向 PrP^{Sc} 的自发转变造成的. 现在已经证明这些疾病与 PrP 序列中某些位置的氨基酸残基如 M129V, N171S 和 E219K 等的多态性有关.

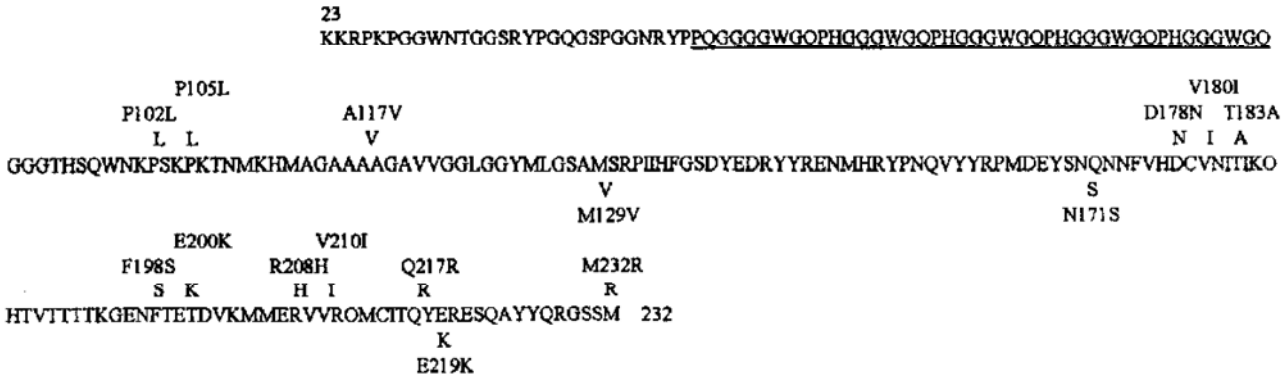

图 1　人的成熟朊病毒蛋白(PrP_{23_232}) 的氨基酸序列

序列上面的残基指此处的氨基酸发生突变, 序列下面的残基指此处的氨基酸发生多态性变化, 序列中划线处残基指八肽重复区

研究者最早观察到 GSS 以常染色体遗传的方式发病, 而后发现羊瘙痒因子侵染鼠后发病的潜育期长短与 PrP 基因在 108 和 187 位密码子处氨基酸之间存在遗传连锁. 这使得他们认为 PrP 基因发生突变可能是造成遗传性朊病毒疾病的原因. 约 10% CJD 是家族性发生, 这也说明 CJD 具有一定的遗传基础. 人的 PrP 基因 102 位残基的点突变 P102L 的发生被证明同 GSS 存在遗传连锁, 后来发现所有的 GSS 病人都含有此突变. 现已证明人类遗传性朊病毒疾病的分子基础是 PrP 基因的突变. 转基因研究也证明 PrP 基因的突变能引起神经退化性疾病. GSS P102L 突变基因导入鼠中, 表达出大量突变蛋白, 结果使 5 个株系的鼠表现出中枢神经系统退化性疾病. 这也说明朊病毒可由 PrP 基因突变后从头(de novo) 产生. 进一步在 PrP 基因中引入点突变 A113V, A115V 和 A117V, 也造成病变. 而且经脑内接种可以将此病传染给表达地鼠 ——鼠嵌合基因的转基因鼠.

已发现在 PrP 序列的 53~ 90 位密码子区插入一段 144bp 的八肽重复序列同 4 个家族的 CJD 病人相连锁, 而且这些家族起源于一个共同的祖先. 有人也证明在 53 位残基处插入 2~9 个八肽重复序列都可引发朊病毒疾病.

4　朊病毒蛋白的三维结构

PrP^{Sc} 与 PrP^{C} 都由同一基因编码, 其氨基酸序列完全相同. 因此 PrP^{Sc} 的形成是一种转录后修饰的过程[18]. 通过对 PrP^{Sc} 与 PrP^{C} 的比较研究发现两者并无共价修饰的区别[19]. 利用 Fourier 转换红外光谱(FT IR) 和圆二色(CD) 对两者结构进行比较, 发现它们在二级结构上有很大区别: PrP^{C} 含 40% 的 α_螺旋, 而含有很少或几乎不含 β_折叠, 相反 PrP^{Sc} 则含有 43% 的 β_折叠及 30% 的 α_螺旋[20, 21]. 采用分子模式对 PrP^{Sc} 与 PrP^{C} 的三维结构进行预测, 认为 PrP^{C} 是一个含有 4 个 α_螺旋(H1_H4) 的球形蛋白. 在 PrP^{Sc} 中有 2 个螺旋 H1 和 H2 形成 4 个 β_折叠链. 一个二硫键将 H3 和 H4 连接在一起, 稳定 PrP^{Sc} 和 PrP^{C} 的结构(表 1)[22].

利用 CD 对 50~ 89 位氨基酸残基的八肽区重复片段的研究表明八肽区采用一种无规则

的延伸型构象, 此结构类似于多聚 L_脯氨酸形成的左手螺旋结构[23]. 通过对一段包括 90~145 位氨基酸残基的合成肽段进行核磁共振(NMR) 研究, 发现这段肽段能以 α_螺旋形式存在, 但是受环境影响后可以形成分子间 β_折叠结构. 在疏水环境中检测到 H1 螺旋区有 α_螺旋存在, 在 H2 中则只有形成螺旋的倾向性. 在所有已知的 PrP 氨基酸序列中, 113_128 位残基是最保守的. 有人认为这段残基是在新生 PrP^{Sc}产生过程中 PrP^{Sc}和 PrP^{C} 结合的中心结构域[24].

利用多维异核 NMR 对大肠杆菌表达的地鼠朊病毒蛋白片段 $PrP_{90\sim 231}$和鼠的朊病毒片段 $PrP_{121\sim 231}$进行研究发现两者都呈现螺旋形式的结构, 类似于 PrP^{C}(表 1)[25, 26]. 地鼠 $PrP_{90\sim 231}$和鼠 $PrP_{121\sim 231}$都含有 3 个 α_螺旋(HA_HC), 螺旋的残基所处的位置区别不大, 而且 HB 与 HC 同预测的 PrP^{C} 结构中 H3 和 H4 的位置相当. 但是在地鼠 PrP 中参与螺旋形成的残基更多, 地鼠 PrP α_螺旋相对鼠 PrP 更长. 鼠 $PrP_{121\sim 231}$中含有 2 个包括 4 残基的反平行 β_折叠片层, 而地鼠 PrP 只发现一个类似的反平行 β_折叠. 在另一位置的残基构象表现出有形成 β_折叠的倾向性, 却没有表现出标准的 β_折叠构型. 在 S2 和 HB 之间环区($Loop_{165\sim 171}$)在地鼠 PrP 的 NMR 结构中表现出有序性, 在鼠 PrP 中却呈无序性, 而此段环区据认为含有两种不同的构象, 它同 HC 一起在稳定 PrP^{C} 结构方面起着一定的作用. 同鼠 $PrP_{121\sim 231}$相比地鼠 $PrP_{90\sim 231}$多出 90~ 120 段残基. 在 NMR 谱中这段残基表现出一定的 α_螺旋谱峰性质, 同时又表现出无规则卷曲的谱峰特征. 因此认为它可能含有瞬间结构的特征, 能进行构象之间的快速转变. 113~ 125 段疏水残基聚集区表现出能选择多种构象的特征, 因此这段残基在 PrP^{C} 向 PrP^{Sc}转变的构象变化中可能起关键作用. 这与前面的合成肽段 90~ 145 的 NMR 谱结果相符合.

对大肠杆菌表达的完整朊病毒蛋白的 NMR 研究表明整个朊病毒三维结构呈很长的舒展状态, 可以分为 2 个结构域, 其中 N 端含有 23~ 120 位残基, 处于舒展的无规则卷曲状态, 缺少确定的二级结构, 具有很高的柔韧性. 而 C 端包括 121~ 231 位残基, 是一个球形结构域, 由一个二硫键相连接的 2 个 α_螺旋组成 V 形骨架, 另一个 α_螺旋和 2 条 β_折叠链附着在此骨架上构成[27, 28]. 对于致病形式的 PrP^{Sc}的三维结构, 由于其在非变性溶液中的不溶性, 很难得到它在溶液中的构象. 因此这有待于固相 NMR 技术的发展, 或利用其他方法来对其结构进行解析.

表 1 朊病毒蛋白 PrP^{C} 和 PrP^{Sc}的二级结构的比较

朊病毒蛋白	α_螺旋	β_折叠
推测的正常蛋白 PrP^{C} 结构	H1 109~ 122 H2 129~ 141 H3 178~ 191 H4 202~ 218	
推测的致病蛋白 PrP^{Sc}结构	H3 178~ 191 H4 202~ 218	S1 108~ 113 116~ 122 S2 128~ 135 138~ 144
鼠 $PrP_{121\sim 231}$的 NMR 结构	HA 144~ 154 HB 179~ 193 HC 200~ 217	S1 128~ 231 S2 161~ 164
地鼠 $PrP_{90\sim 231}$的 NMR 结构	HA 144~ 156 HB 172~ 193 HC 200~ 227	S2 161~ 163

5 朊病毒蛋白的构象转变

对 PrP 基因的序列分析表明 PrP^{C} 和 PrP^{Sc}具有相同的氨基酸序列和共价修饰, 而利用 FTIR和 CD 对其二级结构的研究又证明两者之间存在构象上的差别, 那么 PrP^{C} 是如何转变成 PrP^{Sc}的呢? 研究者提出两种不同的机理(图 2)[29]: 一种转换模式认为 PrP^{Sc}的形成是一种

核依赖的聚合过程, 即“种子”模型, PrP^{Sc}低级聚合物充当种子. 在没有“种子”存在时, PrP^{C} 和 PrP^{Sc}单体之间发生快速的可逆性构象变化, 但 PrP^{C} 单体构象比 PrP^{Sc}稳定. 当 PrP^{Sc}“种子”存在时, 它可通过与 PrP^{Sc}单体的结合稳定 PrP^{Sc}构象, 加速 PrP^{C} 向 PrP^{Sc}的转变. 对于这种稳定转换过程的障碍就是起始的核形成过程. 低级聚合物的形成在热力学上并不是有利的, 因为依靠分子间相互作用所获得的自由能不足以抵消结合所带来的熵增加, 直到一个最小规模的核形成后这种状况才得到改观. 这种模式表现出聚合反应的一些特征, 如需要超过临界浓度的蛋白质浓度以及动力学反应是一个拖后的相变化. 此模式能够解释经脑内潜育后才发病的朊病毒疾病. 另一种转换模式是模板介导的转换过程, 即重折叠模式. 这种模式认为 PrP^{Sc}构象比 PrP^{C} 更稳定, 这种转换在热力学上有利但在动力学上却进行得十分缓慢, 两者之间存在能量屏障. 在这种模式中, PrP^{Sc}依靠催化 PrP^{C} 或一个不稳定的中间体的重排来提高转换, 以形成更稳定的 PrP^{Sc}构象. 感染性将依赖于 PrP^{Sc}结合和催化中间分子转换的能力. 这种模式能够解释由于点突变而引起的遗传性朊病毒疾病. 点突变的发生增加了不稳定的中间分子的数量同时加快它转换成 PrP^{Sc}的速率. 然而这两种模式并不是相互排斥的, 在朊病毒繁殖过程中有可能是这两种模式共同作用.

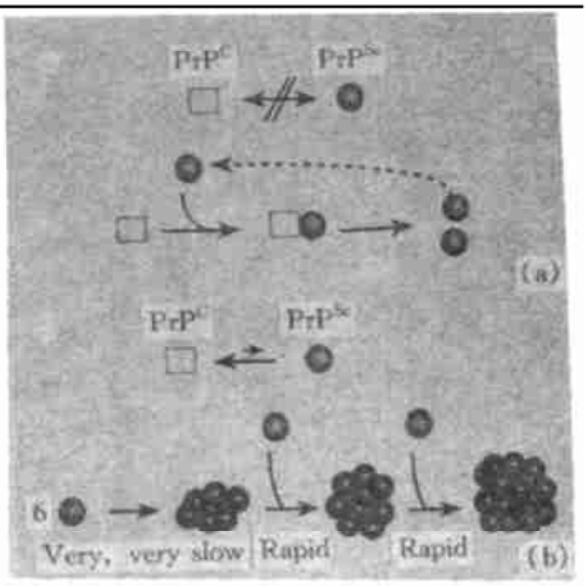

图 2　PrP^{C} 向 PrP^{Sc}转变的模式
(a) “重折叠”模式, (b) “种子”模式

在体外实验中 Caughey 和他的同事[30, 31] 利用预先存在的 PrP^{Sc}把 PrP^{C} 转变成一种类似 PrP^{Sc}的抗蛋白酶水解的结构异型体, 这种异型体经蛋白酶 K 消化后类似于 $PrP_{27\sim 30}$. 因为只有很少数量的 PrP^{C} 发生转变, 还存在大量预先加入的 PrP^{Sc}, 因此检测新生 PrP^{Sc}是否具有感染性在技术上是不可能的. 比较有意思的发现是利用 3 mol/ L 盐酸胍对 PrP^{Sc}进行预处理, 造成 PrP^{Sc}不可逆折叠, 增加了新生的 PrP^{Sc}的转换, 这可能意味着 PrP^{Sc}本身也需要一个构象的改变以适应转换过程.

在体外条件下不同 pH、温度及缓冲液成分都影响 PrP^{C} 向 PrP^{Sc}转换. 有实验表明, 在还原条件下特别是 pH> 7. 0 后, 纯化的 PrP 表现出高 β_折叠含量, 溶解度降低, 类似于 PrP^{Sc}. 而在氧化条件下表现出高的 α_螺旋含量, 类似于 PrP^{C}[32].

体外转变实验不能证明 PrP^{C} 能够变成有感染性的结构异型体, 这使人们更加怀疑是否在体内有别的因子参与 PrP^{C} 向 PrP^{Sc}的转变. 利用培养的细胞研究 PrP 蛋白的合成和转变过程可以得知 PrP^{C} 向 PrP^{Sc}的转变可能发生在细胞内吞过程. GPI 锚点蛋白一般定位于富含胆固醇的质膜表面. 曾证明抑制胆固醇的合成, 同时也抑制 PrP^{C} 向 PrP^{Sc}的转变. 进一步研究表明 PrP^{C} 和 PrP^{Sc}共同定位于膜的穴样内陷类的结构域中, 而且 lovastatin 能够抑制 PrP^{Sc}的形成. 这些实验表明 CLDs 可能是朊病毒合成的地方[33]. Prusiner 和他的同事[34, 35] 利用转基因鼠研究朊病毒繁殖过程发现除 PrP 外可能还有别的蛋白分子参与 PrP^{Sc}的形成, 此蛋白分子被命名为蛋白质 X. 突变分析发现在 PrP^{C} 分子结构表面有同蛋白质 X 相互作用的不连续表

位, 它们是第 167, 171, 214 和 218 位氨基酸残基. 从已知的 PrP^C 三维结构得知这些残基位于 PrP^C 的 HB 和 HC 形成的 V 型结构的开口处, 214 位和 218 位氨基酸残基侧链从螺旋的表面突出与环区的 167 位和 171 位残基形成一个不连续的表位, 是蛋白质 X 结合的位置. Edenhofer 等人[36]利用双杂交显示法(two_hybrid screen) 证明地鼠 PrP^C 同分子伴侣 Hsp60 之间存在特异的相互作用, 其作用位点在 PrP^C 的 180~ 210 位的残基. 其他实验也表明 PrP^C 和 Hsp60 存在于相同的亚细胞部位. 由此可以推测 Hsp60 可能就是蛋白质 X.

一般情况下, 在新生肽链的折叠和成熟过程中, 糖基化起着非常重要的作用. PrP 含2 个 N 型寡糖链, 由此推测这 2 个糖链在 PrP^{Sc}生成的构象转变过程中可能起着一定的作用[37]. 实验表明糖基化位点的残基发生突变后 PrP^C 仍可转变为 PrP^{Sc}, 并且在糖基化抑制剂突尼卡霉素(tunicamycin) 存在的情况下, PrP^{Sc}仍可合成. 这些结果说明 N 型糖链对 PrP^{Sc}的形成并不是必需的. 但有实验表明糖链的存在可以改变 PrP^{Sc}形成的效率. Taraboule 等人发现经突尼卡霉素处理羊瘙痒因子感染的细胞后, 导致潜育期缩短和 PrP^{Sc}的更快产生. 体外实验也证明了这一点. 在一种人的朊病毒疾病的患病个体中发现其 PrP 蛋白的 183 位残基发生突变使 181 位的糖基化失活, 发生了遗传性海绵脑病. 这些结果意味着 PrP 分子中糖链帮助维持正常的 PrP^C 构象, 它的缺失有利于 PrP^{Sc}的形成.

6 朊病毒的种属特异性和株系特异性

体外实验证明 PrP^C 能同预先加入的 PrP^{Sc}共同温育形成具有抗蛋白酶水解的结构异型体, 这为 PrP^{Sc}的繁殖是通过 PrP^C 向 PrP^{Sc}的直接转变的假设提供了证据. 在 PrP^{Sc}的繁殖过程中存在朊病毒的种属特异性和株系特异性的现象.

种属特异性是指一个物种对另一物种产生的朊病毒颗粒的侵染具有抗性的现象, 其外在表现为潜育期的延长甚至不发病. 例如正常的小鼠对由地鼠产生的朊病毒株具有抗感染的能力, 但是转地鼠朊病毒基因的转基因小鼠却对地鼠产生的朊病毒株具有很高的感染性. 而且当自身的 PrP^C 缺失后, 转基因小鼠对小鼠朊病毒株也表现出抗性.

目前认为种属特异性的根本原因在于组成 PrP 的氨基酸一级结构的差异, 造成三维构象上的不同所引起的. 在完整 PrP 序列中鼠和地鼠共有 14 个氨基酸残基不同, 而在构建成的鼠和地鼠嵌合基因中, 鼠的 112~ 180 位残基代替相对应的地鼠基因. 在这部分序列中有三个氨基酸残基不同: 地鼠 Met139$\rightarrow$鼠 Ile、地鼠 Asn155$\rightarrow$鼠 Tyr 和地鼠 Asn 170$\rightarrow$鼠 Ser. 而这足以阻止地鼠的 PrP^{Sc}诱导嵌合的 PrP 产生抗蛋白酶 K 水解的蛋白结构异型体[38]. 从地鼠 PrP 三维结构上看出包含 Met139. Asn155 和 Asn170 三个残基的氨基酸片段形成的疏水区位于 PrP^C 结构的表面, 在转换过程中这段疏水区可能同 PrP^{Sc}发生相互作用. 其他实验也表明 96~ 167 位氨基酸残基的不同对种属特异性的维持起关键作用[34]. 由此说明 PrP 一级结构决定其种属特异性.

在朊病毒的繁殖过程中还存在株系的特异性, 表现在潜育期长短不同、脑中受到损伤的部位不同和 PrP^{Sc}的蛋白酶 K 酶切位点不同形成不同分子量的蛋白几方面[39]. 这些特征即使是连续传代仍然保持. Teling 等人[40]实验证明在 FFI 中特异的抗蛋白酶 K 水解片段去糖基后分子量为 19 ku, 而在 CJD 中相应的片段为 21 ku. 利用 FFI 和 CJD 病人脑中的提取物分别感染含嵌合人鼠基因的转基因鼠, 特异地产生出 19 和 21 ku 的 PrP^{Sc}. 这些结果表明 PrP^{Sc}的

构象是指导新生 PrP^{Sc}合成的模板. 也就是说朊病毒繁殖的信息是贮存在致病蛋白的构象中, 不同的株系代表不同的蛋白构象.

7 PrP 的功能

朊病毒疾病的发生表现在 PrP^{Sc}的积累, 但是致病的根本原因是由于 PrP^{C} 的缺乏, 还是由于 PrP^{Sc}的积累, 以及 PrP^{C} 的生理功能是什么? 这些还不清楚. Tobler 等人[41] 证实缺失 PrP 的小鼠在昼夜节律和睡眠方式上发生了改变. 这使人们想到至少存在一种人类遗传性朊病毒疾病 FFI 同 PrP 的正常功能有关. FFI 病人中大多数丘脑核受到严重破坏, 而丘脑回路的存在是维持正常睡眠节奏所必须的[42]. 还有实验报道缺失 PrP 的小鼠海马组织中 GABA 介导的神经传递抑制受到干扰, 而且长期记忆能力也减弱. Nishida 等人[43] 进一步证实 PrP^{C} 蛋白对潜伏期学习和长期记忆的保持是必需的. CJD 和 GSS 中痴呆的发生, 可能是这些功能缺失的反应. 上述结果意味着朊病毒病的发生可能是正常 PrP^{C} 的缺失, 而不是 PrP^{Sc}的积累所引起的.

曾发现 PrP^{C} 蛋白不仅限于中枢神经系统中, 在鼠和羊的淋巴细胞中也表达, 而且在患病羊的淋巴组织也发现 PrP^{Sc}的积累[44]. PrP^{C} 是细胞膜蛋白, 实验证明它参与 T 淋巴细胞的激活. 研究还发现 PrP 八肽区与哺乳动物的 RNP A1 的核酸结合和链退火的八肽区有同源性, 因此有可能同 RNP 一样具有 NADH 依赖的氧化还原酶活性[45]. 有实验发现, 在 PrP 缺失的鼠中 Cu/Zn 超氧化物歧化酶活性降低, 因此对细胞内氧化压力更敏感导致细胞更快死亡[46]. 还有实验表明朊病毒片段 106~ 126 能够调节小胶质细胞内的 Ca^{2+} 浓度, 从而激活小胶质细胞[47]. 这些实验是否意味着 PrP^{C} 存在功能的多样性.

参 考 文 献

1 田 波. 亚病毒 ——病毒学的一个新分支. 病毒学报, 1985, 1: 190~ 160
2 Alper T, Cramp W A, Haig D A, et al. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid ? Nature (London), 1967, 214: 764~ 766
3 Griffith J S. Self_replication and scrapie. Nature, 1967, 215: 1 043~ 1 044
4 Prusiner S B. Novel proteinaceous infectious partides cause scrapie. Science, 1982, 216: 136~ 144
5 Prusiner S B, Bolton D C, Groth D G, et al. Further purification and characterization of scrapie prions. Biochemistry, 1982, 21: 6 942~ 6 950
6 Basler K, Oesch B, Scoff M. Scrapie and Cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. Cell, 1986, 46: 417~ 428
7 Stahl N, Baldwin M A, Hecker R, et al. Glycosylinositol phospholipid anchors ot the scrapie and cellular prion protein. Biochemistry, 1992, 31: 5 043~ 5 053
8 Vey M, Pilkuhn S, Wille H, et al. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae_like membranous domains. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 93: 14 945~ 14 949
9 Meyer R K, McKinley M P, Bowman K A, et al. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1986. 83: 2 310~ 2 314
10 Oesch B, Westaway D, Prusiner S B. A cellular gene encodes scrapie PrP 27~ 30. Cell, 1985, 40: 735~ 746
11 Taraboulos A, Serban D, Prusiner S B. Scrapie prion protein accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. The Journal of Cell Biology, 1990, 110: 2 117~ 2 132
12 Korth C, Stierli B, Moser M, et al. Prion_specific epitope defined by a monoclonal antibody. Nature, 1997, 390: 74~ 77

13 Prusiner S B. Molecular biology of prion diseases. Science, 1991, 252: 1 515~ 1 522
14 Prusiner S B. Prion diseases and the BSE crisis. Science, 1997, 278: 245~ 251
15 Li G, Bolten D C. A novel hamster prion protein mRNA contains an extra exon: increased expression in scrapie. Brain Research, 1997, 751: 265~ 274
16 Saeki K, Matsumoto Y, Hirota Y, et al. Three_exon structure of the gene encoding the rat prion protien and its expression in tissues. Virus Genes, 1996, 12: 15~ 20
17 Tanji K, Saeki K, Matsumoto Y, et al. Analysis of PrP mRNA by in situ hybridazation in brain, placenta, uterus and testis of rats. Intervirology, 1996, 38: 309~ 315
18 Hope J, Morton L J O, Farquhar C F, et al. The major poly_peptide of scrapie_associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N_terminal procein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). EMBO J, 1986, 5: 2 591~ 2 597
19 Stahl N, Baldwin M A, Teplow D B, et al. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid scquencing. Biochemistry, 1993, 32: 1 991~ 2 002
20 Pan K M, Baldwin M, Nguyen J, et al. Conversion of α_helix into β_sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 10 962~ 10 966
21 Aguzzi A, Weissmann C. Prion research: the next frontiers. Nature, 1997, 389: 795~ 798
22 Huang Z, Gabriel J M, Baldwin M A, et al. Proposed three_dimensional structure for the cellular prion protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 7 139~ 7 143
23 Smith C J, Drake A F, Baufield B A, et al. Conformational properties of the prion octa_repeat and hydrophobic sequences. FEBS lett, 1997, 405: 378~ 384
24 Zhang H, Kaneko K, Nguyen J T, et al. Conformational transitions in peptides containing two putative α_helices of the prion protein. J Mol Biol, 1995, 250: 514~ 526
25 Reik R, Hornemann S, Wilder G, et al. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121~ 231). Nature, 1996, 382: 180~ 182
26 James T L, Liu H, Ulyanov N B, et al. Solution structure of a 142_residue recombment prion protein corresponding to infectious fragment of the scrapie isoform. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 10 086~ 10 091
27 Rick R, Hornemann S, Wilder G, et al. NMR charecterization of the full_length recombinant murine prion protein. FEBS lett, 1997, 413: 282~ 288
28 Donne D G, Viles J H, Groth D, et al. Structure of the recombinant full_length hamster prion protein PrP 29~ 231: The N terminas is highly flexible. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 13 452~ 13 457
29 Horwich A L, Weissman J S. Deadly conformations_Protein mistolding in prion disease. Cell, 1997, 89: 499~ 510
30 Kocisko D A, Come J H, Priola S A, et al. Cell_free formation of protease_resistant prion protein. Nature, 1994, 370: 471~ 474
31 Caughey B, Kocisko D A, Raymond G J, et al. Aggregates of scrapie_associated prion protein induce the cell_free conversion of protease_sensitive prion protein to the protease_resistant state. Chem Biol, 1995, 2: 807~ 817
32 Yokoyama T, Itohara S, Yuasa N. Detection of species specific epitopes of mouse and hamster PrPs by anti_peptide antibodies. Arch Virol, 1996, 141: 763~ 769
33 Kaneko K, Vey M, Scott M, et al. COOH_terminal sequence of the cellular PrP directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 2 333~ 2 338
34 Telling G C, Scott M, Mastrianni J, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. Cell, 1995, 83: 79~ 90
35 Kanek K, Zulianello L, Scott M, et al. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular PrP during scrapie prion propagation. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 10 069~ 10 074
36 Edenhofer F, Rieger R, Famulok M, et al. Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. J Virol, 1996, 70: 4 724~ 4 728