

# 内吞体分选转运复合体 (ESCRT) 及其在包膜病毒出芽中的作用

李朝飞, 田宏刚, 刘同先

西北农林科技大学植物保护学院 旱区作物逆境生物学国家重点实验室 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西 杨凌 712100

李朝飞, 田宏刚, 刘同先. 内吞体分选转运复合体 (ESCRT) 及其在包膜病毒出芽中的作用. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1031-1037.

Li ZF, Tian HG, Liu TX. Cellular ESCRT complex and its roles in enveloped viruses budding. Chin J Biotech, 2012, 28(9): 1031-1037.

**摘 要:** 内吞体分选转运复合体 (Endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 主要识别泛素化修饰的膜蛋白, 介导内吞小泡出芽和多泡体 (Multivesicular bodies, MVBs) 的形成。此外, 以类似的拓扑方式, ESCRT 也参与胞质分裂、自体吞噬、以及包膜病毒的出芽等过程。已有的研究表明, 大量的反转录病毒和 RNA 病毒含有晚期结构域 (Late-domains), 该结构域与 ESCRT 组分相互作用, 将 ESCRT-III 和 VPS4 等募集在病毒组装与出芽区域, 并利用 ESCRT-III 使病毒粒子得以释放。最近, 有研究发现, 一些 DNA 包膜病毒, 如乙肝病毒、疱疹病毒和杆状病毒等的出芽释放也依赖于宿主细胞 ESCRT 系统, 但其机理尚需深入研究。

**关键词:** ESCRT, 多泡体, 泛素, VPS4, 病毒出芽

## Cellular ESCRT complex and its roles in enveloped viruses budding

Zhaofei Li, Honggang Tian, and Tongxian Liu

State Key Laboratory for Crop Stress Biology in Arid Areas, MOA Key Laboratory of Integrated Pest Management on the Northwest Loess Plateau, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** In eukaryotic cells, multivesicular bodies (MVBs) are required for trafficking of membrane proteins to

**Received:** March 20, 2012; **Accepted:** May 7, 2012

**Supported by:** Foundation for Recruitment Program of Northwest A&F University (No. Z111021104), Program for New Century Excellent Talents in University (No. Z111021201).

**Corresponding author:** Zhaofei Li. Tel/Fax: +86-29-87091650; E-mail: zhaofei\_li@yahoo.com.cn

西北农林科技大学人才专项基金 (No. Z111021104), 新世纪优秀人才支持计划 (No. Z111021201) 资助。

lysosomes for selective destruction. The sorting of ubiquitylated membrane proteins into multivesicular bodies and the biogenesis of MVBs are mediated by the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT). Topologically equivalent to the budding of intraluminal vesicles from the limiting membrane of the MVBs, the ESCRT complex is also involved in cytokinetic abscission, phagophore formation, and enveloped virus budding. Many retroviruses and RNA viruses encode “late-domain” motifs that are able to interact with the components of the ESCRT complex, and the interactions recruit ESCRT-III and VPS4 to the viral assembly and budding sites. Recently, few studies revealed that the ESCRT complex is also required for efficient egress of some DNA viruses, including Hepatitis B, Herpes simplex virus type-1, and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. Further examination of virus-ESCRT interactions should shed light on the detailed mechanism of virus assembly and budding.

**Keywords:** ESCRT, multivesicular bodies, ubiquitin, VPS4, virus budding

在细胞正常的生理代谢过程中,膜蛋白需要选择性地通过内吞体途径被转运至溶酶体降解。近年来的研究发现,内吞体分选转运复合体(Endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)负责识别内吞体途径中泛素化修饰的膜蛋白,包括错误折叠的蛋白、激活的生长与细胞因子受体等,并介导内吞小泡(Intraluminal vesicles)出芽和多泡体(Multivesicular bodies, MVBs)的形成<sup>[1]</sup>。除了参与膜蛋白的分选与转运,ESCRT也参与胞质分裂、自体吞噬、以及包膜病毒的出芽等过程<sup>[2-4]</sup>。ESCRT复合体对于调

节细胞分化、抑制肿瘤和神经退行性疾病、以及限制病原物的入侵等具有十分重要的作用<sup>[4]</sup>。

## 1 ESCRT 复合体的组成

迄今的研究表明,ESCRT复合体保守地存在于真核生物中。哺乳动物细胞ESCRT系统由ESCRT-0、I、II、III、和VPS4(Vacuolar protein sorting-associated protein 4)等5个复合物以及包括Alix(ALG-2(Apoptosis-linked gene 2)-interacting protein X)等在内的一些辅助蛋白组成<sup>[2-3]</sup>(图1)。

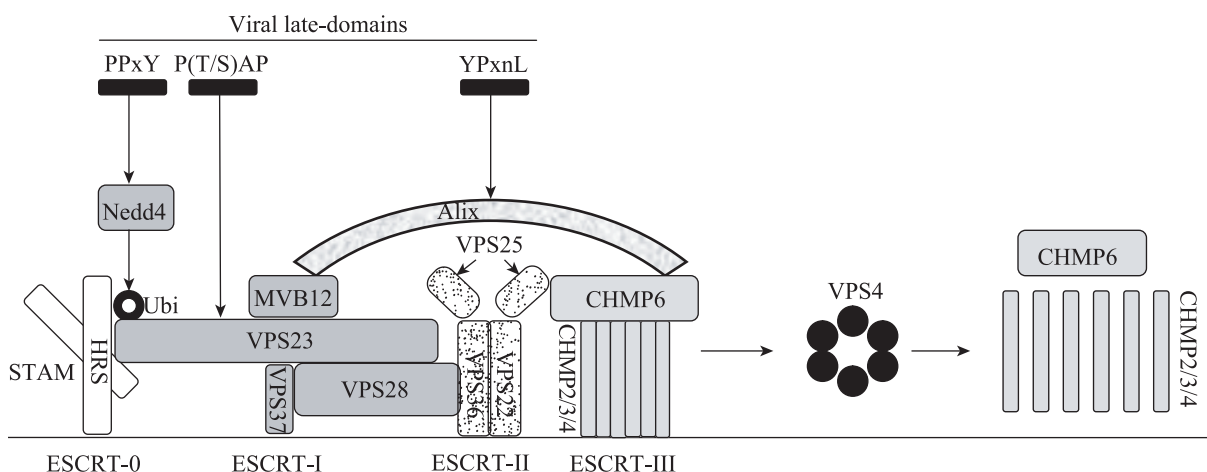


图1 宿主细胞ESCRT复合体及其与包膜病毒编码的晚期结构域之间的相互作用

Fig. 1 Host cellular ESCRT complex and the interaction of the complex with the late-domain motifs encoded by enveloped viruses. Ubi: ubiquitin.

### 1.1 ESCRT-0

ESCRT-0 是一个异源双聚体, 由 HRS (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) 与 STAM (Signal transducing adaptor molecule) 两个蛋白组成。该复合物参与细胞内吞途径中泛素化蛋白的分选 (Sorting)。研究发现, ESCRT-0 通过其亚基 HRS 的 FYVE 模序结合内吞体膜上的 PI(3)P 磷脂, 并通过其亚基 HRS 与 STAM C-末端的 clathrin-box 模序与笼形蛋白 (Clathrin) 结合, 将笼形蛋白募集。笼形蛋白的聚合为蛋白质分选提供了一个平台。在这个分选区域, ESCRT-0 通过其两个亚基含有的泛素作用模序 (Ubiquitin-interacting motif) 与泛素结合, 从而对泛素化修饰的膜蛋白进行识别和分选<sup>[1-3]</sup>。

### 1.2 ESCRT-I 与 ESCRT-II

ESCRT-I 与 ESCRT-II 均为异源四聚体, 其中 ESCRT-I 由 VPS23、VPS28、VPS37 以及多泡体因子 12 (MVB12) 组成, 而 ESCRT-II 则由 VPS22、VPS36 和 2 个 VPS25 分子组成。ESCRT-I 亚基 VPS23 能与 ESCRT-0 亚基 HRS 的 PSAP 模序结合, VPS37 则与脂质膜之间能形成静电相互作用, MVB12 能与 Alix 相互作用, 而 VPS28 则通过其 C-末端的螺旋结构域与 ESCRT-II 结合。ESCRT-II 呈 Y 型结构, VPS22 与 VPS36 相互作用形成 Y 型的柄部, 而 2 个 VPS25 分子则处于 Y 型结构伸展的顶端。VPS25 C-末端的螺旋结构具有结合和激活 ESCRT-III 的功能。ESCRT-I 与 ESCRT-II 均参与内吞小泡的出芽 (Budding)<sup>[1-3]</sup>, 但详细的分子机理仍不清楚。

### 1.3 ESCRT-III

ESCRT-III 是一个动态多聚体, 其组分仍没有明确的定义。目前的研究表明, 哺乳动物细胞 ESCRT-III 至少由 12 个极性多泡体蛋白 (Charged multivesicular body proteins, CHMPs) 组成, 其中包括 CHMP2、CHMP3、CHMP4 和 CHMP6。组成 ESCRT-III 的这些蛋白具有类似的分子结构并依赖于分子内自抑制机制以无活性的单体形式存在。激活的 ESCRT-III 组分能形成具有高度调节性的多聚体。ESCRT-III 参与“出芽”小泡从内吞体膜上的解离 (Scission)<sup>[1-3]</sup>。研究表明, ESCRT-III 亚基之间相互作用形成螺旋丝状结构, 而各个亚基开放的碱性功能区与“出芽”小泡颈部酸性的膜磷脂之间形成静电相互作用。随着 ESCRT-III 螺旋结构的不断增长, 小泡颈部的内吞体膜不断凹陷缢缩, 直至小泡从内吞体膜上解离脱落<sup>[3,5]</sup>。

### 1.4 VPS4 及其复合物

VPS4 是 ESCRT 复合体活性的关键性调节因子, 属于 AAA (ATPase associated with various cellular activities) 类 ATP 酶家族, 高度保守地存在于真核生物中<sup>[2,6]</sup>。VPS4 由约 430 个氨基酸组成, 由 N-末端参与底物结合的 MIT (Microtubule interacting and transport) 结构域, 中间的 AAA 结构域 (Type-1 AAA ATPase), 以及 C-端结合 LIP5 (LYST-interacting protein 5) 的  $\beta$ -折叠结构域和 C-末端参与 VPS4 二聚体形成的  $\alpha$ -螺旋组成。VPS4 在细胞质内以无活性的单体形式存在, 激活的 VPS4 可能由 12 个单体多聚化形成 2 个六聚体环状结构。最近的研究表明, 细胞质内的 VPS46 与 Ist1 (Increased sodium tolerance protein 1) 蛋

白与 VPS4 单体结合形成复合体, 该复合体通过 VPS4 蛋白 N-末端的 MIT 进一步与 ESCRT-III 复合体的 CHMP2、CHMP3、CHMP4 以及 CHMP6 各亚基 C-末端的 MIMs 模序 (MIT-interacting motifs) 结合。而后, 该复合物募集细胞质内的 Vta1 (VPS20(CHMP6)-associated protein 1) 蛋白。Vta1 可能起始促进 VPS4 多聚体的形成及其 ATP 酶的激活, 促使 ESCRT-III 解聚<sup>[7-9]</sup>。采用 RNA 干扰或表达显性-负性 (Dominant-negative) 突变体失活细胞内源性 VPS4, 将造成 ESCRT 系统的累积, 并在酵母、昆虫和哺乳动物细胞内形成内吞体异常的表型<sup>[7,10-11]</sup>。

## 2 ESCRT 复合体在包膜病毒出芽中的作用

病毒在宿主细胞内完成复制后需要组装和释放。研究表明多数包膜病毒出芽释放依赖于宿主细胞 ESCRT 复合体的功能<sup>[12]</sup>。

### 2.1 ESCRT 复合体在哺乳动物包膜病毒出芽中的作用

目前, 已有的病毒出芽释放分子机理主要来源于对反转录病毒的研究<sup>[13]</sup>。研究发现, 反转录病毒结构蛋白 Gag 含有“晚期结构域” (Late-domains), 其核心序列为 P(S/T)AP、PPXY、或 YPXnL ( $n \leq 3$ )。Gag 晚期结构域 P(S/T)AP 能结合 ESCRT-I 亚基 VPS23, YPXnL 能结合 Alix, 而 PPXY 则能结合 E3 泛素连接酶 Nedd4 (Neural precursor cell expressed developmental down-regulated gene 4)<sup>[13-15]</sup> (图 1)。通过与 ESCRT 亚基相互作用, Gag 将 ESCRT-I 和 Alix 等募集在病毒组装与出芽的细胞膜区域, 并通过 ESCRT-I 或 Alix 蛋白进一步募集 ESCRT-III 与 VPS4<sup>[13]</sup>。

研究表明, Gag 自身能起始病毒的组装和出芽 (Assembly and budding), 却需要 ESCRT-III 和 VPS4 将病毒粒子从细胞膜上解离和释放 (Scission and release)<sup>[3]</sup>。迄今关于 Gag 泛素化修饰的意义, ESCRT-III 的激活机理, 以及不同病毒对 ESCRT 组分依赖的差异性仍不清楚。

近期的研究发现, 除了反转录病毒以外, 大量的 RNA 病毒, 如弹状病毒 (Rhabdoviruses)、丝状病毒 (Filoviruses) 和副粘病毒 (Paramyxoviruses) 等均含有晚期结构域。突变这些氨基酸序列能抑制病毒的出芽和释放<sup>[12,16]</sup>。深入研究发现, 这些病毒的出芽释放也依赖于宿主细胞 ESCRT 复合体<sup>[12,16]</sup>。此外, 少量的实验证实, 一些 DNA 病毒, 如乙肝病毒 (Hepatitis B) 和疱疹病毒 (Herpes simplex virus type-1) 的出芽也与宿主细胞的 ESCRT 系统有关。瞬时表达显性-负性 ESCRT-III 蛋白, 如 CHMP3 和 CHMP4 等, 或 VPS4 均能抑制病毒粒子出芽释放<sup>[17-18]</sup>。最近的研究发现, 并非所有包膜病毒的出芽和释放依赖于 ESCRT。瞬时表达显性-负性 VPS4 对流感病毒 (Influenza virus) 和呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus) 的出芽和释放没有影响, 并且在这两种 RNA 病毒中也不存在典型的晚期结构域<sup>[12,19-20]</sup>。深入研究表明, 流感病毒编码的 M2 离子通道蛋白行使 ESCRT 功能在病毒出芽和释放过程中起作用。这是迄今为止发现的第一个 ESCRT-非依赖的病毒出芽释放机制<sup>[21]</sup>。

### 2.2 ESCRT 复合体在昆虫杆状病毒侵染中的作用

杆状病毒是一类在自然界中专一性寄生节肢动物的双链环状 DNA 包膜病毒, 其基因组大小约为 80~180 kb。目前已发现的 600 多种杆状

病毒,绝大多数分离自被感染的鳞翅目、双翅目和膜翅目昆虫<sup>[22]</sup>。杆状病毒可作为安全的生物杀虫剂,外源基因表达与展示载体,以及哺乳动物细胞基因转导载体<sup>[23-25]</sup>。杆状病毒在侵染过程中通常产生两种形态的病毒粒子:包埋型病毒粒子 (Occlusion-derived virions, ODV) 和芽生型病毒粒子 (Budded virions, BV)。ODV 是昆虫个体间水平感染的病毒形式,病毒包膜由核内膜获得,其外包被有多角体蛋白晶体。在昆虫中肠碱性环境下,多角体晶体裂解释放出 ODV 病毒粒子,起始感染昆虫中肠上皮细胞。BV 是昆虫个体内或离体条件下细胞间感染的病毒形式,病毒核衣壳从细胞膜出芽时获得包膜<sup>[23]</sup>。

目前,广泛深入研究的杆状病毒为首蓓银纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)<sup>[23]</sup>。研究表明,AcMNPV 芽生型病毒依赖其包膜表面的糖蛋白 GP64 识别可能的宿主细胞受体,并通过笼形蛋白介导的内吞途径进入宿主细胞<sup>[23,26-27]</sup>。在内吞体酸性条件下,GP64 蛋白的构象发生变化并引发病毒包膜与内吞体膜融合,进而释放出病毒核衣壳<sup>[28-29]</sup>。核衣壳依赖肌动蛋白丝被转运至细胞核,起始病毒复制<sup>[23,30]</sup>。早期的电镜观察结果表明,杆状病毒在宿主细胞核内完成复制后,病毒核衣壳以类似起泡 (Blebbing) 的方式从核膜出芽。核衣壳被包被在含有双层核膜的小泡内。随后,该小泡在细胞质内很快以未知的方式消失,裸露的病毒核衣壳可能依赖肌动蛋白丝被转运至细胞质膜出芽<sup>[30-32]</sup>。近年来,一些与小泡运输相关的宿主细胞蛋白被发现存在于 AcMNPV 芽生型病毒粒子中<sup>[33]</sup>。但是关于 AcMNPV 病毒粒子的组装、出芽和释放仍然知之

甚少。

最近的研究表明,与其他包膜病毒不同的是,表达草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞 VPS4 蛋白的显性-负性突变体不仅能显著抑制 AcMNPV 芽生型病毒粒子的出芽释放,而且能影响 AcMNPV 的入侵 (Entry)。研究发现,荧光标记的病毒粒子虽能有效结合并进入表达 VPS4 显性-负性突变体的宿主昆虫细胞,但却被阻断在异常的内吞体内,核衣壳不能被释放进入细胞核复制。通过利用病毒基因组 DNA 转染 Sf9 细胞表达 VPS4 显性-负性突变体,可以避免 VPS4 突变体对病毒入侵的影响。研究发现,AcMNPV 芽生型病毒粒子的产量急剧下降,揭示了宿主细胞 ESCRT 系统参与杆状病毒的入侵与出芽释放过程<sup>[11]</sup>。关于宿主 ESCRT 系统参与杆状病毒侵染的分子机理仍在进一步研究中。

### 3 展望

自从 2001 年 Katzmann 等<sup>[34]</sup>发现 ESCRT 复合体以来,关于 ESCRT 复合体结构与功能的研究已成为生物学领域新的热点之一。近年来的研究,特别在 ESCRT 复合体的纯化、分子遗传鉴定、晶体与结构解析以及功能重建等方面取得了长足的进展。现已基本清楚转运蛋白的识别机理和 ESCRT-0、I、II 等复合物的组分及其有序的募集过程。但是,关于 ESCRT-III 的组分及其如何形成一个有功能的动态多聚体,又如何参与膜的变形、缢缩与解离等过程,尚不清楚。另外,关于 VPS4 如何促使 ESCRT-III 解聚以维持 ESCRT 系统的循环利用,也有待于深入研究。

目前,ESCRT 复合体与病毒侵染相关的研究主要集中在该复合体如何参与包膜病毒出芽

芽释放方面,已有的病毒出芽理论也主要来自于对反转录病毒、特别是 HIV-1 (Human immunodeficiency virus, type 1) 的研究。关于 ESCRT 复合体参与其他病毒、特别是 DNA 包膜病毒侵染机理的研究相对较少。近年来,随着基因组学的迅猛发展,病毒与其宿主细胞的遗传背景越来越清楚。在此基础上,深入开展 ESCRT 参与多种病毒侵染分子机理的研究,将为抗病毒研究提供新的思路和方法,有助于病毒性疾病的治疗。同时,对一些人类可利用的病毒(如昆虫杆状病毒)开展类似的研究,也有利于促进这类病毒的遗传改良和应用。

## REFERENCES

- [1] Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 2009, 458(7237): 445–452.
- [2] Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 77–91.
- [3] Hurley JH, Hanson PI. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(8): 556–566.
- [4] Rusten TE, Stenmark H. How do ESCRT proteins control autophagy? *J Cell Sci*, 2009, 122(13): 2179–2183.
- [5] Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, et al. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 2009, 458(7235): 172–177.
- [6] Ghazi-Tabatabai S, Obita T, Pobbati AV, et al. Evolution and assembly of ESCRTs. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(1): 151–155.
- [7] Babst M, Sato TK, Banta LM, et al. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J*, 1997, 16(8): 1820–1831.
- [8] Shestakova A, Hanono A, Drosner S, et al. Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(6): 1059–1071.
- [9] Stuchell-Brereton MD, Skalicky JJ, Kieffer C, et al. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*, 2007, 449(7163): 740–744.
- [10] Bishop N, Woodman P. ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(1): 227–239.
- [11] Li ZF, Blissard GW. Cellular VPS4 is required for efficient entry and egress of budded virions of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Virol*, 2012, 86(1): 459–472.
- [12] Chen BJ, Lamb RA. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology*, 2008, 372(2): 221–232.
- [13] Pincetic A, Leis J. The mechanism of budding of retroviruses from cell membranes. *Adv Virol*, 2009, 2009: 6239691–6239699.
- [14] Bieniasz PD. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology*, 2006, 344(1): 55–63.
- [15] Morita E, Sundquist WI. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 395–425.
- [16] Calistri A, Salata C, Parolin C, et al. Role of multivesicular bodies and their components in the egress of enveloped RNA viruses. *Rev Med Virol*, 2009, 19(1): 31–45.
- [17] Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, et al. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS ONE*, 2011, 6: e14517.
- [18] Calistri A, Sette P, Salata C, et al. Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J Virol*, 2007, 81(20): 11468–11478.
- [19] Utley TJ, Ducharme NA, Varthakavi V, et al. Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(25): 10209–10214.

- [20] Watanabe R, Lamb RA. Influenza virus budding does not require a functional AAA+ATPase, VPS4. *Virus Res*, 2010, 153(1): 58–63.
- [21] Rossman JS, Jing XH, Leser GP, et al. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 2010, 142(6): 902–913.
- [22] Blissard GW, Black B, Crook N, et al. Baculoviridae: taxonomic structure and properties of the family//van Regenmortel MHV. Fauquet CM, Bishop DHL, et al. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press, 2000: 195–202.
- [23] Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology*. 2nd Ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2011.
- [24] Jarvis DL. Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol*, 2009, 463: 191–222.
- [25] Hu YC. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr Gene Ther*, 2008, 8(1): 56–65.
- [26] Long G, Pan XY, Kormelink R, et al. Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 2006, 80(17): 8830–8833.
- [27] Zhou J, Blissard GW. Identification of a GP64 subdomain involved in receptor binding by budded virions of the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J Virol*, 2008, 82(9): 4449–4460.
- [28] Blissard GW, Wenz JR. Baculovirus GP64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH dependent membrane fusion. *J Virol*, 1992, 66(11): 6829–6835.
- [29] Li ZF, Blissard GW. The pre-transmembrane domain of the *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 protein is critical for membrane fusion and virus infectivity. *J Virol*, 2009, 83(21): 10993–11004.
- [30] Ohkawa T, Volkman LE, Welch MD. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J Cell Biol*, 2010, 190(2): 187–195.
- [31] Adams J R, Goodwin RH, Wilcox TA. Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. *Biologie Cellulaire*, 1977, 28: 261–268.
- [32] Fraser MJ. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, 1986, 95(1/3): 189–195.
- [33] Wang RR, Deng F, Hou DH, et al. Proteomics of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus budded virions. *J Virol*, 2010, 84(1/4): 7233–7242.
- [34] Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependant sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 2001, 106(2): 145–155.