朊病毒中是“唯蛋白”(protein-only)还是 “存在类病毒”(virino)?

——从生命科学研究角度对朊病毒研究的反思

杨池明^(四) 陈 义^(四) 王志欣^(四) 程津培^(四)

(Institute for Life Science and Health, University of California, San Diego, P. O. Box 12035, La Jolla, CA 92039, USA;

④中国科学院化学研究所分子科学中心, 北京 100080; ④南开大学化学学院, 天津 300071)

摘要 传染性脑神经疾病研究领域里对朊病毒的研究在近年来一直处于一个困境. 本文对朊病毒研究的历史和发展进行了精要的评述, 着重阐述了“唯蛋白”假说的建立和发展及其中存在问题的根源, 包括为什么“唯蛋白”论无法被完全接受, 并指出为彻底解开分子神经科学中的朊病毒之谜, 有大量技术及理论上的障碍尚待冲破. 旨在不仅能够帮助更多的科学工作者理解朊病毒现象, 而且指出这方面的工作需要得到除分子基因学和蛋白科学以外领域的大量科学家的合作.

关键词 朊病毒 疯牛病 脑神经退化疾病 亚病毒病原 蛋白错折叠

朊病毒疾病, 最初被发现的是羊瘙痒病, 是由一种新的并被认为是被不含核酸的亚病毒病原所引起^[1,2]. 因为哺乳动物都具有朊病毒蛋白基因和相应的良性朊病毒蛋白, 且朊病毒疾病具有自发性、遗传性及传染性三大特征, 所以, 朊病毒在脊椎动物体中的出现是不可避免的. 朊病毒可被视为自然界中交叉进化的又一例证: 它是依靠在一个蛋白分子(而非核酸)中编码遗传信息来实现自我复制的^[1~5].

对于病毒学家来说, 病毒通常是由蛋白和核酸组成的, 后者载有遗传信息. 生物学中对亚病毒尚无完整的定义^[6], 例如类病毒(viroid)即为只含有一小段 RNA 片段而无蛋白外壳的一种亚病毒. 那么, 仅仅一个蛋白分子片段是否也具有亚病毒的功能呢? 这是半个世纪以来在分子生物学领域里关于朊病毒研究的主要争议点^[1~5,7].

1 神经分子科学中的朊病毒研究

在短短的 20 年间, Gajdusek^[8] (1976) 和 Prusiner^[1] (1997) 皆因与朊病毒疾病有关的工作获得了诺贝尔奖, 其研究的重要性可见一斑. 本世纪初在 Papua New Guinea 地区 Fore 人中流行一种叫做 kuru 的朊病毒疾病^[8], 它几乎吞噬了太平洋这个小岛上的整个民族. Gajdusek^[8] 的研究发现 kuru 病实际上是通过食用死者的脑而传播的, 并且可以传染给其他实验动物. 人类的克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) 及动物的羊瘙痒病和传染性疯貂症(transmissible mink encephalopathy), 都是在其临床症状出现前亚病毒就已在宿主体内潜育了很长时间. 这类亚病毒不仅具有常规病毒的一些典型特征, 如传染性、种属特异性、菌株特异性、滤过性、致病力及在某些物种对易感性的控制能力等, 而且还具有一些非常规特征, 包括抗紫外辐射、耐高温、耐强酸和福尔马林等化学处理. Gajdusek^[8] 因此将此类亚病毒视为非常规病毒.

“唯蛋白”假说最早是由英国数学家 Griffith^[9] 为解释羊瘙痒病感染因子的复制现象提出的一个极为抽象的模型. 1982 年 Prusiner^[10] 首次利用现代分子生物学手段提取了羊瘙痒病病毒

分子,提出该种病症是由蛋白浸染颗粒,即朊病毒蛋白造成的.由于没有发现致病朊病毒蛋白和良性朊病毒蛋白之间有任何共价连接的不同,因而他认为病的分子机理是由蛋白的错折叠引起的.自此,“唯蛋白”假说成为20年来指导该领域研究的主流观点^[1].

2 朊病毒研究的现况

近来,一些科学家对有关朊病毒研究的进展进行了综述^[1~5,7],引起了人们对朊病毒疾病本质的重新关注和兴趣.来自分子基因学的证据进一步支持了“唯蛋白”假说,其主要论点是病毒传染因子不含有核酸,疾病的发生是由良性细胞蛋白 PrP^C 转变为致病形式 PrP^{Sc} 引起的.良性细胞蛋白 PrP^C 是易溶且对蛋白酶敏感的,而致病形式 PrP^{Sc} 是不溶性且抗蛋白酶的水解.研究者对致病形式蛋白 PrP^{Sc} 提出了两种形成机理,即模板协助下的重新折叠(template assisted refolding)模式和分子核聚(nucleation)模式^[1,11].目前,在既不了解致病蛋白 PrP^{Sc} 的具体结构又不确知良性蛋白 PrP^C 的生理功能的情况下,还无法判断是否有额外的核酸参与了朊病毒疾病,尤其对于单一物种也存在 PrP^{Sc} 株系多样性的现象^[12].病中的株系多样性现象是“唯蛋白”学说面临的主要挑战.同时,“类病毒”假说可以很好地解释朊病毒的株系多样性,假说认为一个少于100个核苷酸的小核酸片段可能是产生疾病的原因之一,但缺乏任何直接的核酸存在证据.此外,朊病毒还存在着种属特异性及跨越种属特异性的可能性.或许,为什么一种病能同时具有遗传性、传染性和自发性三项特征是最难解释的问题.因此,传染因子的本质和朊病毒疾病的发病原因仍然是当今生物学和医学研究中的重要课题^[3~5].

3 “唯蛋白”假说——来自强烈的基因实验证据

在 Prusiner, Weissmann, Chesebro 等人的研究基础上,当年 Gajdusek^[8] 提出的非常规病毒概念已导致了一个假设:造成朊病毒疾病的传染性病原主要是由朊病毒蛋白 PrP 的异常构型体 PrP^{Sc} 组成的.除了使用分子生物学技术对朊病毒传染因子的证明外,另一个支持“唯蛋白”假说的证据来自转基因老鼠的实验:去掉了朊病毒蛋白基因(*Prnp*)的白鼠就能完全抵抗疾病感染^[13].同时朊病毒疾病传染的种属特异性也进一步支持了“唯蛋白”假说^[1].然而,持“类病毒”观点的人认为朊病毒蛋白可能只是一种病毒受体.否则,基于蛋白错折叠的“唯蛋白”学说无法解释这类朊病毒中的株系多样性现象^[12,14,15].

事实上,认为“富含 β 折叠形式”的致病蛋白 PrP^{Sc} 无需核酸存在就可进行自我复制的“唯蛋白”假说并没得到所有生物学家的认同.这并不是因为人们得到了任何来自核酸方面的证据,而是“唯蛋白”理论模型本身仍存在许多缺陷:

第一, PrP^{Sc} 是非晶型的,不易溶解且“富含 β 折叠形式”,它的具体结构尚不清楚.其模型构象主要依赖于3方面的初步信息:(1)可被刚果红染色(但刚果红的染色机理尚不清楚);(2) Fourier 转换红外数据进行计算机模拟;(3)由圆二色散光谱数据计算得到的高 β 折叠含量.这些证据虽然都是有助于结构解析的,但它们无法给出 PrP^{Sc} 的准确结构.此外, PrP^{Sc} 的不溶性和非均相性使得无法通过 NMR 或 X 射线晶体分析获得它们在溶液中的准确构象.

第二,来自蛋白折叠理论的基础尚模糊.目前,“唯蛋白”假说的主要理论基础就是来自蛋白折叠理论中的 β 折叠假说.然而分子的 β 折叠现象本身还是一个不清楚的问题,尤其对它的形成机理更是知之甚少.用一个不确知的现象去解释另一个未知的问题,毫无疑问会得出更加模糊的结论,即便“唯蛋白”假说是正确的.

第三,目前良性细胞蛋白 PrP^C 的生理功能也是未知的. 蛋白折叠理论无法从分子水平解释朊病毒疾病的种属特异性(及跨越种属特异性的可能性)或其在单一宿主上的株系多样性. 更主要的是,从分子水平无法解释为什么一种疾病会同时具有遗传性、传染性和自发性三种特征. 鉴于在现代生物医学研究中,尤其在蛋白错折叠理论指导下的朊病毒研究中所存在的这些矛盾,朊病毒中有核酸作为遗传信息分子的可能性并无法完全被摒弃.

4 阻碍朊病毒研究的主要问题

(1) 目前尚缺乏可以测定非晶型病毒蛋白固态结构的生物物理方法;(2) 目前蛋白结构预测还无法达到测定已知序列蛋白(如 PrP^C) 功能的目的;(3) 短时间内,蛋白折叠研究目前只能对一个蛋白的大量可能性构象给出有限的信息;(4) 朊病毒蛋白与疾病传染性的内在联系及疯牛病形成的分子机理尚未找到. 而且有大量研究表明,病毒蛋白分子数量与传染能力之间相关误差很大^[14~17].

5 回顾与展望

对于一些研究者来说,朊病毒概念已经扩展到具有两个酵母表现型([URE3]和[psi⁺])的真菌^[18]. 这说明,动物中的朊病毒现象在自然界中不是唯一的,一个蛋白的构象异构体可转化与其序列相容的分子的构型. 进化过程中存在的生物多样性使得蛋白分子在生物过程中扮演着多种多样的角色,因此一个基因编码下的一个特殊蛋白序列拥有多个三维构象也并不是不可能的.

朊病毒现象为分子神经科学研究提供了一个强有力的复杂性范例,它涉及了从分子基因学、分子生物学、细胞生物学、免疫学、病毒学,到生物化学、固相物理学和蛋白化学等多学科的内容. 迄今为止,朊病毒研究中基本上阐明了与其有关的分子基因学,它为进一步研究相关病症提供了很好的研究例子. 但是一个挑战性的难题是如何对非晶型、非均相的朊病毒蛋白进行分子结构分析,这是无法用现有的分析技术获得朊病毒蛋白高级结构的原因^[19]. 因此,尽管在多肽合成、朊病毒体外制备、多肽与蛋白的分子模型与光谱研究等方面的工作提供了新的研究途径,但仍无法获取有关致病机理的准确信息.

自80年代开始,一个广为流传的学术思想就是“如果我们把某某病的基因找到了,问题就好办了”. 可是大量的事实证明,即使找到了基因还是不能解决问题. 为解决蛋白功能与疾病之间的关系问题,发展出了一个用生物物理手段研究蛋白结构和折叠问题的结构分子生物学. 许多与蛋白构象有关的疾病被冠以“蛋白构象病”(protein conformational diseases)^[20]. 两个最有代表性的例子就是疯牛病和老年性痴呆症^[11].

为什么与这些病有关的基因已发现了很多年,但它们至今仍然是不治之症? 动物朊病毒颗粒的传染威胁着一些人的生命(如疯牛病 BSE 就已超越了物种间障碍传染到人类^[21]),这在科学技术高度发展的今天不能不说是一个悲剧. 为更快地找到相关的预防和治疗药物,迫切需要从分子水平解释朊病毒疾病(也可称为克雅氏病或疯牛病^[22])的发病机理. 但目前朊病毒研究的状况似乎偏离了它的轨道,人们只专心于蛋白分子自身的折叠过程,遗忘了蛋白的一些生物化学问题. 面临该类疾病正跨越物种间障碍走向人类的现状,人们是否也迫切需要跨越一些障碍来解决朊病毒疾病的问题呢?

致谢 感谢美国 W. Zhao 脑神经研究基金会和中国科学院王宽诚基金会(香港)的资助.

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-24-2659>

参 考 文 献

- 1 Prusiner S B. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 13363~ 13383
- 2 Aguzzi A, Weissmann C. Prion research: the next frontiers. *Nature*, 1997, 389: 795~ 798
- 3 Chesebro B. BSE and Prions: Uncertainties about the agent. *Science*, 1998, 279: 42~ 43
- 4 Caughey B, Chesebro B. Prion protein and TSE. *Trends Cell Biol*, 1997, 7: 56~ 62
- 5 韩生成, 田 波. 朊病毒的基因及其蛋白质结构生物学的研究. *科学通报*, 1998, 43(19): 2017~ 2023
- 6 Voet D, Voet J G. *Biochemistry*. 2nd ed. New York: John Wiley & Son Inc, 1995. 1023~ 1028
- 7 Yang C M. Prion radicals, a marriage between the big and the small. (*Chemistry Online*), <http://www.chemistrymag.org/col/1999/c99086.htm>
- 8 Gajdusek D C. Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru. *Science*, 1977, 197: 943~ 960
- 9 Griffith J S. Nature of the Scrapie Agent. *Nature*, 1967, 215: 1043~ 1044
- 10 Prusiner S B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, 216: 136~ 144
- 11 Jarrett J T, Lansbury P T Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 1993, 73: 1055~ 1058
- 12 Farquhar C F, Somerville R A, Bruce M E. Straining the prion hypothesis. *Nature*, 1998, 391: 345~ 346
- 13 Brandner S, Raeber A, Sailer A, et al. Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 13148~ 13151
- 14 Manuelidis L, Fritch W. Infectivity and host response in Creutzfeldt-Jakob disease. *Virology*, 1996, 216: 46~ 59
- 15 Lasmazas C I, Deslys J-P, Robain O, et al. Transmission of BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, 1997, 275: 402~ 404
- 16 Chesebro B, Caughey B. Scrapie agent replication without the prion protein? *Curr Biol*, 1993, 3: 696~ 698
- 17 Kimberlin R H. Reflections on the nature of scrapie agent. *Trends in Biochem Sci*, 1982, 7: 392~ 394
- 18 Silar P, Daboussi M-J. Non-conventional infectious elements in filamentous fungi. *TIBTECH*, 1999, 17: 141~ 145
- 19 Prusiner S B, Scott M R, DeArmond S J, et al. Prion protein biology. *Cell*, 1998, 93: 337~ 348
- 20 Carrell R W, Lomas D A. Conformational disease. *The Lancet*, 1997, 350: 134~ 138
- 21 Hill A F, Desbruslais M, Joiner S, et al. The same strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 1997, 389: 448~ 450
- 22 Will R G, Cousens S N, Farrington C P, et al. Death from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet*, 1999, 353: 979

(1999-09-06 收稿, 1999-11-08 收修改稿)

科学通报(英文版 Chinese Science Bulletin)是中国科学院主办、中国科学杂志社出版的自然科学综合性学术刊物。科学通报力求及时报道自然科学各学科的基础研究和应用研究方面具有创造性的和有重要意义的最新研究成果,刊载与此直接或间接相关的论文类、评述类和消息类文章。科学通报是国际核心期刊:被收入 Science Citation Index, SciSearch, Research Alert, CC/PCES, 以及 CA, SA,《科技文献速报》等国际最重要的文献检索系统,被引用次数一直位居国内首位。科学通报面向全世界发行,是国内外读者范围最广的中国的学术期刊。科学通报正努力成为学术水平高、可读性高、编辑质量高的和外行有兴趣、同行有收获的综合性和学术性期刊。科学通报开设了8个栏目:评述、论文、简报、进展、动态、论坛、讨论和书评。科学通报的编委会由164位著名的科学家组成,其中有10位海外华人学者,主编为周光召院士。科学通报是中国唯一的学术半月刊(每月月中和月底出版)。欢迎广大科技工作者订阅。