寨卡病毒非结构蛋白NS5的结构与功能研究进展

黄星耀, 叶青, 李晓峰, 秦成峰*

军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

* 联系人, E-mail: qincf@bmi.ac.cn

2019-05-30 收稿, 2019-07-18 修回, 2019-07-19 接受, 2019-09-11 网络版发表

国家自然科学基金(81522025, 81621005, 8161148054, 31770190)和国家重点研发计划(2016YFD0500304)资助

摘要 寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)是黄病毒科黄病毒属重要成员, 因其能引起小头症、格林-巴利综合征等严重神经疾病引起了全球的关注. NS5蛋白是其基因组编码的最大非结构蛋白, 主要包括N端的甲基转移酶MTase(methyl-transferase)结构域和C端的RNA依赖的RNA聚合酶RdRp(RNA-dependent RNA polymerase)结构域. NS5蛋白是一个多功能蛋白, 不仅负责病毒基因组的复制和加帽过程, 而且参与调控宿主的多种天然免疫反应. 鉴于其具备重要的生物学功能, NS5蛋白被广泛认为是抗病毒药物设计的重要靶标. 近年来, 寨卡病毒NS5蛋白的高分辨率结构被成功解析, 其生物学功能的研究也取得了重要突破, 本文就相关领域的最新进展作一简要综述.

关键词 寨卡病毒, NS5蛋白, 结构, 功能, 抗病毒药物, 天然免疫

寨卡病毒与日本脑炎病毒、登革病毒、西尼罗病毒、黄热病毒等同属黄病毒科黄病毒属, 以蚊虫为主要传播媒介. 寨卡病毒最早于1947年在乌干达寨卡森林中的恒河猴体内分离得到, 此后半个多世纪里只有少数病例被报道, 且临床症状多为自限性发热等轻微表征. 直至2007年在西太平洋的雅浦岛首次暴发了寨卡疫情, 导致全岛四分之三的人口感染. 2013年寨卡疫情蔓延到了南太平洋的法属波利尼西亚、库克群岛等地域, 并首次报道感染病例出现了格林巴利综合征(Guillain-Barré syndrome, GBS)等严重神经疾病. 2015~2016年初, 寨卡病毒在巴西等美洲地区暴发了更大规模的流行, 不同寻常的是此次疫情伴有大量新生儿小头症等先天性发育不全的病例出现^[1]. 鉴于此次美洲寨卡病毒流行的广泛性和严重性, 2016年2月WHO宣布此次疫情为“国际关注的突发公共卫生事件”.

寨卡病毒属于具有囊膜的单股正链RNA病毒, 基

因组全长约10.8 kb, 由两端非编码区(UTR)和一个开放读码框(ORF)构成. 其基因组5'端具有I型帽子结构(m⁷GpppAm), 但3'端没有多聚腺苷酸Poly(A)尾. 其5'和3'UTR上包含多个保守互补序列和RNA二级结构, 这些功能元件主要参与寨卡病毒基因组环化及病毒与宿主间相互作用, 进而调控病毒的复制、翻译以及免疫逃逸. ORF区依次编码3个结构蛋白和7个非结构蛋白. 结构蛋白包括衣壳蛋白C、膜蛋白M和前体pr以及囊膜蛋白E, 主要负责病毒颗粒的组装, 对宿主细胞的感染吸附以及主要病毒抗原表位的形成. 非结构蛋白包括NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B和NS5蛋白, 主要负责病毒基因组复制、翻译以及调控病毒和宿主之间的相互作用. 寨卡病毒NS5蛋白是其编码的分子量最大且最保守的蛋白^[2], 其作为一个病毒复制酶不仅负责基因组的复制和加帽, 还可协助病毒进行免疫逃逸, 同时可作为疫苗药物设计的重要靶标. 自疫情暴发以来寨卡病毒NS5蛋白的结构和功能研究已取得了一系列

引用格式: 黄星耀, 叶青, 李晓峰, 等. 寨卡病毒非结构蛋白NS5的结构与功能研究进展. 科学通报, 2019, 64

Huang X Y, Ye Q, Li X F, et al. Advance in research on structure and functions of the nonstructural protein 5 of Zika virus (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64, doi: [10.1360/TB-2019-0124](https://doi.org/10.1360/TB-2019-0124)

突破, 本文旨在介绍和总结近年来寨卡病毒NS5蛋白结构和功能研究的进展情况。

1 寨卡病毒 NS5结构研究进展

1.1 NS5整体晶体结构

寨卡病毒根据全基因组序列可将其分为亚洲世系和非洲世系, 其中NS5蛋白在两个主要世系之间的序列同源性约为94%^[3]。寨卡病毒NS5蛋白的分子质量约为100 kD, 由903个氨基酸组成, 其N端为甲基转移酶MTase(methyltransferase)结构域, 负责催化病毒RNA帽子结构的N7和2'O甲基化^[4-6]; C端为RNA依赖的RNA聚合酶RdRp(RNA-dependent RNA polymerase)结构域^[7], 在病毒复制过程中负责子代RNA的合成; 两者中间为连接区, 主要负责MTase和RdRp结构域在NS5蛋白中的相对取向(图1(a)), 其在病毒复制过程中也起到了重要作用^[8]。研究表明, 寨卡病毒NS5蛋白的N端MTase

结构域能结合GTP以及相应GTP帽子结构类似物^[4,9], 推测具有脱氨转移酶GTase(guanylyltransferase)的活性。与其他黄病毒类似, 寨卡病毒NS5蛋白中间区域存在核定位序列NLS(nuclear localization signal), 能介导NS5蛋白入核^[10]。此外, NS5蛋白还能形成二聚体或低聚体, 并对自身多功能酶活性进行微调^[11]。已有研究报道, 黄热病毒NS5蛋白的Ser56位点可被磷酸化从而改变其特定的酶活性^[12]。寨卡病毒NS5蛋白也存在Ser56, 其是否可被磷酸化有待进一步研究。

国内外已有多个课题组针对寨卡病毒NS5蛋白的结构进行了研究, 其NS5全蛋白、MTase和RdRp结构域的晶体结构先后被解析(表1), 极大地促进了相关领域的发展。Li课题组^[13]于2017年3月首次发表了寨卡病毒MR766株全长NS5蛋白与S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)结合复合物的3.0 Å分辨率结构(图1(b))。如图1(b)所示, MTase结构域位于RdRp结构域上方, 两者间的包埋面积约1600 Å²^[13]。寨卡病毒NS5-MTase连接至RdRp的手

图1 寨卡病毒MR766株NS5蛋白的结构(PDB ID: 5U0B). (a) 寨卡病毒MR766株NS5蛋白一级结构; (b) 寨卡病毒NS5全长蛋白的晶体结构^[13]; (c) 寨卡病毒NS5-RdRp中7段基序、启动环以及RNA模板通道的空间位置^[13]

Figure 1 Structure of full-length ZIKV NS5 (PDB ID: 5U0B). (a) Colour-coded domain architecture of ZIKV NS5; (b) structure overview of full-length ZIKV NS5; (c) ribbon representation of the ZIKV-NS5 RdRp showing the locations of 7 structural motifs and the priming loop. The location of RNA template channel is arrowed

表 1 寨卡病毒NS5蛋白结构生物学研究进展

Table 1 Recent advances on structure of ZIKV NS5 protein

科研团队	发表时间	分辨率	蛋白质数据库PDB	寨卡病毒株
Aggarwal课题组 ^[4]	2016年9月	MTase-SAM: 1.33 Å MTase-SAM/m ⁷ Gpp: 1.50 Å	5KQR, 5KQS	H/PF/2013株
Jin课题组 ^[9]	2016年12月	MTase-GTP/SAH: 2.05 Å MTase-m ⁷ GpppA/SAH: 2.45 Å	5GOZ, 5GP1	Hangzhou/2016株
Decrolya课题组 ^[6]	2017年2月	MTase-SAM: 2.01 Å	5M5B	H/PF/2013株
Li课题组 ^[13]	2017年3月	全长NS5-SAH: 3.0 Å RdRp: 3.0 Å	5U0B, 5U0C	MR766株
Song课题组 ^[14]	2017年3月	全长NS5-SAH: 3.3 Å	5TMH	MR766株
Oliva课题组 ^[7]	2017年3月	RdRp: 1.9 Å	5U04	MR766株
高福课题组 ^[15]	2017年3月	MTase: 2.5 Å MTase-m ⁷ GpppA: 2.6 Å RdRp: 1.8 Å	5WZ1, 5WZ2, 5WZ3	BeH819015株

指亚结构域,且主要位于RdRp的NTP模板通道上方。两者间的相互作用是通过MTase结构域C端延伸区(Pro113, Leu115, Gln117和Trp121)以及RdRp结构域的食指、无名指和中指结构域(Tyr350, Arg354, Phe466和Pro584)介导的^[13,14]。Song课题组^[14]研究发现,寨卡病毒MR766株NS5蛋白结构中的MTase和单独的MTase结构域基本一致(242Cα原子的均方差偏根为0.42 Å),表明MTase和RdRp结构域的相互作用并不导致MTase结构的变化。此外,研究人员还发现,寨卡病毒与日本脑炎病毒、登革3型病毒的NS5蛋白序列同源性分别约为68%和66%。其中寨卡病毒与日本脑炎病毒的NS5蛋白的晶体结构高度相似(872Cα原子的均方差偏根为0.63 Å),且两种病毒NS5-MTase和RdRp结构域间相互作用是由上述同一组范德华力介导的^[14]。寨卡病毒与日本脑炎病毒NS5蛋白之间的细微结构差异主要表现在MTase结构域的N端和C端延伸区、MTase和RdRp结构域间的连接区以及RdRp手掌亚结构域的一段。已有研究报道,这些区域与NS5蛋白介导的免疫抑制相关^[16]。结构的差异可能是导致寨卡病毒和日本脑炎病毒NS5蛋白拮抗I型干扰素机制不同的关键原因。相比之下,寨卡病毒和登革3型病毒的NS5蛋白晶体结构差异较大(844 Cα原子的均方差偏根为6.06 Å),这是由于MTase和RdRp结构域间的相对取向造成的差异^[14]。

1.2 NS5-MTase结构域

(i) MTase整体结构域。MTase是以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体对寨卡病毒帽子结构进行甲基化,其还可与GTP、帽子结构类似物或RNA类似物结合。

至此可将MTase结构分为3个功能区: SAM结合袋、GTP/帽子类似物结合袋以及带正电荷的RNA沟,即RNA结合袋。寨卡病毒 MTase整体结构呈球形折叠,主要包括3个亚结构域: 核心亚结构域, N端和C端亚结构域。鉴于MTase结构域在病毒帽子结构形成中的重要作用, Aggarwal课题组^[4]于2016年9月首次发表了寨卡病毒H/PF/2013株 MTase-SAM以及MTase-SAM/m⁷Gpp结合复合物在1.33和1.50 Å分辨率的晶体结构(PDB ID: 5KQR, 5KQS),为更好地理解寨卡病毒MTase甲基化功能机制提供了重要的构象依据。

(ii) MTase-核心亚结构域。MTase的核心亚结构域是α/β/α经典三明治形式的罗斯曼折叠,两侧4个α螺旋(αX, αA, αD, αE)中间夹带7个β折叠片(β1~β7),空间上形成寨卡病毒MTase上最保守的特定结构,即SAM结合袋,其是由β1, β2, αA构成的裂隙。SAM结合袋包含黄病毒MTase保守的氨基酸基序“Gly-Cys-Gly-Arg-Gly-Gly”(第81~86位氨基酸,即基序1)^[17]。可以通过这段保守基序推断黄病毒NS5蛋白是否具有MTase的活性。Aggarwal课题组^[4]通过解析寨卡病毒H/PF/2013株NS5-MTase与SAM复合物的晶体结构发现, SAM的腺嘌呤碱基位于Lys105和Ile147侧链之间,其N1, N6原子与Val132的酰胺和Asp131的侧链形成氢键;溶剂分子介导SAM的核糖与Gly106和Glu111支架以及Thr104侧链之间的相互作用; SAM的甲硫氨酸则通过与Ser56和Asp146侧链以及Gly86和Trp87支架酰胺间的相互作用而固定。与其他黄病毒一样,寨卡病毒MTase核心亚结构域包含保守的活性位点,即Lys61-Asp146-Lys182-Glu218(K-D-K-E)构成的催化四联体,其空间位置接近

SAM结合袋。

(iii) MTase-N端和C端亚结构域。MTase的N端和C端亚结构域位于其核心亚结构域的两侧, 主要由4个 α 螺旋(A1~A4)和2个 β 折叠片(B1~B2)构成。N端亚结构域包含GTP, 帽子结构类似物的结合袋。Aggarwal课题组^[4]通过解析帽子结构类似物 m^7Gpp 与寨卡病毒H/PF/2013株MTase复合物的晶体结构发现, m^7Gpp 能与N端亚结构域的A1, A2形成的裂沟以及连接核心亚结构域 $\beta 6$, $\beta 7$ 折叠片的环状结构相结合。进一步研究发现, m^7Gpp 的鸟苷酸环结合于N端亚结构域上的一个疏水袋(由Leu16, Met19, Ala21, Phe24和Lys28位点形成), 同时其糖环或二磷酸基团则可与多个位点(Lys13, Asn17, Lys28, Ser150, Arg213和Ser215)发生直接作用或溶剂介导的间接作用^[4,18]。MTase结构域的GTP结合袋据推测其在空间上位于活性位点的左侧。值得关注的是, 寨卡病毒NS5-MTase的C端亚结构域的最后3个氨基酸在所有黄病毒中均高度保守, 即三联基序Gly262-Thr263-Arg264(GTR), 但保守三联基序旁的MTase和RdRp间的连接区在黄病毒中并不保守。研究表明, GTR可能作为RdRp-MTase相互作用的轴心并调节两者间的相互作用^[19]。此外, MTase与RdRp间的连接区对于病毒复制也起到了重要作用^[8]。高福课题组^[20]研究发现, 与登革病毒类似, 寨卡病毒MTase结构域的RNA结合袋位于SAM结合袋和帽子类似物结合袋之间。RNA类似物与其结合后, NS5蛋白构象并无很大变化。

1.3 RdRp结构域

1.3.1 RdRp整体结构域

RdRp可以利用寨卡病毒RNA作为模板在无需引物的情况下合成子链RNA。其主要包括三部分: 核心聚合酶、N末端延伸以及一个共同拇指结构域插入, 即启动环(priming loop)。研究表明, 与其他黄病毒类似, 寨卡病毒(MR766株)也存在两个保守的 Zn^{2+} 结合袋, 一个由拇指结构域的His714, Cys730, Cys849构成, 另一个由手指结构域的Gly439, His443, Cys448, Cys451构成^[7]。寨卡病毒NS5-RdRp的结构域与黄病毒家族的其他成员间存在很高同源性。2017年包括高福课题组^[7,16]在内的数个科研团队解析了寨卡不同病毒株NS5-RdRp的晶体结构, 这也为开发以寨卡病毒NS5为靶点的抗病毒药物提供了结构模型。

1.3.2 RdRp-核心聚合酶结构域

RdRp的核心聚合酶结构域是以右手折叠方式呈

现, 具体可分为手掌、拇指和手指3个亚结构域。手指和拇指亚结构域通过RdRp的N末端延伸以及手指亚结构域突出的环状结构相互接触, 进而围绕形成RdRp的活性位点(D665, D666以及D535)。核心聚合酶结构域含有7段基序(motif A-motif G)主要调控子代RNA的合成(图1(c))。所有基序共同形成了RdRp三通道: RNA模板通道, 其在复制过程中结合病毒RNA模板, 位于手指和拇指亚结构域之间的界面, 在黄病毒中高度保守^[15], 中心通道, 能引导RNA模板以及子代RNA离开; NTP通道, 结构上其与RNA模板通道垂直并与活性位点相交且打开至整体RdRp的背面, 介导原料NTP进入活性位点从而进行子代RNA的复制。RdRp核心聚合酶结构域含有核定位序列 β NLS和 α/β NLS, 其具体位于手指和拇指亚结构域上。

手掌亚结构域是RdRp核心聚合酶结构域中最保守的特定结构, 具体由中心反向平行的 $\beta 4$, $\beta 5$ 折叠片围绕着5个 α 螺旋以及4个 3_{10} 螺旋构成, 包含RdRp活性位点^[16,21]。手掌亚结构域含有4段保守基序(motif A-motif D), 主要负责结合金属离子、核苷酸和RNA以及介导磷酸基团的转移。保守基序A和C包含黄病毒间高度保守且携带天冬氨酸的三联基序(motif A: Asp535-AA₄-Asp540和motif C: Gly664-Asp665-Asp666, GDD), 天冬氨酸能配位二价金属离子从而介导核苷酸的聚合, 其中保守基序C位于 $\beta 4$, $\beta 5$ 折叠片的转角; 基序B介导与RNA模板结合、转运以及NTP的特异性结合; 基序D介导核苷酸转移。

拇指亚结构域是病毒RdRp中最富多样性的结构, 其具体由2个 β 折叠片($\beta 6$, $\beta 7$)、9个 α 螺旋($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 17$ - $\alpha 23$)和2个 3_{10} ($\eta 1$, $\eta 7$)螺旋构成, 其中反向平行的 $\beta 6$ 和 $\beta 7$ 构成了拇指与手掌亚结构域间的交界面同时也组成了保守的基序E, 其能与病毒RNA首位核苷酸ATP结合^[16,21]。各个螺旋之间由环状结构连接, 其中的两个环状结构在病毒RNA合成过程中起到重要作用。一个环连接 $\alpha 17$ 和 $\alpha 18$ 螺旋并指向手指亚结构域, 其与手指结构域共同形成RNA模板通道。另一个环连接 $\alpha 19$ 和 $\alpha 20$ 螺旋, 其蛋白一级序列在黄病毒中高度保守, 即启动环^[21](本文将启动环列入拇指亚结构域讨论)。黄病毒RdRp起始复制是无需引物依赖型, 即通过“de novo”机制进行合成。研究表明, 与引物依赖型RdRp(比如杯状病毒)相比, 无需引物依赖型RdRp的拇指亚结构域更小且具有一个更紧凑的活性位点和更狭窄RNA模板通道, RNA模板通道只能容纳单链RNA。利用“de novo”机

制启动RNA合成的RdRp区别于引物依赖型RdRp的一个重要特征就是其含有启动环。从丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒等RdRp的结构研究表明,从拇指亚结构域突出的启动环延伸到活性位点,稳定了复制前启动复合物的形成,同时封闭RNA的出口通道^[22~24]。随后RdRp从起始状态到延伸状态的过渡导致了启动环构象的转变,从而允许RNA产物从RdRp分子出口。鉴于寨卡病毒RdRp中也存在启动环,推测寨卡病毒RdRp从复制启动阶段到延伸阶段的过渡也采用类似的调节机制。

手指亚结构域具体分为食指、中指、无名指、小指等区域,其主要通过参与活性位点、NTP通道以及RNA模板通道的形成来调节子代RNA的合成。手指亚结构域有4个可变环(分别连接 $\beta 1-\alpha 2$, $\alpha 3-\alpha 4$, $\alpha 6-\alpha 7$, $\alpha 7-\alpha 8$),它们在黄病毒RdRp结构域中是无序的^[15]。在病毒基因组复制过程中,因可变环处于RNA模板通道的上方,所以其在调节RdRp的构象上起到了重要的作用^[15]。可变环中包含有基序F和基序G,前者包含有带正电氨基酸负责与NTP原料的结合,后者负责与RNA模板的结合。此外,手指亚结构域还包含核定位序列NLS其能介导NS5蛋白入核。这些功能元件在维持RdRp结构稳定中均起到重要作用。

1.3.3 RdRp-N末端延伸

寨卡病毒核心聚合酶的N-末端延伸区(第275~304位氨基酸)包含一个 α 螺旋和一个 β 折叠片。有些作者将

其归纳为MTase结构的一部分。然而解析日本脑炎病毒等NS5蛋白的晶体结构时发现,它能与RdRp核心聚合酶结构域结合但与MTase结构域的相互作用很小^[19],所以本文将其归纳为寨卡病毒NS5-RdRp结构的一部分。N末端延伸区并不存在于丙型肝炎病毒、牛病毒性腹泻病毒等。相关研究表明,西尼罗病毒NS5蛋白的RdRp结构域去掉N末端延伸区后丧失了其RdRp的活性^[25]。虽然它的功能目前还不清楚,但N-末端延伸可能通过与手指亚结构域的相互作用从而对RdRp起辅助作用。

2 寨卡病毒NS5蛋白的生物学功能

2.1 参与病毒基因组RNA复制

寨卡病毒NS5蛋白作为病毒复制酶能直接参与基因组的复制,该功能主要由其RdRp结构域负责完成。寨卡病毒与黄病毒家族的其他成员类似,在子代负链RNA合成过程中对模板是有要求的,正链RNA模板需经历环化启动复制。病毒RNA的环化通过两端保守互补序列间的长距离相互作用进而形成圆环,这一保守过程对其基因组的复制密切相关(图2(a))^[26]。寨卡病毒环化序列主要包括位于起始密码子AUG上下游的保守基序5'UAR(5'upstream AUG region,图2(a)中黄色标示),5'DAR(5'downstream AUG region,图2(a)中蓝色标示)以及C蛋白编码区的5'CS(5'~3'cyclization sequence,

图2 寨卡病毒环化模型及其经典加帽途径。(a) 寨卡病毒NS5蛋白参与基因组复制,环化功能元件已在图中用不同颜色标出;(b) 寨卡病毒的经典加帽途径

Figure 2 The model of ZIKV RNA cyclization and the canonical mechanism of RNA CAP formation. (a) The mechanistic model for the function of NS5 protein in ZIKV replication. The cis-acting RNA elements required for ZIKV genome cyclization were colour-coded; (b) the canonical capping mechanism of ZIKV

图2(a)中红色标示)^[26-28]. 寨卡病毒基因组复制过程中, 上述3个环化序列通过与3'UTR区相应的互补序列配对使病毒RNA形成拉链式的环化基因组. 寨卡病毒的UTR区还存在保守的RNA二级结构, 比如5'UTR区存在保守茎环SLA(stem loop A)以及起始密码子上游具有“开关”功能的顺式RNA调控元件UFS(upstream-AUG-region-flanking stem, 图2(a)中绿色标示)^[29,30], 主要负责启动与调控子代负链RNA在3'端的合成; 在3'UTR区的末尾存在保守茎环结构3'SL, 研究表明该结构域能结合宿主细胞因子进而调节病毒的复制^[31].

目前我们团队已经对黄病毒的复制模型进行了系统研究. 基于上述顺式调控元件提出了NS5复制酶参与寨卡病毒基因组复制的模型: 寨卡病毒基因组进入细胞质后, 位于病毒基因组5'和3'末端的互补序列经长距离相互作用使基因组环化. 接着病毒利用宿主对自身环化基因组进行翻译, 产生足够水平的病毒蛋白用于子代病毒RNA合成. 寨卡病毒复制蛋白(NS5, NS3蛋白等)开始积累并形成复制复合体RC(replication complex). 此时NS5复制酶被招募并结合至5'UTR区的SLA结构, 接着就近转移至环化基因组3'末端的起始位点, 其RdRp功能区开始招募NTP并启动子代负链RNA的合成, 最终形成双链复制型RF(double-stranded replication form). RC以RF为模板合成子代正链RNA过程中, 包括UFS, SLA在内的5'末端的功能元件在新合成的子代正链RNA中同时形成, 因基因组未环化UFS处于双链结构, 即“打开”状态, 从而促使NS5复制酶被招募并结合子代正链RNA的5'末端的SLA. 最后子代正链RNA合成后, 基因组通过末端相互作用再次发生环化使UFS双链结构破坏, 即“关闭”状态, 从而降低了NS5复制酶与5'末端的结合能力, 促进其转移至3'末端开始下一轮负链合成. 寨卡病毒NS5复制酶结合基因组的动态调控对于维持适当水平的病毒RNA以及确保病毒RNA复制的全局平衡都有重要意义.

2.2 参与基因组RNA加帽

黄病毒基因组5'端存在CAP I型帽子结构, 而且其加帽过程与真核细胞相同^[32]. 在真核细胞中, mRNA 5'末端的帽子结构是一种重要的结构修饰, 它允许mRNA的高效翻译, 指导前mRNA的剪接, mRNA核转运, 限制宿主5'~3'核酸外核酶降解mRNA以及识别外源RNA等. 病毒在与宿主斗争中也进化出帽子结构使宿主无法区分外源RNA与自身mRNA. 寨卡病毒同黄

病毒家族的其他成员(登革病毒、日本脑炎病毒等)加帽的过程类似, 分别经历了RNA三磷酸酶RTase(RNA 5'-triphosphatase), GTase以及MTase的催化过程(图2(b)). 一般其过程可分为以下4个步骤: 首先RTase催化去除mRNA起始的腺嘌呤三磷酸的 γ 磷酸基团, 形成5'-ppA-RNA; 其次GTase催化GMP转移到ppA上, 形成5'-5'三磷酸基团G^{5'}ppp^{5'}A-RNA; 然后N7MTase催化鸟嘌呤碱基N7位置甲基化, 形成m⁷GpppA-RNA即CAP 0型帽子结构; 最后2'OMTase催化m⁷GpppA-RNA的第一个腺嘌呤核糖核苷酸的2'O位置甲基化, 形成m⁷GpppAm-RNA, 即CAP I型帽子结构. 黄病毒因在其长期适应过程中进化出了自身的加帽系统. 黄病毒NS5蛋白N端以SAM为甲基供体, 具有MTase活性^[33]. 它参与了帽子结构形成过程中后两步N7以及2'O的甲基化. NS5蛋白N端还具有GTase活性, 其可利用GTP作为底物催化形成GMP-NS5中间体然后将GMP转移到RNA末端的ppA上^[34]. 此外, NS3蛋白的解旋活性也有利于刺激中间体的形成^[34]. 值得一提的是, 黄病毒帽子结构的2'O甲基化可以协助病毒逃避宿主IFIT蛋白(interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats)介导的固有抗病毒反应^[35]. 相关研究发现, 2'OMTase功能缺陷的日本脑炎病毒能在小鼠中高度减毒同时能增强病毒对干扰素以及IFIT介导的抗病毒反应的敏感性^[36]. 最近, 寨卡病毒NS5-MTase晶体结构被成功解析并已研究证明其能对病毒RNA帽子结构进行甲基化^[6]. 鉴于NS5-MTase在病毒复制和宿主天然免疫反应中的重要作用, 其作为靶向抗寨卡病毒药物具有很大的前景.

2.3 核定位

寨卡病毒的NS5蛋白能在细胞核中累积. 分子质量超过45 kD的蛋白通常其核转运的过程需要一些核转运因子比如核输入蛋白 α/β , NLS受体等. 研究发现, 黄病毒NS5蛋白上存在两个核定位序列 β NLS以及 α/β NLS, 其分别可与核输入蛋白 β 以及核输入蛋白 α/β 结合. 与已知黄病毒RdRp序列比较, 推测寨卡病毒NS5-RdRp存在核定位序列 β NLS(第316~367位氨基酸)以及 α/β NLS(第368~415位氨基酸). NS5蛋白的核定位序列是RdRp结构域重要组成部分, 同时对于黄病毒的复制也起到了关键的作用. 研究表明, 将突变引入NLS能降低细胞核中NS5蛋白含量同时病毒复制水平也显著降低甚至完全消失^[37]. 登革病毒RdRp的 β NLS核定位区存在保守20个氨基酸(Ala342~Thr361), 其可与NS3蛋白

特异性结合^[38]。寨卡病毒在该区域也存在Ala343~Thr362保守20个氨基酸,推测其也具有类似功能。新加坡Subhash G. Vasudevan课题组研究发现,不同寨卡病毒株的NS5蛋白在细胞核中呈现出了球形壳状且其中不含有DNA^[10]。同时发现NLS的Lys390-Arg391-Pro392-Arg393对于NS5蛋白入核起到关键作用,当突变为Ala390-Arg391-Pro392-Ala393发现NS5蛋白在胞质中积累但不能入核^[10]。此外,激光共聚焦实验表明,寨卡病毒NS5蛋白能与核输入蛋白 α 共定位而不能与核输入蛋白 β 共定位。黄病毒NS5蛋白的 β NLS区还存在核输出序列NES(nuclear export sequence),在核输出蛋白CRM-1蛋白的识别下介导NS5输出^[39]。此外,在NES引入突变后能使NS5蛋白在细胞核内累积增多^[39]。寨卡病毒的NES有待进一步研究。

2.4 抑制I型干扰素

寨卡病毒自身进化过程中获得了多种免疫逃逸的机制来对抗宿主的I型干扰素系统,其中NS5蛋白拮抗I型干扰素系统的JAK-STAT信号通路是最直接最有效的方式之一^[40]。值得关注的是,寨卡病毒与登革病毒的NS5蛋白相似,其通过结合并降解转录激活因子STAT2来阻断I型干扰素信号通路^[41]。早期研究发现,登革病毒NS5蛋白需遵循N端法则才能发挥其降解STAT2的功能,即NS5蛋白的N端需经蛋白酶切割后才能发挥其降解STAT2的功能,以单一蛋白表达NS5时虽能抑制STAT2磷酸化却无法降解STAT2分子^[42]。进一步研究表明,蛋白酶并不仅限于病毒自身蛋白酶NS2B/3,也可能是内源性的泛素水解酶。此外,登革病毒NS5蛋白降解STAT2依赖于N末端的氨基酸残基但结合并不依赖它,N末端起始的10个氨基酸是降解STAT2的必要条件^[42]。进一步研究发现,登革病毒NS5蛋白N端的前5个氨基酸能结合E3泛素连接酶UBR4从而降解STAT2^[43]。以上结果表明,NS5蛋白N端的水解赋予了其拮抗I型干扰素的功能。与登革病毒NS5蛋白降解STAT2的机制不同,寨卡病毒NS5蛋白不遵循N端法则(N-end rule),N端未经蛋白酶切割单独表达NS5蛋白也能降解STAT2,同时降解STAT2无需依赖UBR4泛素连接酶的协同作用^[41]。缺失了N端起始10个氨基酸对于寨卡病毒降解STAT2也没有影响。进一步研究发现,寨卡病毒NS5的MTase功能区和STAT2有直接相互作用,但MTase功能区降解蛋白能力弱于具有完整结构的NS5蛋白^[41]。然而两者也有共性:寨卡病毒NS5蛋白降解STAT2与登革

病毒一样具有物种特异性,能降解人源或者非人类灵长类的STAT2,但不能降解鼠源STAT2^[28]。也有研究报道,寨卡病毒NS5蛋白能阻碍STAT1转录激活因子的磷酸化来拮抗I型干扰素信号通路^[44]。NS5蛋白还可在I型干扰素系统上游通过阻断IRF-3和NF- κ B受体,进而拮抗I型干扰素的产生^[45]。此外,寨卡病毒NS5蛋白与NS2A, NS2B, NS4A, NS4B等非结构蛋白也能通过靶向RIG-I通路中的不同信号分子来拮抗I型干扰素的产生^[46]。值得一提的是,寨卡病毒在流行过程中其NS1蛋白发生一个保守氨基酸的变异A188V,该位点的突变使寨卡早期分离株的NS1蛋白能抑制IFN β 的产生,进而协助病毒逃避宿主免疫^[46]。进一步研究发现,寨卡病毒NS1和NS4B蛋白均能在TBK1(TANK-binding kinase 1)水平上抑制IFN β 信号通路^[47]。

2.5 激活II型干扰素信号通路

固有免疫是病毒入侵宿主的第一道防线,在抵御寨卡病毒感染过程中起到了重要的作用。但从宿主与病毒相互作用的角度出发,固有免疫的异常激活也会导致炎症、凋亡和自噬的发生,这也可能反向促进了寨卡病毒的传播,并解释了胎盘细胞和神经前体细胞的细胞病变效应^[48,49]。相关研究表明,寨卡病毒能利用炎症招募髓系细胞进而促进病毒的复制和传播^[50]。金冬雁课题组^[51]研究发现,寨卡病毒感染后的胎盘绒毛癌细胞系JEG3高表达II型干扰素(IFN γ)刺激基因,如*IRF1*, *CXCL10*,推测寨卡病毒更好地激活了II型干扰素信号通路。至此,研究人员利用GAS(IFN γ 刺激位点)的荧光素酶报告基因,评价了寨卡病毒所有非结构蛋白对II型干扰素信号通路的影响,发现NS5蛋白能有效刺激II型干扰素信号通路^[51]。进一步研究发现,寨卡病毒NS5蛋白通过促进STAT1转录因子的双聚化,从而有效结合GAS并激活II型干扰素通路^[51]。值得关注的是,在病毒感染前和感染后用IFN γ 处理JEG3细胞均能有效促进寨卡病毒本身的复制^[51]。这一研究成果也提示我们寨卡病毒能利用宿主固有免疫系统来增强自身在宿主体内的复制。图3展示的是寨卡病毒NS5蛋白对I型和II型干扰素信号通路差异调节的工作模型。基于此我们可以提出寨卡病毒NS5蛋白的一个新的工作模式:寨卡病毒NS5蛋白对STAT2的降解解除了STAT1的束缚,进而促进STAT1同源二聚化,增强II型干扰素(IFN γ)刺激基因(比如*CXCL10*, *IRF1*等)在GAS控制下的选择性转录激活。

图3 寨卡病毒NS5蛋白对I型和II型干扰素信号通路差异调节的工作模型

Figure 3 Working model for differential regulation of type I and II IFN signaling by ZIKV NS5 protein

3 抗病毒药物-NS5蛋白抑制剂

3.1 NS5-MTase抑制剂

寨卡病毒NS5-MTase加帽功能使其成为很具吸引力的抗病毒药物靶标。两种MTase底物竞争性抑制剂西奈芬净和SAH已被证实能同时阻止登革病毒NS5-MTase的N7和2'-O甲基化反应^[52]。然而,这两种抑制剂由于其细胞的非渗透性和非特异性限制了实际应用。一种新型广谱的SAM竞争性抑制剂12155,其在体外针对多种黄病毒家族成员的NS5-MTase均具有抑制活性^[53]。12155与寨卡病毒NS5-MTase结构相互作用的氨基酸位点在黄病毒多个家族成员中保守,推测其对寨卡病毒也具有抑制作用。研究报道,一种SAM类似物(MS2042)的4-氟苯基部分能侵入MTase的RNA结合通道,其可能通过占据NS5-MTase与碱基对和CAP-0型帽子腺苷2'-OH基团的结合位点进而抑制其甲基化功能^[54]。但迄今为止,MTase特异性抑制剂的设计始终存在一个难点:抗病毒药物的设计会影响宿主MTase活性,即缺乏目标特异性。比如,宿主mRNA帽子结构的N7MTase。值得关注的是,一种具有N6取代基(苄环)SAH类似物的化合物10*能抑制登革病毒NS5-MTase但其对宿主的MTase没

有影响^[55]。通过解析10*与寨卡病毒NS5-MTase结合复合物的晶体构象发现,其能靶向结合于SAM结合袋附近的疏水口袋。此外,研究发现10*化合物与寨卡病毒NS5-MTase相互作用的氨基酸位点与登革病毒一样,推测其能抑制寨卡病毒MTase功能区^[55]。

3.2 NS5-RdRp抑制剂

寨卡病毒NS5-RdRp因其独立的病毒复制活性,拥有作为病毒抑制剂靶点的天然优势。抑制RdRp活性的核苷(酸)类抑制剂已被证明具有高疗效,其可作为竞争性的原料类似物使新生RNA子链的延伸终止。埃默里大学的Kolykhalov课题组^[56]研究发现,UTP核苷酸的竞争抑制剂能有效抑制寨卡病毒RdRp活性。研究人员发现三种UTP类似物均能抑制寨卡病毒NS5-RdRp的功能:(1) 2'-C-甲基-UTP, UTP戊糖C-2'位置的氢被甲基取代;(2) 2'-C-乙炔基-UTP, UTP戊糖C-2'位置的氢被乙炔基取代;(3) 3'-dUTP(尿嘧啶脱氧核糖核苷酸),三者在1 $\mu\text{mol/L}$ UTP竞争下测得 IC_{50} 分别为5.78, 0.46和0.67 $\mu\text{mol/L}$ 。此外,研究报道一种经FDA批准美国上市的丙型肝炎病毒NS5B聚合酶的核苷酸抑制剂——索非布韦,能有效抑制寨卡病毒在人类细胞中的复制,

其主要活性代谢物是2'-F-2'-C-甲基-UTP(IC_{50} :90.76 μ mol/L)^[57]。此外,寨卡病毒感染的I型干扰素系统缺陷小鼠经索非布韦治疗后其存活率明显提高^[58]。这也表明索非布韦作为抗寨卡病毒临床用药具有光明的前景。

同时数项研究发现,ATP核苷酸的竞争抑制剂以及相应的腺苷类似物也可在体外抑制寨卡病毒^[59,60]。例如(1) 2'-C-甲基-ATP(IC_{50} : 5.6 $\pm$ 0.7 μ mol/L)或2'-C-甲基-腺苷(2'CMA),核苷(酸)戊糖C-2'位置的氢被甲基取代;(2) 7-脱氮-2'-C-甲基-ATP(IC_{50} : 7.9 $\pm$ 1.5 μ mol/L)或7-脱氮-2'-C-甲基-腺苷(7DMA),核苷(酸)戊糖C-2'位置的氢被甲基取代同时嘌呤原N-7位置脱氮;(3) 7-脱氮-2'-C-乙炔基-腺苷(NITD008),腺苷戊糖C-2'位置的氢被乙炔基取代同时腺嘌呤原N-7位置脱氮。研究表明,NITD008针对寨卡病毒GZ01株的 IC_{50} 为241 nmol/L,同时感染寨卡病毒的I型干扰素缺陷小鼠经NITD008治疗后其生存率得到提高^[61],但NITD008的体内毒性还是其受限的主要原因,推测进一步修饰NITD008可能得到有效且副作用小的抗病毒药物;(4) 几种新型ATP竞争抑制剂,其核苷与三磷酸空间上被碳环固定进而使核苷南北向锁定。

以上研究提示,甲基或乙炔基取代核苷(酸)戊糖C-2'位置的氢可设计相应的核苷酸类抑制剂,也可作为今后评价新型抗寨卡病毒化学物的基准。此外,抗寨卡病毒核苷酸抑制剂中核苷与三磷酸的整体结构和相对定位也是其重要的结构特征,这也为后续研究提供了新的骨架设计方向。

计算机辅助药物设计能更好模拟药物与受体相互作用。Elfiky^[62]等研究人员用电脑模拟设计了4种新的GTP类似物:通过对GTP戊糖C-2'位置的修饰得到了具有NS5-RdRp活性位点结合能的化合物。这些GTP类似物对寨卡病毒NS5-RdRp的亲和力高于广谱抗病毒药物利巴韦林。4个类似物戊糖C-2'取代基分别为(2-羟基

苯基)氧自由基、(3,5-二羟基苯基)氧自由基、(3-羟基苯基)氧自由基和(3-磺酰基苯基)氧自由基。在随后的研究中,他们又通过分子对接实验分析寨卡病毒NS5-RdRp结构与小分子蛋白间相互作用,从而筛选出了16种核苷(酸)抑制剂,其中3种化合物Setrobuvir, YAK, IDX-184均能很好结合寨卡病毒NS5-RdRp结构,推测其具有很好的抗病毒效果^[63]。值得一提的是,登革病毒RdRp中存在一保守的抑制剂结合域“N口袋”,其具体位于拇指亚结构域且靠近活性位点。N口袋能结合特异性小分子比如酰基磺酰胺衍生物,从而抑制登革病毒NS5-RdRp介导的RNA启动和延伸^[64]。基于寨卡病毒与登革病毒在此结合位点间的保守性,这也提示我们已经证明有效的黄病毒RdRp抑制剂对寨卡病毒可能也具有抑制效果。

4 展望

寨卡病毒NS5蛋白高分辨结构的解析极大地促进了对其生物学功能的认识和抗病毒药物的合理设计,多个候选药物在动物模型中显示出很好的抗病毒效果,有望发展为全新的抗病毒药物。同时,寨卡病毒NS5蛋白与宿主抗病毒天然免疫系统存在复杂的相互作用,其具体分子机制仍有待进一步阐明。更重要的是,寨卡病毒在长期传播流行中出现了一系列适应性突变,其中prM蛋白及NS1蛋白中先后发现了多个决定致病和传播的关键位点^[65,66]。基因组序列比对和进化分析显示,新老分离株寨卡病毒NS5蛋白也存在一系列氨基酸差异,其中亚洲世系寨卡病毒NS5蛋白上且处于全长编码区的第2634位氨基酸存在保守变异M2634V,该突变稳定存在于之后所有的美洲寨卡流行株中^[67]。最近研究发现,不同来源的寨卡毒株其对抗病毒天然免疫的诱导能力以及敏感性不同^[68]。这些生物学表型的差异是否与NS5蛋白调控宿主干扰素系统有关仍不清楚,值得进一步研究。

参考文献

- Petersen E, Wilson M E, Touch S, et al. Unexpected and rapid spread of Zika virus in the Americas-implications for public health preparedness for mass gatherings at the 2016 Brazil Olympic games. *Int J Infect Dis*, 2016, 44: 11–15
- Zhu Z, Chan J F, Tee K M, et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5: e22
- Wang A, Thurmond S, Islas L, et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 6: 1–6
- Coloma J, Jain R, Rajashankar K R, et al. Structures of NS5 methyltransferase from Zika virus. *Cell Rep*, 2016, 16: 3097–3102
- Bukrejewski M, Derewenda U, Radwanska M, et al. Crystal structures of the methyltransferase and helicase from the Zika 1947 MR766 Uganda strain. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2017, 73: 767–774

- 6 Coutard B, Barral K, Lichière J, et al. Zika virus methyltransferase: Structure and functions for drug design perspectives. *J Virol*, 2017, 91: e02202
- 7 Godoy A S, Lima G M A, Oliveira K I Z, et al. Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nat Commun*, 2017, 8: 14764
- 8 Rusanov T, Kent T, Saeed M, et al. Identification of a small interface between the methyltransferase and RNA polymerase of NS5 that is essential for Zika virus replication. *Sci Rep*, 2018, 8: 17384
- 9 Zhang C, Feng T, Cheng J, et al. Structure of the NS5 methyltransferase from Zika virus and implications in inhibitor design. *Biochem BioPhys Res Commun*, 2017, 492: 624–630
- 10 Ng I H W, Chan K W K, Tan M J A, et al. Zika virus NS5 forms supramolecular nuclear bodies that sequester importin- α and modulate the host immune and pro-inflammatory response in neuronal cells. *ACS Infect Dis*, 2019, 5: 932–948
- 11 Ferrero D S, Ruiz-Arroyo V M, Soler N, et al. Supramolecular arrangement of the full-length Zika virus NS5. *PLoS Pathog*, 2019, 15: e1007656
- 12 Bhattacharya D, Hoover S, Falk S P, et al. Phosphorylation of yellow fever virus NS5 alters methyltransferase activity. *Virology*, 2008, 380: 276–284
- 13 Zhao B, Yi G, Du F, et al. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nat Commun*, 2017, 8: 14762
- 14 Wang B, Tan X F, Thurmond S, et al. The structure of Zika virus NS5 reveals a conserved domain conformation. *Nat Commun*, 2017, 8: 14763
- 15 Lin R J, Chang B L, Yu H P, et al. Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J Virol*, 2006, 80: 5908–5918
- 16 Duan W, Song H, Wang H, et al. The crystal structure of Zika virus NS5 reveals conserved drug targets. *EMBO J*, 2017, 36: 919–933
- 17 Koonin E V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and 2 protein of reovirus. *J General Virol*, 1993, 74: 733–740
- 18 Wang B, Thurmond S, Hai R, et al. Structure and function of Zika virus NS5 protein: Perspectives for drug design. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 1723–1736
- 19 Lu G, Gong P, Tellinghuisen T L. Crystal structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003549
- 20 Shi Y, Gao G F. Structural biology of the Zika virus. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42: 443–456
- 21 Davidson A D. Chapter 2 new insights into flavivirus nonstructural protein 5. *Adv Virus Res*, 2009, 74: 41–101
- 22 Butcher S J, Grimes J M, Makeyev E V, et al. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature*, 2001, 410: 235–240
- 23 Appleby T C, Perry J K, Murakami E, et al. Structural basis for RNA replication by the hepatitis C virus polymerase. *Science*, 2015, 347: 771–775
- 24 Surana P, Satchidanandam V, Nair D T. RNA-dependent RNA polymerase of Japanese encephalitis virus binds the initiator nucleotide GTP to form a mechanistically important pre-initiation state. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 2758–2773
- 25 Malet H, Egloff M P, Selisko B, et al. Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J Biol Chem*, 2007, 282: 10678–10689
- 26 Alvarez D E, Lodeiro M F, Ludueña S J, et al. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol*, 2005, 79: 6631–6643
- 27 Friebe P, Shi P Y, Harris E. The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication. *J Virol*, 2011, 85: 1900–1905
- 28 Khromykh A A, Meka H, Guyatt K J, et al. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol*, 2001, 75: 6719–6728
- 29 Liu Z Y, Li X F, Jiang T, et al. Viral RNA switch mediates the dynamic control of flavivirus replicase recruitment by genome cyclization. *eLife*, 2016, 5: e17636
- 30 Filomatori C V, Lodeiro M F, Alvarez D E, et al. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev*, 2006, 20: 2238–2249
- 31 Brinton M A. Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus. *Viruses*, 2013, 6: 13–53
- 32 Decroly E, Ferron F, Lescar J, et al. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 10: 51–65
- 33 Zhou Y, Ray D, Zhao Y, et al. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J Virol*, 2007, 81: 3891–3903
- 34 Issur M, Geiss B J, Bougie I, et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA*, 2009, 15: 2340–2350
- 35 Daffis S, Szretter K J, Schriewer J, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, 2010, 468: 452–456
- 36 Li S H, Dong H, Li X F, et al. Rational design of a flavivirus vaccine by abolishing viral RNA 2'-O methylation. *J Virol*, 2013, 87: 5812–5819
- 37 Pryor M J, Rawlinson S M, Butcher R E, et al. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin α/β -recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. *Traffic*, 2007, 8: 795–807
- 38 Johansson M, Jans D A, Vasudevan S G, et al. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- β and the viral helicase, NS3. *J General Virol*, 2001, 25: 735–745
- 39 Rawlinson S M, Pryor M J, Wright P J, et al. CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8

- induction and virus production. *J Biol Chem*, 2009, 284: 15589–15597
- 40 Best S M. The many faces of the flavivirus NS5 protein in antagonism of type I interferon signaling. *J Virol*, 2017, 91: e01970
- 41 Grant A, Ponia S S, Tripathi S, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 882–890
- 42 Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi P Y, et al. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*, 2009, 83: 5408–5418
- 43 Morrison J, Laurent-Rolle M, Maestre A M, et al. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003265
- 44 Hertzog J, Dias Junior A G, Rigby R E, et al. Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *Eur J Immunol*, 2018, 48: 1120–1136
- 45 Kumar A, Hou S, Airo A M, et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep*, 2016, 17: 1766–1775
- 46 Xia H, Luo H, Shan C, et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat Commun*, 2018, 9: 414
- 47 Wu Y, Liu Q, Zhou J, et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins *in vitro*. *Cell Discov*, 2017, 3: 17006
- 48 Dang J, Tiwari S K, Lichinchi G, et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 258–265
- 49 Frumence E, Roche M, Krejbich-Trotot P, et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology*, 2016, 493: 217–226
- 50 Pinggen M, Bryden S R, Pondeville E, et al. Host inflammatory response to mosquito bites enhances the severity of arbovirus infection. *Immunity*, 2016, 44: 1455–1469
- 51 Chaudhary V, Yuen K S, Chan J F W, et al. Selective activation of type II interferon signaling by Zika virus NS5 protein. *J Virol*, 2017, 91: e00163
- 52 Dong H, Liu L, Zou G, et al. Structural and functional analyses of a conserved hydrophobic pocket of flavivirus methyltransferase. *J Biol Chem*, 2010, 285: 32586–32595
- 53 Brecher M, Chen H, Li Z, et al. Identification and characterization of novel broad-spectrum inhibitors of the flavivirus methyltransferase. *ACS Infect Dis*, 2015, 1: 340–349
- 54 Jain R, Butler K V, Coloma J, et al. Development of a S-adenosylmethionine analog that intrudes the RNA-cap binding site of Zika methyltransferase. *Sci Rep*, 2017, 7: 1632
- 55 Lim S P, Sonntag L S, Noble C, et al. Small molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase. *J Biol Chem*, 2011, 286: 6233–6240
- 56 Lu G, Bluemling G R, Collop P, et al. Analysis of ribonucleotide 5'-triphosphate analogs as potential inhibitors of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase by using nonradioactive polymerase assays. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61: e01967
- 57 Reznik S E, Ashby Jr C R. Sofosbuvir: An antiviral drug with potential efficacy against Zika infection. *Int J Infect Dis*, 2017, 55: 29–30
- 58 Ferreira A C, Zaverucha-do-Valle C, Reis P A, et al. Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. *Sci Rep*, 2017, 7: 9409
- 59 Hercík K, Kozak J, Šála M, et al. Adenosine triphosphate analogs can efficiently inhibit the Zika virus RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res*, 2017, 137: 131–133
- 60 Eyer L, Nencka R, Huvarová I, et al. Nucleoside inhibitors of Zika virus. *J Infect Dis*, 2016, 214: 707–711
- 61 Deng Y Q, Zhang N N, Li C F, et al. Adenosine analog NITD008 is a potent inhibitor of Zika virus. *Open Forum Infect Dis*, 2016, 3: ofw175
- 62 Elfiky A A. Zika virus: Novel guanosine derivatives revealed strong binding and possible inhibition of the polymerase. *Future Virol*, 2017, 12: 721–728
- 63 Elfiky A A, Ismail A M. Molecular docking revealed the binding of nucleotide/side inhibitors to Zika viral polymerase solved structures. *SAR QSAR Environ Res*, 2018, 29: 409–418
- 64 Lim S P, Noble C G, Seh C C, et al. Potent allosteric dengue virus NS5 polymerase inhibitors: Mechanism of action and resistance profiling. *PLoS Pathog*, 2016, 12: e1005737
- 65 Yuan L, Huang X Y, Liu Z Y, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, 2017, 358: 933–936
- 66 Liu Y, Liu J, Du S, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature*, 2017, 545: 482–486
- 67 Liu Z Y, Shi W F, Qin C F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17: 131–139
- 68 Esser-Nobis K, Aarberg L D, Roby J A, et al. Comparative analysis of African and Asian lineage-derived Zika virus strains reveals differences in activation of and sensitivity to antiviral innate immunity. *J Virol*, 2019, 93: e00640–19

Summary for “寨卡病毒非结构蛋白NS5的结构与功能研究进展”

Advance in research on structure and functions of the nonstructural protein 5 of Zika virus

Xingyao Huang, Qing Ye, Xiaofeng Li & Chengfeng Qin*

Department of Virology, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

* Corresponding author, E-mail: qincf@bmi.ac.cn

Zika virus (ZIKV) is an important member of genus *Flavivirus* which includes dengue virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, and yellow fever virus. ZIKV has attracted worldwide attention because of its unexpected causal link to microcephaly, Guillain-Barré syndrome, and other serious neurological diseases. So far, it has been spreading to 90 countries or territories worldwide, and approximately 3.6 billion people are now living at risk of ZIKV infection. Although a lot of efforts have been made to understand the pathogenesis of ZIKV, there is no approved vaccines or antiviral drugs available. ZIKV has a single-stranded and positive-sense genome RNA, which contains a single open reading frame flanked by the highly structured untranslated regions (UTRs). The ORF encodes a polyprotein precursor which is further cleaved into 3 structural proteins (C, prM/M and E) and 7 nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) by either host or viral protease. ZIKV NS5 is the largest and the most conserved protein among all viral proteins. ZIKV NS5 can be divided into two domains: the N-terminal methyltransferase (MTase) domain and C-terminal RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain. Recently, the high-resolution structure of full-length ZIKV NS5 protein as well as the individual MTase and RdRp domains have been resolved, which led to better understanding of its biological function. As a multifunctional protein, ZIKV NS5 interacts with several *cis*-acting RNA elements located in the 5'UTR to initiate viral RNA synthesis, and adds the 5'RNA cap structure to facilitate translation of the polyprotein. NS5 is also involved in the regulation of host innate antiviral immune responses. As such, ZIKV NS5 is widely considered to be a potential target for antiviral drug design, and the research towards this goal also accelerated our understanding of its structure and function. A panel of small molecule inhibitors targeting ZIKV NS5 has been identified to have ideal antiviral effects in both cell cultures and animal models. This review summarizes recent advances on the structure and biological functions of ZIKV NS5 protein.

Zika virus, NS5 protein, structure, biological function, innate immunity, antiviral drugs

doi: [10.1360/TB-2019-0124](https://doi.org/10.1360/TB-2019-0124)