

HIV-1 壳体蛋白的结构及其病毒样颗粒疫苗

孙晓光 宋长征*

(卫生部生物技术药物重点实验室 山东省医药生物技术研究中心 山东省医学科学院, 济南 250062)

摘要 人类免疫缺陷病毒(HIV)的壳体蛋白(CA)在 HIV 病毒的组装和成熟过程中起着至关重要的作用。近年来,壳体蛋白的体外表达及其疫苗的研制成了 HIV 各项研究的焦点。由于壳体蛋白具有较好的保守性,用其制得的疫苗也会提供比包膜蛋白更为广泛的免疫保护力。另外若将 CA 在体外表达成一个颗粒状结构,会增强其免疫原性,可以使疫苗发挥出更大的效力。

关键词 HIV-1, 壳体蛋白, 病毒样颗粒, 疫苗

中图分类号 Q61 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)05-0516-05

人类免疫缺陷病毒具有独特的病毒颗粒结构,其核心为截头圆锥状,是由病毒壳体蛋白(Capsid, CA)构成的一个蛋白外壳包绕着内部的核糖蛋白复合物所形成。目前,尽管人们已经弄清了 HIV 病毒的整体结构,但在分子水平上对病毒颗粒构成组分的结构尚不太清楚,病毒颗粒的成熟,衣壳的形成是一个十分复杂的过程,弄清这一过程,有助于抗病毒药物及疫苗的研制,可以为人类提供一个研究预防和治疗 HIV 感染的新途径,为此需要研究 CA 的生化及结构特征,以及在病毒颗粒的组装成熟过程中的作用。

1 壳体蛋白的结构功能

1.1 gag 基因及其编码产物

HIV 基因组由两条单正链 RNA 组成,其主要基因结构和组合形式与其他反转录病毒相同,均由 5' 末端长重复区(LTR) 结构蛋白编码区(gag) 蛋白酶编码区(pro) 具有多种酶活性的蛋白编码区(pol) 外膜蛋白(env) 和 3' 末端的 LTR 组成。为最大程度地利用有限的基因, HIV-1 基因编码区有很多重叠,尤其在基因组的 3' 端。其部分基因如 *tat* 和 *rev* 是不连续的,被插入的内含子分隔成两个外显子。gag 编码区编码 55kD 的前体蛋白,在病毒成熟过程中,被 pol 基因编码的蛋白酶水解,分别产生如下的蛋白片段:基质蛋白(MA 1-132) P17、外壳蛋白(CA 133-363) P24、P2(364-376) 核衣壳蛋白(NC 377-432) P15、P1(433-448) 和 P6(449-550) (图 1A)。基质蛋白在 N 端被修饰呈疏水状态,能插入病毒包膜的一类质双层中,对 HIV-1 的形态起稳定作用。而壳体蛋白、核衣壳蛋白和病毒的 RNA 浓缩形成病毒的核心(图 1B)。两条 RNA 链和与之结合的 NC 蛋白形成一个高电子密度的核

糖核蛋白复合物,增强了 RNA 的热稳定性。CA 则形成一个圆锥状的外壳将 RNA-NC 聚合物包绕起来。CA、MA、NA 均为 HIV 的组织特异性抗原,故称作 gag 抗原,它们都有保护病毒 RNA 不受外界核酸酶降解的作用。

1.2 CA 的结构

当 gag 前体蛋白被水解时,它们的局部结构伴随着病毒的成熟可发生较为显著的变化。事实上,水解后的壳体蛋白的 N-末端的精细结构强烈地证实了水解过程使 gag 前体蛋白的 MA-CA 结合部位附近的结构发生明显的改变^[1]。近年来,对成熟 HIV-1 病毒颗粒的蛋白进行了大量的高分辨率的结构分析,成熟的 HIV-1 壳体蛋白包括 N-末端核心区域(CA^N) 和 C-末端二聚体区域(CA^C),它们都独立地进行折叠并通过一个灵活易变的接头连接起来^[2,3]。

1.2.1 CA 的 N-末端的结构 利用多维核磁共振光谱法可以得到 CA 的 N-末端核心区域(1-151) 的三维结构。这个结构不同于未被分解之时的结构,共包含有 7 个 α -螺旋, 2 个 β 发夹结构和一个部分暴露的规律的环状结构。这个区域的形态像一个箭头, β -发夹结构和暴露的环状结构构成两条边, 相对位于 C-末端的 α -螺旋则构成了锐端。 β -发夹结构包含 1-13 个氨基酸残基,靠在 N-末端的脯氨酸残基(Pro1) 和高度保守的天冬氨酸残基(Asp51) 之间形成的盐键来稳定其结构(图 1C)。许多现象都表明 β -发夹结构是在 MA-CA 结合部位水解后才形成的^[4],说明水解过程引起了 CA 局部结构的变化。重新折叠后的两个 N-末端结合从而构建一个新的 CA-CA 结合部位对于成功组装成一个锥形核心也是必需的。CA 负责包含约 200 个拷贝的对 HIV-1 的传染性起重要作用的宿主蛋白环孢素 A(CypA) 的包装^[5]。尽管 CypA 的确切功

能尚未得知,近来许多研究证明它有助于 HIV-1 传染过程中壳体蛋白颗粒的拆卸^[6]。HIV-1 病毒与 CypA 的结合位点位于暴露的环状结构上,包含有重要的脯氨酸残基 Pro90。在自由的单体情况下,Pro90 在顺式构象和反式构象之间不断的转换,使得 CypA 催化含 Pro90 的环状结构在顺式和反式构象之间的互变的可能性大大提高^[7]。

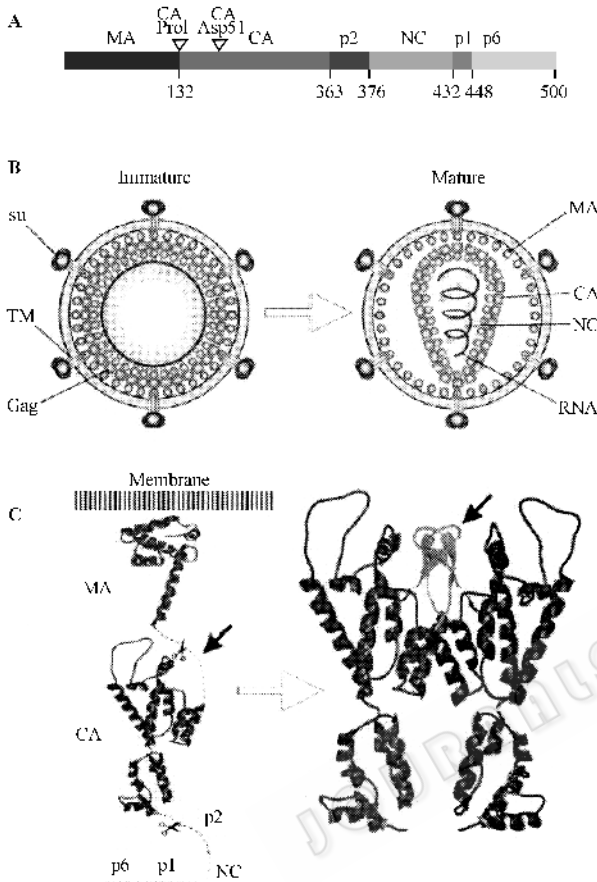


图 1 HIV-1 颗粒的结构及其成熟过程^[8]

Fig.1 Structure and maturation of the HIV-1 virion^[8]

(A) Domain structure of the HIV-1 gag polyprotein. Locations of the capsid Pro1 and Asp51 residues. (B) Schematic structures of immature and mature HIV-1 particles. (C) Model for structural rearrangement of the HIV-1 capsid protein upon proteolytic processing at the MA-CA junction of gag. Two molecules of capsid are shown to illustrate how folding of the capsid β -hairpin (small arrows) could be coupled to formation of a new CA-CA interface

构成 7 个 α -螺旋的氨基酸残基为 Ser16-Lys30, Ser33-Ser44, Thr48-Val59, His62-His84, Arg100-Ala105, Thr110-Thr119 和 Val126-Ser146, 构成包含 CypA 结合位点的灵活易变的环状结构为 Pro85-Pro99。

壳体蛋白重折叠所形成具有功能的变化就是形成了一个新的 CA-CA 结合部位,在 CA 与 CypA 结合形成的复合物的晶体结构的基础上,图 1C 概要地描述了此结构模型。两个壳体蛋白的螺旋 1 和 2 在分子间相互作用成为一个四螺旋束,这个四螺旋束形成一个疏水的核心^[8],从而形成了 CA-CA 接头的主要部位(图 1C)。

1.2.2 CA 的 C-末端的结构:CA 的 C-末端区域包括第 146-231 个氨基酸残基[CA(146-231)],这个区域对 CA 二聚体的形成和病毒的组装都是必需的。这个区域包括一个含有 20 个氨基酸残基的延伸,被称为主要同源区(Major homology region, MHR),它在逆转录病毒中非常保守,对病毒的组装、成熟以至传染都至关重要。CA(146-231)和 CA(151-231)的晶体结构显示此区域由 4 个螺旋和一个 N-末端的延伸股组成,CA(146-231)二聚体是通过第二个螺旋相互作用而形成。而 MHR 区则与此二聚体的接头不同,它形成一个错综复杂的氢键网状物,从而使得 N-末端的延伸股与第一和第二个螺旋相互连接起来^[9]。

HIV-1 的 CA 的晶体结构揭示 C-末端的最后 11 个氨基酸残基是杂乱无章的,这个区域包含有一个富含甘氨酸的序列 353-GVGGP-357,在 HIV-1, HIV-2 和猴艾滋病(SIV)的 gag 蛋白中这个序列是高度保守的,这说明了其在病毒复制过程中的重要性。现今的研究表明不管病毒的蛋白酶是否有活性,在这个保守序列中任何一个残基的改变都会使得在细胞外不能产生病毒颗粒。这个在病毒颗粒生产中的严重缺陷可能是由于 gag 蛋白形成多聚物的能力下降和 gag 蛋白与细胞膜的联系减弱所造成的。壳体蛋白 C-末端氨基酸不规律的特性以及 353-GVGGP-357 的保守性使得 gag 蛋白可以采用多种形态存在,这种结构的灵活性赋予 gag 蛋白形成具有不同几何结构的复杂的颗粒的能力^[10]。

1.3 CA 的保守性

HIV 的核心抗原和各种酶蛋白是比较保守的,即使是在 HIV-1、HIV-2 以及 SIV 之间,也有很高的同源性,其变异主要是在包膜蛋白。反转录病毒的 gag 蛋白的 CA 区包含有一个高度保守的 MHR 亚区,它在几乎所有的鸟类和哺乳动物的反转录病毒中都是保守的。在 MHR 中氨基酸残基的突变会降低病毒的传染性,但 MHR 的精细结构及其功能尚未得知^[11]。

为了更好地了解 MHR 的结构和功能,有人通过多种技术对人工合成的包含 CA 中的 MHR 的肽段进行了深入的研究,研究表明 MHR 的保守的螺旋状的 C-末端具备这个区域的完整的功能,对 CA 的功能起着至关重要的作用^[12]。

1.4 CA 在病毒核心装配中的作用

不管病毒的其他成分是否存在,gag 蛋白均能够自我装配成病毒样颗粒(Virus-like particle, VLP),甚至在部分氨基酸残基缺失,插入或连接外源基因后,gag 蛋白的这种自我装配能力仍不丧失。CA 在 gag 蛋白装配中的作用研究较少,以不同的反转录病毒为研究对象,得到的结果差别很大。对于鼠白血病病毒(MuLV),CA 功能区对微小的序列变化都十分敏感,还没有发现可缺失哪一部分,而不影响病毒粒子的形成。但在 RSV,大部分 CA 序列均非粒子形成所必需,例如缺失 171 个氨基酸(包括 CA 的一半,PI0 的大部分)的 gag 蛋白,形成病毒样粒子的速率与野生株 gag 蛋白相同,缺失 CA 区的反转录病毒 MHR 也不影响 VLP 的形成。在 HIV-1 中,缺失 5 端到 MHR 的核苷酸不影响 VLP 的形成和释放,而缺

失 MHR 或 MHR 到 3' 端的核苷酸则会严重阻碍 VLP 的形成。

HIV-1 病毒出芽时, gag 蛋白呈空心球体, 是为 gag 前体, 而在病毒编码的蛋白酶的作用下, 裂解为 MA、CA、NC 及 P6 等蛋白, 成为成熟颗粒。对 gag 蛋白 MA-CA 连接部位水解后在壳体蛋白 N-末端形成一个 β -发夹结构, 靠 Pro1 和 Asp51 之间形成的盐键来稳定, 而重新折叠后的 N-末端又形成了一个新的 CA-CA 结合部位, 使得装配成成熟的壳体。因此, 在 MA-CA 结合部位的水解是使得 CA 从球状组装为成熟的圆锥状的一个开关。

一些研究设计了 5 个不同的点突变来描述壳体蛋白 N-末端的 CA-CA 结合部位对于 HIV-1 复制的重要性, 每个突变的位点都选择在 CA 的表面, 目的是使分子间结构的干扰降至最低。CA 的 D51A 突变使得 β -发夹结构打开从而中断了它们分子间的联系, CA 的 A22D, E28, 29A, M39D 和 A42D 突变中断了 CA-CA 接头中四螺旋束的疏水核心中分子之间的相互作用, 而 Gln7 和 Gln9 残基位于 β -发夹结构的边上, 不参与分子间的联系, 与病毒核心的组装关系不大, 因此可用 Q7, 9A 突变作为一个对照。

野生株和突变株的 HIV-1NL4-3 基因组被转染入 293T 细胞, 2 天后可从上清液中得到病毒颗粒, 利用透射电子显微镜 (Transmission electron microscopy, TEM) 可以检测到突变病毒颗粒在形态上的缺陷, 其中最为明显的现象就是在所有的 N-末端结合部位突变的颗粒中都缺少成熟的圆锥状核心。至少检测了 200 个突变的颗粒, 但一个圆锥状颗粒也没有发现, 然而在 25% 的野生株和 Q7, 9A 对照的病毒颗粒中形成了圆锥状颗粒。造成这种现象的原因, 首先是由于病毒颗粒产生的减少使得 TEM 难以观察到, 再者是它们在大小和形状上比野生株不均匀得多的缘故。例如, CA 的 E28, 29A 突变使得颗粒大小不一, M39D 的突变使得颗粒在形状上非常不均匀。除去这些不均匀, 突变株的颗粒尽管 RNA-NC 复合物在中心浓缩成高密度的球状, 但是壳体蛋白却没能能够在其周围组装 (如 D51A 突变)。不成熟的突变颗粒也常见, 不过在环状 gag 蛋白上有一个缺口^[8]。

突变实验证明了 CA 的 N-末端 CA-CA 结合部位在 gag 蛋白的组装和 CA 的成熟过程中起了非常重要的作用。

2 体外 CA 球状结构的形成

gag 蛋白自身足以自我装配成具有球状外壳的 VLP, 随着 gag 蛋白被水解成 MA、CA、NC 和 P6, 使得变成成熟的圆锥状核心。在体外单独存在的 CA 只能形成圆柱状颗粒, 然而 CA 的 N-末端的延伸能阻止圆柱体的形成, 使形成具有不均匀直径的球状颗粒^[13]。

2.1 CA 的体外组装

在体外, CA 能够组装成中空的中空的长的圆柱状结构, 原因可能是壳体利用了许多相同的 CA-CA 接头^[14]。一些突变实验也被用来证明 CA 的 N-末端接头部位在病毒核心体外装配中的重要作用。例如用两个不同的点突变 M39D 和 D51A 来证明四螺旋束和 β -发夹结构在圆柱体形成过程中的重要作

用。Met39 埋藏在四螺旋束核心中, 它突变为 Asp 会破坏这个疏水核心。而 Asp 则与 Pro1 形成盐键来稳定 β -发夹结构, 它的突变为 Ala 可破坏盐键以及 β -发夹结构。M39D 的 CA 在组装条件下产生非常少的可被离心和被 TEM 观测到的结构。因此, M39D 突变彻底地阻断了 CA 形成圆柱状结构的能力。然而 D51A 的 CA 则可形成非常少的柱状结构, 但是 TEM 观测到的大都是无定形的蛋白聚集物, 即使是形成了柱状结构, 它比野生株的圆柱状 CA 显得短而少。因此, D51A 突变是抑制而不是阻断 CA 圆柱的形成。突变实验说明了 CA 的 N-末端的四螺旋束及 β -发夹结构有助于 CA 在体外组装成圆柱体。

2.2 MA 的氨基酸残基使 CA 装配为球状结构

将基质蛋白 (Matrix, MA) 的最后 28, 6 或 4 氨基酸残基结合到 CA 的 N-末端可用来检验 MA-CA 接合部位在 CA 的体外组装过程中的作用。核磁共振光谱学研究发现在溶液中 MA₂₈-CA 里大部分 MA 的氨基酸残基是杂乱无章的, 而且在大肠杆菌中表达的 MA₂₈-CA 蛋白部分不溶, 于是设计了另外两种 MA₆-CA 和 MA₄-CA, 借此来使 MA 的影响降至最小^[8]。

和 CA 不同, MA-CA 结合蛋白在体外不组装形成圆柱体, 而形成球状颗粒和无定形的聚集物 (图 2)。这些颗粒沉降在铺有碳的铜滤网栅上, 经负染色后通过电镜能被观测到 (图 2B), MA₄-CA 形成的球状颗粒极易和 CA 形成的圆柱体相区分 (图 2A 和 B), 并且在 MA₄-CA 中绝无圆柱状结构。MA₄-CA 颗粒有时呈非常规则的球状, 但在不成熟的 HIV-1 颗粒中用冷冻电子显微镜也可观测到不规则或成刻面状的颗粒^[15]。MA₄-CA 颗粒的平均直径为 55 ± 13 nm ($n = 20$), 比在未成熟 HIV-1 中 CA 环的直径 (~ 110 nm) 要小^[15]。对 MA-CA 结合蛋白薄层的乙酸双氧铀染色, 可以清楚地看到球状外壳的内边缘和外边缘 (图 2D), 外壳的厚度为 5.6 ± 0.6 nm ($n = 31$)。经检测, MA-CA 形成球状颗粒的效率同 MA 尾巴的长度成反比, MA₂₈-CA 蛋白不易生成球状结构, 它的大部分蛋白只是简单地聚集在一起^[8]。

这些实验说明了 CA 的 N-末端与至少 4 个 MA 的氨基酸残基结合就能使 CA 的组装由圆柱状转至球状, 而球状颗粒能增强 CA 的免疫原性, 利用此技术生产颗粒状 CA 疫苗, 会取得更好的效果。

3 与 CA 相关的疫苗

近年来, 人们在安全有效的艾滋病疫苗研究方面投入了相当大的人力物力, 大多数的 AIDS 疫苗研究都是围绕着外膜糖蛋白 gp160/gp120/gp41 展开的, 虽然有一些已经进入临床实验, 但迄今尚无理想的实验结果报道。分析其失败的原因, 可归纳为: ①疫苗毒株选择不合理; ②疫苗设计只着眼于抗体反应而忽视了细胞免疫; ③使用实验室长期传代的 HIV 毒株测得的中和抗体根本不能中和临床分离毒株; ④寡肽疫苗如 V₃ 肽等更达不到上述效果。另一个原因是其含有的抗原决定簇太少, 既不能刺激细胞免疫, 更无法应付毒株的高

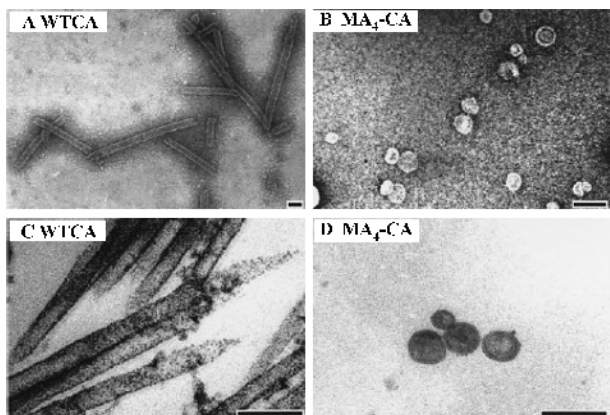


图2 MA₄-CA 蛋白球状结构的形成^[8]

Fig.2 Spherical assembly of the MA-CA protein^[8]

Left : Wild-type CA (A and C) ; right : MA₄-CA spheres (B and D). Direct transmission electron micrographic images of negatively stained particles are shown above (A and B), and thin-section transmission electron micrographs of positively stained particles are shown below (C and D)

度变异问题。

CA 无感染性,具有较好的安全性。它存在的细胞毒性 T 淋巴细胞和 B 细胞的抗原决定簇,能刺激机体产生体液和细胞免疫。HIV 感染者体内的抗 CA 的抗体,在疾病发展到艾滋病时降低或消失,这些均显示核心蛋白也有可能被用作疫苗抗原。由于核心蛋白保守性比较好,一旦成功将会提供比包膜蛋白更为广泛的免疫保护力,可以克服 Env 蛋白不能有效抵抗异源株攻击的缺陷。

体液免疫和细胞免疫的产生都对 HIV 感染和复制的条件要求非常苛刻。利用杆状病毒建立生产包含高滴度 Env 蛋白的 HIV 和 SIV 的 VLP 的系统,接种后可见 VLP 诱导细胞免疫和中和抗体反应。另外通过粘膜接种 VLP 能够高效地诱导粘膜以及全身的免疫反应。这些现象表明了包含 HIV 结构蛋白的 VLP 是能诱导抗病毒免疫反应特别是中和抗体反应的一种疫苗^[16]。

利用转基因植物来生产病毒疫苗具有可靠的安全性,可降低生产成本,提高疫苗的免疫原性。Zhang G G 等报道了利用转基因烟草表达 HIV-1 的 CA 蛋白, Southern blot 检测证实转基因植物的基因组中存在着 CA 的编码序列,对转基因植物中提取蛋白的 Western blot 检测中发现了植物表达的 CA,并且能与 CA 特异单克隆抗体发生交叉反应,证实了此 CA 保持了较好的免疫原性。酶联免疫吸附实验估计每克烟草叶可溶蛋白约含有 3.5mg。此实验说明了转基因植物为 HIV 疫苗的发展和 HIV 诊断程序提供了生产 CA 疫苗的又一途径^[17]。国内尚未见利用转基因植物表达 HIV 重组疫苗的文獻报道。

酵母的一个反转录转座子 Ty1 产生的和 gag 蛋白类似的 TYA (P1-440)在单独存在时也能自我装配成病毒样颗粒^[18]。如今已利用 TY 与 MA/CA 结合利用杆状病毒和昆虫细胞表达出 VLP 的治疗性疫苗 MA/CA :Ty-VLP (CA-VLP) 疫苗,长期追踪调查表明,CA-VLP 治疗性疫苗不会减慢艾滋病的进

程^[19],因为接种 CA-VLP 不能够提高 CA 抗体水平,也对病人体内的 CD4⁺ 细胞的减少和病毒的装配不起作用,而且易被耐受。疫苗对 CA 抗体滴度提高的失败并不是单单由免疫缺陷造成的,主要原因是大多数的抗体反应都针对了 Ty-酵母的一个免疫原^[20]。

然而不能就此否定 CA 疫苗在免疫方面的作用,在对 HIV-1 感染后自然病史的研究过程中,不止一次地发现体内有对 CA 高滴度的抗体反应时,会减缓病情的发展。在未感染 HIV 的人群中,接种 MA/CA :Ty-VLP 会引起对 CA 蛋白的体液免疫和细胞免疫反应^[20]。为了验证 MA/CA :Ty-VLP 疫苗的安全性和免疫原性,进行了一期临床实验,证明此疫苗具有诱导抗 HIV-1 的细胞毒性 T 淋巴细胞反应和粘膜抗体反应的潜力。

我们课题组和美国 Utah 大学的 Sundquist 教授合作,依照 MA 自身存在的影响 CA 形成球状 VLP 结构的最小序列 MA₄ 与 CA 融合。MA₄ 有助于 CA 在转基因枸杞中表达出 VLP 结构,提高 CA 疫苗的免疫原性。枸杞为茄科植物,作为独特的疫苗表达系统,易于遗传操作,筛选出的高表达植株可长期栽培生长,遗传性状稳定。而同属科的其它植物每一代的生存期短,反复传代造成较大的遗传变异,影响表达系统的遗传稳定性。我们将源于水稻的一个富含甘氨酸序列的信号肽 (GRP) 连接在 MA₄-CA 融合基因的 3' 端,使在枸杞中表达的 CA 疫苗被引导进入根细胞间隙,并从根系不断地分泌到培养液中,由此产生出高纯度的 CA 疫苗。转基因枸杞表达的 CA 重组疫苗不仅成本低廉,而且更加安全、更具应用价值。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Gitti R K, Lee B M, Walker J *et al.* Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*, 1996, **273** : 231 - 235
- [2] Momany C. Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. *Nature Struct Biol*, 1996, **9** : 763 - 770
- [3] Worthylake D K, Wang H, Yoo S *et al.* Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr D*, 1999, **55** : 85 - 92
- [4] Wlodawer A, Erickson J W. Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu Rev Biochem*, 1993, **62** : 543 - 585
- [5] Braaten D, Franke E K, Luban J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type-1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol*, 1996, **70** : 3551 - 3560
- [6] Ackerson B, Rey O, Canon J *et al.* Cells with high cyclophilin A content support replication of human immunodeficiency virus Type-1 Gag mutants with decreased ability to incorporate cyclophilin A. *J Virol*, 1998, **72** : 303 - 308
- [7] Gitti R K, Lee B M, Walker J *et al.* Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*, 1996, **273** (5272) : 231 - 235

- HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *EMBO J*, 1998, **17**(6): 1555 – 1568
- [9] Gamble T R, Yoo S, Vajdos F F *et al.* Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*, 1997, **278**(5339): 849 – 853
- [10] Liang C, Hu J, Whitney J B *et al.* A structurally disordered region at the C terminus of capsid plays essential roles in multimerization and membrane binding of the gag protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 2003, **77**(3): 1772 – 1783
- [11] Clish C B, Peyton D H, Barklis E. Spectroscopic study of an HIV-1 capsid protein major homology region peptide analog. *FEBS Lett*, 1996, **378**(1): 43 – 47
- [12] Clish C B, Peyton D H, Barklis E. Solution structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and moloney murine leukemia virus (MoMLV) capsid protein major-homology-region peptide analogs by NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, 1998, **257**(1): 69 – 77
- [13] Gross I, Hohenberg H, Huckhagel C *et al.* N-Terminal extension of human immunodeficiency virus capsid protein converts the *in vitro* assembly phenotype from tubular to spherical particles. *J Virol*, 1998, **72**(6): 4798 – 4810
- [14] Campbell S, Vogt V M. *In vitro* assembly of virus-like particles with Rous sarcoma virus Gag deletion mutants: identification of the p10 domain as a morphological determinant in the formation of spherical particles. *J Virol*, 1997, **71**: 4425 – 4435
- [15] Fuller S D, Wilk T, Bowen B E *et al.* Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle. *Curr Biol*, 1997, **7**: 729 – 738
- [16] Yao Q, Bu Z, Vzorov A *et al.* Virus-like particle and DNA-based candidate AIDS vaccines. *Vaccine*, 2003, **21**(7–8): 638 – 643
- [17] Zhang G G, Rodrigues L, Rovinski B *et al.* Production of HIV-1 P24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol*, 2002, **20**(2): 131 – 136
- [18] Brookman J L, Stott A J, Cheeseman P J *et al.* Analysis of TYA protein regions necessary for formation of the Ty1 virus-like particle structure. *Virology*, 1995, **212**(1): 69 – 76
- [19] Lindenburg C E, Stolte I, Langendam M W *et al.* Long-term follow-up: no effect of therapeutic vaccination with HIV-1 p17/p24 Ty virus-like particles on HIV-1 disease progression. *Vaccine*, 2002, **20**(17–18): 2343 – 2347
- [20] Veenstra J, William I G, Colebunders R *et al.* Immunization with recombinant p17/p24 Ty virus-like particles in human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis*, 1996, **174**(4): 862 – 866

The Structure and Virus-like Particle Vaccine of the HIV-1 Capsid Protein

SUN Xiao-Guang SONG Chang-Zheng*

(Key Laboratory for Biotech-Drugs of Ministry of Health, Shandong Medicinal Biotechnology Center, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

Abstract The HIV-1 capsid protein (CA) plays an essential role in viral core assembly and maturation. Proteolytic cleavage at the MA-CA junction of the retroviral gag polyprotein refolds the amino-terminal end of capsid into a β -helix structure that is stabilized by a salt bridge between the protein's processed amino-terminus and a conserved acidic residue. The refolded capsid amino-terminus then creates a new CA-CA interface, allowing assembly of the mature capsid core. Recently, researches focus on assembly of CA *in vitro* and development of CA vaccine. CA vaccine will provide widely immune protection because CA is comparatively conserved. Experiments demonstrate that fusing as few as four matrix residues onto the amino-terminus of capsid redirects protein assembly from cylinder to spheres *in vitro*. Evaluation of immunogenicity showed that immunization with virus-like particles induced both cellular and neutralizing antibody responses. Furthermore, mucosal administration of virus-like particles effectively induced both mucosal and systemic immune responses. These results indicate that virus-like particles consisting of HIV structural proteins are an attractive vaccine platform for eliciting anti-viral immune responses, especially neutralizing antibody responses. The production of antigens for vaccines in plants indicates that plant-based transgenic expression represents a viable means of producing CA vaccine for the development of HIV vaccine and for use in HIV diagnostic procedures and it has the potential as a safe and cost-effective alternative to traditional production systems.

Key words HIV-1, capsid, virus-like particle, vaccine

Received: 04-22-2003

This work was supported by Grant from Chinese National Natural Science Fund (No. 30271215).

* Corresponding author. Tel: 86-531-2919611; E-mail: genesong@sina.com