

武汉 2019 新型冠状病毒 S 蛋白 可能存在 Furin 蛋白酶切位点

李鑫^{12§}, 段广有^{3§}, 张伟¹, 施劲松⁴

陈嘉源², 陈舜梅⁵, 高山^{2*}, 阮吉寿^{1*}

¹南开大学数学科学学院, 天津 300071;

²南开大学生命科学学院, 天津 300071;

³齐鲁师范学院生命科学学院, 济南 250200;

⁴东部战区总医院, 南京 210016;

⁵昆明医科大学分子临床医学研究院, 昆明 650500

摘要: 2019 年 12 月, 中国武汉报道了 2019 新型冠状病毒 (2019 novel Coronavirus, 2019-nCoV) 引起的肺炎。基于基因组信息, 我们前期研究结果显示 2019-nCoV 与 SARS 冠状病毒虽然同属于 Beta 冠状病毒 B 亚群 (BB 冠状病毒), 但两种病毒差异很大, 这一结果与两者临床症状差异一致。前期研究还发现了 BB 冠状病毒存在大量的可变翻译, 并从分子水平揭示了 BB 冠状病毒变异快、多样性高的特点。本研究在国际上首次报道 BB 冠状病毒 S 蛋白上的一个重要突变, 这个突变使 2019-nCoV 具有了一个可供 Furin 蛋白酶切的位点, 是除鼠肝炎冠状病毒外所有的其它 BB 冠状病毒 (包括 SARS 和 SARS 样 (SARS-like) 冠状病毒) 所不具有的。这个突变有可能增强了 2019-nCoV 感染细胞的效率, 进而使其传播力显著大于 SARS 冠状病毒。由于这个突变, 2019 冠状病毒的包装机制也会不同于 SARS 等其它大部分 Beta 冠状病毒, 而有可能与鼠肝炎冠状病毒、HIV、埃博拉病毒和一些禽流感病毒的包装机制相同。作为一个意外发现, 一些禽流感病毒也可以通过突变获得 Furin 蛋白酶切位点。对这个重要突变的后续研究将为揭示 2019-nCoV 传播力强的原因, 以及为药物、抗体和疫苗的开发等工作奠定基础。

关键词: 冠状病毒; Furin 蛋白酶; 2019-nCoV; HIV; 禽流感

中图分类号: Q93 **文献标识码:** B **文章编号:** 1672-5565 (201x) 03-000-00

A furin cleavage site was discovered in the S protein of the Wuhan 2019 novel coronavirus

Xin Li^{12§}, Guangyou Duan^{3§}, Wei Zhang¹, Jinsong Shi⁴

Jiayuan Chen², Shunmei Chen⁵, Shan Gao^{2*}, Jishou Ruan^{1*}

¹ School of Mathematical Sciences, Nankai University, Tianjin, Tianjin 300071, P.R.China;

² College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin, Tianjin 300071, P.R.China;

³ School of Life Sciences, Qilu Normal University, Jinan, Shandong 250200, P.R.China;

⁴ National Clinical Research Center of Kidney Disease, Jinling Hospital, Nanjing University School of Medicine, Nanjing, Jiangsu 210016, P.R.China;

收稿日期: 201x-0x-0x; 修回日期: 201x-0x-0x.

资助项目: 无

作者简介: 李鑫, 男, 副研究员, 研究方向: 蛋白质结构; E-mail: lix1980@nankai.edu.cn.

*通讯作者: 阮吉寿, 男, 教授、博导, 研究方向: 生物信息学; E-mail: jsruan@nankai.edu.cn.

⁵ Institute of Molecular and Clinical Medicine, Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650500
P.R.China

Abstract: In 2019, the 2019 novel Coronavirus (2019-nCoV) has caused the pneumonia outbreak in Wuhan (a city of China). In our previous study, the analytical results showed that both 2019-nCoV and SARS coronavirus belongs to Betacoronavirus subgroup B (BB coronavirus), but have large differences. The most important finding was that the alternative translation of Nankai CDS could produce more than 17 putative proteins, which may be responsible for the host adaption. The genotyping of 13 viruses using the 17 putative proteins revealed the high mutation rate and diversity of betacoronavirus. The present study for the first time reported a very important mutation in the Spike (S) proteins of BB coronavirus. By this mutation, 2019-nCoV acquired a cleavage site for furin enzyme, which is not present in the S proteins of all other BB coronavirus (e.g. SARS coronavirus) except the Mouse Hepatitis coronavirus (MHV). This mutation may increase the efficiency of virus infection into cells, making 2019-nCoV has significantly stronger transmissibility than SARS coronavirus. Because of this mutation, the packing mechanism of the 2019-nCoV may be changed to being more similar to those of MHV, HIV, Ebola virus (EBoV) and some avian influenza viruses, other than those of all other BB coronavirus (e.g. SARS coronavirus) except the Mouse Hepatitis coronavirus (MHV). In addition, we unexpectedly found that some avian influenza viruses acquired a cleavage site for furin enzyme by mutation as 2019-nCoV. Further studies of this mutation will help to reveal the stronger transmissibility of 2019-nCoV and lay foundations for vaccine development and drug design of, but not limited to 2019-nCoV.

Keywords: Coronavirus; Furin enzyme; 2019-nCoV; HIV; Avian influenza virus

2019年12月, 中国武汉报道了2019新型冠状病毒(2019 novel Coronavirus, 2019-nCoV)引起的肺炎。基于2019-nCoV的基因组信息, 我们发现: (1) 2019-nCoV与严重急性呼吸综合征(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)冠状病毒(SARS Coronavirus, SARS-CoV)同属Beta冠状病毒B亚群(BB冠状病毒), 但两种病毒差异很大, 这一结果与两者临床症状差异一致; (2) 与SARS冠状病毒相比, 2019-nCoV虽然毒力较弱, 但传播力更强; (3) 溯源分析的结果支持2019-nCoV源自中华菊头蝠; (4) BB冠状病毒存在大量的可变翻译, 具有变异快、多样性高的特点。

已知多种RNA病毒侵染的都要通过病毒的膜融合蛋白与靶细胞结合(膜融合)侵入细胞。其中, SARS冠状病毒S蛋白(Spike protein)、HIV包膜糖蛋白(Envelope glycoprotein, Env)、流感病毒血凝素(Hemagglutinin, HA)和埃博拉病毒糖蛋白(Glycoprotein, GP)等属于I类膜融合蛋白[1]。比较HIV病毒与SARS冠状病毒, 相同之处有: 都是包膜病毒, 都可以通过膜融合途径进入细胞, 侵染前都需要融合蛋白被细胞蛋白酶切割, 分割为受体结合结构域和膜融合结构域。两种病毒的不同之处在于: HIV病毒的gp160在细胞内包装过程中被Furin蛋白酶切割, 分泌出的病毒颗粒表面的gp120(负责与受体结合)和gp41(负责膜融合)是分开的两个亚基; 而SARS冠状病毒分泌出的病毒颗粒表面的S蛋白(Spike Protein)中的S1(负责与受体结合)和S2(负责膜融合)仍是融合状态。SARS

冠状病毒通过两种方式侵染宿主细胞，在细胞表面有蛋白酶（如胰蛋白酶Trypsin）时，S蛋白被切割成为S1和S2两个亚基，进而与宿主细胞膜融合侵入胞内；否则，SARS冠状病毒通过胞吞途径进入宿主细胞，而后S蛋白被溶酶体内的组织蛋白酶切割（不再进一步讨论）。研究显示前一种方式（直接膜融合）的侵染效率是后者的约100到1000倍 [2]。除了鼠肝炎冠状病毒(The Mouse Hepatitis coronavirus, MHV)外，SARS等其它大部分Beta冠状病毒的S1与S2之间的交界区（Junctional region）没有被Furin蛋白酶切割的位点（cleavage site），即Furin蛋白酶切位点。

有关SARS冠状病毒感染入侵过程中的很多机制尚不明确，因此不能为药物、疫苗和抗体开发等应用提供更多信息。基于大量基因组数据的研究，特别是针对S蛋白区域的变异研究，不仅可以深入了解BB冠状病毒的感染机制，而且有助于揭示2019-nCoV感染的特点，为病毒防控以及治疗奠定基础。本研究在前期工作基础上，无意间发现了2019-nCoV基因组可能存在Furin蛋白酶切位点。这一发现暗示了2019-nCoV可能在感染途径上与SARS冠状病毒有较大差异，该病毒可能采用了HIV等其它病毒的包装机制。这个发现，为当前2019-nCoV感染的治疗提供理论支持。治疗相关病毒（例如HIV）已有的大量药物都可以考虑以“老药新用”的方式进行组合，与免疫抑制剂等药物联合使用，以提高治疗效果或者降低免疫抑制剂的副作用。

1 数据与方法

在前期研究中，我们共使用 13 条 BB 冠状病毒基因组序列，（GenBank: JX993987、JX993988、GQ153539、GQ153540、GQ153542、DQ071615、DQ412042、DQ412043、AY515512、AY572034、AY274119、MN908947 和 MG772934）。在本研究中，13 条序列根据其宿主分为五组，用于进一步研究，这五组命名为 SARS (AY274119)、果子狸 (AY515512 和 AY572034)、2019-nCoV (MN908947)、来自浙江舟山的中华菊头蝠群体 (MG772934) 和其它蝙蝠群体 (MG772934 之外 8 条来自蝙蝠的序列)。另外，华大基因提供了 29 条 2019-nCoV 基因组序列用于确认结果。在本研究中，序列多重比对使用在线软件 ClustalW2，数据处理、统计与作图使用软件 R v2.15.3 [3]，蛋白质二级结构预测 PSIPRED v4.0 [4]，所有参数采用默认值。

2 结果与分析

使用NCBI工具Blast软件，比对2019-nCoV (MN908947) 与SARS冠状病毒 (AY274119) 之间S1和S2核酸序列之间同一度，结果显示S1在两种病毒之间同一度是66.4%，而S2是80.1%，两个同一度差异很大。于是观察S1与S2之间的交界区的氨基酸序列，无意间发现了“RRAR”序列（图1A），

基于以上结果，2019-nCoV 的 S 蛋白可能因为突变引入了 Furin 蛋白酶切位点，其包装机制可能与鼠肝炎冠状病毒的包装机制相同，而不同于 SARS 等其它大部分 Beta 冠状病毒。前期实验结果表明，鼠肝炎冠状病毒的 S 蛋白在细胞内包装过程中可被 Furin 样（Furin-like）蛋白酶切割，从而分泌出 S1 和 S2 呈非融合状态的病毒颗粒 [6]。另一方面，武汉 2019 冠状病毒的 S 蛋白中新增的“RRAR”中最后一个 R 恰好是 SARS 冠状病毒 S 蛋白中的一个胰蛋白酶酶切位点 R667（图 1A），而 SARS 冠状病毒 S 蛋白中的另外一个胰蛋白酶酶切位点 R797（相比 R667 是主要的）在 2019-nCoV S 蛋白中保持不变。另外，R667 恰好对应鼠肝炎冠状病毒 S 蛋白中的 Furin 酶切位点。有实验表明如果在 SARS 冠状病毒 S 蛋白的交界区的 R667 或 R797 [7] 人为加入 Furin 酶切位点，可能会增强 S 蛋白的膜融合能力。因此，2019-nCoV 与 SARS 冠状病毒相比，同时具备 Furin(R685)和胰蛋白酶酶切位点(R815)。这种改变将使病毒更多地通过直接膜融合的方式侵染细胞，故效率更高。

在第 I 类膜融合蛋白中，HIV（GenBank: NC_001802.1）的 gp160 和埃博拉病毒（GenBank: NC_002549.1）GP 的 Furin 酶切位点分别是“REKR”和“RKIR”，而 Beta 冠状病毒只有鼠肝炎冠状病毒存在 Furin 酶切位点“RRARR”，总体上，SARS 等 Beta 冠状病毒与具有 Furin 酶切位点的其它病毒包装和感染机制不同。作为一个意外发现，一些流感病毒的 HA 也可以通过突变获得一个 Furin 蛋白酶切位点，而且这些流感病毒大部分是禽流感（表 1）。2019-nCoV 在进化过程中获得了 Furin 酶切位点，这一突变显然对其感染等生物学功能产生较大影响，其后续研究将有助于我们提高对膜融合蛋白功能以及病毒膜融合机制的认识，也有助于我们对 Beta 冠状病毒的包装和感染机制的深入研究。

表 1. 流感病毒获得 Furin 酶切位点

Table 1. Furin cleavage sites in influenza viruses

Virus ^a	Type	Subtype	AAposition ^b	Furin ^c	Host
MN653237	Influenza A	H3N2	342	RQTR	Canine
MH988772	Influenza A	H5N1	343	RKKR	Great crested grebe
MH988771	Influenza A	H5N1	343	RKKR	Cormorant
MN918143	Influenza A	H9N2	335	RSSR	Chicken
EF470587	Influenza A	H7N3	343	RMTR	Chicken
AY338459	Influenza A	H7N7	338	RRRR	Chicken
Z12617	Influenza A	H7N7	339	RRKR	Fowl
M24457	Influenza A	H7N1	339	RKKR	Chicken
CY015065	Influenza A	H7N3	338	RRRR	Turkey
Z47199	Influenza A	H7N7	339	REKR	Chicken
M17735	Influenza A	H7N7	339	REKR	Chicken
AJ493216	Influenza A	H7N1	340	RVRR	Turkey
AY303631	Influenza A	H7N3	346	RETR	Chicken
MH363669	Influenza A	H3N2	342	RQTR	Canine

MH266392	Influenza A	H3N2	342	RQTR	Canine
MH988774	Influenza A	H5N2	339	RETR	Teal
MK552554	Influenza A	H9N2	335	RSSR	Duck
LC208508	Influenza A	H9N2	335	RSSR	Duck
DQ864717	Influenza A	H5N1	343	RKKR	Goose
FJ602810	Influenza A	H5N1	343	RKKR	Great black-headed gull
EU401796	Influenza A	H5N1	343	RKKR	Peacock

第一列使用NCBI GenBank数据库的Accession Number; 第四列是Furin酶切位点在氨基酸序列中的位置; 第五列是Furin酶切位点的序列。

^a The Accession Numbers in the NCBI GenBank database. ^b The fourth column are the positions of the Furin recognition site.

^c The fifth column are the sequences of the Furin recognition site.

3 结论

本研究的主要结论: (1) 2019-nCoV 的 S 蛋白可能存在 Furin 蛋白酶切位点, 其包装机制有可能与鼠肝炎冠状病毒的包装机制相同, 而不同于 SARS 等其它大部分 Beta 冠状病毒; (2) 由于包装机制的改变, 2019-nCoV 的 S 蛋白获得了更高的侵染细胞的效率, 这可能是其传播能力大于 SARS 冠状病毒的一个原因; (3) 一些禽流感病毒也可以通过突变获得一个 Furin 蛋白酶切位点, 以提高其侵染细胞的效率。

4 讨论

2019-nCoV 包装机制的改变, 也意味着现有的大量抗病毒药物 (特别是鼠肝炎冠状病毒、HIV、埃博拉病毒和禽流感) 都可以考虑以“老药新用”的方式进行组合, 与免疫抑制剂等药物联合用药, 以提高治疗效果或降低免疫抑制剂副作用。在已有病毒治疗药物中, 有以病毒蛋白 (如 RNA 合成酶) 为靶点的药物, 也有以宿主 (人) 蛋白为靶点 (如 Furin 蛋白酶) 的药物。与当前大部分以病毒蛋白为靶点的研究不同, 南开大学阮吉寿等提出以宿主 (人) 蛋白为靶点进行药物筛选以对抗病毒, 这样就有效规避了病毒变异的影响。我们根据天津中医药大学第一附属医院的心衰治疗数据, 选定了一组治疗心衰的药物组合, 可以很好抑制 Furin 蛋白酶活性, 同时副作用较小。

致谢: 感谢南开大学生命科学学院陈仨、孔德领、卜文俊、张涛、黄大卫、刘燕强、赵强和贺秉军等各位老师对我们生物信息学研究的长期支持。感谢河北师范大学宣益波等同学为本文所做的公益性劳动。

参考文献 (References):

1. B.J. Bosch, R. van der Zee, C.A. de Haan and P.J. Rottier, The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of virology*, 2003. 77(16): p. 8801-8811.
2. S. Matsuyama, M. Ujike, S. Morikawa, M. Tashiro and F. Taguchi, Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. 102(35): p. 12543-12547.
3. GAO Shan, OU JianHong, XIAO Kai. R language and Bioconductor in bioinformatics applications(Chinese Edition) [M]. 2014, Tianjin: Tianjin Science and Technology Translation Publishing Ltd
4. Buchan,D.W.A. and Jones,D.T. (2019) The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.*, 47, W402–W407.
5. S. Molloy, P. Bresnahan, S.H. Leppla, K. Klimpel and G. Thomas, Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-XX-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. 267(23): p. 16396-16402.
6. C.A. de Haan, K. Stadler, G.-J. Godeke, B.J. Bosch and P.J. Rottier, Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. *Journal of virology*, 2004. 78(11): p. 6048-6054.
7. S. Belouzard, V.C. Chu and G.R. Whittaker, Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(14): p. 5871-5876.