

武汉 2019 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 Beta 冠状病毒引起的肺炎。基于基因组信息, 溯源分析的结果支持武汉 2019 冠状病毒源自中华菊头蝠, 但与 SARS 冠状病毒差异很大, 这一结果与两者临床症状差异一致。前期研究还发现了 Beta 冠状病毒存在大量的可变翻译, 并从分子水平揭示了该病毒变异快、多样性高的特点。本研究在国际上首次报道一个重要的变异, 这个变异引入了一个可供 Furin 蛋白酶切的位点, 是此前所有发现的 SARS 和 SARS 样 (SARS-like) 冠状病毒所不具备的, 这种变异有可能增强了武汉 2019 冠状病毒的传播能力。作为一个意外发现, 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, 以提高其感染细胞的效率。2019 冠状病毒的包装机制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, 而不同于 SARS 等其它大部分 Beta 冠状病毒。本研究的思路和方法对研究病毒变异, 以及药物、抗体和疫苗的开发等依然有指导意义。如果 Furin 蛋白酶切位点及相关机制预测正确, 意味着现有的大量抗病毒药物 (特别是 Furin 蛋白酶抑制剂) 可以利用, 实现老药新用。另外, 我们从临床治疗心衰的组合用药数据中为武汉肺炎的鸡尾酒疗法推荐了几种可以抑制 Furin 蛋白酶的药物。

关键词: 冠状病毒; Furin 蛋白酶; 切割位点; 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 Wuhan 2019 human coronavirus S protein

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: 天津市重点研发计划科技支撑重点项目 (南开大学, 项目编号: 19YFZCSY00500)

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, a human coronavirus has caused the pneumonia outbreak in Wuhan (a city of China).

Keywords: Coronavirus; Furin enzyme; Cleavage site; HIV; Avian influenza virus

2019年12月，中国武汉报道了冠状病毒（*Coronavirus*）引起的肺炎。基于该病毒（即武汉2019冠状病毒）基因组信息，我们发现：（1）武汉2019冠状病毒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）；（2）溯源分析的结果支持武汉2019冠状病毒源自中华菊头蝠，但与SARS冠状病毒差异巨大，这一结果与两者临床症状差异一致；（3）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；（4）与SARS冠状病毒相比，武汉2019冠状病毒似乎致病性更弱，但传播能力更强。进一步解读基因组数据，将为揭示该病毒传播和致病规律，以及开发药物、抗体和疫苗奠定基础。

已知的多种RNA病毒感染入侵的第一步是通过病毒的膜融合蛋白与靶细胞结合。其中，SARS冠状病毒S蛋白（Spike protein）、HIV包膜糖蛋白（Envelope glycoprotein, Env）、流感病毒的血凝素（Hemagglutinin, HA）和埃博拉病毒的糖蛋白（Glycoprotein, GP）等为I类膜融合蛋白[1]。HIV病毒与SARS冠状病毒都是包膜病毒，都可以通过膜融合途径进入细胞。两种病毒侵染时都需要融合蛋白被细胞蛋白酶切割，得到一个受体结合结构域，一个膜融合结构域和一段交界区（Junctional region）。两种病毒不同之处在于：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S1与S2之间的交界区没有Furin蛋白酶切位点（cleavage site），所以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，一种是病毒在侵染时，S蛋白被细胞表面其它蛋白酶（如胰蛋白酶 Trypsin）切割成为S1和S2两个亚基，进而直接与宿主细胞膜融合侵入胞内；另一种则是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然后再通过膜融合侵染（不再进一步讨论）。研究显示前一种方式的侵染效率是后者的约100到1000倍 [2]。

有关SARS冠状病毒感染入侵过程中的很多机制尚不清楚，因此阻碍了药物、疫苗和抗体开发等应用。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，而且有助于揭示武汉2019冠状病毒感染的特点，为病毒防控以及治疗奠定基础。本研究在前期工作基础上，无意间发现了武汉2019冠状病毒基因组可能存在Furin蛋白酶切位点。这

一发现暗示了武汉2019冠状病毒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,为当前武汉2019冠状病毒感染的治疗提供理论支持。已有的大量相关病毒(例如HIV)治疗药物都可以考虑以“老药新用”的方式进行组合,与免疫抑制剂等药物联合用药,以提高治疗效果或降低免疫抑制剂副作用。

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)、武汉2019冠状病毒(MN908947)、可能是武汉2019冠状病毒起源的蝙蝠群体(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条武汉2019冠状病毒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,比对武汉2019冠状病毒(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),该序列符合Furin酶切位点的识别模式“RXXR”[5]。比对武汉2019冠状病毒与SARS之间交界区核酸序列,发现变异来源是插入了12个碱基(图1B)。以“CGGCGG”为核心向5'和3'端各扩展15 bp,用这段序列比对到NCBI NT数据库,发现“CGGCGG”也有来自细菌的可能。因此,必须通过以下方式排除这段序列是来自测序或拼接错误的假阳性:(1)检索NCBI Genbank数据库,找到三条以上已提交的武汉2019冠状病毒基因组序列支持“CGGCGG”;(2)检索NCBI Genbank数据库,从所有的Beta冠状病毒(武汉2019冠状病毒除外)的S蛋白的交界区中搜索“RRAR”模式,发现只有鼠肝炎冠状病毒(The mouse hepatitis coronavirus, MHV)中存在同样的Furin酶切位点,而且都是“RRARR”;(3)通过蛋白质二级结构预测确定“RRAR”未参与折叠配对。

基于以上结果,武汉2019冠状病毒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。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 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) 在武汉 2019 冠状病毒 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, 武汉 2019 冠状病毒与 SARS 冠状病毒相比, 同时具备 Furin(R685)和胰蛋白酶酶切位点(R815)。这种改变将更多地使病毒通过直接膜融合的方式感染细胞, 故具有更高的侵袭性。

A.

```
GQ153539 VNVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASY--HTASV--LRSTGQKSIVAYTMSLGAENSIAYANNSIAIPT
GQ153540 VNVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASY--HTASV--LRSTGQKSIVAYTMSLGAENSIAYANNSIAIPT
GQ153542 VNVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASY--HTASV--LRSTGQKSIVAYTMSLGAENSIAYANNSIAIPT
JX993987 INVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASY--HTASV--LRSTGQKSIVAYTMSLGAENSIAYANNSIAIPT
DQ071615 TNVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASY--HTAST--LRSVGQKSIVAYTMSLGAENSIAYANNSIAIPT
DQ412043 VNVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASY--HTASV--LRSTGQKSIVAYTMSLGAENSIAYANNSIAIPT
DQ412042 PYVFQTQAGCLIGAEHVNASYQCDIPIGAGICASY--HTASH--LRSTGQKSIVAYTMSLGAENSVAYANNSIAIPT
JX993988 VNVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASY--HTASL--LRNTGQKSIVAYTMSLGAENSIAYANNSIAIPT
AY515512 NNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASY--HTVSS--LRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNNTIAIPT
AY572034 NNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASY--HTVSS--LRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNNTIAIPT
AY274119 NNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASY--HTVSL--LRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNNTIAIPT
MG772934 TSVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASY--HTASI--LRSTGQKAIIVAYTMSLGAENSIAYANNSIAIPT
MN908947 SNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSERRARSVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNNTIAIPT
Secondary
Structure: CCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCEEECCCC
```

B.

```
AY274119 GACACTTCTTATGAGTGCACATTCCTATTGGAGCTGGCATTGTGTGCTAGTTACCATAC-----AGTTTCTTTA--
||| || ||||| ||||| || ||||| || || || || ||||| || || |||||
MN908947 AACAACTCATATGAGTGTGACATACCATTGGTGCAGGTATATGCGCTAGTTATCAGACTCAGACTAATTCCTCCTCG

AY274119 ----TTACGTAGTACTAGCCAAA-AATCTATTGTGGCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTAC
||| ||||| ||||| ||||| || || || ||||| || ||||| || ||||| |||||
MN908947 GCGGGCACCGTAGTG-TAGCTAGTCAATCCATCATTCGCTACACTATGTCACTTGGTGCAGAAAATTCAGTTGCTTAC

AY274119 TCTAATAACACCATTGCTATACTACTA
||| ||||| ||||| ||||| || || ||
MN908947 TCTAATAACTCTATTGCCATACCCACAA
```

图 1. 武汉 2019 冠状病毒 S 蛋白可能存在 Furin 蛋白酶切位点

Fig1. A furin cleavage site was discovered in the Wuhan 2019 human coronavirus S protein

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)、武汉 2019 冠状病毒 (MN908947)、武汉 2019 冠状病毒起源的蝙蝠群体 (MG772934) 和其它蝙蝠群体 (MG772934 之外 8 条来自蝙蝠的序列)。A: 这里显示的是 S1 (上游) 与 S2 (下游) 之间的交界区的部分氨基酸序列: “RRAR” 序列 (红色方框内) 符合 Furin 酶切位点的识别模式 “RXXR”; 蛋白质二级结构预测使用 MN908947 的, H 代表螺旋结构 helix, E 代表折叠结构 strand, C 代表无规卷曲结构 coil。B: 插入的一段核酸序列 (红色方框内) 与 “RRAR” 序列对应。

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，人流感病毒的血凝素 HA 不含有 Furin 酶切位点，而一些禽流感的血凝素 HA 含有 Furin 酶切位点（表 1）。武汉 2019 冠状病毒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. 禽流感病毒获得 Furin 酶切位点

Table 1. Furin cleavage sites in avian influenza viruses

Virus	Type	Subtype	AAposition	Furin	Host
MN653237	Influenza A	H3N2	342	RQTR	Canine
MH988772	Influenza A	H5N1	343	RKKR	Great created 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。

3 结论

本研究的主要结论：（1）武汉 2019 冠状病毒 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，武汉 2019 冠状病毒 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

我们的结果为当前武汉 2019 冠状病毒感染的治疗提供理论支持。已有的大量相关病毒（例如 HIV、流感和埃博拉病毒）的治疗药物都可以考虑以“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）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（呋塞米、倍他乐克、地高辛、拜阿司匹林、波立维、硝酸异山梨酯、可达龙、来适可和兰索拉唑），可以很好抑制 Furin 活性，同时副作用较小。

致谢：感谢南开大学生命科学学院陈佳、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.