DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20240101

重要人感染RNA病毒复制机制和靶向聚合酶药物开发研究进展

董莹莹[1,2]，彭齐[1]，王敏[1]，施一[1]*

（1.中国科学院微生物研究所，北京 100101；
2.山东第一医科大学，山东 济南 250000）

【摘要】近年来，拉沙热、埃博拉、新冠和尼帕等多种病毒性传染病在世界范围内频繁暴发，给人类健康和社会经济发展带来了巨大威胁。广谱抗病毒药物是主动应对新发突发病毒性传染病的重要手段之一，而其研发的关键是发现病毒特有的保守药物靶点。病毒聚合酶负责病毒基因组的复制和转录过程，蛋白序列相对保守，是理想的药物靶点。本文以重要人感染RNA病毒聚合酶的工作机制和靶向病毒聚合酶的药物开发展开综述，为未来新发突发传染性疾病防控提供新思路和新策略。

【关键词】RNA病毒；聚合酶；结构；药物开发

中图分类号：R373　　文献标识码：A　　文章编号：2096-8965（2024）01-0002-10

Research progress on the replication mechanisms of important human-infecting RNA viruses and polymerase-directed drug development

Dong Yingying[1,2], Peng Qi[1], Wang Min[1], Shi Yi[1]*

（1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
2. Shandong First Medical University, Jinan 250000, Shandong, China）

【Abstract】Recently, emerging infectious viral diseases including Lassa fever, Ebola, COVID-19 and Nipah, have posed a great threat to the public health and development of human society. Developing broad-spectrum antiviral drugs is one of the major strategies to deal with them. The viral polymerase is responsible for the genomic replication and transcription and the protein sequence is highly conserved, making it an ideal target for drug development. In this review, we summarized the current knowledge about the working mechanisms of important human-infecting RNA virus polymerases and development of polymerase-targeting drugs, which will provide new insights into the control and prevention of emerging infectious diseases in the future.

【Keywords】RNA viruses; Polymerase; Structure; Drug development

收稿日期：2024-03-15；修回日期：2024-03-21

基金项目：北京生命科技研究院重大项目（2023000CA0030）

通信作者：施　一（1985-），男，浙江宁波人，教授，主要从事病原感染调控的分子机制研究，免疫细胞受体与配体相互作用及其识别机制，以及药物研发。E-mail：shiyi@im.ac.cn

0 引言

自1940年以来，世界范围内病原体的出现显著增加，给人类社会的安全与稳定带来了严重危害[1]。据统计，在1940-2004年间，全球共发现了335种感染性疾病，每年造成至少1 700万人死亡[2]。进入21世纪后，传染性疾病的暴发频率越来越高，典型代表如2003年严重急性呼吸综合征（又名传染性非典型肺炎）疫情、2014年西非埃博拉疫情、2017年寨卡疫情、2019年底暴发的新型冠状病毒感染和2022年的猴痘感染等。

目前，世界卫生组织在“预防传染病研发行动蓝图”（R&D Blueprint）计划中，确定了新型冠状病毒感染（Corona Virus Disease 2019，COVID-19）、克里米亚-刚果出血热（Crimean-Congo Haemorrhagic Fever）、埃博拉病毒病（Ebola Virus Disease）和马尔堡病毒病（Marburg Virus Disease）、拉沙热（Lassa Fever）、中东呼吸综合征（Middle East Respiratory Syndrome）、严重急性呼吸综合征（Severe Acute Respiratory Syndrome）、亨尼帕病毒病（Henipaviral Diseases）、裂谷热（Rift Valley Fever）、寨卡病毒病（Zika Virus Disease）和“X”疾病（Disease X）（“X”疾病代表由目前未知可以引起人类疾病的病原体引起的严重的国际流行病）为需要进一步加强研究的重要病原体（https://www.who.int/）。不同的病毒差异极大，新发疫情往往难以预测，再加上它们都是RNA病毒，基因组还在不断突变和进化。同时，病毒表面蛋白面对的免疫压力较大，容易发生突变，使得针对表面蛋白开发的疫苗具有一定的滞后性。因此，寻找保守的抗病毒药物靶点用于广谱药物开发，是未来积极应对新发突发传染病的主要手段之一。

病毒聚合酶负责基因组的转录与复制，结构与功能最为保守。DNA病毒聚合酶和RNA病毒聚合酶虽然在工作机制上存在着很大的差异，但是结构上都具有保守的核心酶活区域，通过模板进入通道、底物进入通道和模板/产物出口通道与外界相连（见图1）。同时，它们面对的免疫压力较小，不易发生突变，是理想的广谱抗病毒药物开发靶点，而解析病毒聚合酶的高分辨率三维结构能够帮助获得准确药物靶点。由于关于尼帕病毒和克里米亚-刚果出血热病毒聚合酶结构的研究和认知还非常有限，因此本文主要对埃博拉病毒、冠状病毒、拉沙热病毒和裂谷热病毒聚合酶的结构和靶向聚合酶药物开发的进展进行综述。

1 埃博拉病毒聚合酶结构研究进展与靶向聚合酶的药物开发

埃博拉病毒（Ebola Virus，EBOV）和马尔堡病毒（Marburg Virus，MARV）属于丝状病毒科，自被发现以来已经暴发了30多次，造成数万人死亡，病死率最高可达90%，是世界上最致命的病

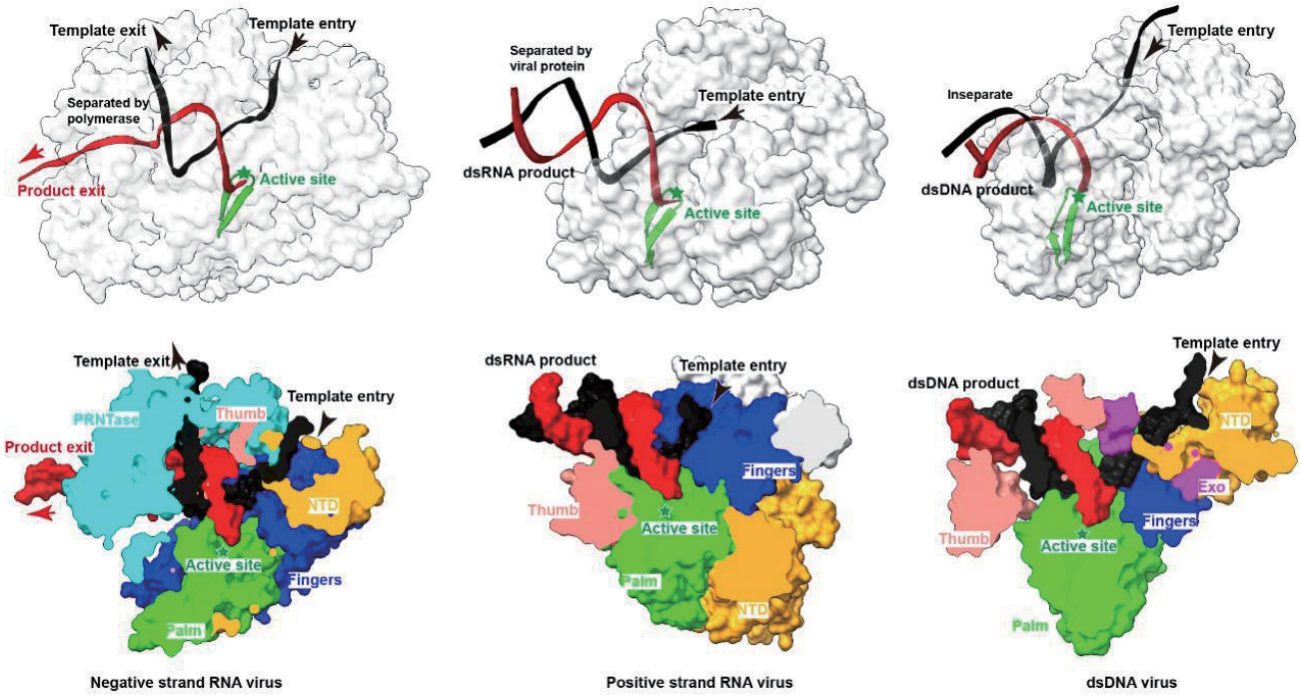


图1 不同病毒聚合酶合成子代产物的模式图

Figure 1 Diagram of products synthesis by different viral polymerases

毒[3]。它们的基因组为不分节段的负链RNA，长约19 kb，包含7个阅读框[4]。病毒基因组被核蛋白（Nucleo Protein，NP）包裹，形成核糖核蛋白复合体（Ribonucleo Protein，RNP），进一步与聚合酶蛋白（Large Protein，L）、病毒辅助蛋白（Viral Protein 35，VP35）、转录激活蛋白（Viral Protein 30，VP30）和核衣壳相关蛋白（Viral Protein 24，VP24）结合，形成螺旋状核衣壳结构，并被基质蛋白（Viral Protein 40，VP40）环绕，进一步与病毒表面糖蛋白（Glycoprotein，GP）形成完整病毒颗粒[4]。病毒表面GP蛋白在细胞入侵和免疫逃逸方面发挥着重要作用[5-6]。L蛋白和VP35组成了埃博拉病毒复制中心的核心单元，其中L蛋白包含了负责基因组转录与复制过程的全部活性位点，VP35作为辅助蛋白来稳定与调控聚合酶的功能[7]。在过去几十年中，研究人员试图解析L-VP35的复合物结构[7]，但是由于它的分子量大、不稳定、易降解等因素，其三维结构的解析一直是世界性难题，从而严重限制了靶向埃博拉聚合酶的药物开发。

本研究团队经过多年的尝试摸索，通过共表达系统，成功获得了埃博拉病毒L-VP35聚合酶复合物，并利用冷冻电镜技术解析了其高分辨率三维结构[8]。埃博拉病毒的L蛋白与VP35蛋白四聚体形成稳定的复合物，其聚合酶活性结构域和加帽结构域与呼吸道合胞病毒（Respiratory Syncytial Virus，RSV）和狂犬病毒（Rabies Virus，RABV）等其它不分节段负链RNA病毒聚合酶结构相似，说明不分节段的负链RNA病毒聚合酶在进化过程中具有保守性，针对聚合酶开发的药物同样会具有广谱性[8]。此外，埃博拉病毒聚合酶的N端结构域（N-Terminal Domain，NTD）具有一个丝状病毒特有的插入结构，它的缺失在细胞复制子水平严重影响埃博拉病毒聚合酶的转录与复制活性，说明丝状病毒还存在一些特殊的调控机制[8]。

针对聚合酶的药物开发，目前最多的还是核苷类似物。核苷类似物因其本身所具有的特性，可以伪装成为病毒聚合酶复制所需的底物掺入至子代RNA中，通过“链终止”或引起突变的机制，抑制病毒复制。法匹拉韦（Favipiravir）是一种在日本批准的抗流感药物，已显示对多种RNA病毒具有抑制效果。其在体内通过细胞激酶转化为活性形式T-705RTP，而宿主细胞酶可以从天然核苷酸中区分T-705RTP，因此法匹拉韦在抑制病毒复制时不会对宿主细胞DNA产生影响[9]。研究表明，法匹拉韦在体外实验和动物模型中对EBOV均有抑制效果，可100%防止感染EBOV的小鼠模型死亡，但在非人灵长类动物上的实验结果和临床实验效果不是特别理想，这可能与药物的代谢或者靶向相关。腺苷类似物的前药瑞德西韦（Remdesivir）同样能在动物水平具有100%的保护效果，但体外活性需要进行更深入的研究[10-14]。加利地韦（Galidesivir）由Biocrystal Pharmaceuticals公司开发，最初用于治疗丙型肝炎。它作为腺苷类似物，在体内代谢为三磷酸形式发挥作用。经研究发现，其对于埃博拉病毒一类的高致病性病毒具有广谱抗病毒活性，目前已经完成了针对埃博拉病毒的临床I期实验，并表现出很好的安全性[15]。除了核苷酸类似物外，本团队还发现此前开发的抗寄生虫药物苏拉明（Suramin）能结合在聚合酶的三磷酸核苷（Nucleoside Triphosphate，NTP）进入通道，阻碍底物进入酶活中心从而发挥抑制作用[8]。并且通过序列比对发现NTP进入通道在所有不分节段负链RNA病毒聚合酶中都相对保守，针对这一通道进行药物筛选，可能获得对所有不分节段负链RNA病毒都有抑制效果的广谱药物（见图2）。

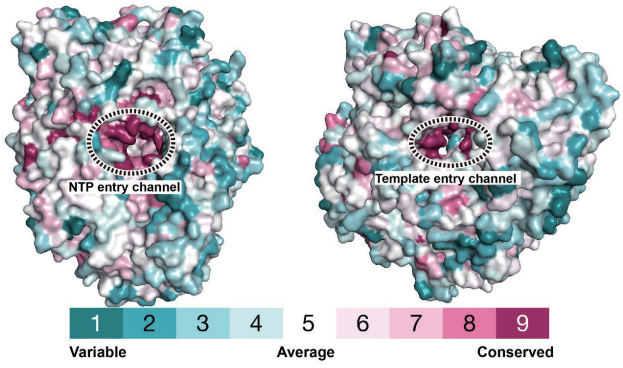


图2　不分节段负链RNA病毒聚合酶的保守性

Figure 2　The conservatism of polymerase in the non-segmented, negative-strand RNA viruses

病毒聚合酶进行基因组复制时，需要识别、结合特定的基因组核酸序列才能起始合成子代RNA产物，而不分节段负链RNA病毒聚合酶识别基因组RNA的分子机制一直是个未解开的谜题。本研究团队以埃博拉病毒聚合酶为代表，发现埃博拉病毒聚合酶在发挥从头起始复制活性时，具有序列识别特异性，即病毒聚合酶只有在结合本身特定的基因组3'-leader RNA序列时，才具有从头起始复制活性[16]。随后解析了埃博拉病毒L-VP35-RNA复合物的高分辨率结构，发现3'-leader RNA以独特的弯曲构象结合在模板进入通道中，

通过RNA自身碱基与碱基之间的相互作用，以及RNA与聚合酶蛋白N末端结构域、手指结构域（Fingers）和拇指结构域（Thumb）相互作用，使蛋白/核酸复合物稳定地处于起始前构象[16]。随后，梁波研究团队也在同一年报道了呼吸道合胞病毒聚合酶与核酸复合物的结构[17]，发现核酸的结合位点和结合模式在埃博拉病毒和呼吸道合胞病毒聚合酶中都非常保守，说明模板的进入通道是一个理想的广谱药物开发靶点，可以通过筛选小分子药物堵住该通道，或者直接影响蛋白与核酸结合来抑制病毒的复制（见图2）。

病毒聚合酶在生成子代RNA的过程中涉及到多种构象变化，从而促进产物的顺利合成，其中最重要的构象变化是从起始态到延伸态的转变。在起始状态时，起始环（Priming Loop）和支撑螺旋（Supporting Helix）会插入酶活中心，为第一个磷酸二酯键的生成提供支撑[18-19]。而从起始状态进入到延伸状态时，它们必须远离酶活中心，才能保证产物链有足够的空间进行延伸，否则它们就会与产物链发生空间位阻[20-23]。基于上述的结构研究，本研究团队提出了关于埃博拉病毒聚合酶从头起始合成子代产物的工作模型。当埃博拉病毒感染宿主细胞，成功释放RNP进入细胞质，位于RNP上的聚合酶与基因组的3'-leader RNA牢牢结合，使聚合酶处于起始前构象。随后，底物NTP进入酶活中心，并在起始环和支撑螺旋的支撑下与基因组的末端互补配对。同时，位于酶活中心的氨基酸和金属离子进一步稳定起始复合物，促进第一个磷酸二酯键的生成。随着延伸过程进行，起始环和支撑螺旋远离酶活中心为双链产物提供足够的空间，直到复制结束[16]。这一过程特异地存在于所有不分节段负链RNA病毒中，因此，此位点是特异性好、副作用少的广谱药物的研发靶点。近期，金志楠研究团队报道了非核苷类似物JNJ-8003能有效抑制呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒（Human Metapneumovirus，HMPV）、Ⅰ型和Ⅲ型人副流感病毒（Parainfluenza Virus，HPIV）的复制，并且明确了JNJ-8003结合在加帽结构域，在起始和早期延伸阶段抑制RNA的合成[24]。JNJ-8003与起始环之间存在直接相互作用，影响它的运动性，通过限制聚合酶的构象变化来抑制聚合酶的活性[24]。雷切尔·费恩斯研究团队也发现非核苷类似物MRK-1能通过抑制RSV和HMPV聚合酶从起始状态到复制状态的构象转变抑制病毒复制[25]，进一步说明靶向聚合酶的构象变化可以作为开发广谱性抗病毒药物的靶点。

2 冠状病毒聚合酶结构研究进展与靶向聚合酶的药物开发

严重急性呼吸综合征冠状病毒（Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus，SARS-CoV）、中东呼吸综合征病毒（Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus，MERS-CoV）以及新冠病毒（Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2，SARS-CoV-2）都属于冠状病毒，基因组为不分节段的正义RNA病毒，能够感染多种哺乳动物和鸟类等宿主[26]。SARS-CoV于本世纪初在世界范围内，尤其是东南亚地区迅速传播，截至2003年8月，共引起8 422例感染，916例死亡[27]。2012年中东呼吸综合征疫情在阿拉伯半岛地区集中暴发，并随着感染者的流行扩散到英国、韩国等其他国家[28]。新冠感染累计造成超过7.7亿人感染，700多万人死亡，给人类社会带来的危害不可估量（https://www.who.int/）。冠状病毒的开放阅读框1a（Open Reading Frame 1a，ORF1a）和ORF1ab编码一系列非结构蛋白（Nonstructural Proteins，nsps）来负责基因组的复制。这些蛋白最初翻译为一个多蛋白，然后进行蛋白水解、切割以及成熟[29]。随后诱导内质网形成病毒复制细胞器[30]，进行基因组的转录和复制，其核心部分主要由聚合酶活性亚基nsp12及其辅助因子nsp8与nsp7，解旋酶nsp13，外切酶nsp14与其辅助因子nsp10组成[29]。

对冠状病毒复制中心蛋白结构的研究在2003年就已经开始，但是直到2019年才首次报道了SARS-CoV核心聚合酶nsp7-nsp8-nsp12复合物的结构[31]。nsp12与辅助因子nsp8和nsp7-nsp8形成稳定的复合物，nsp12具有与其他所有RNA聚合酶相似的结构特征，以及一个长的N端结构，组成冠状病毒特有的NiRAN结构域，并具有典型的激酶样结构特征[31]。在新型冠状病毒感染疫情期间，多个研究团队先后报道了nsp7-nsp8-nsp12的结构[32-33]。它的结构与非典病毒聚合酶的结构高度类似，具有典型的RNA依赖的RNA聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase，RdRp）保守基序。本研究团队通过蛋白酶活水平实验发现，单独的nsp12活性非常弱，只有在加入nsp7和nsp8后才能高效合成子代产物，说明辅助因子具有促进聚合酶活性的功能。在结构上我们也发现，辅助因子的加入能进一步稳定指尖（Fingertip）的构象，从而激活聚合酶的活性。但是与非典病毒相比，新冠病毒nsp7-nsp8-nsp12的聚合酶活性降低，单个亚基的热稳定

性降低，更加接近人体温度，暗示新冠病毒更好地适应了人宿主[33]。围绕新冠病毒转录复制过程，饶子和院士领导的研究团队和国外研究团队自新型冠状病毒感染疫情发生后开展了非常系统地研究，先后揭示了“核心转录复制复合体”“延伸转录复制复合体”“加帽中间态转录复制复合体”“Cap0转录复制复合体”以及新冠病毒核酸加帽的机制[34-38]，阐明新冠病毒能够利用nsp9作为载体，介导新型的加帽过程[34]。这些发现极大促进了对冠状病毒的理解，同时也为抗病毒药物的开发以及作用机制理解提供了重要的结构基础。

从新型冠状病毒感染疫情暴发开始，针对SARS-CoV-2的聚合酶进行药物开发一直是研究热点，其中最受关注的就是美国Gilead Sciences公司研发的核苷类似物瑞德西韦。最开始人们认为其机制是在子代RNA延伸时，瑞德西韦核糖环上的氰基与聚合酶的氨基酸残基形成空间位阻，从而引起产物的异常终止，虽然研究人员在结构上也清晰地阐明了它与聚合酶的识别模式，但是在体外实验中却发现它直接引起链终止的活性并不强[35,39-40]。随后饶子和院士团队进一步发现，瑞德西韦能被聚合酶NiRAN结构域共价连接到nsp9蛋白，进而阻止了加帽反应过程，说明它能通过同时影响新冠病毒聚合酶的两个过程从而有效抑制病毒复制[34]。此外，美国Atea公司开发的嘌呤类似物AT-527也能同时靶向聚合酶酶活中心和NiRAN活性位点[41]。但是在临床试验中，发现瑞德西韦和AT-527的效果并不理想，不如法匹拉韦的临床效果[42-44]。本研究团队发现，法匹拉韦能模拟A和G两种碱基掺入到子代核苷酸中，以一种特殊的方式与U和C配对，通过引起病毒基因组的致死突变来抑制病毒增殖[45]。同时，国外其他研究团队也相继报道了法匹拉韦的作用机制[46-47]。此外，由美国Merck公司联合其他公司开发的莫诺匹韦（Molnupiravir）能与A和G配对，从而产生高度突变的RNA产物，导致无法形成有功能的病毒颗粒[48]。由于新冠病毒编码的nsp14具有外切酶活性，能够切除掺入到子代产物中的核苷类似物，可能会大大降低它们的活性。鞠景月研究团队将针对丙肝病毒（Hepatitis C Virus，HCV）NS5A蛋白开发的抑制剂哌仑他韦（Pibrentasvir）与上述药物联用后，能明显保护核苷类似物免被切除，展现出很强的协同作用[49]。另外，由于嘌呤核苷酸的终产物为尿酸，因此大部分的核苷类抗病毒药物可能有导致尿酸升高的风险，增加肾脏负担，这是潜在的副作用之一。除了核苷类似物外，研究人员也尝试通过虚拟筛选的方式寻找能靶向nsp12聚合酶活性中心或者nsp12和nsp8结合面的小分子抑制剂[50-52]。徐华强等研究团队筛选出苏拉明能直接抑制聚合酶与模板链和产物链的结合而抑制新冠聚合酶的活性[53]。

3 沙粒病毒聚合酶结构研究进展与靶向聚合酶的药物开发

拉沙病毒（Lassa Virus，LASV）主要流行于非洲国家，经啮齿类动物传播，传染性较强，每年造成约5 000人死亡[54]。拉沙病毒属于沙粒病毒科，基因组为分节段的负链RNA，包括大小约7.2 kb的L片段，编码聚合酶和锌指结构基质蛋白（Zinc-finger matrix protein，Z），以及3.4 kb的S片段，编码糖蛋白前体（Glycoprotein Precursor，GPC）和核蛋白[55]。

早在2010年，肖恩·惠兰研究团队就开始了关于沙粒病毒聚合酶结构与功能的研究，他们利用负染电镜技术对马秋波病毒（Machupo virus，MACV）聚合酶的结构形态有了一个大概的认识，发现它具有一个与双链RNA（double-strand RNA，dsRNA）病毒类似的核心结构域以及多个附属部件[56]。此外，还发现基质蛋白Z能直接与L蛋白形成复合物，将其锁定在“失活”状态来抑制聚合酶的活性[57]，但是详细的分子机制还不清楚。直到2020年，本研究团队首次解析了LASV聚合酶的三维结构，其整体结构与其他分节段负链RNA病毒如布尼亚病毒和流感病毒聚合酶的结构较类似[58]。此外，LASV聚合酶具有一个独特的插入结构域，将其缺失突变后，严重影响聚合酶转录和复制活性[58]。此外，对于流感以及布尼亚病毒聚合酶，它们在发挥活性时需要结合基因组3'和5'-RNA末端启动子，而LASV聚合酶的催化位点在不加入任何核酸时就处于开启的活性构象，因此只需要3'-vRNA启动子就可以起始转录和复制过程[58]。在沙粒病毒聚合酶识别3'-vRNA时，它们之间的结合位点与其他分节段负链RNA病毒聚合酶和核酸的结合区域一致，表明它们可以通过类似的机制来识别RNA，为开发靶向多种分节段负链RNA病毒聚合酶的广谱药物提供了理想的靶点（见图3）。

在LASV复制的后期，Z蛋白会抑制聚合酶的活性，促进病毒的组装与出芽。本研究团队解析了LASV聚合酶L蛋白与Z蛋白（L-Z）复合物和L-Z-RNA复合体结构，并结合大量生化实验发现，Z蛋

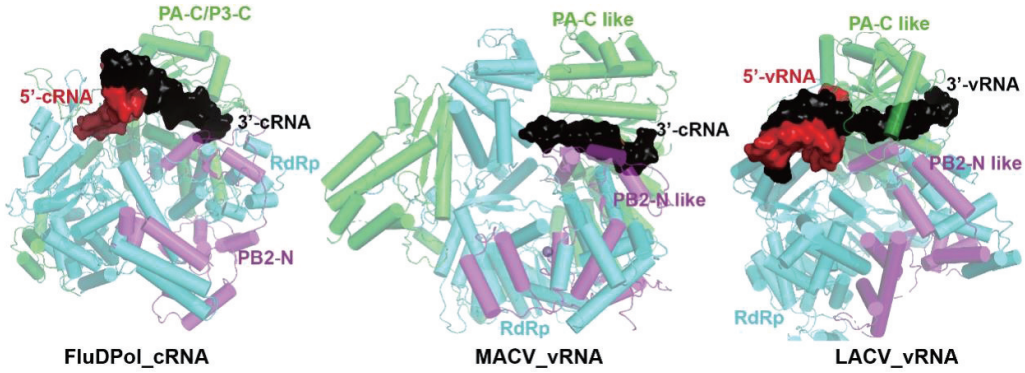


图3　不同病毒聚合酶与3'-vRNA的结合模式

Figure 3　The binding mode between viral polymerase and 3'-vRNA

白是通过限制聚合酶活性中心的构象变化来抑制其活性[59]。之后，其他研究团队也解析了马秋波病毒和胡宁病毒（Junín Virus，JUNV）L-Z复合物的结构，他们对产物通道进行模拟，认为Z蛋白可能是通过限制子代RNA从通道顺利出来而抑制聚合酶的活性[60-61]。斯蒂芬·库萨克等研究团队进一步解析了拉沙病毒L-RNA复合物处于不同构象时的结构，发现内切酶结构域，帽子结合域样结构域（CBD-like）等在不同功能状态时，会发生巨大的位置调整[62]。当拉沙病毒L蛋白处于延伸状态时，它的627样（627-like）结构域和手掌结构域相互作用，与Z蛋白的结合位点重合，说明Z蛋白的结合还可以通过阻碍L蛋白稳定在延伸状态而抑制病毒复制[62]。更重要的是，与L蛋白结合的区域在不同沙粒病毒的Z蛋白中非常保守，而且我们还在蛋白水平上发现不同沙粒病毒Z蛋白能交叉抑制聚合酶的活性，说明在不同沙粒病毒中，Z蛋白采取相似的机制调控L蛋白的活性[59]，为靶向聚合酶的广谱抗病毒药物设计提供了全新方向，提示可以通过抑制聚合酶保守性功能基序的构象变化来进行广谱性抑制剂开发（见图4）。

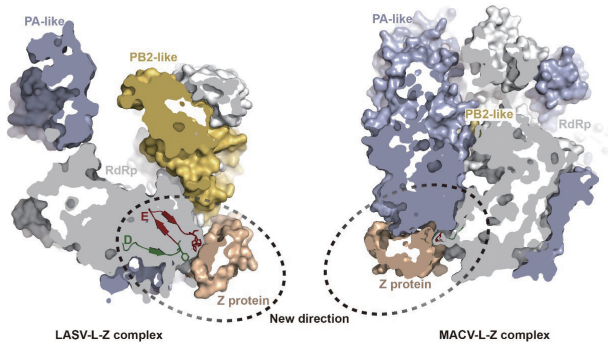


图4　沙粒病毒L蛋白与Z蛋白的结合模式

Figure 4　The interaction between arenavirus L and Z protein

目前，用于应对拉沙热的药物只有利巴韦林（Ribavirin）获批，并且仅在病程早期服用才能进一步降低发病率和病死率，在病程中末期，主要通过静脉补液等支持疗法以维持患者的生命。并且药物副作用强，主要不良反应为可逆性溶血性贫血。静脉输液过快时还会引起患者寒战等症状[63]，作用机制还不完全清楚。核苷类似物法匹拉韦也能抑制拉沙病毒、瓜纳瑞托病毒（Guanarito Virus，GTOV）、胡宁病毒和马秋波病毒的复制[64]，说明针对聚合酶靶点的核苷类似物具有一定的广谱性。沙粒病毒聚合酶在进行基因组转录时采取“cap-snatching”机制从宿主获得带帽子结构的核酸作为引物，所以它的内切酶结构域也是一个理想的药物靶点。王薇研究团队筛选到F1204和F1781能有效抑制拉沙病毒，淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（Lymphocytic Choriomeningitis Virus，LCMV）和发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒（Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Bunyavirus，SFTSV）的内切酶活性，并在活病毒水平抑制LCMV和SFTSV的复制[65]。

4　裂谷热病毒聚合酶结构研究进展与靶向聚合酶的药物开发

裂谷热病毒（Rift Valley Fever Virus，RVFV）感染人后会导致发热、肌肉疼痛、神经紊乱、出血热，甚至死亡[66]。裂谷热的基因组与沙粒病毒相似，是单股分节段的负链RNA，由L片段、M片段和S片段组成。其中，L片段编码RNA聚合酶，M片段编码介导病毒吸附、入侵和膜融合的糖蛋白和非结构蛋白NSm，S片段编码核蛋白和非结构蛋白NSs[66]。自其1930年被分离出来后，裂谷热病毒导致的疫情在非洲地区持续发生，造成了数千人死

亡。我国于2016年报道了首例裂谷热输入病例[67]。

虽然裂谷热病毒已经被发现接近100年，但是直到2019年，才有团队报道关于其聚合酶的结构与功能[68]。裂谷热病毒聚合酶包含2 092个氨基酸，分子量大，表达困难是阻碍其结构解析的重要因素。玛丽亚·罗森塔尔研究团队解析了裂谷热病毒聚合酶C末端的结构，发现它具有经典的帽子结合域结构特征，并能结合“帽子”类似物[68]。陈忠周等合作，利用毕赤酵母表达系统，成功表达纯化得到了裂谷热病毒聚合酶蛋白[69]，并通过蛋白水平实验，证明裂谷热聚合酶蛋白具有很强的内切酶活性和从头起始复制活性。随后他们也通过冷冻电镜技术解析了裂谷热病毒聚合酶的结构，发现它与流感病毒聚合酶和沙粒病毒聚合酶的结构相似，都具有一个稳定的催化核心和多个柔性的外周结构域。在他们解析的结构中无法看到内切酶结构域和帽子结构域，其他的核心结构域由保守的RNA聚合酶motif组成，进一步说明了聚合酶在结构上的保守性，病毒聚合酶是开发广谱抗病毒药物的理想靶点。

虽然关于裂谷热病毒聚合酶结构与功能的相关研究较少，目前也没有裂谷热病毒聚合酶与核酸或其他小分子化合物的结构，但是通过目前已有的结构比对发现它与3'-vRNA的结合位点与沙粒病毒和流感病毒的结合位点相似，暗示着可以针对这一靶点进行药物筛选。同时一些针对流感病毒内切酶结构域、帽子结合结构域以及聚合酶活性中心开发的药物，可能对裂谷热病毒聚合酶也有一定的抑制作用。

5 展望

上述介绍的RNA病毒来源于不同病毒科，基因组的组成形式和特性也不同。不同病毒聚合酶为了转录与复制自身基因组，也相应进化出了不同的工作机制。例如LASV和RVFV都是分节段的负链RNA病毒，为了进行病毒基因组的复制，它必须先由自身携带的聚合酶进行转录，由宿主细胞翻译生成病毒蛋白，才能为复制过程提供足够的蛋白元件。但是，它们的聚合酶不具有加帽活性，所以都采取“cap-snatching”的机制，从宿主抢夺带帽子的RNA来作为转录的引物。因此针对这类病毒，开发靶向内切酶的抑制剂也成为了目前的研究热点，其中最成功的就是靶向流感病毒聚合酶内切酶结构域的药物巴洛沙韦。而像EBOV这类不分节段负链RNA病毒，虽然它们也要先进行转录过程，但是它们的L蛋白具有加帽和甲基化的活性，所以就不需要从宿主抢夺帽子。值得注意的是，不分节段负链RNA病毒的加帽过程和甲基化过程与宿主细胞是完全不一样的，它们具有一个蛋白核酸共价结合的中间产物，但是形成这一产物的结构基础还不清楚。由于加帽机制的特异性，针对不分节段负链RNA病毒聚合酶的加帽结构域开发的药物，对宿主的副作用更小。冠状病毒的基因组是正链RNA，它可以直接作为宿主核糖体翻译的模板生成病毒蛋白。聚合酶本身的活性较弱，需要辅助因子的激活，同时其他复制相关蛋白如解旋酶、外切酶等和核心聚合酶复合物相互作用、配合，从而完成基因组的转录与复制。因此，针对亚基之间的结合面开发抑制剂也是一种有效策略。

虽然它们在结构和功能上存在很大的差异，但是对于RNA病毒聚合酶而言，最主要的活性是以NTP为底物，通过磷酸二酯键形成子代RNA产物。所以，它们都具有一个相似的活性区域，例如motifs A-F，用来识别底物，稳定活性状态，攻击NTP的α磷原子等重要过程（见图5）。因此，靶向这一过程开发的药物，例如核苷酸类似物瑞德西韦和法匹拉韦等在不同的病毒中都具有一定的抑制效果。

进入21世纪后，随着人类活动和城市化进程的加剧，导致野生动物和鸟类的栖息地发生改变，使得人与野生动物之间的接触变得更加频繁，提高了动物源性病原发生跨种传播感染人的几率。世卫组织总干事谭德塞曾警告说，下一次大流行病的暴发“并非是否会发生的问题，而是什么时候发生的问题”，并强调了为应对“X”疾病做好准备的重要性。由于“X”疾病的不确定性，且病原种类的多样性，我们迫切需要研发广谱药物和通用疫苗等抗病原手段来做好疾病大流行准备。我们现在知道病毒都需要自身编码的复制相关蛋白来合成子代遗传信息，而这些复制相关蛋白在同一科甚至不同科病毒中都存在保守性。因此针对不同病毒的复制相关蛋白开展基础研究，了解它们的工作机制，发现保守的药物开发靶点，筛选广谱性药物作为基础储备，是未来积极应对“X”疾病的重要研究方向之一。

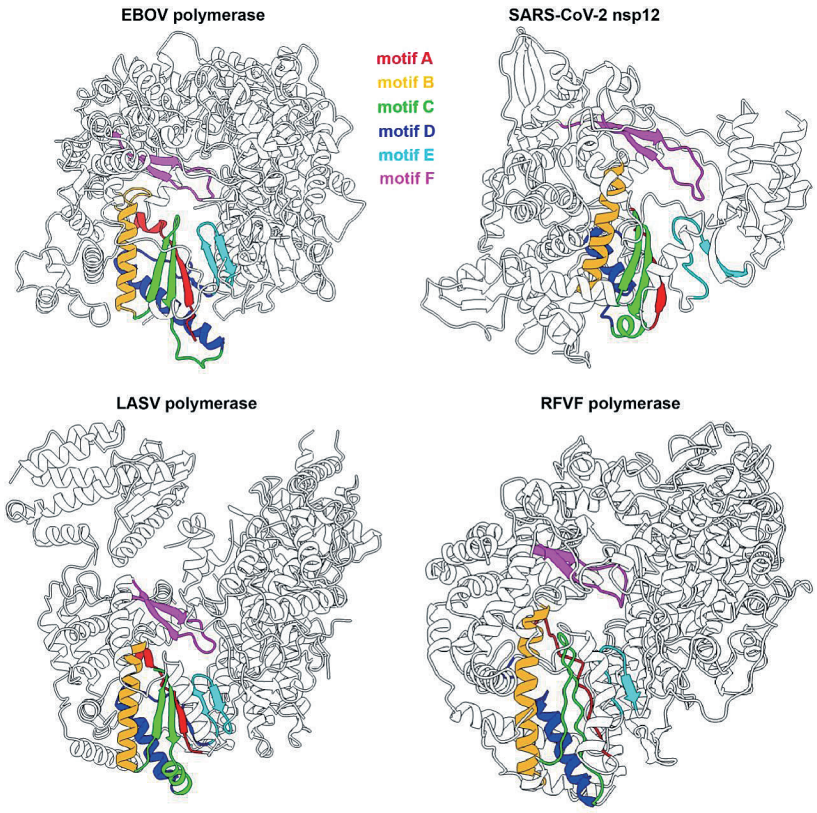


图5　RNA聚合酶的保守特征

Figure 5　The common features of RNA polymerases

参考文献

[1] SMITH K F, GOLDBERG M, ROSENTHAL S, et al. Global rise in human infectious disease outbreaks[J]. J R Soc Interface, 2014, 11(101): 20140950.

[2] JONES K E, PATEL N G, LEVY M A, et al. Global trends in emerging infectious diseases[J]. Nature, 2008, 451(7181): 990-993.

[3] TAKADA A. Filovirus tropism: Cellular molecules for viral entry[J]. Front Microbiol, 2012, 3: 34.

[4] MUHLBERGER E. Filovirus replication and transcription [J]. Future Virol, 2007, 2(2): 205-215.

[5] LEE J E, SAPHIRE E O. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry[J]. Future Virol, 2009, 4(6): 621-635.

[6] PENG W, RAYAPROLU V, PARVATE A D, et al. Glycan shield of the ebolavirus envelope glycoprotein GP[J]. Commun Biol, 2022, 5(1): 785.

[7] JAIN S, MARTYNOVA E, RIZVANOV A, et al. Structural and functional aspects of ebola virus proteins[J]. Pathogens, 2021, 10(10): 1330.

[8] YUAN B, PENG Q, CHENG J, et al. Structure of the Ebola virus polymerase complex[J]. Nature, 2022, 610 (7931): 394-401.

[9] FURUTA Y, TAKAHASHI K, KUNO-MAEKAWA M, et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus [J]. 2005, 49(3): 981-986.

[10] BIXLER S L, BOCAN T M, WELLS J, et al. Efficacy of favipiravir (T-705) in nonhuman primates infected with Ebola virus or Marburg virus[J]. Antiviral Res, 2018, 151: 97-104.

[11] GUEDJ J, PIORKOWSKI G, JACQUOT F, et al. Antiviral efficacy of favipiravir against Ebola virus: A translational study in cynomolgus macaques[J]. PLoS Med, 2018, 15 (3): e1002535.

[12] WARREN T K, KANE C D, WELLS J, et al. Remdesivir is efficacious in rhesus monkeys exposed to aerosolized Ebola virus[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 19458.

[13] MULANGU S, DODD L E, DAVEY R T, et al. A randomized, controlled trial of Ebola virus disease therapeutics[J]. N Engl J Med, 2019, 381(24): 2293-2303.

[14] WARREN T K, WELLS J, PANCHAL R G, et al. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430[J]. Nature, 2014, 508(7496): 402-405.

[15] LIU C H, HU Y T, WONG S H, et al. Therapeutic strategies against Ebola virus infection[J]. Viruses, 2022, 14(3): 579.

[16] PENG Q, YUAN B, CHENG J, et al. Molecular mechanism of de novo replication by the Ebola virus polymerase[J]. Nature, 2023, 622(7983): 603-610.

[17] CAO D D, GAO Y R, CHEN Z H, et al. Structures of the promoter-bound respiratory syncytial virus polymerase [J]. Nature, 2024, 625(7995): 611-617.

[18] OUIZOUGUN-OUBARI M, FEARNS R. Structures and mechanisms of nonsegmented, negative-strand RNA virus polymerases[J]. Annu Rev Virol, 2023, 10(1): 199-215.

[19] TE VELTHUIS A J W, GRIMES J M, FODOR E. Structural insights into RNA polymerases of negative-sense RNA viruses[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(5): 303-318.

[20] CAO D, GAO Y, ROESLER C, et al. Cryo-EM structure of the respiratory syncytial virus RNA polymerase[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 368.

[21] ABDELLA R, AGGARWAL M, OKURA T, et al. Structure of a paramyxovirus polymerase complex reveals a unique methyltransferase-CTD conformation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(9): 4931-4941.

[22] PAN J, QIAN X, LATTMANN S, et al. Structure of the human metapneumovirus polymerase phosphoprotein complex[J]. Nature, 2020, 577(7789): 275-279.

[23] LIANG B, LI Z, JENNI S, et al. Structure of the L protein of vesicular stomatitis virus from electron cryomicroscopy[J]. Cell, 2015, 162(2): 314-327.

[24] YU X D, ABEYWICKREMA P, BONNEUX B, et al. Structural and mechanistic insights into the inhibition of respiratory syncytial virus polymerase by a non-nucleoside inhibitor[J]. Communications Biology, 2023, 6(1): 1074.

[25] KLEINER V A, T O F, HOWE J A, et al. Conserved allosteric inhibitory site on the respiratory syncytial virus and human metapneumovirus RNA-dependent RNA polymerases[J]. Commun Biol, 2023, 6(1): 649.

[26] PUSTAKE M, GIRI P, GANIYANI M A, et al. Drawing parallels between SARS, MERS, and COVID-19: A comparative overview of epidemiology, pathogenesis, and pathological features[J]. Indian J Community Med, 2023, 48(4): 518-524.

[27] CHAN H L, KWAN A C, TO K F, et al. Clinical significance of hepatic derangement in severe acute respiratory syndrome[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(14): 2148-2153.

[28] MEMISH Z A, PERLMAN S, VAN KERKHOVE M D, et al. Middle east respiratory syndrome[J]. Lancet, 2020, 395(10229): 1063-1077.

[29] DAVIDSON A D, WILLIAMSON M K, LEWIS S, et al. Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS -CoV-2 reveals a cell passage induced in-frame deletion of the furin-like cleavage site from the spike glycoprotein[J]. Genome Med, 2020, 12(1): 68.

[30] WOLFF G, LIMPENS R, ZEVENHOVEN-DOBBE J C, et al. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle[J]. Science, 2020, 369 (6509): 1395-1398.

[31] KIRCHDOERFER R N, WARD A B. Structure of the SARS -CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2342.

[32] GAO Y, YAN L M, HUANG Y C, et al. Structure of the RNA - dependent RNA polymerase from COVID-19 virus [J]. Science, 2020, 368(6492): 779-782.

[33] PENG Q, PENG R, YUAN B, et al. Structural and biochemical characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 core polymerase complex from SARS-CoV-2[J]. Cell Rep, 2020, 31(11): 107774.

[34] YAN L, HUANG Y, GE J, et al. A mechanism for SARS-CoV - 2 RNA capping and its inhibition by nucleotide analog inhibitors[J]. Cell, 2022, 185(23): 4347-4360, e17.

[35] WANG Q, WU J, WANG H, et al. Structural basis for RNA replication by the SARS-CoV-2 Polymerase[J]. Cell, 2020, 182(2): 417-428. e13.

[36] CHEN J, MALONE B, LLEWELLYN E, et al. Structural Basis for helicase-polymerase coupling in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex[J]. Cell, 2020, 182 (6): 1560-1573, e13.

[37] YAN L, ZHANG Y, GE J, et al. Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5874.

[38] YAN L, GE J, ZHENG L, et al. Cryo-EM structure of an extended SARS-CoV-2 replication and transcription complex reveals an intermediate state in cap synthesis[J]. Cell, 2021, 184(1): 184-193, e10.

[39] KOKIC G, HILLEN H S, TEGUNOV D, et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 279.

[40] WU J, WANG H, LIU Q, et al. Remdesivir overcomes the S861 roadblock in SARS-CoV-2 polymerase elongation complex[J]. Cell Rep, 2021, 37(4): 109882.

[41] SHANNON A, FATTORINI V, SAMA B, et al. A dual mechanism of action of AT-527 against SARS-CoV-2 polymerase[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 621.

[42] HORGA A, SAENZ R, YILMAZ G, et al. Oral bemnifosbuvir (AT-527) vs placebo in patients with mild-to-moderate COVID-19 in an outpatient setting (MORNINGSKY) [J]. Future Virol, 2023, 10: 2217.

[43] CHEN C, ZHANG Y, HUANG J, et al. Favipiravir versus arbidol for clinical recovery rate in moderate and severe adult COVID-19 patients: A prospective, multicenter, open -label, randomized controlled clinical trial[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 683296.

[44] WANG Y, ZHANG D, DU G, et al. Remdesivir in adults

with severe COVID-19: A randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial[J]. Lancet, 2020, 395 (10236): 1569-1578.

[45] PENG Q, PENG R, YUAN B, et al. Structural basis of SARS -CoV-2 polymerase inhibition by favipiravir[J]. Innovation (Camb), 2021, 2(1): 100080.

[46] NAYDENOVA K, MUIR K W, WU L F, et al. Structure of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase in the presence of favipiravir-RTP[J]. P Natl Acad Sci USA, 2021, 118(7): e2021946118.

[47] SHANNON A, SELISKO B, LE N T, et al. Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4682.

[48] KABINGER F, STILLER C, SCHMITZOVAL J, et al. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2021, 28(9): 740-746.

[49] WANG X, SACRAMENTO C Q, JOCKUSCH S, et al. Combination of antiviral drugs inhibits SARS-CoV-2 polymerase and exonuclease and demonstrates COVID-19 therapeutic potential in viral cell culture[J]. Commun Biol, 2022, 5(1): 154.

[50] MUTLU O, UGUREL O M, SARIYER E, et al. Targeting SARS-CoV-2 Nsp12/Nsp8 interaction interface with approved and investigational drugs: An in silico structure-based approach[J]. J Biomol Struct Dyn, 2022, 40(2): 918-930.

[51] BAKHEIT A H, SAQUIB Q, AHMED S, et al. Covalent inhibitors from saudi medicinal plants target RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of SARS-CoV-2[J]. Viruses, 2023, 15(11): 2175.

[52] BRUNT D, LAKERNICK P M, WU C. Discovering new potential inhibitors to SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) using high throughput virtual screening and molecular dynamics simulations[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 19986.

[53] YIN W, LUAN X, LI Z, et al. Structural basis for inhibition of the SARS-CoV-2 RNA polymerase by suramin[J]. Nat Struct Mol Biol, 2021, 28(3): 319-325.

[54] FICHET-CALVET E, ROGERS D J. Risk maps of Lassa fever in West Africa[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2009, 3(3): e388.

[55] GARRY R F. Lassa virus structural biology and replication[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2023, 440: 147-164.

[56] KRANZUSCH P J, SCHENK A D, RAHMEH A A, et al. Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(46): 20069-20074.

[57] KRANZUSCH P J, WHELAN S P. Arenavirus Z protein controls viral RNA synthesis by locking a polymerase-promoter complex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(49): 19743-19748.

[58] PENG R C, XU X, JING J M, et al. Structural insight into arenavirus replication machinery[J]. Nature, 2020, 579 (7800): 615-619.

[59] XU X, PENG R, PENG Q, et al. Cryo-EM structures of Lassa and Machupo virus polymerases complexed with cognate regulatory Z proteins identify targets for antivirals [J]. Nat Microbiol, 2021, 6(7): 921-931.

[60] MA J, ZHANG S, ZHANG X. Structure of Machupo virus polymerase in complex with matrix protein Z[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6163.

[61] KANG H, CONG J, WANG C, et al. Structural basis for recognition and regulation of arenavirus polymerase L by Z protein[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4134.

[62] KOUBA T, VOGEL D, THORKELSSON S R, et al. Conformational changes in Lassa virus L protein associated with promoter binding and RNA synthesis activity[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 7018.

[63] SALAM A P, DUVIGNAUD A, JASPARD M, et al. Ribavirin for treating Lassa fever: A systematic review of pre-clinical studies and implications for human dosing[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2022, 16(3): e0010289.

[64] MENDENHALL M, RUSSELL A, JUELICH T, et al. T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55 (2): 782-787.

[65] LAN X, ZHANG Y, JIA X, et al. Screening and identification of Lassa virus endonuclease-targeting inhibitors from a fragment-based drug discovery library[J]. Antiviral Res, 2022, 197: 105230.

[66] WRIGHT D, KORTEKAAS J, BOWDEN T A, et al. Rift Valley fever: Biology and epidemiology[J]. J Gen Virol, 2019, 100(8): 1187-1199.

[67] LIU J, SUN Y, SHI W, et al. The first imported case of Rift Valley fever in China reveals a genetic reassortment of different viral lineages[J]. Emerg Microbes Infect, 2017, 6(1): e4.

[68] GOGREFE N, REINDL S, GUNTHER S, et al. Structure of a functional cap-binding domain in Rift Valley fever virus L protein[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(5): e1007829.

[69] WANG X, HU C, YE W, et al. Structure of rift valley fever virus RNA-dependent RNA polymerase[J]. J Virol, 2022, 96(3): e0171321.