

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)04-0231-04

综 述

马铃薯 A 病毒复制相关蛋白研究进展

吴兴泉, 谭晓荣, 陈士华

(河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450052)

摘 要: 马铃薯 A 病毒侵染寄主后的复制主要由推测的复制复合体参与完成, 复制复合体蛋白包括 RNA 解螺旋酶 Cl、病毒基因组结合蛋白 VPg、Nla 蛋白酶部分 NlaPro 和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 Nib。近年来关于 PVA 复制复合体蛋白的研究取得了一定的进展, 很多蛋白在病毒系统侵染过程发挥的作用及各种蛋白间的互作关系等方面已明确。本文对近年来在 PVA 病毒复制相关蛋白的结构与功能方面的研究进展进行评述。

关键词: 马铃薯 A 病毒; 复制相关蛋白; 结构与功能

马铃薯 A 病毒是马铃薯 Y 病毒属成员, 在世界各马铃薯种植区均有广泛分布, 严重危害马铃薯生产。该病毒可随种薯传播, 并随种薯的种植而定植。由于至少有 7 种蚜虫以非持久的方式传播该病毒, 而这些蚜虫在我国又很普遍, 因此该病毒的扩散可能性很大, 具有较高流行风险, 并具有一定的检疫重要性^[1]。目前我国马铃薯 A 病毒的相关研究报道极少, 其原因可能是由于我国马铃薯病毒的检测主要采用国际马铃薯中心提供的免疫学检测试剂进行, 而此试剂中无 PVA 的抗血清, 直接导致我国关于 PVA 的研究极其缓慢。迄今为止, PVA 分子生物学方面的研究在国内报道极少^[2]。本文对 PVA 复制相关蛋白研究进展进行了综述, 为开展相关研究提供理论支持。

1 核内含体蛋白 (Nla)

PVA 基因组含有一个开放阅读框 (ORF), 可表达产生一个大的多聚蛋白, 含有 3058~3059 个氨基酸, 分子量约为 340 ku。多聚蛋白再被切割成小的成熟蛋白, 从 N-端到 C-端分别为 P1、HC-Pro、P3-6K1、Cl-6K2、VPg、Nla-Pro、Nib 和 CP。多聚蛋白的裂解主要通过 3 个具有蛋白酶活性的蛋白 (P1、HC-Pro 和 Nla-Pro) 协调作用来完成。

多聚蛋白中有一个 P1 的酶切位点和一个 HC-Pro 的酶切位点, 它们通过水解自身的 C 端而从多聚蛋白中分离出来, 其余蛋白的裂解均由 Nla 蛋白酶催化^[3-4]。

NlaPro 蛋白酶是核内含体蛋白 Nla 的 C 端, 可催化切割多聚蛋白。NlaPro 具有顺式和反式蛋白水解活性, 水解位点的序列及其邻近序列均或影响水解效率^[5-7]。研究发现 NlaPro 对多聚蛋白的水解可产生一系列中间产物, 它们被释放的速度及存在的半衰期都各不相同。NlaPro 对 3 个蛋白水解位点即: P3-6K1 间、Cl-6K2 间及 Nla 内部的水解位点的水解速度较慢, 可能在病毒的复制循环中发挥一定的功能^[8]。PVA 中 NlaPro 对 P3-6K1 间水解位点的部分或缓慢的处理特点与 PPV 的相关报道相似。在 PPV 中, 即使 P3-6K1 间切割位点的七肽序列与切割效率较高的 Nib/CP 间序列相似, 也不会增加切割效率, 这表明在保守的七肽序列区以外的某个序列或某种构象也参与了 NlaPro 催化反应的调节。Cl-6K2 间切割位点的有效处理仅发生 6K2-VPg 间的水解被阻止时, 说明 Cl-6K2 间切割位点的水解是采用顺式模式^[7-9]。

2 病毒基因组结合蛋白 (VPg)

VPg 是由 NlaPro 蛋白酶从 Nla 蛋白的 N 端水解下来的, 它可通过共价键结合在病毒 RNA 的 5' 端^[10], 是病毒粒体中的第二种结构蛋白质。VPg 功能较多, 它可以通过与 RNA 聚合酶互作而作为病

收稿日期: 2005-12-20

基金项目: 河南工业大学基金项目 200310

作者简介: 吴兴泉 (1970-), 男, 副教授, 博士, 主要从事植物病理学与分子生物学研究。

毒 RNA 复制酶的引物参与病毒复制^[11-13], 也可参与病毒的细胞间运动和长距离系统侵染^[14-18], 因此在病毒侵染循环中发挥着重要作用^[10, 19]。

2.1 VPg 的运动功能

作为运动蛋白的一种, VPg 可以被烟草细胞内的蛋白激酶磷酸化^[20], 具有扩大叶肉细胞间胞间连丝的作用, 这种作用对 TVMV 病毒的细胞间运动中起到决定性作用^[14]。VPg 也参与了病毒的系统侵染^[21], 利用免疫组织化学方法和 RNA 杂交法研究病毒的 5 种蛋白和病毒 RNA 在侵染位点叶脉中的分布, 发现病毒 CP、CI、HC-Pro 和病毒 RNA 均分布在薄壁组织和叶肉细胞中, 在伴胞 (CC) 中没有分布, 却可检测到 VPg 的存在, 但只能在病毒卸载的早期阶段可检测到。在侵染点外的一些叶脉中也可检测到 VPg 的存在, 却没有其它蛋白及病毒 RNA 的存在, 说明在系统侵染的早期阶段, VPg 便可在 CC 中积累并发挥作用, 它可能是“韧皮部蛋白”, 利于病毒的卸载^[22]。

VPg 蛋白在不同植物中还表现出一种抗病基因的毒力因子作用^[23]。Rajamaki 发现, *Nicandra physaloides* 对 PVA-M 具有抗病性, PVA-M 只能产生局部侵染, 当定点诱变 VPg 一氨基酸 (Val116Met) 时可完全克服寄主的抗性而恢复系统侵染能力。这一结果说明 VPg 是 *N. physaloides* 对 PVA-M 的抗病性的决定因子, 同时也表明它们对病毒在维管束中的传播起调控作用^[17]。VPg 暴露在病毒粒体的末端, 可以参与蛋白-蛋白间互作^[24], Dungey 等^[25]在寄主体内鉴定到马铃薯 Y 病毒组病毒 VPg 互作蛋白 (PVIP), 该蛋白可与 VPg 发生互作, 互作位点为 VPg 的 N 端前 16 个氨基酸, 尤其是第 12 个氨基酸, 诱变该氨基酸后会影响病毒的系统侵染, 而不会影响病毒的复制。采用 RNAi 技术降低 PVIP 基因表达可降低寄主对病毒的感病性, 说明该蛋白是天然的利于病毒系统传播的蛋白。

2.2 VPg 在病毒复制中的作用

PVA 基因组 RNA 没有帽子结构, 其翻译的起始例如 eIF4E 的结合等不能按常规方式进行^[26], 而是采用与 VPg 互作而结合在病毒 RNA 上^[27], 这个互作在对 TuMV 的侵染是必须的^[28], 病毒在侵染中与植物竞争这些翻译因子是抑制寄主基因表达的一种机制^[29]。VPg 可被 Nib (病毒 RNA 聚合酶) 核苷酸化, 这种作用不需要 RNA 模板, 并对 UTP 有一

定倾向性, 说明 VPg 可作引物起始病毒 RNA 的复制^[30]。除了与病毒 RNA 共价结合外, VPg 或它的前体蛋白 Nia 均表现出细胞内定位于核上的现象^[31-32], 这种现象与 VPg 功能的关系尚不清楚。

3 核内含体蛋白 Nib

核内含体蛋白 (Nib) 是依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp), 由 516 个氨基酸组成, 负责基因组 RNA 的复制, 复制过程主要有两个步骤: 首先以 +RNA 链为模板合成 -RNA 链, 再以 -RNA 链模板合成 +RNA 链。PVA Nib 含有 RdRp 通常都具有的 Gly-Asp-Asp 保守序列^[33], 该保守区如发生变异可使病毒失去复制能力^[34]。Nib 可使 VPg 尿苷酸化而起始 RNA 复制, 这一催化活性要求 Mn^{2+} 的存在, 在体内 Nib 也可以依靠 Mg^{2+} 进行 RNA 合成, 但 Mn^{2+} 的激活作用比 Mg^{2+} 强^[35]。一般 RdRp 的催化活性均要求有二价阳离子存在, X-射线衍射法分析发现在距离 RdRp 催化活性中心约 6 Å 外存在一个阳离子结合位点, 二价阳离子可作为 NTP 底物中磷酸基团的配体发挥激活作用^[36]。

Nib 具有核迁移活性。Nib 含有两个独立的核定位信号 (NLS I and NLS II), NLS I 位于第 1-17 个氨基酸残基处, NLS II 在第 292-316 个氨基酸残基处, 这些位点的突变会导致核迁移活性的丧失和 RNA 复制的终止^[37], 说明这一功能具有重要的生物学意义。

4 CI 蛋白及其他病毒复制相关蛋白

圆柱状内含体蛋白 CI 有核苷酸结合序列, 具有 RNA 解螺旋酶和 NTP 酶活性^[38]。CI 能够解开 RNA 双链, 解旋方向是 3'→5' 方向, 其活性区位于蛋白 N 端。CI 蛋白在寄主体内可形成风轮状细胞质内含体。

近年来研究表明, CI-6K2 多聚蛋白在昆虫体内或植物组织细胞中非常稳定, 在这两种细胞中, 在膜上主要存在着 CI-6K2 多聚蛋白, 而不是完全水解下的 CI 蛋白。CI 和 6K2 蛋白参与了病毒通过胞间连丝在细胞间的运动或病毒 RNA 在细胞内的重新分布^[39-40]。在植物病组织的的前沿, CI 蛋白与胞间连丝出现短暂的联合^[38]。在两个 PVA 突变株中, CI 与 6K2 间水解位点被修饰后可以在原生质中复制, 但在病毒侵染的植物中被削弱。6K2/VPg 切割

位点的突变可减少病毒的侵染, 减慢 PVA 的增殖, 阻止病毒的运动。一般认为 6K2 蛋白可将病毒复制复合体锚定在 ER 结合位点上, 该复合体以含有 NIa 蛋白的多聚蛋白形式进行复制, 从而使其结合在病毒 RNA 上^[6]。Rajamäki 和 Valkonen^[15]研究发现, 6K2 蛋白的氨基酸替代 Met5Val 可部分恢复病毒的系统侵染能力, 表明 6K2 对病毒在维管束中的传播起调控作用。去除 6K1 和 6K2 蛋白编码区又使 PVA 无侵染性。6K2/VPg 间水解位点的突变减少了病毒在植物中的侵染, 两个 6K 蛋白对于病毒复制是绝对必要的, 将 6K 蛋白从相邻蛋白上水解分离下来对于病毒的复制和运动都是很重要的。对于 6K1 多肽在病毒侵染循环过程中的功能尚无报道。研究表明 6K1 蛋白基因编码区的去除可以阻止 P3 和 CI 蛋白间的水解, 说明 6K1 蛋白的功能很重要。也许是作为 P3 和 CI 蛋白间的间隔作用, 从而影响这两个大蛋白从多聚蛋白上的水解分离^[8]。

P1 蛋白上 PVA N 端的第一个蛋白, 其 C 端具有蛋白酶活性, 可催化将其从多聚蛋白中水解下来^[41]。P3 蛋白是 PVA N 端第三个蛋白, P3 蛋白还未知其具有酶活性, 但它含有一个推测的跨膜结构区, 可能在复制复合体在膜上定位过程中起作用^[42]。Merits 等^[43]研究表明, P1 和 P3 间可发生互作, 并可推测的病毒复制复合体互作。表明 P1 和 P3 蛋白参与了病毒基因扩增, 并与病毒复制复合体相互作用。

5 小 结

PVA 的复制是多蛋白协同完成的, CI 蛋白解开 RNA 链, 结合在病毒 RNA 上的 VPg 蛋白被 Nib (病毒 RNA 聚合酶) 核苷酸化 (主要是结合 UTP), 从而以 VPg 为引物启动病毒 RNA 的复制, RNA 的复制是在具有依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 活性的核内含体蛋白 (Nib) 的催化下进行的, 其催化活性要求 Mn^{2+} 的存在。PVA 基因组可表达产生一个大的多聚蛋白, 再被切割成小的成熟蛋白。多聚蛋白的裂解主要通过 3 个具有蛋白酶活性的蛋白 (P1、HC-Pro 和 NIa-Pro) 协调作用来完成。P1 和 HC-Pro 可分别裂解自身 C 端使之与多聚蛋白分离。其余蛋白的裂解均由 NIaPro 完成, 其对多聚蛋白的水解可产生一系列中间产物, 它们被释放的速度及存在的半衰期都各不相同。NIaPro 对 P3-

6K1 间、CI-6K2 间及 NIa 内部的水解位点的水解速度较慢, 可能在病毒的复制循环中发挥一定的功能。

[参 考 文 献]

- [1] 李明福. 马铃薯病毒及其检疫重要性初析 [J]. 植物检疫, 1997, 11(5): 261-264.
- [2] 吴兴泉, 陈士华, 吴祖建, 等. 马铃薯 A 病毒 CP 基因的克隆与序列分析 [J]. 植物保护, 2003, 29 (5): 25-28.
- [3] Puurand U, Mäkinen K, Paulin L, et al. The nucleotide sequence of potato virus A genomic RNA and its sequence similarities with other potyviruses [J]. J Gen Virol, 1994, 75(2): 457-461.
- [4] Kekkarainen T, Merits A, Oruetebarria I, et al. Comparison of the complete sequences of five different isolates of Potato virus A (PVA), genus Potyvirus [J]. Arch Virol, 1999, 144(12): 2355-2366.
- [5] Schaad M C, Haldeman- Cahill R, Cronin S, et al. Analysis of the VPg- proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification[J]. J Virol, 1996, 70: 7039- 7048
- [6] Carrington J C, Haldeman R, Dolja V V, et al. Internal cleavage and trans- proteolytic activities of the VPg- proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus in vivo[J]. Journal of Virology, 1993, 67: 6995- 7000.
- [7] Riechmann J L, Cervera M T, Garc á J A. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3- 6K1 junction is not required for virus viability [J]. Journal of General Virology, 1995, 76: 951- 956.
- [8] Merits A, Rajamäki M L, Lindholm P, et al. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells[J]. Journal of General Virology, 2002, 83: 1211- 1221.
- [9] Garc á J A, Martin M T, Cervera M T, et al. Proteolytic processing of the plum pox potyvirus polyprotein by the NIa protease at novel cleavage site [J]. Virology, 1992, 188: 697- 703.
- [10] Koonin E V, Dolja V V. Evolution and taxonomy of positive- strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1993, 28: 375- 430.
- [11] Fellers J, Wan J, Hong Y, et al. In vitro interactions between a potyvirus- encoded, genome- linked protein and RNA- dependent RNA polymerase [J]. J Gen Virol, 1998, 79: 2043- 2049.
- [12] Hong Y, Levay K, Murphy J F, et al. A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells [J]. Virology, 1995, 214: 159- 166.
- [13] L éonard S, Plante D, Wittmann S, et al. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity [J]. J Virol, 2000, 74: 7730- 7737.

- [14] Nicolas O, Dunnington S W, Gotow L F, et al. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco [J]. *Virology*, 1997, 237: 452- 459.
- [15] Rajamäki M L, Valkonen J P. The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca* [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, 12: 1074- 1081.
- [16] Rajamäki M L, Valkonen J P. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, 15: 138- 149.
- [17] Schaad M C, Carrington J C. Suppression of long-distance movement of tobacco etch virus in a nonsusceptible host [J]. *J Virol*, 1996, 70: 2556- 2561.
- [18] Schaad M C, Lellis A D, Carrington J C. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement [J]. *J Virol*, 1997, 71: 8624- 8631.
- [19] Dougherty W G, Semler B L. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes [J]. *Microbiol Rev*, 1993, 57: 781- 822.
- [20] Karpova O V, Rodinova N P, Ivanov K I, et al. Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement proteins abolishes its translation repressing ability [J]. *Virology*, 1999, 216: 20- 24.
- [21] Härmäläinen J H, Kekkonen T, Gebhardt C. Recessive and dominant resistance interfere with the vascular transport of Potato virus A in diploid potatoes [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, 13: 402- 412.
- [22] Rajamäki M L, Valkonen J P. Localization of a potyvirus and the viral genome-linked protein in wild potato leaves at an early stage of systemic infection [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16(1): 25- 34.
- [23] Keller K E, Johansen I E, Martin R R, et al. Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines pea mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum* [J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1998, 11: 124- 130.
- [24] Pietri P, Rajamäki M L, Konstantin I. Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases [J]. *J Virol*, 2002, 76(24): 12703- 12711.
- [25] Dunoyer P, Thomas C, Harrison S A. Cysteine-rich plant protein potentiates potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg [J]. *J Virol*, 2004, 78(5): 2301- 2309.
- [26] McKendrick L, Pain V P, Morley S J. Translation initiation factor 4E [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(1): 31- 35.
- [27] Wittmann S, Chatel H, Fortin M G, et al. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso)4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system [J]. *Virology*, 1997, 234: 84- 92.
- [28] Lellis A D, Kasschau K D, Whitham S E, et al. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection [J]. *Curr. Biol*, 2002, 12: 1046- 1051.
- [29] Merits A, Maule A. Virus-induced host gene shutoff in animals and plants [J]. *Virology*, 1998, 243: 261- 267.
- [30] Pietri P, Kristiina M. Uridylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 38103- 38110.
- [31] Carrington J C, Freed D D, Leincke A J. Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant potyviral NIa protein [J]. *Plant Cell*, 1991, 3: 953- 962.
- [32] Restrepo M A, Freed D D, Carrington J C. Nuclear transport of plant potyviral proteins [J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 987- 998.
- [33] Kamer G, Argos P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses [J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12: 7269- 7282.
- [34] Li X H, Carrington J C. Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 457- 461.
- [35] Crotty S, Gohara D, Gilligan D K, et al. Manganese-dependent polioviruses caused by mutations within the viral polymerase [J]. *J Virol*, 2003, 77: 5378- 5388.
- [36] Butcher S J, Grimes J, Makeyev E, et al. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization [J]. *Nature*, 2001, 410: 235- 240.
- [37] Li X H, Valdez P, Olvera R E, et al. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (N1b): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa) [J]. *J Virol*, 1997, 71(2): 1598- 1607.
- [38] Fernandez A, Lain S, García J A. RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 1327- 1332.
- [39] Carrington J C, Jensen P E, Schaad M C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement [J]. *Plant Journal*, 1998, 14: 393- 400.
- [40] Roberts I M, Wang D, Findlay K, et al. Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (Cis) shows that CI protein acts transiently in aiding virus movement [J]. *Virology*, 1998, 245: 173- 181.
- [41] Verchot J, Koonin E V, Carrington J C. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase [J]. *Virology*, 1991, 185(2): 527- 535.
- [42] Martin M T, Cervera M T, García J A, et al. Properties of the active plum pox potyvirus RNA polymerase complex in defined glycerol gradient fractions [J]. *Virus Research*, 1995, 37: 127- 137.
- [43] Merits A, Guo D, Jarvekulg L, et al. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex [J]. *Virology*, 1999, 263(1): 15- 22.