

# 瘟病毒的 p80 (NS3) 蛋白

穆 杨 张彦明 丛 晔

(西北农林科技大学畜牧兽医学院 杨陵 712100)

**摘要:** p80 蛋白为瘟病毒一种多功能的非结构蛋白。综述了 p80 蛋白的丝氨酸蛋白酶, NT-Pase 酶及 RNA 解旋酶 3 种酶活性, 并进一步探讨了 p80 蛋白在瘟病毒生命周期和致性方面的重要性。

**关键词:** 瘟病毒, p80 蛋白

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0081-04

瘟病毒 (Pestivirus) 为黄病毒科 (Flaviviridae) 的一个属, 该属包括牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea virus, BVDV)、猪瘟病毒 (Hog cholera virus, HCV or Classical

收稿日期: 2000-04-25, 修回日期: 2000-07-11

swine fever virus, CSFV) 和羊边界病病毒 (Border disease virus, BDV), 这3种病毒均可给养殖业造成严重的经济损失。与黄病毒科的其它两个属——黄病毒属 (Flavivirus) 和类丙型肝炎病毒属 (Hepatitis C-like Viruses) 一样, 瘟病毒为单股正链 RNA 病毒, 基因组大小约为 12.3nt, 只含有一个大的开放性阅读框 (Open reading frame, ORF), 此 ORF 编码一个约含有 4000 个氨基酸残基的多聚前体蛋白, 多聚蛋白在病毒和宿主细胞蛋白酶的共同作用下, 在翻译过程中或翻译后进行加工, 产生出 10 ~ 11 种成熟的病毒蛋白<sup>[1]</sup>。对于瘟病毒的代表种 BVDV, 这些成熟的蛋白在 ORF 上的顺序如下: NH<sub>2</sub>-p20-p14-gp48-gp25-gp53-p125 (p54/p80) -p10-p30-p58-p75-COOH, 或者为 5'-N<sup>pro</sup>-C-E<sup>ns</sup>-E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>-NS2-3 (NS2/NS3) -NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3'<sup>[2]</sup>, 其中 C (p14)、E<sup>ns</sup> (gp48)、E<sub>1</sub> (gp25)、E<sub>2</sub> (gp53) 为结构蛋白, 其余为非结构蛋白。C 为核衣壳蛋白, E<sup>ns</sup>、E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub> 为 3 种囊膜糖蛋白<sup>[3]</sup>。ORF 的第一个产物 N<sup>pro</sup> 蛋白为瘟病毒特有的非结构蛋白, 在黄病毒属和类丙型肝炎病毒属中均未发现类似的蛋白, 它具有自主蛋白酶的活性, 可将自身从前体蛋白中释放出来<sup>[1]</sup>。E<sup>ns</sup> 也为瘟病毒特有的蛋白, 它具有 RNase 的活性<sup>[4]</sup>。现已证实瘟病毒还有两种蛋白具有酶活性, 但这两种蛋白在黄病毒属和类丙型肝炎病毒属中都具有类似物, 一种为 NS5B 蛋白 (p75 蛋白) (在黄病毒属为 NS5 蛋白, 在类丙型肝炎病毒属为 NS5B 蛋白) 具有 RNA 指导的 RNA 聚合酶活性, 是瘟病毒的复制酶; 另一种为 NS3 蛋白 (在瘟病毒即为 p80 蛋白)。瘟病毒 p80 蛋白的氨基酸序列显示它具有 3 种酶的活性: 丝氨酸蛋白酶活性、NTPase 活性和 RNA 解旋酶活性。

### 1 p80 蛋白的丝氨酸蛋白酶活性

类胰蛋白酶家族中的丝氨酸蛋白酶在自然界中是无所不在的, 并参与广泛的生物学过程, 许多研究已证实瘟病毒的 p80 蛋白具有丝氨酸蛋白酶活性。Bazan 等<sup>[5]</sup>通过序列和结构模式分析指出, 由有包膜的黄病毒和瘟病毒编码的一个未确定功能的蛋白区是与胰蛋白酶有关的具有丝氨酸蛋白酶活性中心的酶, 病毒蛋白区的结构模式对于它的催化活性和与底物结合是至关重要的。Wiskerchen 等<sup>[6]</sup>利用哺乳动物的表达系统证实了瘟病毒的 p80 蛋白确实具有丝氨酸蛋白酶的活性, 并且发现 p80 蛋白的蛋白酶活性对于 BVDV 所有非结构蛋白的加工是必需的, 酶活性位于分子氨基端的 70%, 但羧基端的 80 个氨基酸对它的酶活性也是必需的, 因为若去掉羧基端的 80 个氨基酸, 虽然丝氨酸蛋白酶的催化三联结构是完整的, 但 p80 蛋白丧失了酶活性。在 BVDV 中, p80 蛋白对于非结构蛋白⑥~⑩位点 (图 1) 的加工是必须的, 它通过自主催化作用加工⑥、⑦位点, 将自身从多聚蛋白中释放出来, 并进一步负责⑧、⑨、⑩位点的加工。对于⑩位点的加工是独特的, 需要别的因子和/或条件的辅助。Xu 等<sup>[7]</sup>证实由 64 个氨基酸残基组成的非结构蛋白 NS4A 是 NS3 的辅助因子, 帮助 NS3 行使其对下游蛋白的加工功能。黄茜华等<sup>[8]</sup>对 NS4A 基因进行了克隆、测序及分析, 证实 NS4A 在 CSFV 中高度保守, 尤其是氨基酸序列的同源性更高, 许多碱基的突变都属于

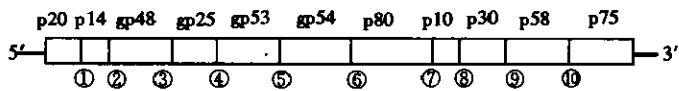


图 1 BVDV 蛋白的加工位点

的因子和/或条件的辅助。Xu 等<sup>[7]</sup>证实由 64 个氨基酸残基组成的非结构蛋白 NS4A 是 NS3 的辅助因子, 帮助 NS3 行使其对下游蛋白的加工功能。黄茜华等<sup>[8]</sup>对 NS4A 基因进行了克隆、测序及分析, 证实 NS4A 在 CSFV 中高度保守, 尤其是氨基酸序列的同源性更高, 许多碱基的突变都属于

同义突变,不引起氨基酸的替换,这可能与它的功能有关。

## 2 p80 蛋白的 NTPase 活性

Tamura 等<sup>[9]</sup>利用杆状病毒为载体,在昆虫细胞中表达 BVDV 的 p80 蛋白,免疫亲和色谱纯化后证实了 p80 蛋白具有 RNA 刺激的 NTPase 活性,并进一步证实 p80 蛋白可以水解 4 种 NTPs 及 4 种 dNTPs;水解 ATP 的最适 pH 为 6.5,且要存在 2.5mmol/L Mg-Cl<sub>2</sub>;加入单链 RNA 可以刺激 p80 蛋白的 ATPase 活性,有 poly (U) 和 poly (C) 时酶活性增至最强,其余的单链 RNA 和 DNA 或双链 RNA 和 DNA 只能微弱增强或不能增强酶活性;NaCl 或 KCl 可以抑制单链 RNA 刺激的 NTPase 活性。

## 3 p80 的 RNA 解旋酶活性

瘟病毒的 p80 蛋白属于 DEAD/DExH 解旋酶家族,这一家族既包括原核生物和真核生物的细胞代表,也包括许多病毒编码的多肽,这些蛋白均具有与 NTP 结合的活性和水解活性及与解开双链核酸有关的相同的氨基酸模式。瘟病毒 p80 蛋白的氨基酸序列结构表明它具有 RNA 解旋酶的活性,Warrener 等<sup>[10]</sup>证实了这一点,他们在研究中发现二价阳离子和 ATP 对 p80 蛋白的 RNA 解旋酶活性是必不可少的,而且这两种成分的比例非常重要,当二价阳离子(如 Mg<sup>2+</sup>)为 3mmol/L、ATP 为 5mmol/L 时,p80 蛋白具有最大的解旋酶活性,在此条件下,反应的最适 pH 为 6.5,而在最适反应条件下若向反应混和物中加入一价阳离子(如 Na<sup>+</sup> 或 K<sup>+</sup>)可以抑制 p80 蛋白的 RNA 解旋酶活性。此外,p80 蛋白解旋酶作用的方向是 3' 端至 5' 端,它需要底物链 3' 末端有未配对的碱基,对于有 5' 尾巴的底物或具有钝性末端的底物,p80 蛋白无解旋酶活性。p80 蛋白通过水解 NTP 获得能量使结合在模板链上的 RNA 或 DNA 解旋下来,在瘟病毒的复制过程中 p80 蛋白使新合成的 RNA 链与模板链分离。

p80 蛋白在瘟病毒的生命周期和致病性等方面发挥着重要的作用,Wilke 等<sup>[11]</sup>研究了瘟病毒 p80/p125 蛋白在感染细胞中的表达情况,结果显示致细胞病变型(cp 型) BVDV 感染的细胞除了表达 p125 蛋白外,还表达它的次级产物 p80 和 p54 蛋白,而非致细胞病变型(ncp 型) BVDV 感染的细胞中只能检测到 p125 蛋白的存在;对于 CSFV 感染的细胞,电泳时 p125 蛋白呈现为粗带,而 p80 蛋白只呈现微弱的条带。大量资料都已证实 ncp 型 BVDV 感染的细胞只表达 p125 蛋白,cp 型 BVDV 感染的细胞还表达 p80 和 p54 蛋白。Meyer 等<sup>[12]</sup>提出,p80 蛋白是导致细胞产生细胞病变效应(CPE)的因素,是 cp 型 BVDV 在蛋白水平上的标志分子。对于 cp 型和 ncp 型 BVDV 基因组核苷酸序列的分析显示,病毒基因组 RNA 与宿主细胞 RNA 间的重组、病毒 RNA 自身的重复复制、重排、缺失、替换等都可导致 ncp 型 BVDV 向 cp 型 BVDV 转化<sup>[12,13]</sup>。Tautz 等<sup>[14]</sup>的实验还表明,在有泛素序列插入的 cp 型 BVDV Osloss 株中,p125 蛋白加工成 p80 蛋白是由宿主细胞中泛素 C 端水解酶介导的。Qi 等<sup>[13]</sup>认为 p80 蛋白之所以引起 CPE 是因为 p80 蛋白缺少 p125 蛋白 N 端具有的疏水区域,不能定位于细胞内质网膜上,而是游离于胞质中,降解细胞中一些重要的蛋白质而损伤细胞,导致 CPE 的产生。对于 CSFV 石门株及兔化弱毒株 p80 区基因分析表明,p80 区是 CSFV 基因组中最保守的区域。Moser 等<sup>[15]</sup>通过构建复制子的方法表明,含有 CSFV 完整的 NS2-3 (p125) 基因

的 RNA 复制子虽然能持续感染 PK-15 细胞并复制,但不能导致细胞明显的形态和功能的损伤,而缺乏 NS2 基因的复制子则能更有效的复制并导致 PK-15 细胞产生 CPE。这就提示,CSFV 的 p80 蛋白也是导致猪肾细胞产生 CPE 的重要因子,但目前无论用 CSFV 强毒或弱毒接种 PK-15 细胞,均不产生 CPE,这可能是因为在猪肾细胞内不能将 p125 蛋白加工成 p80 蛋白,故不能引起 CPE,这一问题值得进一步研究。

总之, p80 蛋白是一种非常重要的多功能蛋白,具有重要的作用,对它的研究和深入了解,有助于阐明瘟病毒的致病机理和防制瘟病毒引起的疾病。

### 参 考 文 献

- [1] Stark R, Meyers G, Rümenapf T, *et al.* J Virol, 1993, 67 (12): 7088 ~ 7095.
- [2] Tautz N, Harada T, Kaiser A, *et al.* J Virol, 1999, 73 (11): 9422 ~ 9432.
- [3] Rümenapf T, Unger G, Strauss JH, *et al.* J Virol, 1993, 67: 3288 ~ 3294.
- [4] Hulst M M, Himes G, Newbigin E, *et al.* Virology, 1994, 200: 558 ~ 565.
- [5] Bazan J F, Fletterick R J. Virology, 1989, 171: 637 ~ 639.
- [6] Wiakerchen M, Collett M S. Virology, 1991, 184: 341 ~ 350.
- [7] Xu J, Mendez E, Caron R P, *et al.* J Virol, 1997, 71: 5312 ~ 5322.
- [8] 黄茜华, 张楚禽. 微生物学杂志, 1999, 19 (2): 5 ~ 7.
- [9] Tamura J K, Warrenner P, Collett M S. Virology, 1993, 193: 1 ~ 10.
- [10] Warrenner P, Collett M S, J Virol. 1995, 67 (3): 1720 ~ 1726.
- [11] Wilke I G, Dittmar K E, Moening V. J Gen Virol, 1992, 73: 47 ~ 52.
- [12] Meyer G, Tautz N, Stark R, *et al.* Virology, 1992, 191: 368 ~ 386.
- [13] Qi F X, Ridpath J F, Lewis T, *et al.* Virology, 1992, 189: 285 ~ 292.
- [14] Tautz N, Thiel H J, Dubvi E J, *et al.* J Virol, 1994, 68: 3289 ~ 3297.
- [15] Mozer C, Stettler P, Tratschin J D, *et al.* J Virol. 1999, 73: 7787 ~ 7794.