

# 杆状病毒 IAP 基因的结构、功能及其进化

张瑞 姚青 彭建新\* 洪华珠

(华中师范大学昆虫学研究所 武汉 430079)

**摘要:** 杆状病毒的 IAP (inhibitor of apoptosis protein) 基因是最早鉴定的 IAP 家族基因, 具有 BIR 和 RING 结构域特征, 与杆状病毒 P35 基因有相似抗细胞凋亡功能, 但在结构和作用机制上存在差异。系统分析表明, 杆状病毒 IAP 基因可能是病毒与鳞翅目昆虫在长期的进化过程中从宿主基因组中获得的。

**关键词:** 杆状病毒, IAP 基因, 结构, 功能, 进化

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0128-05

## Structure, Function and Evolution of Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Protein Gene

ZHANG Rui YAO Qing PENG Jian-Xin\* HONG Hua-Zhu

(Institute of Entomology, Hua Zhong Normal University, wuhan 430079)

**Abstract:** Baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis protein) gene was identified firstly in IAP gene family. The structural feature of baculoviral IAP genes are characterized BIR and RING domain; Despite similar to P35 in antiapoptotic function, baculoviral IAP and P35 differ in structure and mechanism of action. Phylogenetic analysis of IAP genes and lots of evidence support the origin of this viral gene by capture of a host gene early in the evolution of Lepidoptera.

**Key words:** Baculovirus, IAP gene, Structure, Function, Evolution

IAP 基因最初是在苹果蠹蛾颗粒体病毒 (*Cydia pomonella granulovirus*, CpGV) 中发现的, 它能抑制缺失 P35 基因的首蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) 突变株诱导的 Sf-21 细胞发生凋亡, 以后在 AcMNPV, 黄杉毒蛾多角体病毒 (*Orguia pseudotsugata*, Op MNPV) 等其它杆状病毒中也发现存在 IAP 基因<sup>[1~4]</sup>。对其它生物类群研究, 也鉴别了此基因, IAP 家族的基因广泛存在于病毒、昆虫、哺乳动物等不同生物类群, 它们的表达产物能抑制由许多刺激物诱导的细胞凋亡<sup>[5,6]</sup>。目前, 对杆状病毒 IAP 基因的结构、功能及进化的研究有了较大的进展, 本文就 IAP 基因研究概况作一简要介绍与评述。

## 1 杆状病毒 IAP 基因的结构

**1.1 杆状病毒 IAP 基因** 迄今, 已经对多种杆状病毒 IAP 基因进行了测定和分析, 包括 CpIAP、OpIAP、AcIAP、美国白蛾核型多角体 (*Hyphantria cunea* GV) IAP、棉褐带卷蛾颗粒体 (*Adoxophyes orana* GV) IAP、家蚕核型多角体 (*Bombyx mori* NPV) IAP、*Xestia c-nigrum* 颗粒体病毒 (*XcGV*) IAP 以及油桐尺蠖核型多角体 (*Buzura suppressaria guenee* GV) IAP 等; 根据氨基酸序列的同源性, 杆状病毒 IAP 被划分为 5 个成员 IAP1

\* 通讯作者 Tel: 027-67862431, E-mail: jianxinpeng@21cn.com

收稿日期: 2005-04-12, 修回日期: 2005-05-26

~IAP<sup>[7]</sup>。有的病毒基因组中含有多个 IAP 基因, 如 OpMNPV 有 4 个 IAP 基因, 分别为 OpIAP1、OpIAP2、OpIAP3 和 OpIAP4。杆状病毒 IAP 基因具有大小比较相近, 结构相似, poly 尾相同等特点。下面以两种杆状病毒 IAP 基因为例, 分析 IAP 基因的结构及其特点。OpIAP 基因起始密码子为 ATG, ATG 上游有杆状病毒晚期基因起始部位特征性序列 ATAAG, 在启动子部位有 TATA 盒。IAP 基因编码相对分子质量为 30kD、由 268 个氨基酸组成的多肽, 此多肽含有 C3HC4 基元序列。IAP 终止密码子之后有两个 AATAAA 多腺苷化信号序列<sup>[8]</sup>。棉铃虫核型多角体病毒 (Helicoverpa armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV) IAP3 基因的开放阅读框 (ORF) 大小为 807bp, 编码 268 个氨基酸, 推测其产物的分子量大小为 31.5kD。在 IAP3ORF 翻译密码子上游 83-79 的位置有一保守的晚期转录信号 GTAAG, 在紧接该转录结构的上游 6 碱基处有一个可能的早期转录信号 CAAT。在翻译终止密码子下游 21-26 核苷酸碱基处有一典型的 poly (A) AATAAA 信号<sup>[5]</sup>。

**1.2 杆状病毒 IAP 的结构** 杆状病毒 IAP 主要含有一个或多个在 N 端的 BIR (Baculovirus IAP Repeat) 结构和 C 端的 RING 指结构。

BIR 是 IAP 的特征性结构, 绝大多数 IAPs 含有 2 个或 3 个串连的 BIR 基序结构, BIR 是一种锌指折叠结构, 它包括 3 个保守的半胱氨酸残基和 1 个保守的组氨酸残基 (即 CysX2Cys 和 CysX6His, X 为任意氨基酸) 构成的基元序列, BIR 结构域有大约 70 个氨基酸, 包含 4 或 5 个  $\alpha$  螺旋和 1 个三链折叠结构, 这个三链折叠结构带有 1 个与保守的半胱氨酸残基和组氨酸残基配位结合的锌离子<sup>[9,10]</sup>。BIR 折叠也能分成两半, N 端一半包含两个  $\alpha$  螺旋和 1 个保守的精氨酸残基; C 端一半包含 1 个与 3 个半胱氨酸残基和 1 个组氨酸残基配位结合的锌离子, C 端一半的近起始处, 是保守的甘氨酸残基<sup>[11]</sup>。溶液结构分析 (solution-structure analysis) 显示, BIR 折叠成 1 个疏水结构中心, 它包括 1 个 C2HC 基元, 配位结合 1 个锌离子。这个中心包括一些高度保守残基和表现为 1 个新的锌配位蛋白折叠, 疏水和亲水残基位于它的表面。理论分析表明, BIR 中心是支持蛋白-蛋白相互作用<sup>[12]</sup>。

RING 锌指结构位于 IAP 的 C 端, 具有 C3HC4 基元结构, 但它不是 IAP 独有的。RING 指结构域的特征是由一系列保守的金属连接氨基酸残基 (C3HC4) 构成的, 它们可配位结合 2 个锌离子<sup>[9]</sup>。测定 RING 指的溶液结构, 在 C3HC4 基元开始 2 个和第 4 个半胱氨酸都采用一个紧密交叉结构, 配位结合 1 个锌离子, 同时, 与组氨酸和剩下的半胱氨酸配位结合第二个锌离子<sup>[13]</sup>。

结构分析表明 BIR 结构域结合在 caspase 的表面, 使得 BIR 之间的序列抑制靶酶的催化沟。另外的研究揭示 RING 结构域可作为泛素连接酶, 通过泛素化和蛋白酶体降解与其结合的 caspase<sup>[14]</sup>。

## 2 杆状病毒 IAP 基因的功能

IAP 基因属于内源抑制因子家族, 在细胞中通过抑制 caspase 的加工过程和活性而控制细胞凋亡; 它也能影响细胞分裂和细胞周期的调控<sup>[15]</sup>, 在细胞分裂和伴随基因复制时对胞质分裂和有丝分裂纺锤体起作用<sup>[12]</sup>。

**2.1 杆状病毒 IAP 基因的抗凋亡功能及作用方式** 研究者很早就发现杆状病毒的 P35 能抑制病毒感染的宿主细胞凋亡。1993 年, Crook 等发现缺失 P35 基因的杆状病毒 Ac-

MNPV 突变株的感染导致昆虫细胞凋亡, 而将 AcMNPV 突变株 DNA 与 CpGV 的 DNA 共转染 SF-21 细胞, 无凋亡发生。显然, CpGV DNA 中存在 P35 的同源基因, 发挥着抑制细胞凋亡的功能, 以此鉴别了 CpIAP<sup>[16]</sup>。OpIAP 基因的功能互补测定实验也证明 IAP 能抑制有 AcMNPVp35 基因缺失突变体 vAcAnH 诱导的昆虫细胞凋亡。由于很多杆状病毒基因组中无 p35 基因, 所以这些病毒的抗凋亡功能由 IAP 承担。分析也显示, AcMNPV 中的 IAP 基因无抑制细胞凋亡的功能。

杆状病毒 IAP 可与昆虫凋亡诱导物结合, 抑制昆虫细胞的凋亡。果蝇中鉴别了 grim, reaper, doom 和 HID 几种凋亡蛋白, IAP 可结合这些果蝇细胞凋亡蛋白, 阻抑果蝇细胞凋亡。研究显示, 果蝇蛋白 doom 在 SF-21 细胞中超量表达时, 可诱导细胞凋亡。但是 doom 与 OpIAP 在 SF-21 共表达时, 凋亡被抑制。研究发现 doom 包含一个最近鉴别的 3' 外显子编码新序列, 此序列对诱导细胞凋亡是必需的, 同时它也可与 OpIAP 的 BIR 结构产生相互作用。有趣的是, OpIAP 和 doom 分别超量表达, 表达产物分别定位于细胞质和细胞核, 但两者共表达, 均定位于细胞核, 说明 OpIAP 抑制由 doom 的诱导细胞凋亡发生在细胞核内<sup>[10]</sup>。

杆状病毒 IAP 不仅具有抑制昆虫细胞的凋亡的功能, 也具有能够抑制哺乳动物细胞的凋亡的能力。利用转基因技术, 将 OpIAP 基因导入鼠体内, 培养表达 OpIAP 转基因鼠发现, 正在发育的胸腺细胞表达 OpIAP 基因, 同时显示细胞核中 NF- $\kappa$ B 水平的增加和细胞质中抑制因子 I $\kappa$ B 水平的降低。在成熟的胸腺细胞, 在缺少共同刺激信号的情况下, OpIAP 诱导 TCR 击发后的 T 细胞活化和增殖。OpIAP 在未成熟胸腺细胞中的表达抑制 TCR 诱导的细胞凋亡<sup>[15]</sup>。尽管 OpIAP 最初是作为昆虫细胞凋亡的抑制因子鉴别的, 但异位表达研究表明, OpIAP 抑制哺乳动物细胞的细胞凋亡, 说明不同 IAP 有一个共同作用的机制, 杆状病毒 IAP 在昆虫细胞和哺乳动物细胞中作用于细胞凋亡途径的细胞组分可能是保守的<sup>[10]</sup>。

最近研究表明, OpIAP 有较大力抑制 BAX 介导的人体细胞的凋亡, 但不能直接抑制哺乳动物的 caspases。OpIAP 能有效地结合 IAP 的拮抗物 Smac/Diablo, 因此阻止 Smac/Diablo 介导的细胞内 IAP 的抑制作用。而 Smac/Diablo 蛋白的减少, 在 OpIAP 缺失时不引起介导的细胞凋亡, 不能结合 Smac/Diablo 的 OpIAP 变异体不能抑制细胞凋亡。最终, OpIAP 催化 Smac/Diablo 的泛素化作用, 这一活性促成 OpIAP 介导的细胞凋亡的抑制作用。这些显示起细胞保护作用的 IAPs 能抑制细胞凋亡是通过与 IAP 拮抗物的中和, 而不是直接抑制 caspase<sup>[17]</sup>。

杆状病毒 IAP 抑制细胞凋亡的作用机制尽管至今仍不明确, 但取得了一些研究成果。杆状病毒 IAP 一般是通过结合细胞凋亡前体物抑制它们的活性, 从而阻抑细胞凋亡的启动。由于 IAP 具有 RING 指结构域相关的泛素连接酶活性, 它可以与细胞凋亡蛋白作用, 通过对靶蛋白的泛素化作用被蛋白酶体降解<sup>[18]</sup>。

杆状病毒 IAP 能抑制果蝇中的 reaper (RPR), HID, grim 和 doom 细胞凋亡诱导物。研究发现, 任何一种诱导物的超量表达, 将导致昆虫细胞 caspase 的激活, 包括 SF-caspase-1 和 drICE (一种果蝇 caspase)。然而, OpIAP 和一种诱导物的共表达能抑制这些前体物的加工和激活。研究显示 RPR, HID 和 grim 的 N 端有一个保守的氨基酸簇, 这一氨基酸簇足以诱导细胞凋亡, 同时也是与 OpIAP 互相作用所必需的, 它们间的相互作用, 似乎直接的且涉及 OpIAP 的 BIR 核心结构 C 端侧翼序列。BIR 核心结

构在抑制细胞凋亡过程中具有重要作用，但核心结构的完整性对诱导物的连接并不是主要的，诱导物的连接可调整 BIR 核心的活性和相互作用。一种称之为“apopsat”的模型用于说明 IAP 与凋亡诱导物及 caspase 相互作用，抑制细胞凋亡的机制（如图 1）。这个模型认为，IAP 可作为凋亡诱导物（如 RPR、HID、grim 和 doom）水平的清除者（encumbrators），IAP 通过与各种凋亡诱导物的结合，感知和综合各种激发关键 caspase 活化的细胞凋亡信号，该模型强调了 IAP 与凋亡诱导物浓度水平的关系与平衡，如果 IAPs 的水平足以结合全部的诱导物和增加游离的 IAPs，游离的 IAPs 将结合 caspase，从而抑制细胞的凋亡；反之，则诱导细胞凋亡性死亡<sup>[12]</sup>。一般认为 IAPs 可能主要作用信号转导阶段，杆状病毒 IAPs 结合和抑制不同果蝇凋亡诱导物活性的能力表明，杆状病毒 IAPs 可作为多种凋亡信号的感受器和整合器，是死亡信号的中心调节物。

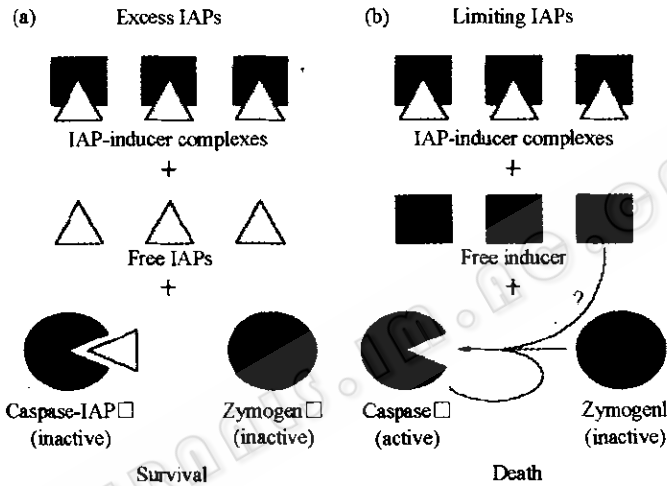


图 1 apopsat 模型：IAP-诱导物-caspase 作用模式图

**2.2 杆状病毒 IAP 与 P35 功能比较** 杆状病毒 OpIAP 能抑制 P35 缺失的 AcMNPV 突变体诱导的细胞凋亡，OpIAP 与 p35 基因有相似抗细胞凋亡功能，但 OpIAP 和 P35 在结构和作用机制上不同。OpIAP 包含两个 BIR 结构域和一个 C 端 RING 指结构域，而 P35 缺少这些结构。杆状病毒 IAP 抑制细胞凋亡的方式不同于 caspase 抑制因子 P35，P35 是“广谱性”的凋亡抑制基因，它能抑制由病毒感染诱导的细胞凋亡和抑制 ICE 蛋白酶家族，也能抑制其他 caspase 的超量表达诱导的细胞凋亡，还能直接抑制体外许多 caspase 的蛋白水解活性及细胞死亡蛋白酶 CED23。作为 caspase 的抑制因子，P35 被 caspase 切割成两个多肽，与 caspase 形成一个稳定的抑制复合体，抑制 caspase 活性，P35 作用于细胞凋亡的效应阶段。而杆状病毒 IAP 不能抑制有活性的 caspase 诱导的细胞凋亡，研究显示，在 Sf-21 细胞中，OpIAP 和 CpIAP 能够抑制多种刺激诱导的细胞凋亡，但是不能够阻断由具活性的 Sf-caspase-1 (active Sf-caspase-1) 或哺乳动物 caspase-1 或 -3 表达诱导的细胞死亡，这说明 IAPs 作用 P35 的上游<sup>[12,15]</sup>。杆状病毒中为何存在两种不同结构、作用方式不同但功能相同的基因耐人寻味，这些基因可能是多功能性的。

### 3 杆状病毒 IAP 基因的进化

最近，已经从粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*, Tn)、草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, Sf)、家蚕 (*Bombyx mori*, Bm) 等鳞翅目昆虫细胞中鉴定了 IAP 基因。BmIAP 包含两

个 BIR 和一个 RING 结构域, 与 SflAP 和 TnIAP 以及两个杆状病毒 CpIAP 和 OpIAP 相似, 这提示 IAP 基因进化的保守性<sup>[4]</sup>。SflAP 与杆状病毒 CpIAPBIR 和 RING 结构域有 85 % 的氨基酸一致 (90 % 相似), 与 OpIAP 有 70 % 一致 (80 % 相似)。SflAP 分别在序列和功能上相似于它的杆状病毒 IAP 基因, 说明杆状病毒 IAP 起源于昆虫 IAP 基因<sup>[19]</sup>。杆状病毒 IAP 和昆虫 IAP 的近亲关系说明杆状病毒 IAP 可能是病毒在与昆虫的长期进化过程中, 从昆虫宿主细胞中获得的<sup>[9]</sup>。

根据 DNA 聚合酶的种类的不同, 进一步研究杆状病毒 IAP 的进化, 对昆虫和昆虫病毒中的 IAP 系统进化重组、比较和对病毒系统发育的进行重建, 发现 CpGV 的颗粒体病毒的 IAP 基因与鳞翅目昆虫的 IAP 基因有很近的亲缘关系, 从而支持起源的病毒基因通过在鳞翅目的进化中获取早期的宿主基因<sup>[20]</sup>。

#### 4 结语

当前, 对杆状病毒 IAP 的研究主要集中在其结构和功能方面, 有关杆状病毒 IAP 作用分子的机制、信号转导途径还不清楚。其中有许多有趣的问题, 如 RING 指结构域在杆状病毒 IAP 行使抑制细胞凋亡的功能时必不可少, 但在某些正常的哺乳动物中如 Survivin 就缺失这一结构, 仍有抑制细胞凋亡功能; 甚至在某些哺乳动物中除去 RING 结构域反而增强其抑制细胞凋亡的功能<sup>[13]</sup> 亟待深入研究和探索。IAP 蛋白对癌症生成过程中起着重要的作用, 而杆状病毒 IAP 基因的研究可促进这一领域研究的发展与深化。另外, 利用杆状病毒 IAP 抗细胞凋亡的特性, 建立一个新的、持续表达的杆状病毒载体系统, 可为科研工作提供一个便利的平台。

#### 参考文献

- [1] Abrams M J. *Cell Biology*, 1999, **9**: 435 ~ 440.
- [2] Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, **314**: 902 ~ 907.
- [3] McLachlin J R, Escobar J C, Harrelson J C, *et al.* *Virus Research*, 2001, **81**: 77 ~ 91.
- [4] Huang Q h, Deveraux Q L, Maeda S, *et al.* *Biophysica*, 2001, **1499**: 191 ~ 198.
- [5] 王华林, 胡志红, 孙修炼, 等. *中国病毒学*, 2000, **15**: 43 ~ 49.
- [6] Song K H, Kim T M, Kim H J, *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, **301**: 236 ~ 242.
- [7] Ikeda M, Yanggimoto K, Kobayashi M. *Virology*, 2004, **321**: 359 ~ 371.
- [8] 彭建新. *杆状病毒分子生物学*. 武汉: 华中师范大学出版社, 121.
- [9] Verhagen A M, Coulson E J, Vaux D L. *Genome Biology*, 2001, **2**: reviews 3009.1 ~ 3009.10.
- [10] Clem R J, Duckett C S. *Cell Biology*, 1997, **7**: 337 ~ 339.
- [11] Silke J, Vaux J D L. *Cell Science*, 2001, **114**: 1821 ~ 1827.
- [12] Wormleaton S, Kuzio J, Winstanley D. *Virology*, 2003, **311**: 350 ~ 365.
- [13] Miller L K, Kaiser W J, Seshagiri S. *Virology*, 1998, **8**: 445 ~ 452.
- [14] Kaufmann S H, Hengartner M O. *Cell Biology*, 2001, **11**: 526 ~ 534.
- [15] Robles M S, Leonardo E, Miguel C L, *et al.* *The Journal of Immunology*, 2002, **168**: 1770 ~ 1779.
- [16] Crook N E, Clem R J, Miller L K, *J Virol*, 1993, **67**: 2168 ~ 2174.
- [17] Wilkinson J C, Wilkinson A S, Scott F L, *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279** (49): 51082 ~ 51090.
- [18] Thiem S M, Chejanovsky N. *Virology*, 2004, **319**: 292 ~ 305.
- [19] Huang Q h, L Deveraux Q, Maeda S, *et al.* *Pans*, 2000, **97**: 1427 ~ 1432.
- [20] Hughes A L. *Infection Genetics and Evolution*, 2002, **2**: 3 ~ 10.