

专论与综述

马铃薯Y病毒属病毒的分子生物学研究进展

李向东 李怀方 范在丰

(中国农业大学植保系 北京 100094)

关键词 马铃薯Y病毒属,基因组表达,复制,病毒传播

分类号 S435 文献标识码 C 文章编号 0253-2654(1999)-04-0283-03

马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*)是种类最多的一类植物病毒,现在国际病毒分类委员会(ICTV)承认的成员有168种。它们的病毒粒子都是弯曲线状的,长度在680~900nm,在植物细胞内可以形成圆柱形(风轮状)内含体或卷旋状内含体。基因组为正义单链RNA,翻译时先翻译成多聚蛋白(polyprotein)。本属病毒可由蚜虫传播。Riechmann等曾在1992年介绍过其基因组结构、基因组表达等方面的进展,本文主要介绍1992年以后的研究进展。

1 基因组结构与功能

马铃薯Y病毒属的基因组为正单链RNA,约10,000个核苷酸,5'-端具有病毒基因组连接蛋白(VPg),3'-端具poly(A),含一个可读框(ORF)。翻译时先产生340~368K的多聚蛋白,它具有蛋白酶活性,可以将自身裂解为小的多肽。裂解产物从N端到C端依次为P1(第一个蛋白)、HC-Pro(辅助组分/蛋白酶)、P3(第三个蛋白)、6K1、CI蛋白(圆柱形内含体蛋白)、6K2、NIa(核内含体蛋白a,VPg-Pro)、NIb(核内含体蛋白b)、CP(外壳蛋白)。马铃薯Y病毒属病毒基因产物的功能见表1。

表1 马铃薯Y病毒属病毒基因产物的功能*

基因产物	氨基酸序列特征	功能
P1	具有典型的丝氨酸蛋白酶的特征	参与多聚蛋白加工(蛋白酶);影响基因组复制
HC-Pro	含有富含半胱氨酸区域;具有典型半胱氨酸蛋白酶的氨基酸	参与介体传播;长距离运输;症状表达,多聚蛋白加工等过程。豌豆种传花叶病毒(PSBMV)的HC-Pro可以影响种传。
P3	与32K CPMV蛋白具有相似性	影响基因组复制;参与多聚蛋白加工
6K1	具有疏水氨基酸序列	与膜结合,参与复制
CI	有核苷酸结合基序,与解旋酶具有相似性	参与病毒在寄主细胞间运动和病毒复制(RNA解旋酶)
6K2	具疏水氨基酸序列	具膜结合功能,参与复制
NIa	具有NLS和典型的丝氨酸蛋白酶的氨基酸	参与多聚蛋白加工(蛋白酶)和病毒复制(VPg)
NIb	具有NLS和依赖于RNA的RNA聚合酶基序	依赖于RNA的RNA聚合酶,参与病毒的复制
CP	(I/V)DAG序列	参与RNA的衣壳化;细胞间及长距离运输;蚜虫传播等

*据Riechmann(1992)有修正,CPMV豇豆花叶病毒, NLS核定位信号,VPg基因组连接蛋白

2 基因的表达:多聚蛋白加工

马铃薯Y病毒属病毒的基因表达时首先翻译成多聚蛋白,然后在蛋白酶的作用下加工形成各种功能蛋白。翻译从AUG开始,而AUG是被一种渗漏扫描机制识别——即病毒根据AUG的前后序列判断从哪一

个AUG开始翻译。如李痘病毒(PPV)基因组的第36~38个核苷酸就是AUG,但PPV基因组上第2个AUG(₁₃₇AUG)前后的序列更适合于作为翻译的起始

1998-05-21收稿,1998-08-31修回

点,因而PPV从第2个AUG开始翻译(Simon - Buela, 1997)。多聚蛋白的加工由病毒编码的蛋白酶P1、HC-Pro和N1a以共翻译加工或者翻译后加工的方式完成。

Carrington(1990)通过分析重组烟草蚀纹病毒(TEV)多聚蛋白在转基因烟草中的表达,证实了P1的蛋白酶活性。P1可在多聚蛋白的C-端催化自身切割。Verchot(1992)证明TEV的P1为丝氨酸型的蛋白酶,His²¹⁴、Asp²²³、Asp²⁸⁸对于保持P1的最大活性是必需的。

HC-Pro以自动催化方式裂解多聚蛋白,切割位点在其C-端的Cly-Gly二肽处。HC-Pro的酶解活性不需要寄主因子,在*E. coli*中可行使蛋白酶功能;以P1-HC-Pro-P3形式在昆虫细胞内表达时也有活性,可检测到成熟的P1、HC-Pro和P3(Thornbury 1993)。Kasschau(1995)证实影响TEV HC-Pro活性位点残基(His⁷²²和Cys⁶⁴⁹或切割位点P1'残基Gly⁷⁶⁴)的突变抑制HC-Pro的酶解活性。

Carrington(1987-1988)等证实N1a是一蛋白酶,活性位于N1a蛋白的C端;并证实N1a是自动催化裂解加工多聚蛋白。多聚蛋白的2/3都是由N1a催化裂解的。N1a催化的马铃薯Y病毒属病毒多聚蛋白的酶解加工是一个以不同效率识别、不同速率加工的(包括顺式和反式切割)的调控过程。N1a裂解位点对顺式(分子内)或反式(分子间)加工的敏感性不同。在多聚蛋白上有6个N1a酶切位点,依次命名为A到F。Hidaka(1993)克隆并分析了PVY3'-端的5kb cDNA, cDNA经修饰后在*E. coli*中表达出了蛋白酶-聚合酶-CP(N1a-N1b-CP)部分。在*E. coli*细胞抽提液中可以检测到成熟的CP。在聚合酶编码区的人段缺失不影响成熟CP的出现,但在蛋白酶区的小段缺失就导致成熟CP的消失和完整多聚蛋白的出现。这些结果表明*E. coli*中表达的多聚蛋白依赖于PVY蛋白酶(N1a)的酶切活性进行切割。Marcost(1997)将编码TEV N1a、TMV CP、大豆花叶病毒(SMV) CP的基因组成一个嵌合体转化烟草(SMV自然情况下不侵染烟草),结果表明嵌合体表达后能正确加工多功能的多肽,并在植株内分别积累这三种蛋白。若转化切割位点突变的N1a,植株内就只能积累未加工的多聚蛋白。

因为马铃薯Y病毒属病毒基因组的表达不能在转录和翻译水平上进行调控,只能通过后续的酶切加工

调控基因产物的表达。

3 基因组复制

马铃薯Y病毒属病毒基因组的复制需要在N1b的催化下进行,同时受CI、N1a、HC-Pro等的影响。

CI有核苷酸结合基序,具有解旋酶活性。如PPV CI能够解开RNA双链。体外实验表明PPV CI只能解旋具有3'-单链的双链RNA,说明解旋酶是3'-5'方向的。而且只有CI的N-端与解旋酶活性有关。

N1b具有典型的依赖RNA的RNA聚合酶基序。烟草脉斑纹病毒(TVMV)的聚合酶与谷胱甘肽S-转移酶融合到一起在*E. coli*中表达后,融合蛋白具有Poly(U)聚合酶活性,同时能以全长TVMV RNA为模板合成RNA。高度保守的GDD基序突变为ADD后,活性仅有野生型的7%(Ilong 1996)。Li(1995)将TEV聚合酶的某些基序改变后,所有的突变体均不能在未转化的烟草原生质体中扩增,但在表达N1b的转基因植物细胞内,除了在430处的Gln被Asp替代的突变之外,均可不同程度地扩增;缺少整个N1b序列的突变体在表达N1b的转基因植株中也可复制。这表明转基因植株中表达的N1b可以提供病毒RNA扩增需要的聚合酶功能。

6K蛋白有疏水氨基酸,与膜紧密相连;它通过与膜结合将N1a锚定到膜上。N1a或者是其VPg结构域共价结合到6K蛋白上,从而到达复制复合体。N1b通过与N1a-Pro相互作用结合到复制复合体上;N1a或者是其VPg结构域共价连接到子代PNA的5'-端磷酸基团上,作为引物起始子代RNA的合成(Li 1997)。

另外,P1对病毒RNA扩增也有作用,可反式促进基因组扩增。HC-Pro、P3也能影响病毒基因组的扩增(Kasschau 1995 Rodriguez-Cerezo 1993)。

4 病毒的运动与传播

大多数病毒在细胞间的运动需要病毒编码的运动蛋白。但马铃薯Y病毒属病毒至今未确定专一的运动蛋白。

有人推测P1可能参与胞间运输,但缺失整个P1编码区的突变体可在细胞间运动,也可在叶片间进行系统运动,说明P1对病毒的运动无影响。CI蛋白形成受马铃薯Y病毒属病毒侵染的植物中都有的风轮状细胞质内含体。有人认为CI蛋白可能参与病毒在细胞间运动。也有人认为CI蛋白在内含体内行使结构功能,

可能修饰细胞骨架使之适合病毒合成与转运。CP的不同结构域分别在细胞间和长距离运输中起作用。TEV CP的中心区是病毒在细胞间运动必需的。其N-端(29个残基)和C-端(18个残基)在细胞表面,是病毒长距离运动必需的(Dolja 1994, 1995)。缺少末端结构域的突变体可以在初侵染位点进行细胞间运输,但不能在维管束中运动。HC-Pro能影响病毒的长距离运输。Cronin(1995)证实TEV HC-Pro中央区域突变后TEV就不能进行长距离运输。

马铃薯Y病毒属病毒主要由蚜虫进行传播,而蚜虫传毒需要CP及HC-Pro的共同参加。CPN-端保守的(I/V)DAG结构域参与蚜虫对病毒的传播。VDAG结构域改变为VDAE后TVMV不能被蚜虫传播(Aureya 1990)。Andrejva等(1996)测定了马铃薯A病毒(PVA)两个非蚜传(NAT)分离物(Ali和Juliniere)和一个蚜传(AT)分离物3'-端的1145个核苷酸的序列,证明只有三肽DAG与蚜传有关。马铃薯Y病毒属病毒CP的中央结构域形成核心亚基结构。N-端免疫优势结构域形成病毒专化性表位,是蚜虫传播需要的。

介体昆虫必须在获毒的同时或者是获得病毒之前获得IIC才能传播病毒。IIC的生物学活性形式可能是二聚体,它介导病毒在蚜虫口针内的选择性定位。至少有两个位点与HC-Pro的蚜传活性有关。一个是N-端高度保守的KITC(Lys-Ile-Thr-Cys)序列。另一个是PTK保守区。HC-Pro可能是作为连接病毒和蚜虫口针的桥梁:一个氨基酸保守区(KITC或PTK)与病毒CP结合,另一个(PTK或KITC)与蚜虫口针中的病毒附着位点(VAS)结合。任何一个氨基酸保守区的突变都会干扰二聚体形成从而会影响HC的蚜传活性(Pirone 1996)。也有人认为HC是通过修饰CP N-端使病毒粒子直接与蚜虫口针相互作用(Saloman 1995)。

5 结语

近年,对马铃薯Y病毒属病毒的基因组结构和功能的了解进一步深入。越来越多病毒的全基因组序列测定出来,由此对其功能进行推断,并可通过转基因植物予以证实。对病毒的复制与表达、病毒的传播机制又

有了更清楚的认识。但仍有许多方面的问题有待深入研究,如基因组的翻译过程、HC与病毒结合的结构域鉴定等等。搞清病毒的生活史将为有效的控制马铃薯Y病毒属病毒的发生与危害提供依据。

参 考 文 献

- [1] Andrejva J, Merits A, Rabenstein F *et al.* Arch Virol, 1996,141(7): 1207~1219.
- [2] Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R *et al.* The Plant Cell, 1995, 7: 549~559.
- [3] Dolja VV, Haldeman R, Robertson N L *et al.* EMBO J, 1995, 13: 1487~1491.
- [4] Dolja V V, Haldeman-Cahill R, Montgoery A E. Virology, 1995, 206(2): 1007~1016.
- [5] Gal-On A, Meiri E, Huet H *et al.* J Gen Virol, 1995, 76(2): 3223~3227.
- [6] Hajmorad M R, Ding X S, Flasiński S. Virology, 1996, 224(2): 368~379.
- [7] Hong Y L, Hunt A G. Virology, 1996, 226: 146~151.
- [8] Huet H, Gal-On A, Meiri E *et al.* J Gen Virol, 1994, 75(6): 1407~1414.
- [9] Kashiwazaki S, Hibino H. J Gen Virol, 1996, 77(4): 581~585.
- [10] Kasschau K D, Carrington J C. Virology, 1995, 209(1): 268~273.
- [11] Li X H, Carrington J C. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 457~61.
- [12] Li X H, Valdez P, Olvera R E. J Virol, 1997, 31(2): 1598~1607.
- [13] Marcost J F, Beachy R N. J Gen Virol, 1997, 78: 1771~1778.
- [14] Pirone T P, Blanc S. Annu Rev Phytopathol, 1996, 34: 227~247.
- [15] Riechmann J L, Lain S, Garcia J A. J Gen Virol, 1992, 73: 1~16.
- [16] Saloman R, Bernardi F. Virology, 1995, 213: 676~679.
- [17] Simón-Buela L, Guo H S, García J A. J Gen Virol, 1997, 78: 2691~2699.
- [18] Soumounou Y, Laliberte J-F. J Gen Virol, 1994, 75(10): 2567~2573.

致 读 者

有欲订1999年及以前本刊的读者,请与编辑部联系。