

猪口蹄疫病毒受体通用亚基 α_v 的基因克隆及序列分析

Cloning and Sequence Analysis of cDNA Encoding Porcine α_v Subunit for FMDV Receptor

独军政, 高闪电, 常惠芸*, 丛国正, 邵军军, 林彤, 才学鹏, 谢庆阁

DU Jun-Zheng, GAO Shan-Dian, CHANG Hui-Yun*, CONG Guo-Zheng, SHAO Jun-Jun, LIN Tong, CAI Xue-Peng and XIE Qing-Ge

中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点开放实验室 国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046

National Foot-and-mouth Disease Reference Laboratory, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

摘 要 病毒受体是病毒宿主范围和组织嗜性的决定因素。研究发现,至少有四种整联蛋白 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_8$ 是口蹄疫病毒(FMDV)的受体,其中 α_v 是 4 种受体的通用亚基。首次从口蹄疫病毒实验感染猪的肺组织中克隆到了通用亚基 α_v 基因并对其核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行了比较分析。猪 α_v 亚基基因的编码区含有 3141 个核苷酸,编码 1046 个氨基酸,其 N-端 30 个氨基酸为信号肽,其后的胞外域、跨膜区、胞浆域分别由 955、29、32 个氨基酸组成,胞外域含有 11 个潜在的糖基化位点(NXT/NXS),2 个 Ca^{2+} 结合位点(DX[D/N]XDGXXD),18 个半胱氨酸残基。猪 α_v 基因与牛、人、猕猴、家鼠、鸡、犬的 α_v 基因的核苷酸序列同源性分别为 93.3%、91.5%、91.4%、85.6%、73.2%、89.9%,推导的氨基酸序列同源性分别为 96.3%、94.6%、94.1%、90.8%、81.6%、93.8%。猪与牛 α_v 亚基同源性最高,表明受体 α_v 亚基可能与口蹄疫病毒的宿主范围有关。

关键词 口蹄疫病毒,病毒受体,猪 α_v 基因,序列分析

中图分类号 S852.659.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1086-05

Abstract Receptors play a crucial role in determining the pathogenesis and tissue tropism of virus. Foot-and-mouth disease virus(FMDV) has been showed to use four integrins, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ and $\alpha_v\beta_8$ as receptors to initiate infection. In this study, the porcine integrin α_v gene was cloned by RT-PCR from the lung tissue of healed pig infected experimently with FMDV, and compared its nucleotide and deduced amino acid sequence with the α_v gene of other animals. The 3141bp cDNA of bovine integrin α_v encodes a polypeptide of 1046 amino acids consisting of a 30-residue putative signal peptide, a 955-residue ectodomain, a 29-residue transmembrane domain, and a 32-residue cytoplasmic domain. The ectodomain contains 11 potential N-linked glycosylation sites(NXT/NXS), 2 calcium binding domains(DX[D/N]XDGXXD) and 18 cysteine residues. The nucleotide sequence similarities of integrin α_v between pig and cattle, human, rheses monkey, house mouse, chicken, dog are 93.3%, 91.5%, 91.4%, 85.6%, 73.2% and 89.9% respectively; and the amino acid sequence similarities are 96.3%, 94.6%, 94.1%, 90.8%, 81.6% and 93.8%, respectively. The α_v gene of cattle and pig exhibited the highest sequence homology. It is possible that host tropism of FMDV may related to divergence in receptors among different species.

Key words FMDV, virus receptor, porcine integrin α_v cDNA, sequence analysis

Received: April 3, 2007; Accepted: May 8, 2007.

This work was supported by the grant from the National Basic Research(973) Program(No.2005CB523201) and the National Key Technology R&D Program(Nos.2006BAD06A03 and 2006BAD06A10).

* Corresponding authors. Tel: +86-931-8342052; E-mail: changhuiyun@126.com

国家重点基础研究发展计划(973)项目(No.2005CB523201)和国家科技支撑计划(No.2006BAD06A03和2006BAD06A10)。

© 2007 中国微生物学研究所(中国微生物学杂志编辑部) http://journals.im.ac.cn

2.2 序列测定

采用 Sanger's 双脱氧末端终止法对阳性克隆进行核苷酸序列测定。结果表明 猪 α_v 亚基基因的编码区含有 3141 个核苷酸, 编码 1046 个氨基酸, 其中信号肽由 30 个氨基酸组成, 胞外域由 955 个氨基酸组成, 跨膜区由 29 个氨基酸组成, 胞浆域由 32 个氨基酸组成; 胞外域含有 11 个潜在的糖基化位点 (NXT/NXS) 2 个 Ca^{2+} 结合位点 (DX [D/N] XDGXXD) 18 个半胱氨酸残基 (图 2)。该基因在 GenBank 中的登录号为 EF474019。

2.3 序列分析

本试验所测猪 α_v 基因与牛、人、猕猴、家鼠、鸡、犬的 α_v 基因的核苷酸序列同源性分别为 93.3%、91.5%、91.4%、85.6%、73.2%、89.9%, 推导的氨基酸序列同源性分别为 96.3%、94.6%、94.1%、90.8%、81.6%、93.8% 猪与牛 α_v 亚基同源性最高。不同物种来源的 α_v 亚基各功能区段的核苷酸与氨

基酸序列同源性有一定差异, 跨膜区和胞浆域的同源性最高, 其次是胞外域, 信号肽序列同源性最低 (表 1)。以 Mega3.1 软件绘制遗传进化树, 发现猪与牛 α_v 亚基的亲缘关系较近 (图 3)。

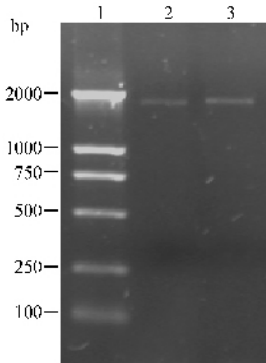


图 1 猪 α_v 亚基基因的 PCR 结果

Fig. 1 PCR results of porcine α_v cDNA
1: PCR products of 5' piece of porcine α_v cDNA;
2: PCR products of 3' piece of porcine α_v cDNA.

表 1 猪和几种动物 α_v 亚基各功能区段的核苷酸和氨基酸同源性比较 %

Table 1 Nucleotide and amino acid similarities of integrin α_v between pig and other animals							
Function region	Cattle	Human	Monkey	Mouse	Chicken	Dog	Average
Mature subunit	93.5	91.6	91.4	86.2	74.1	90.6	87.9
	96.7	95.0	94.6	91.6	82.9	96.8	92.9
Signal peptide	92.2	81.1	80.0	67.8	33.3	ND	70.9
	96.7	80.0	76.7	66.7	26.3	ND	69.3
Ecto-domain	93.6	91.5	91.3	86.0	73.7	90.6	87.8
	96.5	94.8	94.3	91.1	82.2	96.7	92.6
Transmembrane domain	93.1	95.4	95.4	87.4	72.4	86.2	88.3
	100	100	100	100	93.1	96.6	98.3
Cytoplasmic domain	95.8	94.8	93.8	89.6	86.5	92.7	92.2
	100	100	100	100	93.8	100	99.0

Note :The odd lines represent the nucleotide sequence similarity ; the even lines represent the amino acid sequence similarity. ND represents no defined.

3 讨论

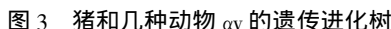
整联蛋白是一类分布广泛的细胞表面受体家族, 该家族成员均是由 α 与 β 两个亚基以非共价键结合形成的异源二聚体跨膜糖蛋白, 具有广泛的生物学活性, 在细胞的生长、迁移、增殖和分化等诸多方面发挥重要作用^[8,9]。目前已知该蛋白家族包括由 18 种不同的 α 亚基和 8 种 β 亚基形成的 24 种 $\alpha\beta$ 复合物, 多数 α 亚基只能与一种 β 亚基结合组成异二聚体, 而 β 亚基大部分则可以结合数种不同的 α 亚基, 在这 24 种整联蛋白 $\alpha\beta$ 复合物中, 有 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_8$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_8\beta_1$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 8 种整联蛋白能够识别 RGD 序列而与其配体相互作用^[10]。这 8 种整联蛋白中包括了 α_v 亚群的全部 5 个成员, 其中仅 $\alpha_v\beta_5$ 不是 FMDV 受体^[11]。近年来, 大量对整联

蛋白与病毒感染关系的研究发现, 许多病毒都能利用整联蛋白分子作为病毒受体或共受体 (co-receptor) 进入宿主细胞, 如柯萨奇病毒 9 型、人肠道孤儿病毒^[12]、人腺病毒^[13]、汉坦病毒^[14]、艾博拉病毒^[15]等均能与整联蛋白结合感染宿主细胞。

FMDV 具有严格的宿主范围, 自然条件下其感染对象是猪、牛、羊及其他家养和野生偶蹄动物^[16]。FMDV 受体的发现均是以人源整联蛋白基因进行受体重建实验的。2000 年, Neff 等首次从牛肺组织中克隆到了牛 α_v 和 β_3 的基因, 二者与人 α_v 和 β_3 的氨基酸序列同源性分别为 98.8% 和 93%。他们分别将编码牛和人 $\alpha_v\beta_3$ 的 cDNA 转染 FMDV 非允许细胞 K562 后, 该细胞对病毒的感染性大大提高, 且牛 $\alpha_v\beta_3$ 介导病毒感染的的能力比人 $\alpha_v\beta_3$ 更强, 这说明 FMDV 的宿主范围在一定程度上与它结合自然宿主

图2 猪 α_V 亚基的核苷酸及其推导的氨基酸序列

The putative signal peptide is marked with the dotted line ; The putative transmembrane domain is indicated by the shading ; potential N-glycosylation sites are underlined ; Cysteine residues are shaded ; Arrows indicate putative cleavage sites ; Calcium binding domains are boxed ; The asterisk indicates the terminal codon.



整联蛋白受体的能力有关^[17]。因此,开展 FMDV 自然宿主的受体研究具有重要意义。我们首次报道了猪 αV 亚基的 cDNA 序列并进行了序列分析。从序列同源性比较与进化树看,口蹄疫自然感染宿主猪与牛 αV 亚基的亲缘关系较近,而与人、猕猴、家鼠、鸡、犬等口蹄疫非易感物种的关系较远。不同物种间 αV 亚基的同源性高低是否与 FMDV 的宿主范围

存在一定的相关性呢?这有待更多实验证明。

FMDV 除了可通过整联蛋白作为病毒受体进入细胞外,还可利用硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)作为受体。近年来,有人提出了 FMDV 存在第三类受体的假设。除 RGD 基序外,人们发现一些 FMDV 可利用其它基序与受体结合,如 Martinez 等发现当 FMDV 的细胞吸附位点 RGD 变为 RGE 后,仍可在细胞中能正常复制;Zhao 等发现当 FMDV 的 RGD 变为 KGE 后,在排除利用 HS 的情况下仍可在培养细胞中生长^[18];另外一些已发现的 FMDV 细胞吸附位点基序有 GGD、TGD、RDD、PGD、KGN、RSG、KGD、IGD 等^[19]。由此可见,存在第三类 FMDV 受体是完全有可能的。已经证实整联蛋白在 FMDV 的感染过程中具有重要地位,至于整联蛋白与其他 FMDV 受体分子如何协调发挥作用决定病毒的宿主范围尚待进一步研究。当然,病毒的宿主嗜性不仅与受体有关,还与病毒本身的特性有关,如 1997 年台湾的 FMD 流行毒对猪的致病力高,但不感染牛,测序发现该毒株的 3A 蛋白缺失 10 个氨基酸,反向遗传学技术证明了这种缺失与病毒对牛的致病力减弱有一定关系^[20]。所以,从病毒和其受体两个方面研究才有可能揭示 FMDV 宿主嗜性差异的原因。截止目前,人们对整联蛋白在 FMDV 与宿主细胞相互作用中的角色做了一些研究,但对于许多问题尚难做出解释,如病毒识别受体的结构基础、病毒感染细胞后的信号转导途径、受体之间的协作关系、受体与病毒宿主嗜性的关系等。因此,开展这一领域的研究,将为 FMDV 感染机制的阐明、病毒感染的预防、抗病毒疫苗以及抗病毒药物的研制等诸多课题奠定基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Norkin LC. Virus receptor : implications for pathogenesis and design of antiviral agents. *Clin Micro Rev*, 1995, **8** (2): 293 – 315.
- [2] Su CJ (苏春霞), Duan XQ (段相国), Wang XQ (王秀青), *et al.* Fusion expression of O type foot-and-mouth disease virus VP1 gene and HSP70 gene and induction of immune responses in mice. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2006, **22** (5): 733 – 736.
- [3] Jackson T, King AM, Stuart D, *et al.* Structure and receptor binding. *Virus Res*, 2003, **91** : 33 – 46.
- [4] Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, *et al.* Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha\beta 3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol*, 1995, **69** :

- 2664 – 2666.
- [5] Jackson T, Sheppard D, Denyer M, *et al.* The epithelial integrin $\alpha\beta 6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, **74** : 4 949 – 4 956.
- [6] Jackson T, Mould A P, Sheppard D, *et al.* Integrin $\alpha\beta 1$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2002, **76** : 935 – 941.
- [7] Jackson T, Clark S, Berryman S, *et al.* Integrin $\alpha\beta 8$ functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus : role of the β -chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol*, 2004, **78** : 4533 – 4540.
- [8] Hynes RO. Integrins : bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, **110** : 673 – 687.
- [9] Moissoglio K, Schwartz MA. Integrin signalling in directed cell migration. *Cell*, 2006, **98** (9): 547 – 555.
- [10] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, **12** : 697 – 715.
- [11] Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Sevilla N, *et al.* Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif : flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol*, 2000, **74** : 1641 – 1647.
- [12] Nelsen-Salz B, Eggers HJ, Zimmermann H. Integrin $\alpha\beta 3$ (vitronectin receptor) is a candidate receptor for the virulent echovirus 9 strain Barty. *J Gen Virol*, 1999, **80** : 2311 – 2313.
- [13] Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA. Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 1993, **73** : 309 – 319.
- [14] Gavrilovskaya IN, Brown EJ, Ginsberg MH, *et al.* Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by $\beta 3$ integrins. *J Virol*, 1999, **73** : 3951 – 3959.
- [15] Takada A, Watanabe S, Ito H, *et al.* Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein : implication for virus entry. *Virology*, 2000, **278** : 20 – 26.
- [16] Thomson GR, Vosloo W, Bastos AD. Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res*, 2003, **91** : 65 – 80.
- [17] Neff S, Mason PW, Baxt B. High-efficiency utilization of the bovine integrin $\alpha\beta 3$ as a receptor for foot-and-mouth disease virus is dependent on the bovine $\beta 3$ subunit. *J Virol*, 2000, **74** : 7298 – 7306.
- [18] Zhao QZ, Pacheco JM, Mason PW. Evaluation of genetically engineered derivatives of a Chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in Animals. *J Virol*, 2003, **77** : 3269 – 3280.
- [19] Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, *et al.* Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2005, **79** : 6487 – 6504.
- [20] Knowles NJ, Davies PR, Henry T, *et al.* Emergence in Asia of foot-and-mouth disease viruses with altered host range : characterization of alterations in the 3A protein. *J Virol*, 2001, **75** : 1551 – 1556.