

# 杆状病毒几丁质酶基因结构与功能的研究进展\*

贾 放 余泽华

(华中师范大学昆虫学研究所 武汉 430079)

**摘要:** 杆状病毒几丁质酶基因是杆状病毒的非必需基因,是高度保守的基因。该基因在杆状病毒复制晚期表达产生几丁质酶,该酶 N 端具信号肽,中部是酶的活性区,C 端是酶的内质网结合区。杆状病毒几丁质酶同时具有内切和外切几丁质酶活性,主要功能是水解昆虫体内的组成型几丁质。杆状病毒几丁质酶对于虫体液化是必需的,同时它还是原组织蛋白酶(pro-V-Cath)的分子伴侣,并与病毒侵染机制相关联。杆状病毒的几丁质酶基因与细菌的几丁质酶基因可能源于共同的祖先。

**关键词:** 杆状病毒,几丁质酶,基因,结构,功能

**中图分类号:** Q939.4      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654(2003)02-0074-04

## RESEARCH ADVANCES ON STRUCTURES AND FUNCTIONS OF BACULOVIRUS CHITINASE GENES

JIA Fang YU Ze-Hua

(Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079)

**Abstract:** The chitinase gene of baculovirus is an unnecessary and high conservative gene. Chitinase is expressed in the late phase virus replication in insect cells. There are signal peptide in its N termini, chitinase's active motifs in its central section and ER-attaching motifs of chitinase in its C termini. Baculoviral chitinase possesses both endo- and exo-chitinase activities, which can hydrolyze inherent chitin in insect's body. Chitinase is necessary for liquefaction of the virus-infected host insect, and it may also serve as a molecular chaperone for pro-V-Cath. Perhaps Baculoviral chitinase has same ancestors with bacterium's chitinase.

**Key words:** Baculovirus, Chitinase, Gene, Structure, Function

几丁质是一类在自然界中储量仅次于纤维素的天然多糖,它广泛存在于原核和真核生物中。并且它也是昆虫内外表皮、呼吸道、肠腔等组织中的主要成分。在微生物中,许多细菌、放线菌、真菌、和病毒能够产生几丁质酶。几丁质酶是一类具有生物催化活性的水解酶,它能特异性的水解几丁质。几丁质酶可分为内切几丁质酶和外切几丁质酶。它们对几丁质的降解及循环利用起着重要作用。

杆状病毒是一类寄生在节肢动物体内的环状双链 DNA 病毒。1995 年, Hatin 在苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcMNPV)中发现了第一个杆状病毒几丁质酶基因,随后在其他昆虫病毒中也相继发现了几丁质酶基因。几丁质酶基因是一个晚期非必需基因,与受染虫体液化有着直接关系。

## 1 杆状病毒几丁质酶的基因结构与蛋白质结构

### 1.1 杆状病毒几丁质酶的基因结构 目前,对苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcMNPV),

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39870039)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39870039)

收稿日期:2002-03-18, 修回日期:2002-04-10

美洲棉铃虫核多角体病毒(HzSNPV), 中国棉铃虫核多角体病毒(HaSNPV), 甜菜夜蛾核多角体病毒(SeMNPV), 甜菜夜蛾核多角体病毒中国株(SeMNPV-CN), 家蚕核多角体病毒(BmNPV), 黄杉毒蛾核多角体病毒(OpMNPV), 美国白蛾核多角体病毒(HcNPV), 舞毒蛾核多角体病毒(LdMNPV), 云杉卷夜蛾核多角体病毒变异株(CfNPV), 斜纹夜蛾核多角体病毒(SINPV), 颗粒体病毒(XcGV), 苹果蠹蛾颗粒体病毒(CpGV)等 13 种杆状病毒几丁质酶基因序列已测定。研究表明杆状病毒几丁质酶基因是一个晚期基因<sup>[1,2]</sup>, 为杆状病毒非必需基因。该基因是一个高度保守的基因, 在不同的核型多角体病毒中同源性较高。在其起始密码子 ATG 上游都有保守的晚期转录启动子(ATAAG)。在 ChiA 附近区域, 许多杆状病毒, 如 AcMNPV、BmNPV、OpMNPV、CfNPV 及 CpGV 等的几丁质酶基因(ChiA)的右侧都与组织蛋白酶基因(V-Cath)相邻。

不同的杆状病毒, 它们的几丁质酶基因有其异同。AcMNPV 的几丁质酶基因位于 105282-106935bp 处, 其开放阅读框(ORF)为 1653bp, 编码分子量为 58kD, 由 551 个氨基酸组成的蛋白质, 此蛋白序列与灵菌(*S. marcescens*)的 ChiA 有 60.5% 的同源性。其晚期启动子 TAAG 位于起始密码子上游 14 个核苷酸处, 此基因与多角体蛋白基因反向<sup>[3]</sup>。HaSNPV 几丁质酶基因的 ORF 长 1713bp, 编码分子量为 60kD, 由 570 个氨基酸组成的蛋白质。在 -29bp 处有保守晚期转录序列 A7AAG, 并且在 -38bp 和 -21bp 处分别有一个 TATA 盒, 在序列的邻近下游没有发现典型 poly(A)信号 AATAAA, 而是在转录终止密码子下游的 143bp 处出现了一个简单的 AATTAAA 序列<sup>[4]</sup>。HcNPV 的几丁质酶基因的 ORF 大小为 1662bp, 编码 553 个氨基酸, 5'、3' 非编码区分别具有 TAAG 基序和 polyA 信号序列<sup>[5]</sup>。HcNPV 的 ChiA 与 AcMNPV、BmNPV<sup>[6]</sup> 的 ChiA, 在 DNA 水平上的同源性分别为 73.5%、75.5%, 在氨基酸水平上的同源性分别为 75.0%、78.7%, 与来自灵菌的 ChiA 比较, 一致性氨基酸达 51%。

**1.2 杆状病毒几丁质酶的蛋白质结构** 几丁质酶蛋白在杆状病毒复制晚期大量表达。几丁质酶家族分为两类: ChiA 和 ChiB, 目前鉴定出的杆状病毒几丁质酶都属于 A 类几丁质酶(ChiA), 它同时具有内切和外切几丁质酶活性。迄今已鉴定的杆状病毒几丁质酶基因编码的几丁质酶蛋白多由 551 ~ 588 个氨基酸残基组成, 定位于内质网上<sup>[7]</sup>。序列比较表明 NPV 之间的几丁质酶同源性较高(53% ~ 94%); 迄今已鉴定的 NPV 类几丁质酶和 CpGV 几丁质酶之间的同源性远远小于 NPV 之间的同源性。杆状病毒几丁质酶与细菌的几丁质酶之间的同源性也较高。

杆状病毒与原核生物的几丁质酶序列具有类似的较为保守的区域分布: I 区, 即 N 末端区, 是原核生物和杆状病毒几丁质酶的信号肽区。N 端信号肽可能通过与内质网的结合而起作用, 有助于几丁质酶进入分泌途径; II 区, 位于序列中部, 是几丁质酶的活性区, 该区具有几丁质酶 18 家族的催化位点, 具有很高的氨基酸同源性, 是起催化作用的区域; III 区, 即 C 末端区, 是杆状病毒几丁质酶的内质网结合区, 含有内质网定位序列(KDEL 序列)。此定位序列可能具有在病毒感染早期起将几丁质酶固定在内质网上的作用, 阻止几丁质酶在感染早期的分泌, 延迟虫体的液化, 从而使多角体产量达到最高值<sup>[1]</sup>。受杆状病毒感染的培养细胞, 其产生的几丁质酶 90% 位于细胞内, 而很少分泌进入培养基<sup>[7,8]</sup>。如果把 KDEL 序列缺失或用甘氨酸替代, 将导致部分几丁质酶释放入细胞外, 促使虫体的液化<sup>[9]</sup>。序列分析还发现, 这些几丁质酶 N 端的同源性明显小于中部和 C 端。

杆状病毒几丁质酶的活性区域序列中,显示出两个高度保守的残基 Asp (aspartate)和 Glu (glutamate)。这些残基对酶活性来说是决定性的,它们构成了许多杆状病毒几丁质酶的活性位点<sup>[10]</sup>。研究显示杆状病毒的 ChiA 的二级结构在进化上具有保守性,与灵菌 ChiA 也有一定的类似性。并且杆状病毒 ChiA 对应位点氨基酸的疏水性、亲水性总体上是相似的。

## 2 杆状病毒几丁质酶的功能

**2.1 促使虫体的液化** 杆状病毒几丁质酶的主要功能是水解昆虫体内的组成型几丁质,促使虫体液化以辅助病毒在宿主幼虫体内增殖后向环境扩散,因此杆状病毒几丁质酶基因的缺失与否直接影响杀虫速度。

研究发现如果破坏 AcMNPV 的几丁质酶,会导致内切和外切几丁质酶活性同时减弱<sup>[3]</sup>,表明同一个杆状病毒几丁质酶同时具有内切和外切的功能。这与其他产生几丁质酶的生物体不同,那些生物是合成一个酶系,外切和内切几丁质酶功能是分开的。利用不同的反应底物能同时检测到内切型几丁质酶(endochitinase)、外切型几丁质酶(exochitinase)的活性,说明杆状病毒几丁质酶的底物范围较宽。Hatin 研究发现,AcMNPV 的几丁质酶在 pH4.0~9.0 范围内都能保持或接近最大酶活性,且在强碱性条件下仍具活性<sup>[3]</sup>。这不同于大部分微生物的几丁质酶的活性范围(在 pH4.0~5.0 间)<sup>[2]</sup>。

几丁质酶基因常和组织蛋白酶(V-Cath)基因在杆状病毒基因组中所处位置比邻,头头相对,并且协同作用,使虫体液化。缺失两个基因中的任意一个,均会导致幼虫死亡后表皮保持完整,虫体不液化。但如果用 V-Cath 和 ChiA 突变体病毒共同感染幼虫,幼虫死亡后液化会恢复。说明受杆状病毒感染后,虫体的液化依赖于 Cath 和 ChiA 基因的完整性<sup>[11]</sup>。

**2.2 可作为原组织蛋白酶(pro-V-Cath)的分子伴侣** V-Cath 是与虫体液化直接相关的酶<sup>[12]</sup>。在被感染的细胞内先是作为无活性的酶原而聚集成 pro-V-Cath,然后通过蛋白水解酶的分解作用而被活化。pro-V-Cath 是一个糖蛋白。如果用缺失几丁质酶基因的病毒感染细胞,只能在受感染细胞的内质网中形成不溶的无活性的 pro-V-Cath 聚集体,并且不能使幼虫液化。因此 ChiA 可能作为分子伴侣在 pro-V-Cath 向有活性的 V-Cath 转化过程中起重要作用。研究表明,几丁质酶的表达对 pro-V-Cath 多肽在内质网上的正确折叠是必需的。ChiA 和 pro-V-Cath 之间的相互作用可能是通过位于 pro-V-Cath 上的 N-连接寡糖来调节的<sup>[13]</sup>。

**2.3 与病毒侵染机制相关联** 在对两株云杉卷叶蛾核多角体病毒的感染特性的研究中发现,一株既能感染细胞(Cf-70)同时也能感染幼虫的病毒,其 DNA 中含有完整的几丁质酶基因。另一株只感染细胞(Cf-70)不感染幼虫的病毒,其 DNA 中缺失了含几丁质酶基因 3.5kb 的片段。通过 mRNA 分析进一步证实前者感染细胞后 12h 就能检测出几丁质酶基因的表达产物,而后者感染细胞 96h 后仍然难检测到几丁质酶基因的产物<sup>[4]</sup>。这说明了儿丁质酶与病毒侵染机制有一定关系。可能是杆状病毒产生的几丁质酶被分泌进入昆虫中肠,破坏了昆虫中肠围食膜的几丁质组分,而将中肠上皮暴露给肠内的病毒,于是大大增加病毒感染昆虫机体的机会,促使病毒从中肠进入幼虫血淋巴<sup>[2]</sup>。

## 3 杆状病毒几丁质酶基因的起源

氨基酸同源性分析表明,杆状病毒几丁质酶与 4 种细菌的几丁质酶(*E. sp.*, *S. ma-*

*reescens* precursor, *S. marcescens*, *E. agglomerans*)之间的同源性较高(50%左右),大于它与其它类原核生物几丁质酶之间的同源性。其中与灵菌(*S. marcescens*)的几丁质酶同源性最高。杆状病毒几丁质酶的氨基酸的一级序列、推测的活性位点、底物识别区域与灵菌几丁质酶相似。在 DNA 水平上,杆状病毒几丁质酶基因与灵菌基因有较严格的保守性,并且在翻译起始位点上游区域,相对于 ATG 同样部位,杆状病毒和细菌几丁质酶基因都具有与杆状病毒晚期基因启动子相似的 TAAAG 基序。这些结果暗示杆状病毒的几丁质酶基因与细菌的几丁质酶基因有更为接近的进化关系,可能源于共同的祖先。

#### 4 结束语

目前几丁质酶在生物防治上的应用越来越广,人们也日益重视对杆状病毒几丁质酶的研究。人们已从多种杆状病毒(HaSNPV, CpGV, AcMNPV 等)中克隆了几丁质酶基因,并把几丁质酶基因与病毒的其它基因连接,构建出重组杆状病毒,提高病毒杀虫效果和杀虫谱。杆状病毒几丁质酶基因还可导入动植物体内,培育出转基因动植物,从而增强动植物对昆虫的抗性。当前有关杆状病毒几丁质酶的研究主要集中于几丁质酶基因的定位、核苷酸序列同源性比较、几丁质酶基因的克隆和含 ChiA 基因的重组杆状病毒构建方面,并取得很大进展。不过仍有必要加强对几丁质酶蛋白的空间结构、理化性质以及分子水平上的作用机理等方面的研究,掌握几丁质酶基因及其蛋白的结构与功能的关系,拓宽其在基因工程中的应用范围,提高其实用性,从而充分发挥杆状病毒几丁质酶的作用和优势。

#### 参考文献

- [1] Hawtin R E, Arnold K, Ayres M D, *et al.* Virology, 1995, 212: 673 ~ 685.
- [2] Hawtin R E, Zarkowska T, Arnold, *et al.* Virology, 1997, 238: 243 ~ 253.
- [3] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, *et al.* Virology, 1994, 202: 586 ~ 605.
- [4] 彭辉银, 李 星, 张双民, 等. 中国病毒学, 1998, 13: 139 ~ 143.
- [5] 贡成良, 小林 淳, 宫岛成寿, 等. 病毒学报, 1999, 15: 260 ~ 269.
- [6] Maeda S. GenBank accession no. L33180, 1996.
- [7] Thomas C J, Brown H L, Hawers C R, *et al.* J virol, 1998, 72: 10207 ~ 10212.
- [8] Shinoda T, Kobayashi J, Matsui M, *et al.* Insect Biochem Mol Biol, 2001, 27, 31(6 ~ 7): 521 ~ 532.
- [9] Saville G P, Thomas C J, Possee R D, *et al.* J Gen Virol, 2002, 83(3): 685 ~ 694.
- [10] Carole J T, Graham W G, Linda A K, *et al.* Journal of General Virology, 2000, 81: 1403 ~ 1411.
- [11] 彭建新, 杆状病毒分子生物学. 武汉: 华中师范大学出版社, 2000. 134 ~ 135.
- [12] Hon L G, Volkman L E. Virology, 2000, 277: 178 ~ 183.
- [13] Slack J M, Kuzio J, Faulkner P. J Gen Virol, 1995, 76: 1091 ~ 1098.

#### · 论文写作要点 ·

#### 摘 要

中英文摘要为报道性文摘,用第三人称书写。本刊要求中文文献控制在 200 字左右,外文摘要不超过 250 个实词。摘要内容简明扼要,客观如实反映自己的工作内容,包括:目的、方法、结果。书写时注意语法一定要正确,符合中英文表达方式,特别是英文摘要最好请英文水平较好的专家审定,以免出现错误。

按照国家标准,摘要应具有独立性和自明性,并拥有与 1 次文献同等量的主要信息,可以说,摘要是一种可以被引用的完整短文。