

# 朊病毒的分子遗传学研究

戴 秀 玉

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

朊病毒(prion)是一种能引起哺乳动物中枢神经系统退行性疾病,即一般称为传染性海绵状脑病(TSE)的病原因子。这些疾病包括人类克雅氏病(Creutzfeldt-Jacob)、致死性家族失眠症、羊瘙痒症和疯牛病等<sup>[1]</sup>。1982年美国科学家 Prusiner 从感染了瘙痒症的叙利亚老鼠脑中分离出具有传染性的蛋白因子,并首先提出朊病毒这一名词,以与病毒、类病毒相区别。朊病毒最显著的特征是不含核酸。现已知道朊病毒(prion protein, PrP)是由宿主染色体基因 PrP 编码的一

种正常细胞蛋白,在非患病个体中以低水平存在。这种蛋白在细胞内质网上合成、高尔基小体中修饰后传递到神经元细胞表面,其正常的生物学功能还不清楚,但小鼠基因破坏试验证明它并不是小鼠生长发育所必需的蛋白<sup>[2]</sup>。根据现有的研究结果认为,朊病毒的传染性是由其蛋白构型所决定的。朊病毒以两种构型存在<sup>[3]</sup>:一种是非传染性的野生型构型,称为

---

1996-03-16收稿

$\text{PrP}^C$ ; 另一种是传染型构型, 称为  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ 。当  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  蛋白分子与  $\text{PrP}^C$  蛋白分子相互作用时,  $\text{PrP}^C$  被催化转变为  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , 见图1所示。所形成的  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  蛋白分子又与新的  $\text{PrP}^C$  蛋白分子发生反应, 进而形成  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  大分子聚集体, 并在中枢神经细胞中堆积、多聚化而形成朊病毒传染病症—瘙痒症相关纤维和淀粉样蛋白斑。

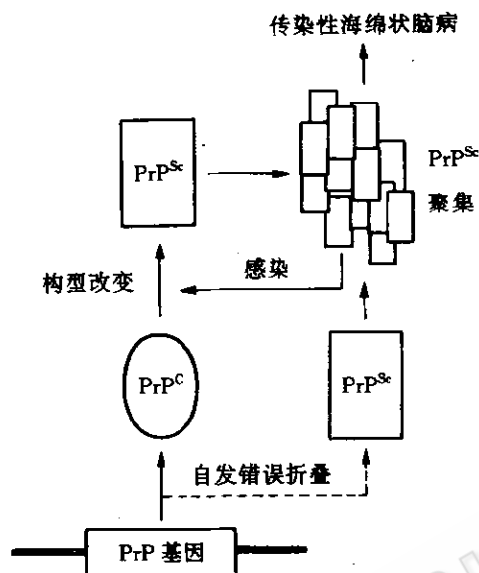


图1  $\text{PrP}$  基因编码正常的  $\text{PrP}^C$ , 由自发错误折叠或受细胞内  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  感染,  $\text{PrP}^C$  蛋白变构成  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , 细胞内  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  间相互作用、聚集, 形成传染的  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  蛋白

## 1 酵母 [URE3] 和 [PSI<sup>+</sup>] 决定因子的遗传特性

朊病毒最初发现和研究都是在哺乳动物体内, 由于哺乳动物神经细胞的体外培养十分困难, 所以对这种造成致死性中枢神经系统疾病分子机制的研究进展缓慢, 更谈不上找到解决问题的对策。

酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是最简单的真核生物。细胞生物学家、遗传学家都喜欢以酵母为模式系统来研究真核生物的普遍规律。但在朊病毒研究上, 情况却恰恰相反。由哺乳动物中观察到的现象启发了酵母遗传学家, 在酵母中也发现了朊病毒的存在, 并以此为材料深化了这一研究。酿酒酵母中 [URE3] 和 [PSI<sup>+</sup>] 这两种因子分别在 25 年前和 30 年前就已被分离鉴别<sup>[4]</sup>。[URE3] 的正常蛋白是 Ure2p, 它是由染色体 URE2 基因编码合成的氮代谢调节蛋白; [PSI<sup>+</sup>] 的正常蛋白是 Sup35P, 它是由染色体 SUP35 基因编码的翻译

终止蛋白亚单位。这两种因子均以显性非孟德尔方式遗传: 当 [PSI<sup>+</sup>][psi<sup>-</sup>] 遗传交配中形成的二倍体及产生的四个孢子均为 [PSI<sup>+</sup>], 经证实这种遗传现象与染色体外遗传因子, 包括线粒体 DNA、2 $\mu$  质粒 DNA 以及双链 RNA 病毒无相关联系。而且根据经典遗传学和现代分子生物学获得的实验数据证明: (1) [PSI<sup>+</sup>] 细胞能以低频率自发形成 [psi<sup>-</sup>] 细胞, 反之亦然; (2) 当把 [PSI<sup>+</sup>] 细胞培养在蛋白变性剂, 如盐酸胍中时, [PSI<sup>+</sup>] 被消除, 回复到 [psi<sup>-</sup>] 状态; (3) URE2 和 SUP35 基因过量表达分别增加 [URE3] 和 [PSI<sup>+</sup>] 的自发出现, 在消除负责编码过量表达的质粒后, 这种状态仍可维持<sup>[5,6]</sup>; (4) [PSI<sup>+</sup>] 和 [URE3] 的传代取决于细胞内是否存在野生型染色体基因 SUP35 和 URE2<sup>[7]</sup>; (5) Sup35P 或 Ure2P 的氨基末端是 [PSI<sup>+</sup>] 或 [URE3] 表型所必需的, 缺失氨基末端的蛋白, 其细胞无法再回到 [PSI<sup>+</sup>] 或 [URE3], 这与 PrP 基因缺失的小鼠不再被传染为海绵状脑病相类似。此外, 对生化实验数据进行分析发现, 酵母与哺乳动物朊病毒蛋白氨基末端序列有两个共同的特征: (1) 这些区域的二级结构显示高度可变性; (2) PrP 和 Sup35P 均在该区域存在短肽重复, 这些短肽重复与发病有关<sup>[8,9]</sup>。哺乳动物朊病毒蛋白  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  能够形成大分子凝聚物及抗蛋白酶的特性, 在酵母中也已观察到。酵母中 [PSI<sup>+</sup>] 或 [URE3] 细胞形成 Sup35P 或 Ure2P 的蛋白大分子凝聚物, 从而失去转录终止功能或抗蛋白酶 K。因此, [URE3] 和 [PSI<sup>+</sup>] 显性非孟德尔遗传方式及上述遗传学、生物化学两方面的证据都支持 [URE3] 和 [PSI<sup>+</sup>] 是朊病毒的假说, Ure2P 和 Sup35P 被认为是朊病毒的决定因子<sup>[10]</sup>。

## 2 热休克蛋白对酵母朊病毒的形成及消除的作用

从哺乳动物的朊病毒研究得知,  $\text{PrP}^C$  和  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  具有相同的氨基酸序列和翻译后修饰, 但结构却截然不同。进一步分析证明  $\text{PrP}^C$  含有约 40%  $\alpha$ -螺旋结构且几乎不含  $\beta$ -折叠结构; 而  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  则富含  $\beta$ -折叠结构。因此人们推测  $\text{PrP}^C$  向  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  转变时需要热休克蛋白 (heat shock protein) 以帮助其折叠成特定的蛋白构型, 这种推测在酵母中得到证实。与哺乳动物中的情况类似, 酵母细胞中的 Hsp104P 通过对 Sup35P 行使热休克蛋白功能, 引导其折叠成特定的空间构型, 并使这种构型的分子间相互凝聚形成大分子的蛋白凝聚物, 进而产

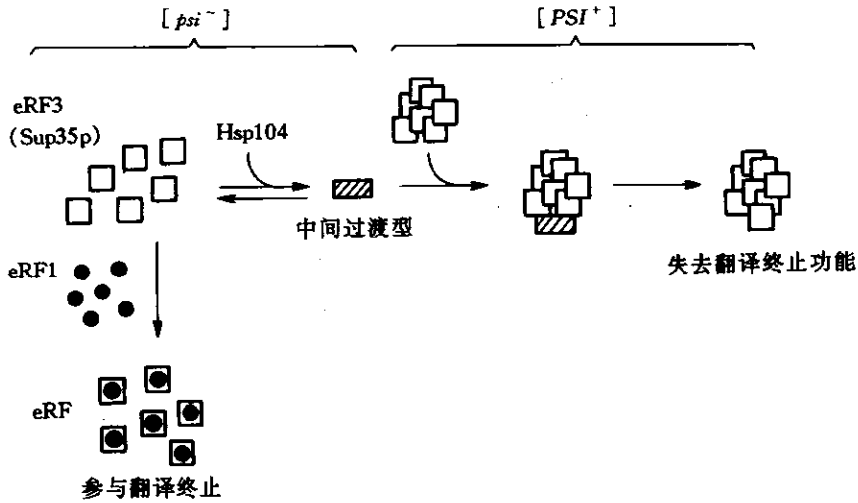


图2 Hsp104对[PSI<sup>+</sup>]形成的作用。当HSP104遇到新合成的Sup35P分子时,形成中间过渡型蛋白;这种蛋白捕获预先存在的Sup35P产生多聚化的朊病毒大分子;胞内没有Sup35P,中间型蛋白不稳定,回复到自然的[psi<sup>-</sup>],参与翻译终止作用

生朊病毒的[PSI<sup>+</sup>]表型(图2),且[PSI<sup>+</sup>]表型持久不变,能够遗传。Chernoff等<sup>[11]</sup>构建了含有编码热休克蛋白Hsp104P的HSP104基因的质粒,并使HSP104编码序列置于可诱导的启动子控制之下。将该质粒引入[PSI<sup>+</sup>]细胞,由诱导物的存在与否决定[PSI<sup>+</sup>]的消除,该实验证明HSP104基因过量表达引起[PSI<sup>+</sup>]的消除。Hsp104P是细胞在经受高温、高浓度酒精等不良环境时合成的一种热休克蛋白,其功能是促使蛋白恢复构型及活性,帮助细胞存活,但Hsp104P并不能阻止高温等引起的蛋白变性。还必须指出的是,Hsp104P消除[PSI<sup>+</sup>]的效率比蛋白变性剂盐酸胍要低得多。因为在逆境条件下,细胞不仅诱导合成Hsp104P,也诱导合成全部热休克蛋白及其它一系列分子,包括海藻糖等。虽然就消除[PSI<sup>+</sup>]而言,盐酸胍更具选择性,但是酵母中热休克蛋白对朊病毒的形成、维持和消除都起着直接和重要的作用。

对酵母这两种朊病毒类因子的研究使我们了解到由蛋白构型的改变产生了特有的表型改变,如[URE3]能够解除氮阻遏,使细胞能自主合成尿嘧啶前体,表现为在无尿嘧啶的培养基上生长;[PSI<sup>+</sup>]则使Sup35P蛋白丧失终止翻译的功能等。蛋白构型的改变不仅引起表型改变,而且这些表型还能代传,这有着重要的

生物学意义。对酵母朊病毒的分子遗传学研究所获得的结果更加说明酵母是研究该因子的发生、形成和传染的分子机理的理想材料,利用这一模式系统开展研究将为预防和治疗具有医学和农业重要意义的传染性海绵状脑病提供有效的途径。

### 参 考 文 献

- [1] Prusiner S B. *Annu Rev Microbiol*, 1994, 48: 655-686.
- [2] Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, *et al.* *Cell*, 1993 73: 1339-1347.
- [3] Prusiner S. B. *Science*, 1994, 264: 530-531.
- [4] Wickner R B. *Science*, 1994, 264: 566-569.
- [5] Doel S M, McCreedy S J, Nierras C R, *et al.* *Genetics*, 1994, 137: 1659-1670.
- [6] Ter-Avanesyan M D, Dagkesamanskaya A R, Kushnirov V V, *et al.* *Genetics*, 1994, 137: 671-676.
- [7] Masison D C, Wickner R B. *Science*, 1995, 270: 93-95.
- [8] Paushkin S V, Kushnirov V V, Smirnov V N, *et al.* *EMBO J*, 1996, 15: 3127-3134.
- [9] Patino M M, Liu J J, Glover J R, *et al.* *Science*, 1996, 273: 622-626.
- [10] Weissmann C. *Science*, 1994, 264: 528.
- [11] Chernoff Y O, Lindquist S L, Ono Bun-ichiro, *et al.* *Science*, 1995, 268: 880.