

猪瘟病毒囊膜糖蛋白 E0 的 RNA 酶活性及其研究进展

王 宁 付烈振 张楚瑜

(武汉大学生科院病毒系 武汉 430072)

关键词 猪瘟病毒, 蛋白

分类号 Q939.4

猪瘟病毒(CSFV, classical swine fever virus)属于黄病毒科瘟病毒属, 同属的成员还有牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和羊的边界病病毒(BDV)。猪瘟病毒是一种有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组大小约 12.3kb, 含有一个大的 ORF, 此 ORF 编码一个大的多聚蛋白, 经宿主和病毒编码蛋白酶的共同作用, 在共同翻译中和/或翻译后, 将此多聚蛋白加工成病毒的结构蛋白和非结构蛋白。猪瘟病毒基因组的 5' 端编码病毒结构蛋白, 即衣壳蛋白(C)和三个囊膜糖蛋白(E0, E1, E2)。其中 E0 和 E2 能够刺激机体产生中和抗体, 并使猪获得免疫力^[1,2]。意外发现 E0 是一个强的 RNA 酶^[3], 引起人们的浓厚兴趣, 猪瘟病毒是如何避免对其自身 RNA 的降解呢? 作为结构蛋白的 E0, 它的 RNA 酶活性有什么生物学功能呢? 这一发现不仅有助于人类对哺乳动物病毒致病机理的认识, 而且有可能为猪瘟的治疗和防制和抗病育种^[4]开辟新的途径。

1 E0 的结构

E0 以同源二聚体的形式存在于猪瘟病毒感染细胞和病毒粒子中, 其分子量为 97KD。其相应单体由 227 氨基酸组成, 分子量为 44 / 48KD, 其中糖占分子量的一半。E0 无跨膜结构, 它与病毒囊膜的结合方式还不太清楚。猪瘟病毒感染细胞能大量分泌 E0, 因此可在病毒培养上清液及猪瘟感染猪的组织 and 血清中检测到 E0 的存在。核酸序列比较分析表明, E0 是猪瘟病毒的一个比较保守的蛋白, 但目前制备的 E0 单克隆抗体尚未检测到一个猪瘟病毒 E0 的共同抗原决定簇, 也未发现与其它瘟病毒有共同抗原决定簇^[5,6]。这一结果提示 E0 暴露于囊膜外的部分为其易变区。

氨基酸序列比较分析表明, E0 存在真菌和植物的 RNA 酶特征序列, E0 在两个区域与细胞外 RNA 酶如硫

胺素曲霉 T₂ RNA 酶, 雪白根霉 Rh RNA 酶及植物自我不适应型 RNA 酶如翅形烟草的 S-糖蛋白, 均具有很高的同源性。这两个区域虽很短, 分别由 8 个和 9 个氨基酸组成, 但它们构成这些 RNA 酶的活性区。其中位于 30 和 79 位的 H₅s 高度保守, 它们是 RNA 酶催化活性所必需的。Schneider 等^[3]1993 年采用亲和层析的方法自猪瘟病毒感染的淋巴瘤细胞系中获得纯化的猪瘟病毒囊膜糖蛋白 E0, 试验发现 E0 能降解酵母细胞总 RNA、大肠杆菌核糖体 RNA、tRNA 及 poly(rU), 证实了 E0 具有 RNA 酶活性。其比活性为 353A₂₆₀ units min⁻¹ mg⁻¹, 正好在真菌和植物 RNA 酶比活性范围之内 (170—3900 A₂₆₀ units min⁻¹ mg⁻¹)。Hulst 等^[7]1994 年把 E0 基因插入杆状病毒 p10 区, 构建了重组杆状病毒 BacCE0, 在昆虫细胞 Sf21 中表达 E0, 经亲和层析纯化获得 E0。重组病毒 BacCE0 表达的 E0 与病毒自身的 E0 大小相似, 而且重组表达产生的 E0 同样具有 RNA 酶活性, 其比活性为 525A₂₆₀ units min⁻¹ mg⁻¹, 与 Schneider 等所测的 E0 比活性相当。

2 E0 的 RNA 酶活性^[3,7,8]

E0 是一个非常独特 RNA 酶。E0 具有高的热稳定性, 50℃ 至 60℃ 为其最适温度, 65℃ 仍保持最大酶活性的 75%, 而在 37℃ 时 E0 的酶活性为最大酶活性的 86%。其最适 pH 为 6.0 至 6.5, 与其它 RNA 酶相似, E0 嗜弱酸性环境, pH 由 3.5 升至 4.5, 其酶活性可由最大酶活性 25% 升至 90%, 继续提高 pH 则酶活性升高速度减慢。E0 的 RNA 酶活性不受 Ca²⁺、Mg²⁺、EDTA、RNasin 的影响, 高浓度的 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 对 E0 的 RNA 酶活性仅有弱的抑制作用, Mn²⁺ 和 Zn²⁺ 为其强的抑制剂,

137 $\mu\text{mol/L}$ 的 Mn^{2+} 或16.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Zn^{2+} 都可使E0的RNA酶活性下降50%。E0对富含尿嘧啶核糖核苷酸有很高的底物专一性,它可以降解poly(rU)和poly(rGU),相对酶活性分别为1700和260。不降解poly(rA)和poly(rG)。双链的形成阻碍E0对poly(rU)的水解,其影响程度与碱基对稳定性一致,在双链poly(rA)-poly(rU)中poly(rU)的降解下降90%,而在poly(rG)-poly(rU)中poly(rU)降解仅下降76%。它不降解poly(rG)-poly(rC),也不降解单链和双链DNA,这与核酸酶SN不同^[4]。

E0虽以同源二聚体的形式存在,但与其它许多类似结构的酶性质不同,其酶活性不依赖于由分子间二硫键所形成的同源二聚体结构,用二硫苏糖醇(DL-DTT)和巯基乙醇(2-ME)处理E0后,E0仍保持其RNA酶活性。将E0先用DTT处理后,再用0mol/L至2mol/L的NaCl处理E0,结果发现无论低浓度还是高浓度的NaCl对E0的RNA酶活性均无影响,这些说明E0的二聚体并不是其酶活性所必须的,E0能在较宽盐浓度范围内保持其酶活性,表明E0的三级结构非常牢固。糖占E0分子量的一半,但用内切糖苷酶H处理E0后,E0仍保持酶活性,说明E0的糖基也非其RNA酶活性所必须,这也是其独特性质之一。此外,E0的RNA酶活性作用机理似乎与其它RNA酶作用机理不同。

试验证明,E0可以降解猪瘟病毒自身的RNA,将提纯的猪瘟病毒RNA与E0共同孵育一段时间,然后做Northern blot,结果可见随E0量的增加,猪瘟病毒RNA的降解也随之增加,4ng的E0就可将约0.5 μg 猪瘟病毒RNA完全降解^[6]。猪瘟病毒是如何避免E0对其自身RNA的降解呢?目前认为猪瘟病毒是通过使病毒RNA与E0隔离,从而避免E0对自身RNA的降解^[3,7,8]。猪瘟病毒经囊膜与细胞膜融合或受体介导的内吞作用进入细胞,在这两种情况下,E0与病毒RNA均可以是隔离的;新合成E0由于内部信号肽的作用而局限位于内质网或高尔基体腔内,E0与病毒RNA也是隔离的。

3 E0的功能

E0是猪瘟病毒的一个重要蛋白,这表现在(1)E0是瘟病毒属病毒的一个很保守的蛋白。(2)E0能刺激机体产生中和抗体,并获得对猪瘟的免疫力。(3)E0在

长期进化中仍保持其固有的RNA酶活性。通过对E0的中和单克隆抗体和非中和单克隆抗体对E0的RNA酶活性影响的比较研究发现^[8],虽然并非完全一致,但绝大多数(5/6)的E0中和单克隆抗体能抑制其RNA酶活性,而非中和单克隆抗体则不能,这一结果揭示猪瘟病毒E0的RNA酶活性在猪瘟病毒的生命周期中发挥着重要作用。RNA酶与许多重要生物过程有关,如器官发生、癌症(肿瘤)、免疫调节、细胞毒性作用等。E0具有强RNA酶活性,且有高度底物特异性等性质,提示E0并不是非特异性降解宿主RNA。人们推测E0的RNA酶活性可能涉及细胞RNA特异性降解,介导细胞毒性作用,或细胞程序性死亡。E0可从感染细胞中大量分泌,因此E0可能对远位非感染细胞发生作用。

E0的RNA酶学性质已有了较深入的研究,但是E0的RNA酶活性在病毒繁殖和致病中的作用尚未阐明,这阻碍人类对其RNA酶活性的利用。上述问题的解决依赖于E0基因定点突变株的建立。目前已有猪瘟病毒感染性全基因组cDNA克隆构建成功的报道^[9,10],因此建立E0基因突变株已为时不远。

参 考 文 献

- [1] König M, Lengsfeld T, Pauly T *et al.* J Virol, 1995,69(10):6470~6486.
- [2] Pauly T, Elbers K, König M *et al.* J Gen Virol, 1995,76:3039~3049.
- [3] Schneider R, Unger G, Stark R *et al.* Science, 1993,261:1169~1171.
- [4] 刘玉乐,叶 寅,魏征宇等,微生物学通报,1992,19(4):200~203.
- [5] Weiland E, Ahl R, Stark R *et al.* J Virol,1992,66(6):3677~3682.
- [6] Kosmidou A, Ahl R, Thiel H J *et al.* Vet Microbiol, 1995,47:111~118.
- [7] Hulst M M, Himes G, Newbigin E *et al.* Virology, 1994,200:558~565.
- [8] Windisch J M, Schneider R, Stark R *et al.* J Virol, 1996,70(1):352~358.
- [9] Moormann R J M, van Gennip H G, Miedemu G K *et al.* J Virol,1996,70(1):763~770.
- [10] Ruggli N, Tratschin J, Mittelhoizer C *et al.* J Virol, 1996,70(6):3478~3487.