



专论与综述

附属蛋白：冠状病毒不容忽视的一类蛋白

司伏生^{Δ1,2} 姜黎^{Δ3} 于瑞嵩^{1,2} 董世娟^{1,2} 谢春芳^{1,2} 陈冰清^{1,2} 李震^{*1,2}

1 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106

2 上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201106

3 中国科学院华南植物园 广东 广州 510650

摘要：冠状病毒(Coronaviruses, CoVs)是基因组最大的一类单股正链RNA病毒，多数可以跨物种传播并感染人类，是当前引起重大公共卫生事件、严重威胁人类健康的病原之一。病毒基因组全长约25–31 kb，编码多个非结构蛋白、结构蛋白(S、E、M、N)及附属蛋白。对于大多数冠状病毒来说，附属蛋白虽然是病毒复制的非必需蛋白，但往往在病毒的致病过程中发挥重要作用，是冠状病毒重要的功能蛋白。该类蛋白位于病毒基因组的3'端，由位于基因起始位置的转录调控序列(Transcription Regulating Sequence, TRS)调控其mRNA的转录，而且蛋白编码序列的密码子使用偏爱性对蛋白翻译也产生重要影响。附属蛋白具有跨膜蛋白的属性和独特的蛋白转运基序，后者对该类蛋白跨膜区的形成、拓扑学结构及蛋白的细胞内运输过程起决定性的作用，从而直接影响附属蛋白的功能。本文首先总结了冠状病毒最新的分类及基因组结构；然后从附属蛋白的种类、功能、蛋白转运基序、拓扑学结构及密码子使用偏爱性等方面系统概述了相关研究进展，并对下一步的研究方向进行了展望，为更加全面地认识冠状病毒附属蛋白的生物学特性提供重要参考。

关键词：冠状病毒，附属蛋白，细胞内转运，拓扑学，密码子使用偏爱性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (32072838); 2021 Special Project of Shanghai Academy of Agricultural Sciences on Agricultural Science and Technology Innovation Supporting Field-Applied Fundamental Research Project; National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500101); Shanghai Key Project on Agricultural Development (2020-02-08-00-12-F01478)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

Received: 25-01-2021; Accepted: 20-02-2021; Published online: 26-03-2021

基金项目：国家自然科学基金(32072838)；上海市农业科学院2021年度农业科技创新支撑领域研究专项-应用基础研究项目；国家重点研发计划(2016YFD0500101)；上海市科技兴农项目(2020-02-08-00-12-F01478)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 021-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

收稿日期: 2021-01-25; 接受日期: 2021-02-20; 网络首发日期: 2021-03-26

Accessory proteins: a type of protein that cannot be neglected in coronaviruses

SI Fusheng^{Δ1,2} JIANG Li^{Δ3} YU Ruisong^{1,2} DONG Shijuan^{1,2} XIE Chunfang^{1,2}
CHEN Bingqing^{1,2} LI Zhen^{*1,2}

1 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

2 Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

3 South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China

Abstract: Coronaviruses (CoVs) are a group of positive-sense, single-stranded RNA viruses with the largest genome, most of which can spread across species and infect humans. Some of the pathogens in the group are causing major public health problems and seriously threatening human health. The full-length genome of the viruses is about 25–31 kb in length, encoding multiple nonstructural, structural proteins (S, E, M, and N) and accessory proteins. For most coronaviruses, their accessory proteins are not indispensable for viral replication, but they are often involved in pathogenesis in hosts and act as functional proteins. These accessory protein genes are located at the 3' end of the viral genomes. Expression of these genes can be regulated at transcription level by the transcription regulating sequence (TRS) which locates at the beginning of the genes or at translation level by the codon usage bias of the protein-coding sequences. The accessory proteins belong to trans-membrane protein and carry unique protein transport motifs. These characters play decisive role for the formation of unique topological structures and intracellular transport of the proteins, thus directly affect their functions. A summary of the latest classification and genome structure of coronaviruses was made in the beginning of the article; then roles, categorization, protein transport motifs, topological structures and codon usage bias of the accessory proteins were discussed individually and prospects of research in the field were foreseen as well, aiming to help understand the biological characteristics of this category of proteins.

Keywords: coronaviruses, accessory proteins, cellular transport, topology, codon usage bias

冠状病毒(Coronaviruses, CoVs)是 20 世纪 30 年代首次被发现的一类有囊膜的单股正链 RNA 病毒^[1-2]。CoVs 广泛存在于自然界中, 主要感染哺乳动物和鸟类, 并存在跨种传播的风险, 是对人类和动物构成重大健康威胁的一类病原。在不到 20 年的时间里先后出现了 3 种与 CoVs 感染相关的人类致命疾病: 2002 年的严重急性呼吸综合征(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)、2012 年的中东呼吸综合征(Middle East Respiratory Syndrome, MERS)和 2019 年的新型冠状病毒肺炎(Coronavirus Disease 2019, COVID-19)。这 3 种疾病分别由人畜共患性的冠状病毒——严重急性呼吸综合征冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(Middle

East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV)和严重急性呼吸综合征冠状病毒-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起^[3]。

冠状病毒基因组除了编码结构蛋白和非结构蛋白外, 还编码一些亚群特异性的附属蛋白(Accessory Proteins)。这些附属蛋白在不同冠状病毒亚群中的数量、位置和大小各不相同。随着人们对冠状病毒的重视程度不断加强, 近年来有关其附属蛋白的研究也取得了一些进展, 但还有不少领域尚未被揭示, 甚至来自不同国家和地区的研究人员对同一种冠状病毒附属蛋白功能的研究结果还存在相互矛盾的地方, 因此, 只有更加全面地了解附属蛋白的生物学特性, 才能更进一步地阐明冠状病毒的传播规律和致病机制。

基于目前相关的研究进展, 本文针对冠状病毒最新的种类划分、基因组结构、附属蛋白的种类及功能、拓扑学结构及密码子使用偏爱性等方面的研究进展进行了详细的介绍和概括, 以期对相关研究提供参考。

1 冠状病毒的分类

冠状病毒属于套式病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus), 是一类具有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 广泛存在于自然界中^[2]。病毒粒子是一个平均直径约 100 nm 的球形颗粒, 包被在一个双层膜中, 称为囊膜。棘突蛋白(Spike Protein, S)、膜蛋白(Membrane Protein, M)、包膜蛋白(Envelope Protein, E)和核衣壳蛋白(Nucleocapsid Protein, N)构成病毒粒子的主要结构, 其中 S 蛋白末端插入囊膜中, N 蛋白与基因组 RNA 构成核糖核蛋白(Ribonucleoprotein, RNP)位于病毒粒子内部^[4](图 1)。

冠状病毒可感染包括人类在内的多种哺乳动物和鸟类, 引起急慢性呼吸道疾病和消化系统疾病^[4]。根据高度保守的 ORF1ab 编码区和血清学特点, 冠状病毒可分为 4 个属: α 、 β 、 γ 和 δ 冠状病毒^[5]。 α 和 β 冠状病毒主要感染哺乳动物, 而 γ 和 δ 冠状病毒主要感染鸟类^[6](图 2)。根据属内遗传距

离, α 冠状病毒可分为 2 个亚群(α -1 亚群和 α -2 亚群)^[7]: α -1 亚群包括犬冠状病毒(Canine Coronavirus, CCoV)、猫冠状病毒(Feline Coronavirus, FCoV)、猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible Gastroenteritis Virus, TGEV)和猪呼吸道冠状病毒(Porcine Respiratory Coronavirus, PRCV)等; α -2 亚群包括菊头蝙蝠冠状病毒 HKU2 (Rhinolophus Bat Coronavirus HKU2, Rh-BatCoV HKU2)、水貂冠状病毒(Mink Coronavirus, MCoV)、人冠状病毒 229E (Human Coronavirus 229E, HCoV-229E)、人冠状病毒 NL63 (Human Coronavirus NL63, HCoV-NL63)和猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)等。 β 冠状病毒的基因组最长, 可分为 4 个亚群(A、B、C 和 D 亚群)^[8-9]。其中人冠状病毒 HKU1 (Human Coronavirus HKU1, HCoV-HKU1)、人冠状病毒 OC43 (Human Coronavirus OC43, HCoV-OC43)、猪血凝性脑脊髓炎病毒(Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis, PHEV)、鼠肝炎病毒(Mouse Hepatitis Virus, MHV)和牛冠状病毒(Bovine Coronavirus, BCoV)等属于 A 亚群; SARS-CoV、SARS-CoV-2 和菊头蝙蝠冠状病毒 HKU3 (Rhinolophus Bat Coronavirus HKU3, Rh-BatCoV HKU3)等属于 B 亚群;

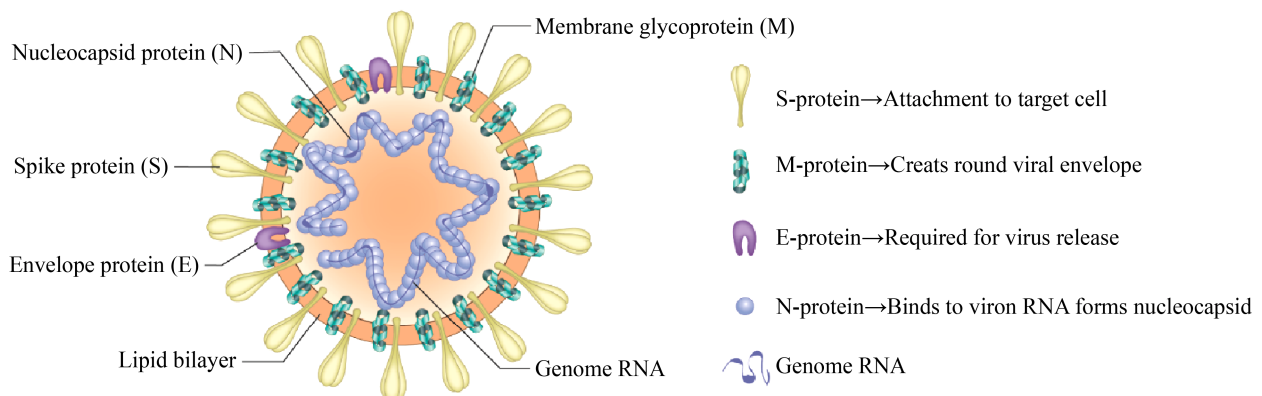
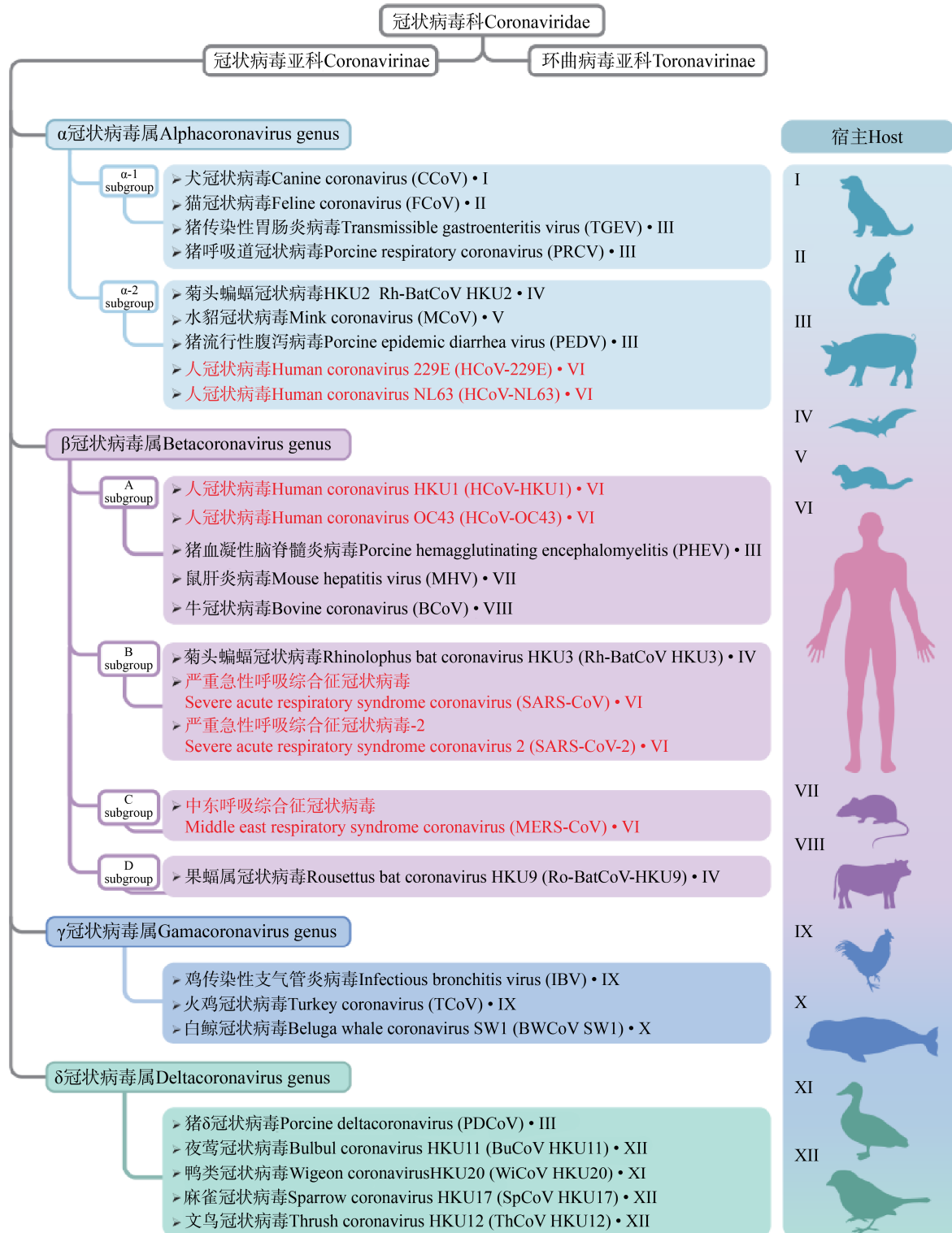


图 1 冠状病毒粒子结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of coronavirus structure

注: S: 棘突蛋白; M: 膜蛋白; E: 包膜蛋白; N: 核衣壳蛋白

Note: S: Spike protein; M: Membrane glycoprotein; E: Envelope protein; N: Nucleocapsid protein



宿主 Host

I

II

III

IV

V

VI

VII

VIII

IX

X

XI

XII

图 2 冠状病毒的分类、代表性毒株与主要宿主

Figure 2 Classification, representative strains and the main host of coronaviruses

注：拉丁文数字(I–XII)代表对应的宿主动物

Note: The Latin numbers (I–XII) represent the corresponding host animals

MERS-CoV 属于 C 亚群; D 亚群有果蝠属冠状病毒 HKU9 (Rousettus Bat Coronavirus HKU9, Ro-BatCoV-HKU9)。 γ 冠状病毒主要指的是鸡和火鸡的冠状病毒, 如鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious Bronchitis Virus, IBV) 和火鸡冠状病毒 (Turkey Coronavirus, TCoV), 它们分别引起鸡和火鸡的传染性支气管炎和腹泻^[10]。此外, γ 冠状病毒还有白鲸冠状病毒 SW1 (Beluga Whale Coronavirus SW1, BWCoV SW1)。 δ 冠状病毒的基因组最短, 主要包括猪 δ 冠状病毒 (Porcine Deltacoronavirus, PDCoV)、夜莺冠状病毒 HKU11 (Bulbul Coronavirus HKU11, BuCoV HKU11)、鸭类冠状病毒 HKU20 (Wigeon Coronavirus HKU20, WiCoV HKU20)、麻雀冠状病毒 HKU17 (Sparrow Coronavirus HKU17, SpCoV HKU17) 和文鸟冠状病毒 HKU13 (Thrush Coronavirus HKU13, ThCoV HKU13)。上述病毒中感染人的冠状病毒有 7 种(图 2), 分别是: HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 以及当前全球流行的 SARS-CoV-2^[7], 这些病毒都是 α 或 β 冠状病毒。

2 冠状病毒的基因组结构和转录调控序列

冠状病毒的基因组是一个长约 25–31 kb 的单股正链 RNA 基因组, 包含一个 5' 端帽子结构和一个 3' 多聚 Poly(A) 尾。编码冠状病毒非结构蛋白 (Nsp) 的复制酶基因 (*ORF1a*、*ORF1ab*) 占据了基因组全长的 2/3, 约 20 kb, 剩余 10 kb 左右的基因编码 4 种主要的结构蛋白 (S、E、M 和 N) 和数量不等的附属蛋白, 它们大部分都位于病毒基因组的 3' 端, 其中 S 蛋白和 M 蛋白是病毒囊膜的主要蛋白成分(图 1)。S 蛋白 (150 kD 左右) 是一个跨膜糖蛋白, 一些冠状病毒的 S 蛋白具有蛋白酶依赖特性, 在病毒成功感染细胞之前需要先被宿主细胞或环境中的多种蛋白酶, 如弗林蛋白酶、胰蛋白酶、组织蛋白酶、跨膜丝氨酸蛋白酶或人呼吸道胰蛋白酶样蛋白酶等切割成 2 个独立的亚基 (Subunit) S1 和 S2^[11-12]。S1 亚基负责和细胞受体

结合, S2 亚基介导病毒和细胞的膜融合^[13-14]。最近有研究表明 S2 亚基是决定 S 蛋白胰蛋白酶依赖特性的关键区域^[15]。M 蛋白 (25–30 kD) 在病毒粒子装配中发挥重要作用, 其含有 3 个跨膜结构域^[16-17], 也是病毒囊膜中含量最丰富的结构蛋白。E 蛋白 (8–12 kD) 也是一个跨膜蛋白, 基因序列变异较大。该蛋白具有离子通道活性, 参与病毒粒子的包装和释放^[18-19]。N 蛋白 (43–58 kD) 是唯一存在于核衣壳中的病毒蛋白, 具有拮抗 I 型干扰素的功能, 并参与病毒的包装和出芽过程^[20-22]。此外, N 蛋白还由 2 个独立的结构域组成, 即 N 末端结构域 (N-Terminal Domain, NTD) 和 C 末端结构域 (C-Terminal Domain, CTD), 这 2 个结构域都能在体外结合 RNA, 从而保护 RNA 不被破坏。通常情况下 N 蛋白通过非共价键将病毒 RNA 包裹起来形成核衣壳。此外, β 冠状病毒属的一些亚群 (Group A) 基因组还编码另外一种蛋白——血凝素酯酶 (Hemagglutinin-Esterase, HE), 该蛋白编码区位于 *ORF1b* 和 *S* 基因之间, 具有乙酰酯酶活性^[23], 能与细胞表面的血凝素受体结合, 并与 S 蛋白共同作用, 以实现功能平衡和最佳的病毒粒子亲和力^[24]。

每个结构基因或附属基因的起始位置是该基因的转录调控序列 (Transcription Regulating Sequence, TRS)。已知冠状病毒的 mRNAs 通过不连续转录机制产生, 这一过程受到 TRS 的调控, TRS 包含一个高度保守的核心序列 (Core Sequence, CS), 与病毒基因组中的序列和前导序列的 3' 端相似性较高。研究表明, 各种属冠状病毒的 TRS 序列大部分是相同的, 如: α 冠状病毒属的转录调控序列为 CUA AAC^[9,25]; β 冠状病毒属的 4 个亚群中 A 亚群的 TRS 是 CUA AAC, 其余亚群病毒的 TRS 为 ACG AAC^[9]; γ 冠状病毒属的 TRS 为 CUUA ACAA, δ 冠状病毒属的 TRS 为 ACACCA^[9,25]。在长期遗传进化过程中, 有些属内病毒的 TRS 也可能引入特定突变^[25]。如 α 属

HCoV-NL63 的 TRS 为 CUMAAC (M 为 A 或 C)。此外,一些种属的 TRS 与其本属的 TRS 不一致,反而与其他种属的 TRS 相近。例如, β 属 HCoV-OC43 的 TRS 是 UYYAAAC, 其与 β 冠状病毒属 ACGAAC 差别较大,更类似于 α 冠状病毒属的 TRS (CUAAAC)^[25]。

3 冠状病毒编码的附属蛋白种类和功能

不同种属的冠状病毒编码数量不等的附属蛋白,即使处在同一种属的不同病毒之间,其附属蛋白的数量也各不相同(图 3),并且功能各异。根

据目前的研究报道,冠状病毒附属蛋白主要在 5 个方面发挥作用(表 1)。

(1) 能整合进病毒粒子中,发挥结构蛋白的作用。这种作用主要存在于 α 、 β 和 δ 冠状病毒属的部分附属蛋白中。如在 α 冠状病毒属中 HCoV-NL63 的附属蛋白 ORF3 在细胞内主要定位在内质网-高尔基中间体(ER-Golgi Intermediate Compartment, ERGIC)中,通过蔗糖密度梯度离心后发现该附属蛋白和 HCoV-NL63 的其他结构蛋白(M 蛋白和 N 蛋白)共同出现在纯化的病毒粒

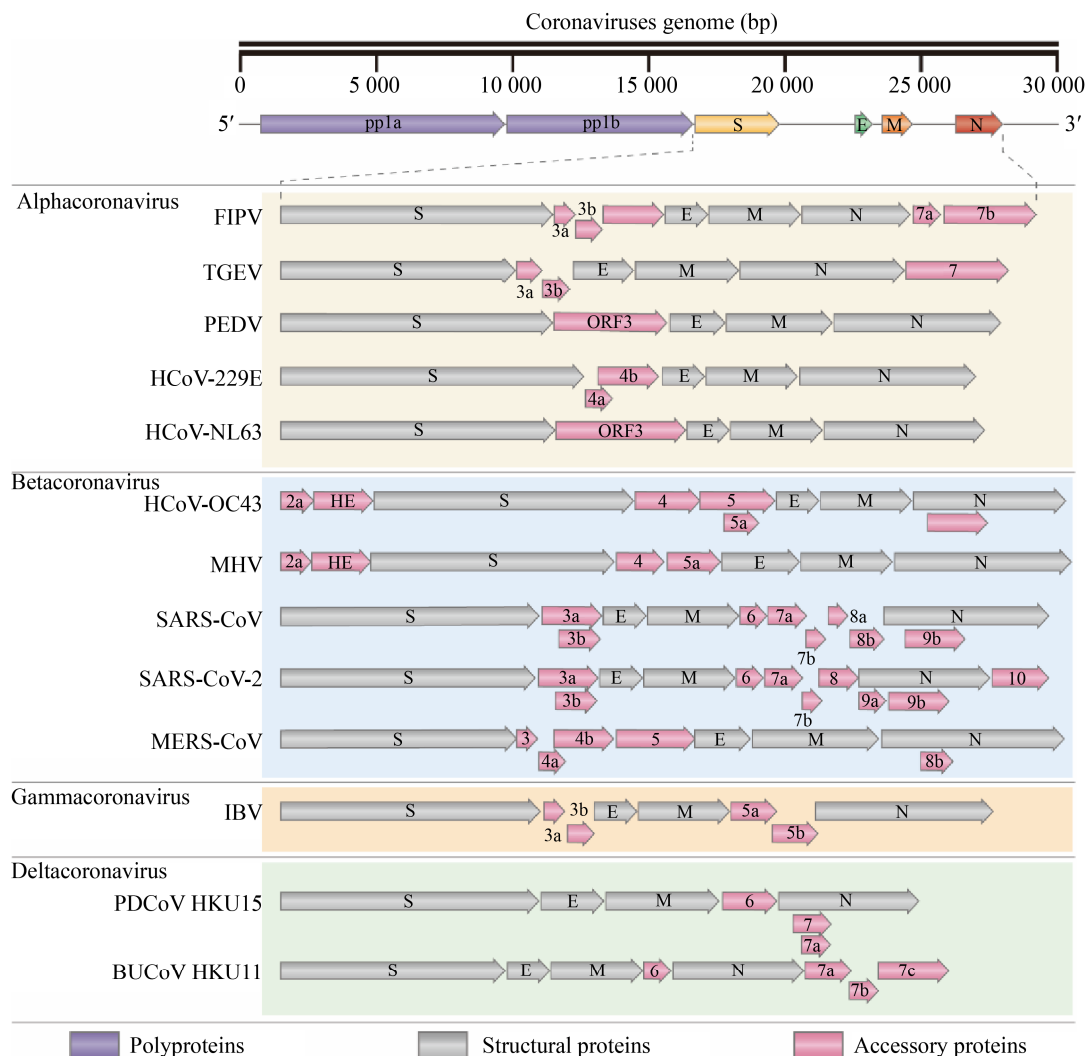


图 3 冠状病毒的基因组结构与编码蛋白

Figure 3 Genomic structure and coded proteins of coronaviruses

表 1 各种属冠状病毒附属蛋白的种类、亚细胞定位及其主要功能

Table 1 Categories, subcellular localization and functions of the accessory proteins of various coronaviruses

Genus	Virus species	Accessory proteins	Subcellular location	Features and functions	References
α	HCoV-229E	4a, 4b	ER-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC)	4a: Forms an ion channel and promotes virus replication	[26]
	HCoV-NL63	ORF3	Plasma membrane and ERGIC	N-glycosylated at the N-terminus, incorporates into virions and functions as structural protein	[27]
	FIPV	3a, 3b, 3c, 7a, 7b	Golgi	ORF3: Promotes virus replication; 7a: Functions as type I interferon antagonists	[28-29]
	PEDV	ORF3	Plasma membrane and Golgi	Forms an ion channel and promotes virus replication, causes autophagy, inhibits apoptosis and type I interferon response	[30-34]
β	TGEV	3a, 3b, ORF7	N. A.	ORF7: Attenuates virulence and inhibits apoptosis	[35]
	HCoV-OC43	2a, HE (2b), 5a (ns12.9), 4, 7b	Plasma membrane and cytoplasm	Inhibits host antiviral response elements, blocks the activation of antiviral signal pathway or has ion channel activity to promote virus replication	[25,36-37]
	MERS-CoV	3, 4a, 4b, 5, 8b	4a: Cytoplasm and ERGIC; 4b: Nucleus	4a and 4b: Functions as type I and III interferon antagonists; ORF5: Promote the type I interferon production and reduce the virulence; 8b: Functions as type I interferon antagonists and inhibits the innate immune signaling pathway	[38-42]
	MHV	2a, HE (2b), 4, 5a	N. A.	ORF2, 5a and 8b: Inhibit type I interferon response	[43]
	SARS-CoV	3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b	3a: Plasma membrane and Golgi; 3b: Nucleus; ORF6 and 7a: Endoplasmic Reticulum (ER) and ERGIC; 7b: Golgi; 8a: ER; 8b: Cytoplasm and nucleus; 9b: Cytoplasm	3a: Forms an ion channel and promotes virus replication, incorporates into virions and functions as structural protein, promotes virus replication; 3b: Inhibits type I interferon response; ORF6: Incorporates into virions to enhance virulence; 7a and 9b: Incorporate into virions and induce apoptosis; 8a: induces apoptosis; 8b: Inhibits type I interferon response	[44-49]
γ	SARS-CoV-2	3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c, 10	3a: Plasma membrane and Golgi; ORF6 and 7a: Golgi; ORF9: Cytoplasm and nucleus; 7b, 8 and 10: ER	3a: Forms an ion channel and induces apoptosis; 6, 8 and 9b: Functions as type I interferon antagonists; Function of other accessory proteins has not been reported	[22,50-54]
	IBV	3a, 3b, 5a, 5b	N. A.	All: Not necessary for virus replication, but reduce the virulence after deletion; Specifically, 3a and 5a: Inhibit type I interferon response; 3b: Involves in the pathogenesis	[55-57]
δ	PDCoV HKU15	6, 7, 7a	ORF6: ER and ERGIC	ORF6: Incorporates into virions, inhibits type I interferon response and promotes virus replication; ORF7: Regulates host protein expression; 7a: Inhibits IFN- β production and the host innate immune signaling pathway	[58-62]
	BuCoV HKU11	6, 7a, 7b, 7c	N. A.	N. A.	

Note: N. A. means not available

子中, 表明该蛋白可参与病毒粒子的装配过程, 发挥病毒结构蛋白的作用^[27]。同样地, β 冠状病毒属中 SARS-CoV 的附属蛋白 3a、7a 和 9b 以及 δ 冠状病毒属中 PDCoV 的附属蛋白 ORF6 都被证实能整合进纯化的病毒粒子中, 具有结构蛋白的属性^[44,48,62]。

(2) 能影响病毒复制, 与病毒毒力密切相关。这类作用也主要存在于 α 、 β 和 δ 冠状病毒属的部分附属蛋白中。如 α 冠状病毒属中的 HCoV-229E 基因组编码一个附属蛋白 4a, 病毒感染细胞后其定位在细胞的 ERGIC 中, 该蛋白的缺失虽不影响其对细胞的感染能力, 但病毒的复制能力显著下

降^[26]。对 TGEV 附属蛋白 ORF3 的研究表明,该蛋白敲除后对病毒在细胞内的复制能力无影响^[63],但是会显著影响病毒的毒力^[64]。与 TGEV 类似,FIPV 的附属蛋白 ORF3 敲除后虽然不影响其体外复制能力,但其感染巨噬细胞的能力显著下降^[28],并且能显著降低病毒的毒力^[65]。MERS-CoV 的 ORF5 蛋白通过促进 I 型干扰素的生成和激活先天性免疫通路导致病毒致病能力下降^[40]。 β 冠状病毒属中 SARS-CoV 的附属蛋白 3a 也可促进病毒的复制,进一步研究发现该作用是通过离子通道活性来实现的^[66]。 δ 冠状病毒属中 PDCoV 的附属蛋白 ORF6 是通过抑制 I 型干扰素的产生来促进病毒的复制^[60]。

(3) 具有离子通道活性并形成跨膜蛋白,能调节病毒粒子的释放。这种作用主要存在于部分 α 和 β 冠状病毒属的附属蛋白中。如 α 冠状病毒属中 HCoV-229E 基因组编码的附属蛋白 4a 是一个 3 次跨膜蛋白,具有钾离子通道活性,进一步研究表明该离子通道活性与其促进病毒复制的作用直接相关^[26]。PEDV 附属蛋白 ORF3 已被证实也是一个具有钾离子通道活性的多次跨膜蛋白,并通过该特性调节病毒粒子的产生、包装和释放^[30]。 β 冠状病毒属中 HCoV-OC43 的 5a 蛋白(又称为 ns12.9)是个跨膜蛋白,也具有钾离子通道活性;研究表明该离子通道活性能促进病毒粒子的产生和释放,并对病毒粒子的完整性产生重要影响,体内试验表明缺失该蛋白的重组病毒对小鼠的致病性显著降低,表明该蛋白也影响病毒的毒力^[37]。此外,由于 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 具有较近的亲缘关系,二者附属蛋白 3a 的功能也非常相似:都是 3 次跨膜蛋白,具有钾离子通道活性,能够调节病毒粒子的生成并促进病毒的释放^[66-67]。

(4) 影响细胞周期、自噬及细胞凋亡。这类作用主要存在于部分 α 和 β 冠状病毒属的附属蛋白中。如 α 冠状病毒属中 PEDV 编码的 ORF3 附属蛋白可延长细胞周期的 S 期,有助于双膜囊泡(Double-Membrane Vesicle, DMV)的形成,从而促

进病毒的增殖^[68]。研究证实,该蛋白通过上调葡萄糖调节蛋白 78 (Glucose Regulated Protein 78kD, GRP78)的表达和激活 pERK-eIF2 α 信号通路来触发细胞的内质网应激反应(ER Stress);同时,ORF3 蛋白通过诱导细胞自噬标志蛋白 LC3-I 向 LC3-II 的转变而促进细胞自噬^[31]。本团队最近的研究表明,ORF3 蛋白不但能够促进 PEDV 在 Vero 细胞上的增殖^[69],而且能延缓细胞病变的形成,对 PEDV 诱导的细胞凋亡产生明显的抑制作用,进一步研究证实这种作用是通过该蛋白抑制 Caspase-3 的切割活化来实现^[32]。然而不同属冠状病毒附属蛋白在细胞凋亡方面的作用并非完全相同, β 冠状病毒属,如 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的附属蛋白 3a 主要是促进细胞凋亡的发生,其作用机制是通过促进细胞凋亡蛋白 Caspase-3/8/9 和 tBid 的切割活化引起细胞色素 C (Cytochrome C)向线粒体外释放,从而促进凋亡小体的形成,最终引起外源性细胞凋亡^[45,50]。此外,SARS-CoV 的 3a 蛋白还可通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)途径激活线粒体死亡途径来促进细胞凋亡的发生^[70]。

(5) 拮抗宿主抗病毒天然免疫反应,抑制 I 型干扰素的产生。这类作用最为普遍,存在于 4 个冠状病毒属的附属蛋白中。如: α 冠状病毒属中 FIPV 的 7a 蛋白^[29];PEDV 的 ORF3 蛋白^[34];MERS-CoV 的 4a、4b 和 8b 蛋白^[38-39,41-42]。此外,MERS-CoV 的 ORF5 蛋白较为特殊,该蛋白可促进 I 型干扰素的生成,从而造成病毒毒力致弱^[40]。 β 冠状病毒属中 MERS-CoV 的 4a 和 8b 蛋白^[38,41]、MHV 的 ORF2 和 5a 蛋白^[43]、SARS-CoV 的 3b 和 8b 蛋白^[48-49]以及 SARS-CoV-2 的 ORF6、ORF8 和 9b 蛋白^[22,52-54]、都可抑制 I 型干扰素的产生。 γ 冠状病毒属中 IBV 基因组编码的附属蛋白为 3a、3b、5a 和 5b,研究表明,这些蛋白能够拮抗 I 型干扰素的产生,在宿主抗病毒天然免疫方面发挥重要作用^[55-57]。 δ 冠状病毒属中 PDCoV 的 NS6 (ORF6)和 NS7 (ORF7)是最先鉴定出来的 2 个附属蛋白^[9,71],随后 NS7a 被鉴定出来^[72]。研究表明,PDCoV 附属蛋白 NS6 的表达

能显著抑制仙台病毒诱导的干扰素 β (Interferon- β , IFN- β)的产生和转录因子 IRF3 及 NF- κ B 的激活, 并且 NS6 通过与维甲酸诱导基因 (Retinoic Acid-Inducible Gene, RIG)和黑色素瘤分化相关基因 5 (Melanoma Differentiation-Associated Gene 5, MDA5)相互作用来拮抗 IFN 的产生, 从而阻止它们与双链 RNA (Double-Stranded RNA, dsRNA)的结合^[60]。

由此可以看出,冠状病毒附属蛋白的功能纷繁复杂,不同功能之间又有着密切的关联,一种作用往往是通过另外一种功能来实现。因此,要想对附属蛋白的功能进行系统解析,应综合考虑多方面的因素来进行研究。

4 冠状病毒附属蛋白的细胞内转运信号(基序)

冠状病毒编码多个结构蛋白、非结构蛋白及附属蛋白,病毒成功感染细胞并复制后,这些蛋白表达在细胞的不同位置,随后利用不同的机制与宿主细胞蛋白相互作用,在病毒入侵、复制或者维持病毒的感染方面发挥作用。理论上,冠状病毒与细胞受体结合并成功感染细胞后,病毒首先在内质网-高尔基中间体(ERGIC)内包装并完成出芽^[73]。在此过程中,病毒蛋白在内质网(Endoplasmic Reticulum, ER)内合成后利用自身编码的转运信号或基序向 ERGIC、高尔基体(Golgi)和细胞外膜转运。如 SARS-CoV 的 S 蛋白是在感染细胞的分泌途径中合成,其包含一个 N 末端信号序列,介导新合成的蛋白向内质网转运,在内质网内蛋白质被折叠并被富含甘露糖的碳水化合物修饰;当蛋白运输到高尔基体时,大多数高甘露糖碳水化合物被加工成复杂的聚糖^[74]。S 蛋白内还有一个内质网转运基序促进 S 蛋白在 ERGIC 和高尔基体内的聚集^[75]。还有研究表明, PEDV 的 S 蛋白 C 末端存在 Yxx \emptyset (x 可以是任何氨基酸残基, \emptyset 是具有较大疏水性、侧链较大的氨基酸残基)和 KVHVQ (KxHxx)这 2 个转运基

序,其中 Yxx \emptyset 是入胞(Endocytosis)信号, KxHxx 是内质网驻留信号,两者相互协同调控 S 蛋白在细胞膜上的表达,是影响 PEDV 毒力的关键因素之一^[76]。

同样地,对于冠状病毒附属蛋白来说也存在类似的细胞内转运信号(基序),这些转运信号是决定附属蛋白在不同的细胞器或者细胞结构驻留或转运的关键。如 SARS-CoV 3a 蛋白的 C 末端有 2 个胞内蛋白转运基序: Yxx \emptyset 和双酸性基序(ExD, x 是任一氨基酸残基),这 2 个氨基酸基序在 3a 蛋白向细胞膜表面转运以及随后入胞(Endocytosis)方面发挥重要作用^[77]。此外, SARS-CoV 3a 蛋白的 Yxx \emptyset 基序能调节 S 蛋白内化并阻止其在细胞表面的表达^[78]。6a 蛋白含有 YSEL (氨基酸 49-52)和酸性氨基酸基序,其中 YSEL 基序促进与 6a 蛋白相互作用的靶蛋白的内化,而酸性氨基酸基序引导蛋白从内质网输出^[79]。SARS-CoV 7a 的氨基酸 97-117 具有高度的疏水性并横穿细胞膜, C 末端的最后 5 个氨基酸(KRKTE)形成经典的内质网驻留信号(KKxx 或 KxKxx, 其中 x 是任一氨基酸残基);当该基序从 KRKTE 突变为 ERETE 时, 7a 蛋白不能逆向转运到内质网,只能在高尔基体内积累,导致其在高尔基体内被蛋白酶快速水解^[80]。SARS-CoV 9b 的氨基酸 46-54 基序(LRLGSQLSL)是一个核输出信号,已知该氨基酸基序通过核输出蛋白-1 (Exportin-1)借助能量依赖机制运输蛋白^[80]。对 SARS-CoV-2 来说,附属蛋白 3a 的细胞内转运基序是 Yxx \emptyset 和 SDG^[50]。研究表明,野生型 3a 蛋白能够在细胞膜上表达,但 Yxx \emptyset 基序中的 Y \rightarrow A 突变导致 3a 蛋白不能向细胞膜转运^[50],说明 Yxx \emptyset 参与 3a 蛋白的细胞膜转运。进一步的功能研究表明,野生型 3a 蛋白可以显著诱导细胞凋亡的发生,但 Yxx \emptyset 和 SDG 基序中 Y \rightarrow A 突变或者 S/D \rightarrow A 突变都能显著降低 3a 蛋白诱导细胞凋亡的水平,表明上述氨基酸基序在附属蛋白诱导细胞凋亡过程中的作用非常关

键^[50]。FIPV 的附属蛋白 7b 定位在高尔基体, 其 C-端的 KTEL 氨基酸基序是该蛋白在高尔基体驻留的重要信号, T→D 突变后能使 7b 在内质网驻留^[81]。本团队对 PEDV 附属蛋白 ORF3 的研究结果表明, ORF3 蛋白通过拮抗 Caspase-3 的切割活化来抑制 PEDV 诱导的细胞凋亡^[32]。进一步研究发现, 该附属蛋白的细胞内转运基序是 YxxØ 和 ExD, 经定点突变证实 ORF3 蛋白 C 末端 YxxØ 氨基酸基序(¹⁷⁰YLAI¹⁷³)是影响 ORF3 蛋白细胞内转运的关键基序, 并决定其在细胞膜上的表达^[33]。有关 SARS-CoV-2 附属蛋白 3a 的细胞内转运基序(YxxØ 和 SDG)调控细胞凋亡的过程提示人们: PEDV 附属蛋白 ORF3 的细胞内转运基序(YxxØ 和 ExD)是否也参与调控 PEDV 诱发细胞凋亡的过程? 若是则该转运基序的调控机制与 SARS-CoV-2 的 3a 蛋白有何异同? 这值得人们在现有基础上进行深入探索。

5 冠状病毒附属蛋白的拓扑学结构

研究表明, 很多冠状病毒的附属蛋白是多次跨膜蛋白, 能够整合到成熟的病毒粒子中, 参与病毒粒子的包装和释放, 并对病毒的复制产生影响。如 SARS-CoV 3a 蛋白有胞外 N 端和胞内 C 端结构, 是一个 3 次跨膜蛋白, 能够形成四聚体结构和钾离子通道, 调节 SARS-CoV 病毒粒子的释放^[66,82], 诱导细胞凋亡^[45,83] (表 1)。PEDV 附属蛋白 ORF3 是一个 4 次跨膜蛋白, 也能够形成四聚体结构和钾离子通道, 调节 PEDV 病毒粒子的生成; 定点突变结果表明, 其第 4 个跨膜区 (Transmembrane Domain, TMD) YxxØ 氨基酸基序(¹⁷⁰YLAI¹⁷³)中 Y→A 突变可导致钾离子通道活性显著降低^[30]。我们团队的研究结果进一步证实, 该位点(Y→A)突变导致 ORF3 蛋白不能向细胞膜转运^[33]。据此推测, Y170A 中酪氨酸(Trp)位点对钾离子通道的形成起决定性作用, 并且该离子通道的形成影响 ORF3 蛋白向细胞膜的转运。SARS-CoV-2 的 3a 蛋白也是一个 3 次跨膜蛋白, 该

蛋白某些氨基酸位点的突变可导致蛋白二级结构的改变^[84]或者抗原表位的丢失^[85], 从而造成某些功能的丧失^[67]。此外, 研究证实 3a 蛋白氨基酸的突变还与 SARS-CoV-2 的全球流行传播^[86]以及高感染率和高死亡率有关^[87]。上述结果表明附属蛋白的拓扑学结构与其功能紧密相关, 深入解析附属蛋白的拓扑学结构可为理解此类蛋白与病毒其他蛋白或宿主蛋白的相互作用提供重要参考, 并为进一步明确冠状病毒的发病机制奠定基础。

6 冠状病毒附属蛋白的密码子使用偏爱性

不同生物在基因翻译过程中, 特定密码子的使用频率高于其他同义密码子的现象称为密码子使用偏爱性(Codon Usage Bias, CUB), 又叫同义密码子使用偏性。在实际应用中, 通过对不同物种或者已知基因的同义密码子使用偏爱性进行预测和验证, 有针对性地在表达蛋白时通过添加对应的转运 RNA (Transfer RNA, tRNA), 以克服因密码子使用偏爱性而导致的异源蛋白表达量低的问题^[88]。研究表明, 冠状病毒的密码子使用偏爱性在不同宿主或环境中受到不同选择压力的影响。如对 MERS-CoV 的研究表明, 该病毒基因组能够较为均衡地使用各个同义密码子, 遗传突变和自然选择双重压力决定了 MERS-CoV 密码子的使用模式^[89]。SARS-CoV-2 基因组同样具有相对较低的密码子使用偏爱性, 来自不同国家的 SARS-CoV-2 分离株的密码子使用模式也略有不同, 其整体密码子使用偏性与蝙蝠冠状病毒(如 Bat Coronavirus RaTG13, BatCoV RaTG13)相似^[90], 这种现象也是由遗传突变和自然选择共同决定的。

值得说明的是, 上述研究都是对冠状病毒基因组密码子整体使用偏爱性的报道, 单个基因的密码子使用偏爱性可能与基因组全长的密码子使用偏爱性存在一定差异。就其附属蛋白密码子使用偏爱性来说相关的研究还很少, 目前的报道表明, α 冠状病毒属成员中 PEDV 附属蛋白 ORF3 的密码子使用偏爱性较低, 这在一定程度上提示

ORF3 基因的相对多变性。进一步对碱基组成与密码子使用偏爱性的相关性分析表明, 遗传突变对 PEDV ORF3 蛋白密码子的使用模式有较大影响; 中性分析表明, 在密码子使用偏爱性方面, 自然选择压力比遗传突变具有更显著的影响; 该研究还发现疏水性和芳香性因素也影响 ORF3 蛋白的密码子使用; 由于所选择基因序列的局限性, 该研究结果只适用于回答 PEDV 中国分离株 ORF3 蛋白的密码子使用偏爱性, 其是否也能解释其他国家和地区 PEDV 毒株 ORF3 蛋白的密码子偏爱性问题有待进一步的研究^[91]。截至目前, 该报道是对 PEDV ORF3 蛋白密码子使用模式最全面的分析, 相关结果对 ORF3 蛋白表达条件的优化和其他冠状病毒附属蛋白密码子使用偏爱性的研究具有重要的参考价值。

7 结语与展望

在过去 20 年的时间里自然界先后出现了 7 种感染人类的冠状病毒, 其中包括 2 种 α 冠状病毒 HCoV-229E 和 HCoV-NL63; 5 种 β 冠状病毒 HCoV-OC43、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 及 SARS-CoV-2 (图 2)。由于冠状病毒对人类健康的长期持续威胁, 详细了解冠状病毒的生物学特征和传播规律并采取针对性的措施控制其流行传播, 对全球公共卫生安全 and 经济稳定发展具有重要意义。

自 2003 年 SARS 暴发以来, 冠状病毒的相关研究开始引起各国重视。尤其是 2019 年底 SARS-CoV-2 的全球流行传播, 促使多国政府投入巨大的资源进行应急科研攻关, 短时间内人们对冠状病毒的致病机制以及重要结构蛋白的生物学功能研究取得了显著进展。然而, 随着各项研究工作的稳步推进, 一些研究的瓶颈问题开始浮现, 如单纯对冠状病毒结构蛋白或者非结构蛋白功能的研究已不能完全阐明病毒的致病机制。随着研究方法的改进, 一些新的附属蛋白被鉴定出来, 但其相关功能研究尚未引起足够的重视。人们

要想全面系统地了解冠状病毒的生物学特性, 对附属蛋白的功能解析也应提到新的高度。经过多年的研究, 虽然人们对冠状病毒附属蛋白的功能有了一定程度的了解, 但是认识水平还非常有限, 并且有的冠状病毒附属蛋白的体外表达和检测还存在较大困难^[92], 这对进一步解析其功能造成了一定障碍。此外, 学术界对有些病毒附属蛋白的种类划分还存在争议^[93-94], 一些新的蛋白鉴定方法有待经过验证后推广使用^[95], 蛋白拓扑学研究大多还停留在生物信息学的预测方面, 其结构生物学研究尚未引起足够重视, 对其密码子使用偏爱性的了解也非常有限, 一些新发现的附属蛋白其稀有氨基酸位点的错义突变是否影响病毒的毒力^[96], 这些都是今后病毒学领域应当聚焦的热点。

鉴于以上存在的问题, 关于冠状病毒附属蛋白的相关研究应集中在以下几个方面: (1) 把生物信息学技术和分子生物学技术结合起来进行附属蛋白的鉴定, 在生物信息学预测的基础上利用分子克隆和基因工程手段进行功能实验, 验证预测结果; (2) 加强附属蛋白密码子使用偏爱性的研究, 明确相关附属蛋白常用密码子组成, 在此基础上优化蛋白的表达条件和表达体系, 提高表达效率, 为抗原制备和检测方法的建立奠定基础; (3) 附属蛋白的拓扑学研究方面, 在蛋白二级结构预测的基础上, 通过单克隆抗体技术和蛋白纯化与结晶, 对附属蛋白的拓扑学结构进行精准解析; (4) 附属蛋白转运基序的研究方面, 在明确其转运氨基酸基序的基础上, 应加强造成表型差异的相关分子机制研究。随着人们对该类蛋白相关研究重视程度的加强, 相信上述领域会不断拓展, 通过借助于附属蛋白的深入研究, 人们对冠状病毒的认识会上升到新的高度。

REFERENCES

- [1] Estola T. Coronaviruses, a new group of animal RNA viruses[J]. Avian Diseases, 1970, 14(2): 330-336
- [2] King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. San Diego: Elsevier, 2011,

- 1-1326
- [3] Liu J, Xie WL, Wang YT, Xiong Y, Chen SQ, Han JJ, Wu QP. A comparative overview of COVID-19, MERS and SARS: review article[J]. *International Journal of Surgery (London, England)*, 2020, 81: 1-8
- [4] Artika IM, Dewantari AK, Wiyatno A. Molecular biology of coronaviruses: current knowledge[J]. *Heliyon*, 2020, 6(8): e04743
- [5] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. *Annual Review of Virology*, 2016, 3(1): 237-261
- [6] Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, Bai R, Teng JLL, Tsang CCC, Wang M, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995-4008
- [7] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 181-192
- [8] Wang XJ, Li JX, Wang MR, Zhou ZY, Zhu BC, Zhang XX, Zhang R, Tang W, Wu YF, Zhang WT, et al. Antiviral properties of traditional Chinese medicine against coronavirus: research clues for coronavirus disease-2019[J]. *World Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 6(2): 132-138
- [9] Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis[J]. *Viruses*, 2010, 2(8): 1804-1820
- [10] Gomaa MH, Yoo D, Ojkic D, Barta JR. Infection with a pathogenic turkey coronavirus isolate negatively affects growth performance and intestinal morphology of young turkey poults in Canada[J]. *Avian Pathology*, 2009, 38(4): 279-286
- [11] Ou XY, Liu Y, Lei XB, Li P, Mi D, Ren LL, Guo L, Guo RX, Chen T, Hu JX, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1620
- [12] Papa G, Mallery DL, Albecka A, Welch LG, Cattin-Ortolá J, Luptak J, Paul D, McMahon HT, Goodfellow IG, Carter A, et al. Furin cleavage of SARS-CoV-2 Spike promotes but is not essential for infection and cell-cell fusion[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(1): e1009246
- [13] Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(14): 5871-5876
- [14] Hulswit RJG, De Haan CAM, Bosch BJ. Coronavirus spike protein and tropism changes[J]. *Advances in Virus Research*, 2016, 96: 29-57
- [15] Tan YB, Sun LM, Wang G, Shi YJ, Dong WY, Fu YN, Fu Z, Chen HC, Peng GQ. The trypsin-enhanced infection of porcine epidemic diarrhea virus is determined by the S2 subunit of the spike glycoprotein[J]. *Journal of Virology*, 2021: e02453-20
- [16] Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, Rottier P, Warren G. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus[J]. *Nature*, 1984, 308(5961): 751-752
- [17] Chen Y, Liu QY, Guo DY. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(4): 418-423
- [18] Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, Castaño-Rodríguez C, Alcaraz A, Torres J, Aguilera VM, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(5): e1004077
- [19] Singh Tomar PP, Arkin IT. SARS-CoV-2 E protein is a potential ion channel that can be inhibited by Gliclazide and Memantine[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 530(1): 10-14
- [20] Mu JF, Fang YH, Yang Q, Shu T, Wang A, Huang MH, Jin L, Deng F, Qiu Y, Zhou X. SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6: 65
- [21] Chang CY, Liu HM, Chang MF, Chang SC. Middle East respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein suppresses type I and type III interferon induction by targeting RIG-I signaling[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(13): e00099-20
- [22] Li JY, Liao CH, Wang Q, Tan YJ, Luo R, Qiu Y, Ge XY. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway[J]. *Virus Research*, 2020, 286: 198074
- [23] Klausegger A, Strobl B, Regl G, Kaser A, Luytjes W, Vlasak R. Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(5): 3737-3743
- [24] Lang YF, Li WT, Li ZS, Koerhuis D, Van Den Burg ACS, Rozemuller E, Bosch BJ, Van Kuppeveld FJM, Boons GJ, Huizinga EG, et al. Coronavirus hemagglutinin-esterase and spike proteins coevolve for functional balance and optimal virion avidity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25759-25770
- [25] Shang JZ, Han N, Chen ZY, Peng YS, Li L, Zhou HY, Ji CY, Meng J, Jiang TJ, Wu AP. Compositional diversity and evolutionary pattern of coronavirus accessory proteins[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2020. DOI: 10.1093/bib/bbaa262
- [26] Zhang RH, Wang K, Lv W, Yu WJ, Xie SQ, Xu K, Schwarz

- W, Xiong SD, Sun B. The ORF4a protein of human coronavirus 229E functions as a viroporin that regulates viral production[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 2014, 1838(4): 1088-1095
- [27] Müller MA, Van Der Hoek L, Voss D, Bader O, Lehmann D, Schulz AR, Kallies S, Suliman T, Fielding BC, Drosten C, et al. Human coronavirus NL63 open reading frame 3 encodes a virion-incorporated N-glycosylated membrane protein[J]. *Virology Journal*, 2010, 7: 6
- [28] Dedeurwaerder A, Desmarests LM, Olyslaegers DAJ, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2013): 447-455
- [29] Dedeurwaerder A, Olyslaegers DAJ, Desmarests LMB, Roukaerts IDM, Theuns S, Nauwynck HJ. ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN- α -induced antiviral response[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(2): 393-402
- [30] Wang K, Lu W, Chen JF, Xie SQ, Shi HY, Hsu H, Yu WJ, Xu K, Bian C, Fischer WB, et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(4): 384-391
- [31] Zou DH, Xu JX, Duan XL, Xu X, Li PF, Cheng LX, Zheng L, Li XZ, Zhang YT, Wang XH, et al. Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein causes endoplasmic *Reticulum* stress to facilitate autophagy[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 235: 209-219
- [32] Si FS, Hu XX, Wang CY, Chen BQ, Wang RY, Dong SJ, Yu RS, Li Z. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) ORF3 enhances viral proliferation by inhibiting apoptosis of infected cells[J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 214
- [33] Si FS, Chen BQ, Hu XX, Yu RS, Dong SJ, Wang RY, Li Z. Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein is transported through the exocytic pathway[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(17): e00808-20
- [34] Kaewborisuth C, Koonpaew S, Srisutthisamphan K, Viriyakitkosol R, Jaru-Ampornpan P, Jongkaewwattana A. PEDV ORF3 independently regulates I κ B kinase β -mediated NF- κ B and IFN- β promoter activities[J]. *Pathogens*, 2020, 9(5): 376
- [35] Cruz JLG, Sola I, Becares M, Alberca B, Plana J, Enjuanes L, Zuñiga S. Coronavirus gene 7 counteracts host defenses and modulates virus virulence[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(6): e1002090
- [36] Beidas M, Chehadeh W. Effect of human coronavirus OC43 structural and accessory proteins on the transcriptional activation of antiviral response elements[J]. *Intervirology*, 2018, 61(1): 30-35
- [37] Zhang RH, Wang K, Ping XQ, Yu WJ, Qian ZK, Xiong SD, Sun B. The ns12.9 accessory protein of human coronavirus OC43 is a viroporin involved in virion morphogenesis and pathogenesis[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(22): 11383-11395
- [38] Niemeyer D, Zillinger T, Muth D, Zielecki F, Horvath G, Suliman T, Barchet W, Weber F, Drosten C, Muller MA. Middle east respiratory syndrome coronavirus accessory protein 4a is a type I interferon antagonist[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(22): 12489-12495
- [39] Matthews KL, Coleman CM, Van der Meer Y, Snijder EJ, Frieman MB. The ORF4b-encoded accessory proteins of Middle East respiratory syndrome coronavirus and two related bat coronaviruses localize to the nucleus and inhibit innate immune signalling[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(4): 874-882
- [40] Gutierrez-Alvarez J, Wang L, Fernandez-Delgado R, Li K, McCray PB Jr, Perlman S, Sola I, Zuñiga S, Enjuanes L. Middle east respiratory syndrome coronavirus gene 5 modulates pathogenesis in mice[J]. *Journal of Virology*, 2020, 95(3): e01172-20
- [41] Lee JY, Bae S, Myoung J. Middle East respiratory syndrome coronavirus-encoded ORF8b strongly antagonizes IFN- β promoter activation: its implication for vaccine design[J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 57(9): 803-811
- [42] Comar CE, Goldstein SA, Li Y, Yount B, Baric RS, Weiss SR. Antagonism of dsRNA-Induced innate immune pathways by NS4a and NS4b accessory proteins during MERS coronavirus infection[J]. *mBio*, 2019, 10(2): e00319-19
- [43] Koetzner CA, Kuo LL, Goebel SJ, Dean AB, Parker MM, Masters PS. Accessory protein 5a is a major antagonist of the antiviral action of interferon against murine coronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(16): 8262-8274
- [44] Ito N, Mossel EC, Narayanan K, Popov VL, Huang C, Inoue T, Peters CJ, Makino S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(5): 3182-3186
- [45] Law PTW, Wong CH, Au TCC, Chuck CP, Kong SK, Chan PKS, To KF, Lo AWI, Chan JYW, Suen YK, et al. The 3a protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(7): 1921-1930
- [46] Yuan XL, Shan YJ, Yao ZY, Li JY, Zhao ZH, Chen JP, Cong YW. Mitochondrial location of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3b protein[J]. *Molecules and Cells*, 2006, 21(2): 186-191
- [47] Geng H, Liu YM, Chan WS, Lo AWI, Au DMY, Waye MMY, Ho YY. The putative protein 6 of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus: expression and functional characterization[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(30): 6763-6768
- [48] Liu DX, Fung TS, Chong KK-L, Shukla A, Hilgenfeld R. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses[J]. *Antiviral Research*, 2014, 109: 97-109
- [49] Wong HH, Fung TS, Fang SG, Huang M, Le MT, Liu DX. Accessory proteins 8b and 8ab of severe acute respiratory syndrome coronavirus suppress the interferon signaling pathway by mediating ubiquitin-dependent rapid degradation of interferon regulatory factor 3[J]. *Virology*,

- 2018, 515: 165-175
- [50] Ren YJ, Shu T, Wu D, Mu JF, Wang C, Huang MH, Han Y, Zhang XY, Zhou W, Qiu Y, et al. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(8): 881-883
- [51] Zhang J, Cruz-Cosme R, Zhuang MW, Liu DX, Liu Y, Teng SL, Wang PH, Tang QY. A systemic and molecular study of subcellular localization of SARS-CoV-2 proteins[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, 5: 269
- [52] Flower TG, Buffalo CZ, Hooy RM, Allaire M, Ren XF, Hurley JH. Structure of SARS-CoV-2 ORF8, a rapidly evolving immune evasion protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(2): e2021785118
- [53] Zinzula L. Lost in deletion: the enigmatic ORF8 protein of SARS-CoV-2[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021, 538: 116-124
- [54] Wu J, Shi Y, Pan XY, Wu S, Hou RX, Zhang Y, Zhong TS, Tang H, Du W, Wang LY, et al. SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO[J]. Cell Reports, 2021, 34(7): 108761
- [55] Laconi A, van Beurden SJ, Berends AJ, Krämer-Kühl A, Jansen CA, Spekreijse D, Chénard G, Philipp HC, Mundt E, Rottier PJM, et al. Deletion of accessory genes 3a, 3b, 5a or 5b from avian coronavirus infectious bronchitis virus induces an attenuated phenotype both *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of General Virology, 2018, 99(10): 1381-1390
- [56] Kint J, Dickhout A, Kutter J, Maier HJ, Britton P, Koumans J, Pijlman GP, Fros JJ, Wiegertjes GF, Forlenza M. Infectious bronchitis coronavirus inhibits STAT1 signaling and requires accessory proteins for resistance to type I interferon activity[J]. Journal of Virology, 2015, 89(23): 12047-12057
- [57] Zhao Y, Cheng JL, Yan SH, Jia WF, Zhang KR, Zhang GZ. S gene and 5a accessory gene are responsible for the attenuation of virulent infectious bronchitis coronavirus[J]. Virology, 2019, 533: 12-20
- [58] Zhang MJ, Li W, Zhou P, Liu DJ, Luo R, Jongkaewwattana A, He QG. Genetic manipulation of porcine Deltacoronavirus reveals insights into NS6 and NS7 functions: a novel strategy for vaccine design[J]. Emerging Microbes & Infections, 2020, 9(1): 20-31
- [59] Choi S, Lee C. Functional characterization and proteomic analysis of porcine Deltacoronavirus accessory protein NS7[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(11): 1817-1829
- [60] Fang PX, Fang LR, Ren J, Hong YY, Liu XR, Zhao YY, Wang D, Peng GQ, Xiao SB. Porcine Deltacoronavirus accessory protein NS6 antagonizes interferon beta production by interfering with the binding of RIG-I/MDA5 to double-stranded RNA[J]. Journal of Virology, 2018, 92(15): e00712-18
- [61] Fang PX, Fang LR, Xia SJ, Ren J, Zhang JS, Bai DC, Zhou YR, Peng GQ, Zhao SH, Xiao SB. Porcine Deltacoronavirus accessory protein NS7a antagonizes IFN- β production by competing with TRAF3 and IRF3 for binding to IKK ϵ [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 257
- [62] Qin P, Luo WT, Su Q, Zhao PW, Zhang YQ, Wang B, Yang YL, Huang YW. The porcine Deltacoronavirus accessory protein NS6 is expressed *in vivo* and incorporated into virions[J]. Virology, 2021, 556: 1-8
- [63] Woods RD. Efficacy of a transmissible gastroenteritis coronavirus with an altered ORF-3 gene[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2001, 65(1): 28-32
- [64] McGoldrick A, Lowings JP, Paton DJ. Characterisation of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a[J]. Archives of Virology, 1999, 144(4): 763-770
- [65] Tekes G, Hofmann-Lehmann R, Bank-Wolf B, Maier R, Thiel HJ, Thiel V. Chimeric feline coronaviruses that encode type II spike protein on type I genetic background display accelerated viral growth and altered receptor usage[J]. Journal of Virology, 2010, 84(3): 1326-1333
- [66] Lu W, Zheng BJ, Xu K, Schwarz W, Du LY, Wong CKL, Chen JD, Duan SM, Deubel V, Sun B. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(33): 12540-12545
- [67] Bianchi M, Borsetti A, Ciccozzi M, Pascarella S. SARS-Cov-2 ORF3a: mutability and function[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 170: 820-826
- [68] Ye SY, Li ZH, Chen FZ, Li WT, Guo XZ, Hu H, He QG. Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 gene prolongs S-phase, facilitates formation of vesicles and promotes the proliferation of attenuated PEDV[J]. Virus Genes, 2015, 51(3): 385-392
- [69] Hu XX, Yu RS, Si FS, Chen BQ, Dong SJ, Song ZF, Li Z. ORF3 protein promotes the proliferation of porcine epidemic diarrhea virus on Vero cells[J]. Microbiology China, 2018, 45(7): 1508-1517 (in Chinese)
胡晓霞, 于瑞嵩, 司伏生, 陈冰清, 董世娟, 宋增福, 李震. ORF3 蛋白促进猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞上的增殖[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 1508-1517
- [70] Padhan K, Minakshi R, Towheed MAB, Jameel S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein activates the mitochondrial death pathway through p38 MAP kinase activation. Journal of General Virology[J]. 2008, 89(8): 1960-1969
- [71] Zhao F, Sun Y, Qian BX, Zhang XR, Wu YT. Complete genome characterization of Chinese porcine Deltacoronavirus strain CHN/Tianjin/2016[J]. Genome Announcements, 2017, 5(16): e00237-17
- [72] Fang PX, Fang LR, Hong YY, Liu XR, Dong N, Ma PP, Bi

- J, Wang D, Xiao SB. Discovery of a novel accessory protein NS7a encoded by porcine Deltacoronavirus[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(2): 173-178
- [73] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses[J]. *Advances in Virus Research*, 2006, 66: 193-292
- [74] Nal B, Chan CM, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, Kam J, Staropoli I, Crescenzo-Chaigne B, Escriou N, et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(5): 1423-1434
- [75] McBride CE, Li J, Machamer CE. The cytoplasmic tail of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains a novel endoplasmic *Reticulum* retrieval signal that binds COPI and promotes interaction with membrane protein[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(5): 2418-2428
- [76] Hou YX, Meulia T, Gao X, Saif LJ, Wang QH. Deletion of both the tyrosine-based endocytosis signal and the endoplasmic *Reticulum* retrieval signal in the cytoplasmic tail of spike protein attenuates porcine epidemic diarrhea virus in pigs[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(2): e01758-18
- [77] Tan YJ, Teng E, Shen S, Tan THP, Goh PY, Fielding BC, Ooi EE, Tan HC, Lim SG, Hong WJ. A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein, U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(13): 6723-6734
- [78] Tan YJ. The Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-coronavirus 3a protein may function as a modulator of the trafficking properties of the spike protein[J]. *Virology Journal*, 2005, 2(1): 5
- [79] Netland J, Ferraro D, Pewe L, Olivares H, Gallagher T, Perlman S. Enhancement of murine coronavirus replication by severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 requires the N-terminal hydrophobic region but not C-terminal sorting motifs[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(20): 11520-11525
- [80] Fielding BC, Tan YJ, Shuo S, Tan THP, Ooi EE, Lim SG, Hong WJ, Goh PY. Characterization of a unique group-specific protein (U122) of the severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(14): 7311-7318
- [81] Florek D, Ehmann R, Kristen-Burmann C, Lemmermeyer T, Lochnit G, Ziebuhr J, Thiel HJ, Tekes G. Identification and characterization of a Golgi retention signal in feline coronavirus accessory protein 7b[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(8): 2017-2029
- [82] Shi N, Ye S, Alam A, Chen LP, Jiang YX. Atomic structure of a Na⁺- and K⁺-conducting channel[J]. *Nature*, 2006, 440(7083): 570-574
- [83] Chan CM, Tsoi H, Chan WM, Zhai SY, Wong CO, Yao XQ, Chan WY, Tsui SKW, Chan HYE. The ion channel activity of the SARS-coronavirus 3a protein is linked to its pro-apoptotic function[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009, 41(11): 2232-2239
- [84] Azad GK, Khan PK. Variations in Orf3a protein of SARS-CoV-2 alter its structure and function[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2021, 26: 100933
- [85] Gupta AM, Chakrabarti J, Mandal S. Non-synonymous mutations of SARS-CoV-2 leads epitope loss and segregates its variants[J]. *Microbes and Infection*, 2020, 22(10): 598-607
- [86] Wang MJ, Li MJ, Ren RT, Li LF, Chen EQ, Li WM, Ying BW. International expansion of a novel SARS-CoV-2 mutant[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(12): e00567-20
- [87] Majumdar P, Niyogi S. ORF3a mutation associated with higher mortality rate in SARS-CoV-2 infection[J]. *Epidemiology and Infection*, 2020, 148: e262
- [88] Lee SF, Li YJ, Halperin SA. Overcoming Codon-usage bias in heterologous protein expression in *Streptococcus gordonii*[J]. *Microbiology*, 2009, 155(11): 3581-3588
- [89] Chen Y, Xu QM, Yuan XM, Li XX, Zhu T, Ma YM, Chen JL. Analysis of the Codon usage pattern in Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(66): 110337-110349
- [90] Hou W. Characterization of Codon usage pattern in SARS-CoV-2[J]. *Virology Journal*, 2020, 17(1): 1-10
- [91] Xu X, Li PF, Zhang YT, Wang XH, Xu JX, Wu XN, Shen YJ, Guo DX, Li YC, Yao LL, et al. Comprehensive analysis of synonymous Codon usage patterns in *orf3* gene of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. *Research in Veterinary Science*, 2019, 127: 42-46
- [92] Li YQ, Huang XB, Qing Y, Zhang YD, Chen J, Wen XT, Cao SJ, Wen YP, Wu R. Bioinformatics analysis and truncated expression of ORF3 protein of porcine epidemic diarrhea virus in *E. coli*[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(6): 723-730 (in Chinese)
- 李亚青, 黄小波, 卿盈, 张雨迪, 陈杰, 文心田, 曹三杰, 文翼平, 伍锐. 猪流行性腹泻病毒 ORF3 蛋白的生物信息分析及截短原核表达的研究[J]. *中国兽医学*, 2016, 46(6): 723-730
- [93] Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome[J]. *Cell*, 2020, 181(4): 914-921
- [94] Davidson AD, Williamson MK, Lewis S, Shoemark D, Carroll MW, Heesom KJ, Zambon M, Ellis J, Lewis PA, Hiscox JA, et al. Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS-CoV-2 reveals a cell passage induced in-frame deletion of the furin-like cleavage site from the spike glycoprotein[J]. *Genome Medicine*, 2020, 12(1): 68
- [95] Michel CJ, Mayer C, Poch O, Thompson JD. Characterization of accessory genes in coronavirus genomes[J]. *Virology Journal*, 2020, 17: 131
- [96] Hassan SS, Choudhury PP, Roy B. Rare mutations in the accessory proteins ORF6, ORF7b, and ORF10 of the SARS-CoV-2 genomes[J]. *Meta Gene*, 2021, 28: 100873