

昆虫杆状病毒基因表达的调控^{*}

林广云 施先宗 龙蔡新 王珣章

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要 综述了近 10 年来杆状病毒基因的调控研究进展, 包括 6 种与调控有关的基因及 11 种晚期表达因子基因的功能. 杆状病毒基因组中的同源区为其顺式作用元件 (*cis*-acting element) 或增强子, 对基因的表达起正调作用, 而病毒编码的反式激活因子 (*transactivator*) 则决定着病毒基因表达的调控以级联方式进行.

关键词 调控, 顺式作用元件, 反式激活因子, 级联调控

分类号 Q 7. 756

杆状病毒基因的表达是以极其复杂的方式在转录与翻译水平上调控的. 由于病毒基因可转录成一组重叠且不拼接的 RNA, 其 5' 端或 3' 端甚至方向或转录时间顺序上各有不同, 因此, 病毒基因的表达可通过启动子封堵 (*promote occlusion*)、反意 RNA 或多顺反子翻译 (*polycistronic translation*) 的途径调控. 在宿主细胞因子或病毒自身编码的反式激活因子的作用下, *AcMNPV* 基因组以级联式 (*cascade*) 进行时序性表达 (*temporal expression*). 基因组中的同源区为其顺式作用元件 (*cis*-acting element) 或增强子, 对基因的表达起正调作用, 而病毒编码的反式激活因子 (*transactivator*) 则决定着病毒基因的表达以级联方式进行.

1 与调控有关的基因

一些基因已被证实了与基因的调控功能有关, 包括编码 *IE-0*, *IE-1*, *IE-N*, *PE-38*, *ME3* 和 *CG-30* 蛋白的基因. *IE-0* 实际上是 *IE-12* 种形式中的其中 1 种外显子. *IE-0/IE-1* 是在 *AcMNPV* 基因组中唯一 1 个分隔基因. *IE-1* 在瞬间表达分析中表明能激活一些早期启动子, 其实单独的 *IE-1* 外显子已有足够的转录活性功能. *IE-1* 及 *IE-0/IE-1* 的活性在瞬间表达分析中有细微的差别^[1]. 其它的 3 个蛋白 *IE-N*, *PE-38* 和 *CG-30*^[2] 都有相同的结构模式: 1 个不平常的双锌指类基序结构 (*double zinc-fingerlike motif*) 和羧末端的亮氨酸拉链. 在一些与 DNA 相关功能的蛋白中也发现了双锌指类基序结构^[3]. 因此, 在杆状病毒中, 一些相关的基因组成了 1 个家族来进行基因的调节.

2 基因调控的机理

杆状病毒基因的表达可分为 3 个时期: 早期, 晚期, 最晚期. 大部分的基因在其中 1 个

^{*} 收稿日期: 1997-06-19 林广云, 女, 30 岁, 讲师

时期转录, 但有的基因也可能在 2 个甚至 3 个时期都转录. 早期基因可在无需别的病毒基因表达的时候进行转录. 晚期及最晚期基因的转录依赖于早期病毒基因的表达和 DNA 的复制. 最晚期基因的转录, 大约在晚期基因转录后的 10~ 12 h 被激活.

2.1 早期基因的转录

当裸露的病毒 DNA 进入细胞后, 许多早期基因的转录在很大程度上是依赖于 IE-1 的产物. 然而, 1 个普通病毒感染时, 一些早期基因的转录也可不需要任何病毒基因的表达. 有些初始期基因的产物还可以激活自己的启动子, 进行自我调控^[4].

从 IE-1 瞬时表达的结果来看, *hr* 序列可刺激一些早期启动子的转录活性, 特别是当 *hr* 序列位于 *cis* 的上游或是早期启动子与报告基因融合基因的下游时更为明显. IE-1 基因感染的细胞的提取液可引起含有 *hr5* 序列的 DNA 片段的移动^[5], 成为 IE-1 介导的 *hr5* 的增强子角色及具有 IE-1 转录活性功能. IE-1 是 1 个多功能的转录调控蛋白, 它既具备 DNA 结合活性 反式激活活性, 又可正调自己的启动子活性及抑制 IE-0 和 IE-2 的启动子活性^[6]. 近来有实验表明, IE-1 可以以同源二聚体 (homodimer) 的形式与 *hr5* 的回文结构直接相结合^[1]. 瞬时表达分析还表明 IE-1 对 IE-*N* 及 IE-0 有负调节效果^[6].

IE-*N* 产物似乎对 IE-1 的活性有微弱的增强效果, 瞬时表达分析的结果, 它对自身的表达有自动调节的功能^[6]. IE-*N* 是背靠背地位于 *pe* 38 起点处, 这 2 个基因的转录物组成了感染后最早期 (比如感染后 1 h) 的主要的 mRNA^[2].

早期基因的转录是由宿主细胞的 RNA 聚合酶 II 进行的, 因为早期基因的转录被 α 鹅膏蕈碱 (真核 RNA 酶 II 的抑制剂) 所抑制^[7]. 图 1 示部分早期基因的调控模式.

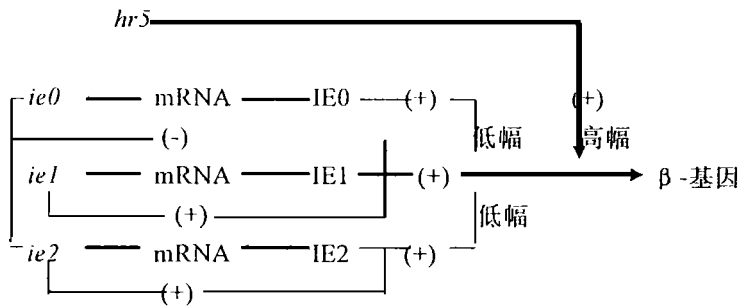


图 1 杆状病毒部分早期基因调控模型
—— 高幅 - - - 低幅 + 正调 - 负调

2.2 晚期及最晚期基因的转录

2.2.1 晚期基因表达所必需的因子 晚期及最晚期基因的转录是不受 α 鹅膏蕈碱所抑制的^[7]. 一些生化证据暗示了在病毒感染的细胞中出现了 1 种可能是病毒修饰的宿主 RNA 聚合酶, 或者是在基因表达的晚期和最晚期由病毒编码了一些亚单位或一些组成部分. 1993 年, Miller 实验室鉴定出 1 种最晚期表达因子 *vlf*-1 (very late factor, *vlf*) 和 11 种晚期表达因子的基因, 从 *lef*-1^[8] 到 *lef*-11^[9]. 加之 *p47 ie1 ie2* 解旋酶基因、DNA 聚合酶基因、*p35* 及 *39K*, 目前已经知道的晚期和最晚期表达因子有 18 种. 值得一提的是解旋酶和 DNA 聚合酶也是晚期基因表达所必需的因子, 为晚期基因的表达依赖于病毒 DNA 的合成提供了部分依据. 晚期和最晚期基因的转录是依赖于早期病毒基因的表达和 DNA 的复制;

放线菌酮和蚜肠毒素 (aphidicolin) 都能抑制晚期和最晚期基因的转录。

2.2.2 晚期和最晚期启动子-TAAG的重要性 晚期和最晚期启动子最明显的特征是具有四核苷酸 TAAG, TAAG位于已知的所有晚期和最晚期转录子的转录起点。多角体蛋白启动子是最晚期启动子的 1个例子: 它在晚期的活性很弱 (感染后 6 h~ 18 h), 但从感染后 18 h开始提高。在感染后 27 h到 48 h, 细胞总 RNA中的大约 20%都是多角体蛋白基因所转录的 mRNA。相反, 晚期 *vp39*启动子在感染后 12 h到 24 h之间活性最强。

运用缺失突变和接头扫描 (linker-scan) 分析^[10]的方法, 对多角体蛋白 (*polh*) 启动子进行了特征性的研究。其转录起始点位于序列 TAAATAAGTATT之内, 在不同的杆状病毒之间, 这段序列是非常保守的, 而且, 它与 *p10* RNA的转录顺序 (TAATAAGAATT) 非常相似。TAAG这一顺序对转录的起始是绝对必须的, 利用 linker-scan技术替换 TAAG这一部分后, 报告基因的转录水平下降了大约 2 000倍且可检测到的 RNA量大大减少了^[10]。额外的启动子决定因素存在于非翻译前导区域内。在 linker-scan突变株中, 低水平的稳定状态的 RNA是由于低效的转录起始而不是 RNA转换 (turnover) 速率的改变^[10]。因此, 多角体蛋白基因 (*polh*) 转录的主要决定因素位于转录起始位点, 以及 RNA起始位点与翻译起始密码之间的序列。

2.2.3 TAAG上游序列的影响 TAAG上游的核苷酸对于调节起着微妙的作用。在多角体蛋白基因 RNA起始位点ATAAG序列中的A可能会影响到转录的水平和启动子的速度。所有强的晚期和最晚期 RNA都是从 ATAAG起始的, 据所观察到的结果, 弱的 RNA转录都是从 TTAAG和 GTAAG起始的。然而, 这个5端的顺序对调节的影响并不是孤立的, 因为多角体蛋白基因5端 TAAG位置通过接头插入突变后, 其转录水平只降低了3倍^[10]。在 TAAG顺序的远端上游 (上游 10~ 20核苷酸处) 插入1个接头后, 转录水平增加了1.倍。“LSXIV”启动子 (*R_{IV}*) 是这1系列接头修饰启动子中最强的1个^[10]并且已被用于一些载体中以提高基因的表达水平。

2.2.4 多角体 (*polh*) 启动子的调节 多角体蛋白基因的转录起始是通过与非翻译前导区域有关的顺序来调节其活性。这些顺序在病毒感染后的最晚期对高水平的表达起着决定性的作用^[10]。是否有1个抑制结合位点来控制多角体蛋白基因的转录还不清楚。因此, 在感染后期缺少多角体蛋白基因的转录并不一定是抑制控制的结果。稳定形式 RNA的水平及报告蛋白的水平直接相关说明了多角体蛋白基因的表达是由转录来调节而不是由翻译来调节。然而, 翻译水平的调节也不能完全排除, 特别是所有的晚期及最晚期转录出的 RNA都有相同的5端, 这可能会影响到它们的翻译。

*p10*启动子的特征性研究较多角体蛋白启动子稍差些, 但根据它的分布及天然的启动子决定因素, 它的调节方式与多角体蛋白启动子的有相似之处。AcMNPV多角体蛋白基因 (*polh*) 及 *p10* TAAG侧翼的核苷酸顺序惊人的相似, 意味着这些顺序在最晚期与晚期的调节中扮演着一定的角色。

TAAG序列似乎是晚期启动子起始转录最原始的决定因素。*vp39*启动子实际有3个转录起始位点, 都位于 TAAG顺序内。如果将 TAAG位点缺失, 启动子转录就会马上停止。

2.2.5 启动子的移动及翻转 (Moving and Flipping Promoters) 晚期及最晚期启动子即使被移动到基因组的另一位置也可同样保持着其功能。例如多角体蛋白启动子在被翻转到基因组的相反方向也可保持着同样高的活性^[10]。将 *p10*及 *cor* 启动子移动到多角体蛋白启

动子区域内, 活性不受任何影响. 两个多角体蛋白启动子可尾接尾地放在一起同样保持着全活性. 两个启动子串联使用可增加其转录活性.

2.3 启动子的时间交叉

一些基因在感染过程中可在不同的时期进行表达, 例如 *p39*, *p35* 及 *gp64* 基因在早期及晚期都有转录起点; 晚期的起点包括有 TAAG 顺序^[11]. 同样的, IE-1 及 *p26 ORF* 的转录产物在感染过程中稳定地增加, 表明这些基因的转录至少在早期及晚期都存在.

2.4 基因重排对转录调节的影响

杆状病毒基因组的许多区域通常被转录为多个重叠的 RNA^[11]. 这些重叠的 RNA 相对于 ORF 可以是反向的也可以是正向的. 晚期的转录经常是同一个 5' 端不同的 3' 端. 对出现这些晚期重叠 RNA 可解释为在晚期有效识别多聚“ A” 及终止信号的转录机器失灵.

已有证据表明杆状病毒基因组中不同种基因的重排对基因的调节起着一定的作用. 多角体蛋白基因侧翼的两个 ORF 的转录分析证明了这一点. 相邻基因的转录可影响到其上游或下游基因的调节.

2.5 微型顺反子 (minicistron)

在 AcMNPV 基因中, 有 15 个微型顺反子, 分别紧接于一些大的 ORF 的翻译起始位点上游 80 bp 之内^[12]. 它们具备自己的起始密码子 ATG 和终止密码子, 一般仅编码几个至十几个氨基酸的多肽. 这些微型顺反子并不都与其下的大 ORF 同框. 不同框者, 其终止密码子位于大 ORF 内部, 并靠近大 ORF 的 5' 端; 或位于大 ORF 的上游. 微型顺反子 ATG 周围的序列全部符合 Kozak 规则, 但这些微型顺反子的具体功能目前尚不清楚. 1995 年, Kozak 指出, 它们的存在与下游 ORF 的翻译起始相关, 故推测它们与大 ORF 的翻译调控有关.

综合上述, 杆状病毒基因的调控是一个很复杂的过程, 关于其更细致的调控机理, 人们还在进一步研究当中.

参 考 文 献

- 1 Guarino L A, Dong W. Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhancer hr5. *Virology*, 1994, 200 328~ 335
- 2 Carson D D, Summers M D, Guarino L A. Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. *Virology*, 1991a, 182 279~ 286
- 3 Freemont P S, Hanson I M, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell*, 1991, 64 483~ 484
- 4 Yoo S, Guarino L A. Functional dissection of the *ie2* gene product of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1994b, 202 164~ 172
- 5 Guarino L A, Dong W. Expression of an enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *J Virol*, 1991, 65 3676~ 3680
- 6 Carson D D, Summers M D, Guarino L A. Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *J Virol* (b), 1991, 65 945~ 951
- 7 Huh N E, Weaer R F. Identification the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of

- the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Gen Virology (b), 1990, 71: 195~ 202
- 8 Passarelli A L, Miller L K. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression *ie1*, *ie2* and *lef-2*. J Virol (b), 1993, 67: 2149~ 2158
- 9 Todd J W, Passarelli A L, Miller L K. Eighteen baculovirus genes, including *lef-11*, *p35*, and *p47*, support late gene expression. J Virol, 1995, 69: 968~ 974
- 10 Ooi B G, Rankin C, Miller L K. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. J Mol Biol, 1989, 210: 721~ 736
- 11 Kool M, Vlak J M. Arch Virol, 1993, 130: 1~ 16
- 12 Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 1994, 202: 586~ 605

Regulation of Baculovirus

Lin Guangyun^{*} Shi Xianzhong Long Qingxin Wang Xunzhang

Abstract The present paper reports about the regulation of baculovirus over the past ten years. It has been found that the homologous regions in the genome of baculovirus are its *cis*-acting element or enhancer whose function is positive regulation; while the transactivator which is encoded by virus decides that baculovirus genes are transcribed in a regulated cascade. Six genes related to the regulation and 11 genes of expression factors in late phase are reported respectively.

Keywords regulation, *cis*-acting element, transactivator, regulated cascade

^{*} State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275