

核型多角体病毒 gp67 基因的研究^{*}

农 广 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要 核型多角体病毒是重要的杆状病毒,在其生活周期中存在有包涵体产生的病毒粒子和出芽病毒粒子两种形式的子代病毒。出芽病毒能有效地感染血腔细胞,并且发现,它的感染能力决定于病毒粒子囊膜上的 gp67 蛋白, gp67 蛋白为酸激发的膜融合作用所必需。gp67 蛋白还是囊膜上唯一由病毒编码的膜蛋白。序列分析表明, gp67 蛋白与木瓜蛋白酶同源,蛋白分子的主要功能区有 N 端的信号肽序列, C 端的转膜固着序列, 以及中间的外作用区域,膜融合作用区段位于外作用区域上。gp67 蛋白在胞质合成后,会发生寡聚化及糖基化其他。gp67 基因的转录存在有依赖于 TATA 盒和不依赖于 TATA 盒两种转录因子,并且这两种方式有部分重叠现象。利用 gp67 蛋白的基因工程正引起人们的重视。

关键词 核型多角体病毒,“出芽”病毒粒子, gp67 基因,膜融合作用

分类号 Q 75

核型多角体病毒 (nuclear polyhedrosis virus, NPV) 是一类重要的昆虫病原病毒,它的侵染寄主涉及不同目的几百种昆虫,尤其是鳞翅目。在分类学上,属于杆状病毒科 (Baculoviridae) 真杆状病毒亚科 (Eubaculovirinae) 的核型多角体病毒属。自然环境中,核型多角体病毒是以包涵体形式存在,包涵体由多角体蛋白组成,其内包埋有呈杆状的病毒粒子 (virion),包涵体在环境中非常稳定并能长时期保存活性。当包涵体被昆虫吞食而进入肠道,在高 pH 环境下迅速溶解并释放出病毒粒子,病毒粒子表面的囊膜与中肠上皮细胞微绒毛突起发生融合,核衣壳进入胞内并转运到细胞核,在核内核衣壳除去外膜并释放出病毒 DNA。感染后 8 h,病毒就开始第一轮子代核衣壳的复制,感染后 12 h,所产生的子代病毒有部分从核膜出芽进入胞质,并脱去来自核膜的外膜,再到达质膜并以“出芽”方式通过质膜,形成“出芽”病毒粒子 (budded virion, BV), BV 能感染很多组织的细胞 (如脂肪体 肌细胞 血腔细胞 上皮细胞等),并形成二次感染。NPV 生活周期的特点是形成两种不同侵染方式的病毒粒子,一种是由包涵体产生的病毒粒子 (polyhedra derived virus, PDV),另一种是“出芽”病毒粒子 (BV),这两种病毒粒子在囊膜来源,囊膜的蛋白构成及形态学,对不同组织和细胞的侵染性方面都有明显差异。PDV 囊膜专一与多角体蛋白作用并侵染中肠上皮细胞, BV 囊膜专一与血腔内的组织和细胞作用; PDV 对中肠细胞有高度侵染性,而在血腔中则感染力极低, BV 的表现则相反; PDV 侵染中肠是通过病毒的囊膜与中肠细胞微绒毛发

^{*} 国家自然科学基金 (39680029) 和广东省科学基金 (950039) 资助项目

收稿日期: 1997-01-31 农广,男,34岁,博士后

生融合而进入胞内, BV 则通过细胞内吞作用进入胞内. BV 和 PDV 的差异与它们的囊膜不同有关, BV 的囊膜来自细胞质膜, 并且含有由病毒编码的膜蛋白— gp67(亦有文献称作 gp64), PDV 的囊膜来自核膜, 并且没有 gp67 糖蛋白存在, 正是囊膜构成的差异引起它们在生物活性和表型上的差异. BV 囊膜的 gp67 蛋白独特的生物学特性正引起人们的重视, 本文拟就近年对 gp67 蛋白的分子生物学研究作一概述.

1 gp67 蛋白的一般生物学特性

gp67 蛋白是膜颗粒 (peplomers) 的组成成分, 是囊膜上唯一由病毒基因编码的蛋白, 集中出现在鼓槌状膨大的 BV 顶端, 病毒粒子上的膜颗粒结构是 BV 的特征性结构. gp67 蛋白在胞质中合成, 并插入到质膜上一定位置, 然后核衣壳在插入膜颗粒的质膜位置“出芽”, 形成在外膜含有 gp67 蛋白的 BV.

gp67 蛋白是一种酸性蛋白, 等电点 pI 为 3.15, 相对分子质量约在 64 000~70 000 范围, 成熟的蛋白发生糖基化、磷酸化, 相对分子质量中有 10 000 是由糖基化所产生, gp67 蛋白在依赖于 pH 的膜融合中起主导作用.

2 gp67 基因结构和功能

gp67 蛋白在侵染过程中的作用, 已有不少研究, 并且确认 BV 和 PDV 在血腔和中肠以及对培养细胞的感染活性差异是由于 gp67 存在的结果. 抗体中和试验表明 gp67 蛋白为酸激发的膜融合过程所必需. Monsma 等通过将 *lacZ* 插入到 AcMNPV 的 gp67 基因中, 导致基因失活, 并重组到基因组中, 重组病毒 (带有 *lacZ* 插入失活的基因替换野生型 gp67 基因) 转染表达 OpMNPV gp67 蛋白的细胞, 并在胞内组装成病毒粒子, 重组病毒虽然不能产生 gp67 蛋白, 但由于从感染的细胞中获得了 gp67, 因而这种病毒粒子能够感染 Sf9 细胞, 但它的子代病毒粒子缺乏细胞到细胞间的感染能力, 所形成的病毒包涵体能感染银纹夜蛾 (*T. ni*) 中肠细胞, 但是感染后不能进一步表现感染血腔细胞的能力, 研究结果直接证明 gp67 蛋白是病毒粒子的必要结构蛋白, 它是细胞间传染以及寄主昆虫全身感染所必需^[1].

到目前为止, 已知其 DNA 编码序列的四种 gp67 基因分别来自 AcMNPV, OpMNPV, CfMNPV 和 BmNPV^[2-4], 其中以 AcMNPV 和 OpMNPV 研究得较深入. gp67 基因在 AcMNPV 和 OpMNPV 基因组中的位置, 都是位于 hr4 和 hr5 两个增强子之间, 分别编码 509 和 511 个氨基酸的蛋白. 在蛋白的两端, 是高度疏水序列区, N 端的 17~20 个起始氨基酸残基在功能上还起到信号肽 (signal peptide) 作用, 引导蛋白经过内质网, 而信号肽在此过程中通常被切除掉^[2,3], 位于 C 端的疏水区是一段用于转膜的锚着序列 (transmembrane anchor sequence), 它使得糖蛋白固着在其后成为病毒粒子囊膜的质膜部分; gp67 蛋白的乙酰化发生在 C 端的疏水区, 由乙酰化连上的羟链对于决定蛋白酶的降解能力起重要作用.

两个疏水区之间为高度保守区, 比较 AcMNPV 和 OpMNPV, N 端或 C 端疏水区的氨基酸同源性只有 40%~59%, 而这两端夹着的保守区, 氨基酸同源性达到 83%. 保守区内有 5~7 个 N 糖基化位点, 夹在糖基化位点间的一段序列被认为是膜融合功能区, 223~228 位区域的氨基酸替换突变也证实了它对膜融合作用的决定作用^[5]. 在昆虫细胞系, gp67 糖基化在早期感染阶段合成 gp67 蛋白后 90 min 内完成, 后期则需要 150 min, 糖化作用有 N-糖基化 (N-glycosylation) 和 N 连系寡聚糖化 (N-linked oligosaccharide) 两种方式, 在任一

形式的糖基化过程中, gp67蛋白都能有效地转运到达细胞表面,而 N 糖基化对于有效转动是必需的, N 连系寡聚糖化却不是必需的,这两种形式的 gp67蛋白都能整合到子代的 BV 囊膜,只是整合到子代病毒粒子的 N 连系寡聚糖化的 gp67蛋白,对于 BV 最后的安装和出芽并不重要. 糖化作用的方式对于具感染性 BV 的产生以及 gp67的膜融合会有影响,正是 N 糖基化,而不是 N 连系寡聚糖化,为具感染力 BV 的有效产生所必需,对于 gp67的膜融合能力也是如此.

gp67蛋白在成熟过程中除了发生糖基化等修饰外,还会发生分子的寡聚化作用,并以三聚体形式存在,然而寡聚化的效率并不高,所合成的 gp67蛋白分子只有 33% 转化为三聚体,存留于细胞内的大量单体分子在合成后的 30~45 min 内会被降解,也有报道认为, gp67蛋白是以四聚体形式存在. gp67蛋白分子的寡聚化,与分子的外作用区域 (ectodomain) 中的高度疏水性区段 II (330~338 氨基酸残基间) 直接相关,其中存在 1 个由 7 个亮氨酸组成的疏水 α 螺旋结构,当单个丙氨酸替换其中 1 个亮氨酸时,对于 gp67的寡聚化、转运和融合功能并没有影响,而发生多个丙氨酸或脯氨酸的替换时, 7 个亮氨酸的 α 螺旋结构就会受到破坏,导致寡聚化作用和膜转运功能的丧失,缺失掉区段 II 亦会失去寡聚化作用,这些结果都说明寡聚化作用定位于区段 II 的亲水脂的 α 螺旋 (amphipathic α -helix) 内^[5].

3 BV 侵染的膜融合机制

BV 侵染细胞穿透细胞膜的内吞噬作用,是由 gp67 外被糖蛋白所介导,由低 pH 所激发的膜融合过程. gp67 定位突变研究显示,膜融合作用位点定位于区段 I (region I, 223~228 氨基酸残基间) 中. gp67 外作用区域内的疏水性区段 I,是由 6 个疏水氨基酸残基形成一个局部高度疏水性区域,将 226 和 227 位的两个亮氨酸用丙氨酸或天冬氨酸替代,中和或改变区段 I 的疏水性质,结果使酸激发的膜融合功能丧失,但不影响 gp67 的寡聚化和转运定位到膜表面的功能;将这两个亮氨酸的任一个用丙氨酸代替,使疏水性质稍有改变,膜融合功能并不会丧失,但酸激发融合所需的 pH 值比野生型所需的要低;用一段含有区段 I 的 21 个氨基酸肽段制备的多克隆抗体,能够中和 gp67 蛋白的膜融合功能,区段 I 对于 gp67 蛋白的膜融合作用是必要的^[5].

BV 侵染的膜融合作用,不仅决定于 gp67 蛋白,被侵染细胞的膜脂成分也有重要作用. 膜上的溶性脂能够阻遏膜融合的发生,而油酸 (oleic acid)、二十碳四烯酸 (arachidonic acid) 和单油酸甘油酯 (monoolein) 则有利于膜融合. 研究认为,膜融合除了 gp67 蛋白结合到膜并整合进去之外,还与膜脂的有效分子形状相关,膜双层的圆锥形不饱和脂肪酸能提高膜融合作用,而倒圆锥形的溶性脂则相反,并且还认为,在膜并合阶段,需形成一个具有净负弯曲、可随意弯折的柄状中间体,由此最终实现膜融合^[6].

关于膜融合作用,可概括为这样一个过程: gp67 蛋白介导生物学上的膜融合作用,其中包括酸激发作用和 gp67 蛋白结合到膜上的作用,这些过程并不依赖于膜脂成分,而是由 gp67 蛋白所决定. 当融合蛋白发生了结构变化后,其在脂双层的融合能力急剧上升,在随之发生的真正的膜与膜整合阶段仍然依赖于 gp67 蛋白,而此时 pH 值并没有影响,但膜脂成分的改变却能使融合发生可逆转的变化,溶性脂阻遏膜整合,而不饱和脂肪酸能增强融合作用.

4 基因的转录和表达

gp67基因转录和表达方面的研究集中在 OpMNPV 上,研究表明, gp67的转录有两种类型:起始于 gp67起始密码子上游 - 43 nt 处的单一早期启动子,另外是 4 个分别起始于 - 153, - 167, - 174 和 - 175 nt 处的晚期启动子. 将 gp67早期转录子的起始区与基因组的其它基因进行比较,发现有一个四核苷酸保守序列 CAGT;在启动子上游存在有 4 个 ATAAG 结构,4 个晚期启动子都位于这 4 个 ATAAG 的两个前面, gp67 基因由不同位点开始转录的 mRNA,都终止于同一位点^[3]. 通过缺失核苷酸分析,发现在 - 319 至 - 166 nt 之间存在 1 个负调控因子,在 - 166 至 - 77 nt 间,存在多个正调控因子;将位于 - 77 至 - 62 nt 间的 TATA 盒缺失掉,则会导致转录活性丧失,而维持基准水平的转录只需要从早期转录子起始位点上溯 34 个核苷酸的一段序列^[7].

gp67 基因的早期转录子是由寄主转录因子所激活,而寄主转录激活因子的结合区位于 TATA 盒上游 35 个核苷酸处左右的一段 24 b 序列,在这 24 b 序列中发现有 2 个保守的真核转录因子结合位点特征结构: GATA(- 114 nt)和 CACGTA(- 104 nt). 利用任一个含有 GATA 或 CACGTA 的寡核苷酸片段,或类似的点突变片段,进行竞争性转录表达试验,结果表明每个结合位点对于寄主转录因子的结合都是必需的,在 GATA 或 CACGTA 的任一个或两个序列造成突变,都会降低转录表达活性^[8].

除了依赖于 TATA 盒的转录, Kogan 等通过定位缺失和多点突变,去除 TATA 盒的功能后,发现存在不依赖于 TATA 盒的转录活性,并鉴定出 4 个不依赖于 TATA 盒的转录因子,其中 2 个是位于 - 114 nt 处的 GATA 和 - 104 nt 处的 CACGTG,它们也是依赖于 TATA 盒转录的寄主转录因子结合位点;第 3 个位点是保守的起始位点序列 CAGT,当某个核苷酸替换发生在 CAGT 中的前两个核苷酸时,对于转录的影响会相当明显,而替换发生在其内的后两个核苷酸时,就相对不太敏感;第 4 个转录因子位于早期 mRNA 的 5' 不翻译前导序列(5' UTR)内,其中的 10 b 序列缺失会导致不依赖 TATA 盒转录活性的丧失,这 10 个核苷酸位于翻译起始位点上游 - 30 至 - 20 nt 处,相应地在转录起始位点下游的 14~ 24 nt 处^[9].

在依赖 TATA 盒的转录因子和不依赖于 TATA 盒的转录因子中, GATA, CACGTA 及起始位点的 CAGT 序列在两类转录中都涉及到,只有 5' UTR 的 10 b 序列为不依赖 TATA 盒转录所特有,转录因子表现出部分重复现象.

5 gp67 蛋白的分子本质

DNA 序列同源性分析显示, gp67 蛋白与木瓜蛋白酶(papain)有一个片段的氨基酸序列有 32% 同源,并且 gp67 的序列明显受到一个移码突变的影响,但仍然具备编码一个功能酶分子的能力,在催化功能所必需的氨基酸部分以及二硫桥结构均表现出保守性; gp67 整个分子结构与木瓜蛋白酶相似,二级结构分析也显示保留有木瓜蛋白酶类似的 α 区域和 β - 区域,包括其中一个由第 25 位的半胱氨酸残基开始的长 α - 螺旋特征结构.

木瓜蛋白酶是一种半胱氨酸肽链内切酶. gp67 在功能方面显示,感染病毒后的 Sf9 细胞中,并没出现半胱氨酸肽链内切酶活性的增加;用半胱氨酸肽链内切酶失活因子处理,也未能对病毒的侵染活性发生影响. 如果不考虑 gp67 基因所编码的蛋白酶活性,可以认为

gp67是在病毒基因组中发现的一个木瓜蛋白酶类的蛋白分子^[10].

6 利用 gp67基因的遗传工程

在 gp67基因的遗传改造上,已经成功地利用 N端信号肽与外源基因融合,制造出新式实用的杀虫剂或建立有效表达外源产物的表达系统.

杆状病毒杀虫剂因为杀虫作用时间长,超过经济忍受阈限而限制它的应用范围,将昆虫专性的蝎子神经毒素重组到杆状病毒可克服这个问题,并获得了初步成功^[11,12]. 利用 gp67的信号肽序列与蝎子神经毒素构建融合蛋白,重组杀虫剂的优点是重组病毒侵染昆虫后,进行融合基因的表达,在 gp67的信号肽引导下,将蝎子神经毒素迅速分泌至胞外,作用于昆虫神经系统,从而使虫子迅速麻痹,并停止进食,然后重组病毒不断复制和侵染虫子的其它组织,与一般杆状病毒侵染作用一样,最终导致虫子死亡. 它的优点是 gp67基因的信号肽使蝎子神经毒素迅速分泌到胞外起作用,从而降低虫子的破坏作用.

杆状病毒和昆虫细胞系构成一个很好的体外表达系统,但外源基因的表达,往往出现表达量低,难于分泌到胞外的问题. 将 gp67的信号肽序列融合到外源基因,或替代外源基因的信号肽,在昆虫细胞中可以使得表达量显著提高,并能有效改善产物的分泌,在 HIV-1 gp120蛋白, IL-1受体蛋白和表面金属蛋白酶 GP63这些融合基因表达中,其产物都获得了明显的改善.

目前,本实验室利用 gp67外作用区域的区段 I膜融合功能,与苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白构建 Bt-gp67融合蛋白,利用杆状病毒 gp67蛋白的融合功能,构建能够扩大杀虫谱的新型杀虫晶体蛋白. 同时,还发现 gp67作为细胞接触到病毒的第一个信号,在诱导细胞凋亡作用中可能担当重要的作用.

gp67蛋白是杆状病毒生活周期中一个很有特色的蛋白,它在 BV 的侵染作用中有着重要的作用,还有它在侵染及表达方面表现出的优越性,都正引起人们对它的重视,深入开展 gp67蛋白及其基因的研究会是一件有意义的工作.

参 考 文 献

- 1 Monsma S A, Oomens A G, Blissard G W. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell to cell transmission of infection. *J Virol*, 1996, 70 4607~ 4616
- 2 Whitford M, Stewart S, Kuzio J, et al. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 1989, 63 1393~ 1399
- 3 Blissard G W, Rohrmann G F. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1989, 170 527~ 555
- 4 Hill J E, Faulkner P. Identification of the gp67 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*, 1994, 75 1811~ 1813
- 5 Monsma S A, Blissard G W. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. *J Virol*, 1995, 69 2583~ 2595

- 6 Chernomordik L, Leikina E, Cho M S, et al. Control of baculovirus gp64-induced syncytium formation by membrane lipid composition. *J Virol*, 1995, 69 3049~ 3058
- 7 Blissard G W, Rohrmann G F. Baculovirus gp64 gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. *J Virol*, 1991, 65 5820~ 5827
- 8 Kogan P H, Blissard G W. A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTA and GATA elements. *J Virol*, 1994, 68 813~ 822
- 9 Kogan P H, Chen X Y, Blissard G W. Overlapping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene. *J Virol*, 1995, 69 1452~ 1461
- 10 Rawlings N D, Pearl L H, Buttle D J. The baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome includes a papain-like sequence. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1992, 373 1211~ 1215
- 11 Stewart L M D, Hirst M, Ferber M L, et al. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature*, 1991, 352 85~ 88
- 12 庞义, 姚斌, 范云六, 等. 利用蝎毒基因改良杆状病毒杀虫剂. *昆虫天敌*, 1995, 17: 90~ 92

Molecular Biology and Function of gp67 Gene in Nuclear Polyhedrosis Virus

Nong Guang* Pang Yi

Abstract Nuclear polyhedrosis virus (NPV) is subject to Baculovirus. A unique feature of the NPV life cycle is the production of two virions polyhedra-derived virus (PDV) and “budded virus” (BV). BV may infect many cell types and is much more infectious than PDV within hemocoel. GP67 on the membrane of virion envelope is the determinant in infection. It has been shown to mediate acid triggered membrane fusion. gp67 is the only membrane protein encoded by viral genome. With sequence analysis it shows that gp67 is homologous to papain. The gp67 gene contains a signal peptide sequence at the N-terminus, a transmembrane anchor at the C-terminus, and a ectodomain between them. The membrane fusion region were localized within the ectodomain. After the biosynthesis in cytoplasm, gp67 was oligomerized and processed to be gp67 glycoform. Four sequence elements were identified to be involved in transcriptional activities. The gp67 early promoter contains overlapping TATA-dependent and TATA-independent transcriptional activities. At present, more attention is being paid to the genetic engineering of gp67 gene.

Keywords nuclear polyhedrosis virus, “budded virus”, gp67 gene, membrane fusion

* State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275