

### 植物呼肠孤病毒研究的最新进展

龚祖坝      彭海

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海200031)

S432.41

### Research Advance on Plant Reoviruses

Gong Zuxun , Peng Hai

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

**关键词:** 植物呼肠孤病毒 病毒的蛋白质 依赖RNA的RNA聚合酶 病毒基因组的结构

**Key words:** Plant reoviruses      Viral proteins      RNA-dependent RNA Polymerase organization of viral genomes

植物呼肠孤病毒是一类形态复杂、具有多种病毒结构蛋白及片段化双链RNA基因组的病毒, 一直受到病毒学家的注意。植物呼肠孤病毒对媒介昆虫的侵染不表现细胞病理

表 1. 植物呼肠孤病毒  
Table 1. Plant Reoviruses

亚组 1 Subgroup 1	植物呼肠孤病毒属 Phytoreovirus
	伤瘤病毒 Wound tumor virus (WTV)
	水稻矮缩病毒 Rice dwarf virus (RDV)
	水稻瘿瘤矮缩病毒 Rice gall dwarf virus (RGDV)
亚组 2 Subgroup 2	斐济病毒属 Fijivirus
	斐济病病毒 Fiji disease virus (FDV)
	玉米粗矮病毒 Maize rough dwarf virus (MRDV)
	马塘草矮化病毒 Pangola stunt virus (PSV)*
	水稻黑条矮缩病毒 Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)*
	燕麦不育矮缩病毒 Oat sterile dwarf virus (OSDV)
亚组 3 Subgroup 3	可能的属 Possible Genus
	水稻齿叶矮缩病毒 Rice ragged stunt virus (RRSV)
	稗齿叶矮缩病毒 Echinochloa ragged stunt virus (ERSV)

\* 可能为玉米粗矮病毒的地理小种。Probable geographical races of MRDV.

本文于1992年7月1日收到, 9月18日修回。



性变化,但对植物寄主的侵染能表现出各种不同的病症,有些还是组织专一性的。由于它们既能在寄主植物内又能在媒介昆虫的组织或培养细胞中复制,因此是一类研究病毒-媒介昆虫-植物寄主之间关系的极好对象。根据近年来的研究,考虑到病毒基因组片段的数目及其电泳行为、病毒壳体的形态、血清学关系和媒介昆虫的同一性,植物呼肠孤病毒可分为三个亚组,其中第三亚组为目前尚未能明确归属分类的病毒。三个亚组的成员见表1。

### 一、病毒的蛋白质

尽管植物呼肠孤病毒的结构和形态较为复杂,但近年来对病毒蛋白质组成的研究仍有一定的进展。纯化的植物呼肠孤病毒颗粒有6至8个病毒编码的结构蛋白,大部分已知的结构蛋白已在病毒颗粒中定位(表2)。

除结构蛋白外,病毒的基因组还编码一些在被感染细胞中表达的非结构蛋白。被WTV感染的AC20培养细胞用<sup>35</sup>S-甲硫氨酸标记后,其溶胞产物经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析可区分出五种非结构蛋白<sup>[1]</sup>。我们用体外翻译的方法也证明,RRSV的基因组除编码结构蛋白外还编码几种非结构蛋白<sup>[9]</sup>。

植物呼肠孤病毒含有数种与病毒基因组的合成和转录后加工有关的酶活性。到目前为止,在植物呼肠孤病毒分属三个亚组的病毒颗粒中都已发现含有依赖RNA的RNA聚合酶(即转录酶)活性。在第一亚组所有三个已知成员的病毒制剂中都测出了这种酶活性<sup>[10,14]</sup>。日本的Uyeda等<sup>[16,18]</sup>和我们<sup>[11]</sup>分别发现第三亚组的RRSV的亚病毒颗粒含有这种酶活性。第二亚组曾在FDV诱导的甘蔗瘿瘤组织抽提物中测到这种酶活性<sup>[18]</sup>,最近,意大利的Marzachi等<sup>[19]</sup>用体外转录的方法直接检测到这个亚组的另一成员MRDV也含有这种酶活性。这些病毒的RNA聚合酶体外活性的最适条件见表3。有报道WTV的病毒制剂含有与RNA戴帽(capping)有关的甲基转移酶(methyltransferase)<sup>[21]</sup>,但在其它植物呼肠孤病毒中尚未发现。至今这些酶功能与哪个病毒编码的蛋白有关还未确定。

表3. 植物呼肠孤病毒RNA聚合酶体外活性的最适条件

Table 3. Optimum conditions of in vitro assay of RNA polymerase activity of plant reoviruses

病毒 Virus	温度(°C) Temperature	酸碱度 pH	氯化镁浓度 MgCl <sub>2</sub> (mmol/L)	文献 Reference
伤瘤病毒 WTV	28—30	8.2—8.5	7.5	[10] [12]
水稻矮缩病毒 RDV	35	8.5—9.0	4.0	[11] [20]
水稻瘿瘤矮缩病毒 RGDV	25	8.0—8.5	2.0	[14]
斐济病病毒 FDV	35	8.5—9.0	8.0	[18]
玉米粗矮病毒 MRDV	20	8.0—8.5	4.0	[19]
水稻齿叶矮缩病毒 RRSV	3.0—4.0	8.0—8.5	6.0—8.0	[16] [17]

## 二、病毒的基因组

所有植物呼肠孤病毒的基因组都由10或12条双链RNA(dsRNA)组成。由于分子克隆技术的发展,近年来植物呼肠孤病毒基因组的cDNA克隆已被用来测定病毒基因在宿主细胞中的表达、确定病毒编码的多肽与基因组片段的相关性、研究与片段化RNA基因组分检(sorting)和包装有关的机制以及测定基因组片段的序列。关于每个基因组片段是如何有选择性地包裹于病毒颗粒中的问题,目前正吸引着很多实验室的注意力,但对这些片段在病毒颗粒内部排列的构象还知之甚少,看来这比单基因组的构象问题更加复杂,况且后者至今也还是个“谜”,因此要阐明这一机制还需更多的实验证据。这里着重介绍基因结构方面的研究进展。

### 1. 第一亚组

植物呼肠孤病毒第一亚组(即植物呼肠孤病毒属)成员的基因组都是由12个dsRNA片段组成的。这个亚组是目前研究得最多、最深入的一个亚组。

#### 1) WTV

自1985年 Asamizu 等<sup>[22]</sup>成功地建立了 WTV 的 cDNA 文库并提供了 12 个基因片段中 9 个全长 cDNA 克隆以及三个最大片段的部分克隆以来,利用这些克隆已做了多方面的研究。所有 12 个基因组片段的末端序列和其中 9 个片段的全序列已被测定<sup>[22-27]</sup>。对这些序列的分析结果表明, WTV 的基因组具有下列特点<sup>[28]</sup>,

(1) 所有编码正链的 5' 端和 3' 端都有分别由 6 个和 4 个核苷酸组成的相同的保守序列;

(2) 紧接保守序列后, 两端各有 6 至 14 个片段专一的反向重复序列 (inverted repeats, IR);

(3) 除片段 S12 外, 其余片段的编码区都只有一个阅读框架。

已知全序列的九个基因片段的基因结构通式如图 1 所示,

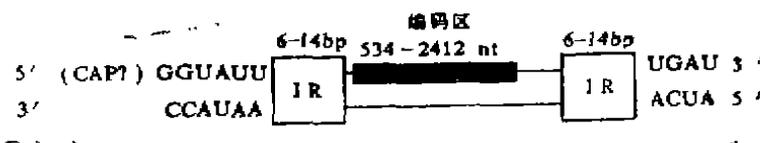


图 1. WTV 基因组片段的基因结构通式

Fig 1. The general organization of WTV genomic segments

这九个片段中 S5、S7、S8 和 S11 编码结构蛋白, 其余的编码非结构蛋白<sup>[28]</sup>。S12 在第一个阅读框架下游 102 个核苷酸处存在一个含 40 个密码子的短阅读框架<sup>[22]</sup>, 但目前没有证据证明它能够进行表达。

近年来对 WTV 的缺损性干扰 (defective interfering, DI) 颗粒的研究也有很大进展。对缺损性干扰颗粒基因序列的研究提供了不少关于病毒复制和包装机制的信息。多方面的研究证明基因组片段的中间部分对病毒的转录、复制和包装是不重要的。例如, 对 S5 (2613bp) 的研究表明, 复制和包装所需的序列位于正链 5' 端的 319 个碱基对和 3' 端的 205 个碱基对之中<sup>[23]</sup>。

## 2) RDV

1987年至今, RDV的12个基因组片段中已有九个(S3-S11)的全序列已经测定<sup>[39-43]</sup>。最近, 所有12个片段的末端序列也已测得<sup>[39]</sup>。从序列分析的结果来看, 其3'和5'端均有与WTV相似的保守顺序; 3'端除S9有一个核苷酸的差异外与WTV完全一致, 5'端则与WTV有2或3个核苷酸的差异。除此以外, RDV还存在长度和位置上与WTV极为相似的片段专一反向重复序列。

已知全序列的9个片段中除S11外均只有一个阅读框架。S11的正链中有一个大的阅读框架, 从第一个起始密码(第6—8个碱基)开始共567个碱基, 此外, 在这个阅读框架内还有第二个起始密码(第30—32个碱基), 用体外转录和翻译系统可以得到与之相应的两种多肽<sup>[38]</sup>, 但还没有这两种多肽均能在体内表达的证据。

RDV的基因组片段和表达产物之间的对应关系尚未完全阐明, 目前已知S8编码的是病毒的40KD外壳蛋白<sup>[32]</sup>, S3和S7分别编码114KD和60KD的病毒核心结构蛋白<sup>[38, 37]</sup>。

## 3) RGDV

最近, RGDV的12个基因组片段中有3个(S8-S10)的全序列已测定<sup>[40, 41]</sup>, 所有12个片段的末端序列也已测定<sup>[39]</sup>。序列分析的结果表明, RGDV的末端保守序列除3个片段的5'端序列有一个核苷酸的差异外与WTV完全一致。此外, 已测得全序的3个片段也有与WTV十分相似的反向重复序列。这3个片段都只有一个阅读框架, 目前仅确定S8编码47KD的外壳蛋白<sup>[41]</sup>。

## 2. 第二亚组

植物呼肠孤病毒第二亚组(即斐济病毒属)成员的基因组含10个dsRNA片段。目前仅RBSDV的S10<sup>[42]</sup>和MRDV的S6<sup>[43]</sup>测定了全序列, MRDV的S7和S8测定了部分序列<sup>[43]</sup>。从所得的结果来看, 和第一亚组一样, MRDV的三个片段在5'和3'端都有末端保守序列和相邻的反向重复序列, RBSDV基因组片段S10的5'端和3'端的序列与MRDV几乎完全一致。由于RBSDV和MRDV在很多性质(如血清学、基因组的电泳行为、媒介昆虫等)上非常相似, 因此对MRDV和RBSDV的基因序列进行仔细的比较后将会进一步确定这两种病毒之间的关系。

MRDV的基因组片段S6(2193bp)经序列分析发现含有两个分别由363和310个密码子组成的不重叠阅读框架, 并为体外翻译实验所证实, 但以全长的编码链作模板仅位于5'端的阅读框架能有效地表达, 其产物为—40KD的多肽<sup>[43]</sup>。这一特性和第一亚组的已知研究结果不同, 因而这个亚组可能有与第一亚组不同的基因表达调控机制。

## 3. 第三亚组

植物呼肠孤病毒第三亚组的成员目前仅有RRSV和ERSV两个, 其中RRSV研究得较多。它们的基因组也是由10个dsRNA组成, 但其电泳行为与第二亚组有较大的差别。我们用变性的基因组dsRNA直接进行体外翻译的方法, 初步确定了RRSV的基因组片段与其表达产物的对应关系<sup>[44]</sup>, 这在植物呼肠孤病毒的研究中尚属首次。

1991年底, 在美国召开的由洛氏基金会支持的水稻生物工程国际会议上, 澳大利亚的Upadhyaya宣称已获得RRSV的S6—S10五个dsRNA基因组片段的全序列<sup>[45]</sup>。但关于序列分析的详细情况尚未见公开报道。

最近报道,用直接RNA测序法已确定了RRSV的全部10个基因组片段的末端序列<sup>〔11〕</sup>,分析结果表明与其它两个亚组的末端保守序列有很大的差别。表4比较了这些末端保守序列,可以看出,每个亚组内成员间的末端序列都很相似,可认为是同源的,而亚组之间则有较大的差别,因此将植物呼肠孤病毒分为三个亚组看来是合理的。

表 4. 植物呼肠孤病毒基因组片段末端序列比较

Table 4. Comparison of terminal sequences of genomic segments of plant reoviruses

病 毒 Virus	序 列 Sequence
亚组 1 Subgroup 1	
伤痂病毒 (22) WTV	5' GGUAUU— —UGAC 3'
水稻矮缩病毒 (39) RDV	5' GGUAAA— —UGAC 3'
水稻瘠瘠矮缩病毒 (39) RGDV	5' GGUAUU— —UGAU 3'
亚组 2 Subgroup 2	
水稻黑条矮缩病毒(S10) (42) RBSDV(S10)	5' NAGUUUUUU— —UGUC 3'
玉米粗矮病毒(S8-S8) (43) MRDV(S8-S8)	5' AAGUUUUUU— —UGUC 3'
亚组 3 Subgroup 3	
水稻齿叶矮缩病毒 (46) RRSV	5' GAUAAA— —GUGC 3'

由于至今所有研究过的植物呼肠孤病毒的基因组片段都有相同或相似的末端序列和反向重复序列,因此可以推断这些保守序列具有非常重要的功能。

## 参 考 文 献

- 〔1〕 Nuss, D.L. and Peterson, A.J., 1980, *J. Virol.* 34: 532-541.
- 〔2〕 Reddy, D.V.R. and MacLeod, R., 1978, *Virology* 70: 274-282.
- 〔3〕 Kimura, I. et al., 1987 *J. Gen. Virol.* 68: 3211-3215.
- 〔4〕 Nakata, M. et al., 1978., *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 44: 288-298.
- 〔5〕 Omura, T. et al., 1985, *J. Gen. Virol.* 66: 811-815.
- 〔6〕 Boccardo, G. and Milne, R.G., 1975, *Virology* 68: 79-85.
- 〔7〕 Chen, C.C. et al., 1989, *Intervirology* 30: 278-284.
- 〔8〕 Hagiwara, K. et al., 1986. *J. Gen. Virol.* 67: 1711-1715.
- 〔9〕 陆惠华等, 1987, 生物化学与生物物理学报 19: 354-358.
- 〔10〕 Black, D.R. and Knight, C.A., 1970, *J. Virol.* 6: 194-198.
- 〔11〕 Kodama, T. and Suzuki, N., 1973, *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 39: 251-258
- 〔12〕 Reddy, D.V.R. et al., 1977, *Virology* 80: 356-381.
- 〔13〕 Nuss, D.L. and Peterson, A.J., 1981, *Virology* 114: 399-404.
- 〔14〕 Yokoyama, M. et al. 1984, *J. Gen. Virol.* 65: 533-538.
- 〔15〕 Uyeda, I. et al., 1987., *Ann. Phytopath. Soc. Jap.* 53: 60-62.
- 〔16〕 Lee, S.Y. et al., 1987, *Intervirology* 27: 189-195.
- 〔17〕 陆惠华等, 1988, 中国科学B辑(3): 271-274.

- [18] Ikegami, M. and Francki, R.I.B., 1976, *Virology* 70: 292-300.
- [19] Marzachi, C. et al., 1990, *J.Gen.Virol.* 71: 707-711.
- [20] Uyeda, I. and Shikata, E., 1984, *Virus Res.*(1): 527-532.
- [21] Nuss, D.L., 1984, *Adv.Virus Res.* 29: 57-93.
- [22] Asamizu, T. et al., 1985, *Virology* 144: 398-409.
- [23] Anzola, J.V. et al., 1987, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84: 8301-8305.
- [24] Anzola, J.V. et al., 1989, *Virology* 171: 222-228.
- [25] Anzola, J.V. et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 3300.
- [26] Dall, D.J. et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 3599.
- [27] Xu, Z. et al., 1989, *Virology* 170: 511-522.
- [28] Nuss, D.L. and Dall, D.J., 1990, *Adv.Virus Res.* 38: 249-308.
- [29] Uyeda, I. et al., 1987, *Proc.Jpn.Acad.Ser.B* 63: 227-230.
- [30] Omura, T. et al., 1988, *J.Gen.Virol.* 69: 227-231.
- [31] Uyeda, I. et al., 1989, *J.Gen.Virol.* 70: 1297-1300.
- [32] Omura, T. et al., 1989, *J.Gen.Virol.* 70: 2759-2764.
- [33] Suzuki, N. et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 8858.
- [34] Fukumoto, F. et al., 1989, *Archives of Virology* 107: 135-139.
- [35] Suzuki, N. et al., 1990, *Virology* 179: 446-454.
- [36] Suzuki, N. et al., 1990, *Virology* 179: 455-459.
- [37] Nakashima, K. et al., 1990, *J.Gen.Virol.* 71: 725-729.
- [38] Suzuki, N. et al., 1991, *J.Gen.Virol.* 72: 2233-2237.
- [39] Kudo, H. et al., 1991, *J.Gen.Virol.* 72: 2857-2856.
- [40] Koganezawa, H. et al., 1990, *J.Gen.Virol.* 71: 1861-1863.
- [41] Noda, H. et al., 1991, *J.Gen.Virol.* 72: 2837-2842.
- [42] Asuhata, F. et al., 1990, *J.Fac.Agric.Hokkaido Univ.* 64: 183-189.
- [43] Marzachi, C. et al., 1991, *Virology* 180: 518-526.
- [44] 陆惠华等, 1990, *病毒学报*(6): 167-172.
- [45] Upadhyaya, N.M. et al., 1991, Abstracts of 5th Annual Meeting of the International Program on Rice Biotechnology 92.
- [46] Yan, J. et al., 1992, *J.Gen.Virol.* 73: 785-789.