

98 | 975/975: 300  
丙型肝炎病毒翻译及调控机制

唐时幸

R 373.21

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

## The Mechanism of Translation Regulation of Hepatitis C Virus

Tang Shixing

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

**关键词** 丙型肝炎病毒, 翻译, 调控**Key words** Hepatitis C virus, Translation, Regulation

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是单股正链 RNA 病毒,有单一阅读框架,编码约 3 010 个氨基酸的病毒前体蛋白。HCV 基因组结构和病毒蛋白的亲疏水性与黄病毒相似,因此将其归于黄病毒科丙型肝炎病毒群<sup>[1]</sup>。与黄病毒不同的是,HCV 5'非编码区(noncoding region, NCR)较长,有 332~341 个碱基,含 3~5 个 AUG 密码子,可形成稳定的二级结构(图 1)<sup>[2]</sup>。黄病毒的 5'NCR 仅 95~132 个碱基,没有 AUG 密码子,但其 RNA 5'端有一“帽子结构”(cap structure)m<sup>7</sup>GpppAmp,采用“依赖帽子的扫描机制”(cap-dependent scanning mechanism)翻译,而 HCV RNA 5'端没有类似的帽子结构,其翻译机制类似于小 RNA 病毒(piconaviruses)的“内部起始”(internal initiation)翻译机制<sup>[3-4]</sup>。

**1 HCV 的内部起始翻译机制**

首先发现 HCV 内部起始翻译机制的是 Tsukiyama-Kohara,他们在 1992 年发表的研究结果显示,在 HeLa S3 细胞融解物或兔网织红细胞(RRL)融解物制备的体外无细胞翻译系统中,由 HCV 5' NCR 和 core、env 基因组成的表达载体能有效地表达病毒蛋白 C 和 E;当系统中加入甲基转移酶的竞争抑制剂—S 腺苷同型半胱氨酸(SAH),以抑制 RNA 5'端帽子结构的甲基化后,HCV 蛋白的翻译不受影响,说明 HCV 5' NCR 介导的翻译是非依赖 5'端帽子结构的。进而,作者构建了含氯霉素乙酰转移酶(CAT)和 HCV 基因的双顺反子重组体,并用柯萨奇病毒(CV B1)感染 S3 细胞以抑制依赖帽子的宿主蛋白翻译系统,结果证实位于 HCV 5' NCR 上游的 CAT 基因表达受到抑制,而下游 HCV 基因表达正常,说明 HCV 5' NCR 所指导的 HCV 的基因的翻译,采取了不同于核糖体扫描的内部起始的翻译机制<sup>[3]</sup>。同年,Wang 等报告了用 HCV RNA 转染 HepG2 细胞,研究 HCV 在体内的翻译机制。他们采用经典的双基因策略,将 HCV 5' NCR 插入两个报告基因 CAT 和荧光素(LUC)之间,构建了 5' CAT - 5' NCR - 5' LUC - An 重组体,转染 HepG2 细胞,CAT 和 LUC 基因都能有效地表达,说明在体内 HCV 5'

NCR 仍然以内部起始方式控制下游基因的翻译<sup>[4]</sup>。此外,他们用脊髓灰质炎病毒(poliiovirus, PV)感染 HepG2 细胞,由于组成 e-IF4F 的 P220 蛋白被切割而失活,宿主蛋白合成终止, CAT 基因表达受抑制,但 HCV 5' NCR 控制的 LUC 基因在感染或未感染细胞中的表达效率相似,再次从体内实验角度验证了 Tsukiyama-Kohara 等的结果。1994 年 Iizuka 等在酵母细胞提取物中证实了 HCV 5' NCR 介导的内部起始翻译机制<sup>[5]</sup>。1995 年 Lu 等用 HCV 5' NCR 取代 PV 5' NCR IRES,构建了嵌合病毒,结果 HCV 5' NCR 不但指导了病毒蛋白的正确表达,还形成了能稳定传代并产生噬斑(plaques)的活病毒<sup>[6]</sup>。上述结果都一致表明,HCV RNA 的翻译机制与小 RNA 病毒相似,5' NCR 含有 IRES,与核糖体内部结合以控制病毒蛋白表达,而不同于细胞 mRNA 的核糖体扫描翻译机制。

## 2 HCV IRES 的定位

各种缺失和插入突变方法被用来确定 HCV IRES 的 5' 端和 3' 端边界。最初的研究显示 HCV 5' NCR 5' 端缺失 101 个碱基都不影响其翻译效率<sup>[3]</sup>,但后续的研究表明完整的 5' NCR 具有更高的翻译效率<sup>[7]</sup>。也有研究显示 5' 端 1~45 个碱基区对翻译效率影响不大,尤其是 1~29 个碱基区形成的发夹结构对翻译有一定的抑制作用<sup>[8,9]</sup>。但 Wang 等比较了含 5' NCR 全序列和 29~332 碱基突变序列重组体的翻译效率,结果没有明显差异<sup>[10]</sup>,提示 5' 端发夹结构没有抑制作用。Reynolds 等应用点突变方法发现,HCV 5' NCR 最靠 5' 端的 AUG 对 HCV 翻译调控功能的至关重要作用,该 AUG 序列在所分离的 HCV 株中也是保守不变的,该位点可能代表了 HCV IRES 的 5' 端边界<sup>[11]</sup>。从 HCV 5' NCR 的空间结构看,IRES 的 5' 端边界位于 II 区  $\alpha$  分枝前。

至于 IRES 3' 端边界的确定,各研究结果比较相似,都显示起始 AUG 密码子上游序列是控制翻译的重要部位,任何碱基的缺失或插入都可能影响翻译效率<sup>[10]</sup>。但最近的研究表明,紧靠起始 AUG 密码子下游的部分编码基因(10~30 个碱基)对翻译效率有一定影响,因此这部分编码序列也应包括在 HCV IRES 内而作为 IRES 的 3' 端<sup>[6~11]</sup>,对此尚有不同的看法。

## 3 HCV 5' NCR 和 core 序列对 IRES 的影响

### 3.1 嘌呤区段对翻译起始的影响

早期对小 RNA 病毒 IRES 的研究表明,5' NCR 中都存在一个十分保守的嘌呤区段(pyrimidine tract),其后是 AUG 密码子,组成特征性的  $Y_n-X_m-AUG$  结构( $Y_n$  代表了多个嘌呤碱基组成的嘌呤区段, $X_m$  代表了  $Y_n$  与 AUG 之间的间隔碱基),直接影响 IRES 功能<sup>[12]</sup>。对比研究发现,HCV 5' NCR 的 -222~-212 以及 -151~-143 碱基区也有两个嘌呤区段 Py I 和 Py II。所不同的是,Py I 后没有紧接 AUG 密码子。但从计算机模拟的 5' NCR 空间结构图(图 1A)看,它与下游 -27~-19 序列互补后,相隔约 20 个碱基就是起始 AUG,从空间结构上具备了上述  $Y_n-X_m-AUG$  结构。Py II 位于 III 区顶环,与其后的 AUG 相隔约 16 个碱基,是一个典型的  $Y_n-X_m-AUG$  结构。但采用碱基突变方法研究它在翻译调控中的作用时发现,它们本身都不是发挥 HCV IRES 功能所必须的。尤其是 Py II 碱基同临近序列均不匹配,又位于 5' NCR 空间结构的外部,显然与 IRES 关系不大。如果是 Py I 碱基突变,改变了碱基间的配对和 5' NCR 的二、三级结构,则将直接影响 HCV 的翻译功能。相反,Wang 等采用互补突变方法,Py I 与下游临近序列因共变异(covariance)而不改变已有的空间螺旋结构,则 IRES 的翻译效率不受影响<sup>[10]</sup>。说明嘌呤区段核酸序列本身并非组成 IRES 的必要成份,但它与临近序列配对形成的空间结构是维持 IRES 的重要因素,在

IRES 介导的翻译调控中具有重要作用

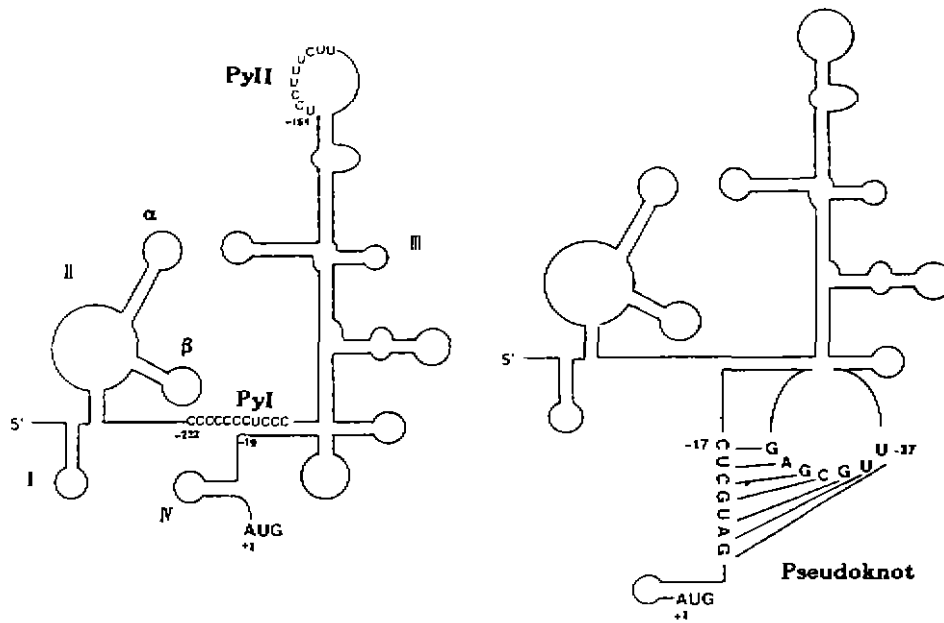


图 1 计算机模拟的 HCV RNA 5'NCR 二级结构(A)和假结结构(B)

Fig 1 Map of the computer predicted RNA structure of the 5'NCR of HCV RNA (A) and the predicted pseudoknot structure in the 5'NCR of HCV RNA (B)

3.2 假结结构对 HCV IRES 的影响 从图 1B 可以看出, -37~-31 与下游 -17~-11 碱基间的匹配,加上上述 Py I 与 -19~-24 碱基区互补而共同形成一假结结构(pseudoknot)。Wang 等采用点突变方法破坏假结结构中的碱基配对,重组体的翻译功能被破坏;如果碱基突变维护了碱基间的配对和假结结构,其翻译功能会重新修复。最近有关瘟疫病毒翻译机制的研究也发现,类似的假结结构在翻译调控中具有至关重要的作用,可能是组成 IRES 的关键成份<sup>[13]</sup>。小 RNA 病毒以及传染性支气管炎病毒 RNA3 也可能含有类似的假结结构<sup>[14-16]</sup>,推测 HCV 5'NCR 中的假结结构可能是核糖体的有效结合部位,或者是与内部翻译起始相关的起始因子的结合部位。

3.3 HCV 5' NCR 的完整性与翻译调控的关系 HCV 5' NCR 中包含多个杆环样的发夹结构。通过缺失突变发现,除 I 区杆环结构对 IRES 作用不大、甚至可能有抑制作用外,其它部位都是必要的。尽管象 III 区与 IRES 可能没有直接关系,并非其直接组成成份,缺少 III 区也同样影响翻译效率,说明 IRES 并非碱基的基本序列或者是某一位点,而是整个 5'NCR 相互作用形成的空间结构<sup>[8,10]</sup>,这一结构能有效地结合核糖体,成为翻译的起始部位。

3.4 HCV core 基因对翻译效率的影响 Reynolds 等构建了含不同大小 HCV core 基因的重组体,研究 HCV core 基因序列对翻译效率的影响。结果发现缺少 core 基因的重组体在体外和体内的翻译效率都非常低,而在 5'NCR 和报告基因之间加入 core 基因后<sup>[6]</sup>,翻译效率明显

增加。说明 core 基因是 IRES 的有效成份,并因此确定 IRES 的 3'末端在 HCV 354~372 碱基之间,即 HCV 起始 AUG 下游 12~30 个碱基<sup>[11]</sup>。Lu 等用 HCV 5'NCR 和 core 基因取代 PV IRES 序列,构建了一系列嵌合病毒,结果发现缺少 core 基因的嵌合病毒 PV/HCV 335 在体外的翻译效率非常低,感染 HeLa 细胞后也不能产生活病毒和表达病毒蛋白。相反,加入 core 基因 8 个和 123 个氨基酸的嵌合病毒 PV/HCV356 和 PV/HCV701,都能产生活病毒和噬斑。尤其是 PV/HCV 701 嵌合病毒产生的噬斑大,病毒滴度也高。但 PV/HCV 701 中 core 序列发生移码或部分缺失突变后,病毒滴度较前分别降低 1~2 个数量级,产生的噬斑也减小<sup>[6]</sup>,说明 HCV core 基因对发挥 HCV IRES 的功能至关重要。关于 HCV core 基因的作用,一方面可能是组成 IRES 的有效成份,促进 IRES 功能的发挥;另一方面,HCV core 蛋白是一种碱性蛋白,本身具有结合 RNA 和核糖体的功能,因此作为一个翻译激活因子。值得注意的是,含 HCV core 全基因的嵌合病毒 PV/HCV 905 同 PV/HCV 335 一样都是缺损病毒(defective virus),既不能复制,又不能产生噬斑和病毒蛋白,可能是 HCV core 蛋白 C 端的信号肽序列对病毒复制的抑制所致,以前的研究也发现将信号肽插入 PV 基因,可完全抑制病毒的复制。

综上所述,象小 RNA 病毒一样,HCV 5'NCR 含有类似的 IRES 功能区,以内部起始方式调控病毒蛋白的翻译。HCV 5'NCR 与下游 core 基因的相互作用,形成稳定的空间结构,能更有效地发挥 IRES 功能。但对于可能参加翻译调控的蛋白因子及其作用部位、HCV core 基因及其表达产物的作用及机制、HCV 不同基因型之间可能存在的翻译效率的差异及其分子基础等,仍需广泛深入地研究。

### 参 考 文 献

- 1 Plagemann P G W. Hepatitis C virus. *Arch Virol*, 1991, 120: 165~180
- 2 Brown E A, Zhang H, Ping L H *et al*. Secondary structure of the 5' untranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 5041~5045
- 3 Tsukiyama-Kohara K, Izuka N, Kohara M *et al*. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, 1992, 66: 1476~1483
- 4 Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome binding mechanism. *J Virol*, 1993, 67: 3338~3344
- 5 Iznka N, Najita L, Franzusoff A *et al*. Cap-dependent and cap-independent translation of mRNA in cell-free extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1995, 14: 7322~7330
- 6 Lu H-H, Wimmer E. Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1412~1417
- 7 Fukushi S, Katayama K, Kuribara C *et al*. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem Biophys Res Comm*, 1994, 199: 425~432
- 8 Rijnbrand R, Bredenbeek P, van der Straaten T *et al*. Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett*, 1995, 365: 115~119
- 9 Yoo B J, Spaete R R, Geballe A P *et al*. 5' end-dependent translation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translational control elements within the 5' untranslated region. *Virology*, 1992, 191: 889~899
- 10 Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. A conserved element is essential for internal initiation of hepatitis C viral RNA. *J Virol*, 1994, 68: 7301~7307

- 11 Reynolds J E, Karimski A, Kettine H *et al*. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J*, 1995, 14:6010~6020
- 12 Wamner F, Hellen C U T, Cao X M. Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet*, 1993, 27:353~436
- 13 Peole T L, Wang C, Popp R A *et al*. Pestivirus translation initiation by internal ribosome entry. *Virology*, 1995, 206:750~754
- 14 Le S-Y, Chen J-H, Sonenberg N *et al*. Conserved tertiary structure elements in the 5' nontranslated region of human enteroviruses and rhinoviruses. *Virology*, 1992, 191:858~866
- 15 Le S-Y, Chen J-H, Schneidberg N *et al*. Conserved tertiary structure elements in the 5' nontranslated region of cardiovirus, aphthovirus and hepatitis A virus RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21:2445~2451
- 16 Le S-Y, Chen J-H, Sonenberg N *et al*. Distinct structural elements and internal entry of ribosomes in mRNA3 encoded by infectious bronchitis virus. *Virology*, 1994, 198:405~411



#### 第四届全国病毒学高级讲习班通知

接卫生部 1997 第 07 号《关于公布 1998 第一批国家级继续医学教育项目的通知》, 湖北医科大学病毒所将在今年 6 月 8 日~14 日举办第 4 届全国病毒学高级讲习班, 学分数 14, 主要介绍病毒学与边缘学科和临床医学的最新动态。欲参加者请与该所杨占秋教授联系。地址: 湖北省武汉东湖路 39 号, 邮编 430071, 电话 027-7812136。