

## RNA 病毒 RNA 聚合酶的研究进展\*

丁清泉

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

Q939.43

## Research Advances on RNA Polymerase of RNA Viruses

Ding Qingquan

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

**关键词** RNA 聚合酶, RNA 病毒, 转录, 复制**Key words** RNA polymerase, RNA viruses, Transcription, Replication

自然界仅有 RNA 病毒以 RNA 作为基因载体。依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶在这种病毒的增殖复制期起到了非常重要的作用。它一方面以病毒 RNA 为模板复制子代病毒的基因, 另一方面也将病毒增殖期间需要的蛋白质和酶类的基因转录成为 mRNA, 也就是说它担负了复制酶和转录酶双重功能。由于酶的稳定性差、结构复杂, 在分子水平对它进行分析存在许多困难。基因克隆、核酸序列分析和 cDNA 转染技术的发展促进了酶的结构和功能的研究。本文就这方面的研究进展作一简要的介绍。

**1 单股正链 RNA 病毒的 RNA 聚合酶**

单股正链 RNA 病毒的基因组 RNA 能直接翻译成病毒蛋白包括 RNA 聚合酶, 该酶参与两步反应: 病毒 RNA(v-RNA) 指导的负性互补 RNA(v-RNA) 的合成, cRNA 指导的 vRNA 合成。

多数 RNA 噬菌体以正链 RNA 作为基因组, RNA 复制酶的亚单位  $\beta$  由噬菌体基因组编码, 它和三个细菌蛋白即核糖体蛋白 S1( $\alpha$  亚单位), 翻译延长因子 Tu( $\gamma$ ) 和 Ts( $\delta$ ) 结合形成 RNA 聚合酶全酶<sup>[1]</sup>, 并可能还具有 RNA 螺旋酶(helicase)活性<sup>[2]</sup>。

感染大肠杆菌的噬菌体有四组, 彼此的血清型不同, MS2(I 组)、GA(II 组)、Q $\beta$ (III 组) 和 SP(IV 组) 的 RNA 聚合酶的氨基酸序列的中心区有一保守区域。保守的 YGDD 序列是这些噬菌体中共同的, 这一序列中任一氨基酸的改变将损害酶的功能<sup>[3]</sup>。

脊髓灰质炎病毒(POLV)是细小核糖核酸病毒科的典型种, 其基因组含有 7.5 kb 的正链 RNA, 在病毒感染的细胞内, 基因翻译成一个大聚蛋白前体, RNA 聚合酶核心酶(3D 基因产物)、引物蛋白 VPg 和含蛋白酶活性的聚蛋白体(3C)都定位在多聚蛋白前体的近 C 末端, 用高浓度的盐处理转录/复制复合物时, 3D 聚合酶具有可溶性, 并显示出依赖引物和模板的

收稿日期: 1997-01-20, 修回日期: 1997-10-23

\* 本项目得到中国科学院留学经费择优支持和所长基金资助

RNA合成活性<sup>[4]</sup>。在病毒的温度敏感突变株中,负链合成的热敏感发生在RNA合成的启动而不是新生链的延长<sup>[5]</sup>。改变POLV RNA聚合酶保守序列YGDD的结构,用酪氨酸置换甘氨酸导致酶活性的丧失,仅在少数情况下,苯丙氨酸取代色氨酸、丙氨酸或丝氨酸取代甘氨酸不影响酶的活性<sup>[6]</sup>。病毒在适宜条件下有能力回复YGDD区的突变<sup>[7]</sup>。

黄病毒(flaviviruses)类似细小核糖核酸病毒。编码七种非结构蛋白的基因定位于基因组的近3'端。病毒非结构蛋白NS5含有病毒RNA聚合酶的结构区<sup>[8]</sup>。

目前有关甲病毒属的转录和复制的知识,均来自Semliki森林病毒(SFV)和辛德毕斯病毒(SND)。SND含有11.7 kb正链RNA基因组,具有帽状结构和polyA尾,与POLV和黄病毒不同,它的非结构蛋白的基因定位在近5'端区域,四种非结构蛋白(NS1、NS2、NS3、NS4)是两种聚蛋白前体(NS123、NS1234)水解过程产生的,聚蛋白前体由全长vRNA翻译而成。聚合酶的保守区定位在NS4,蛋白前体的加工由NS2自身催化完成<sup>[9]</sup>,NS4被整合进与细胞膜结合的转录/复制复合体中。整合的NS4的酶活性较稳定,而非整合的酶能被随机降解<sup>[10]</sup>。

冠状病毒含有一个大的单链RNA(>20 kb)基因组,通过转录cRNA成为mRNA来表达病毒基因,所有的mRNA 5'端都有一个共同的序列,这种结构是cRNA 3'末端区的转录产物。禽传染性支气管炎病毒(IBV)和鼠冠状病毒(MCV)的RNA聚合酶基因,由两个长度分别为12 kb(ORF 1a)、8 kb(ORF 1b)的vRNA近5'端编码的开放阅读框(ORF)组成,从ORF 1a的3'端到ORF 1b的5'端进行移码翻译全RNA聚合酶,ORF1a和ORF1b交界处的特殊序列包括RNA的假突结(pseudoknot)参与这个过程,有效的核糖体移码即使在体外翻译系统中也能发生。冠状病毒RNA聚合酶的这个异常表达阶段可能与一种镶嵌分子的产生有关<sup>[11]</sup>。

伯尔尼(Berne)病毒(BEV)的基因结构和表达模式类似于冠状病毒。序列分析的结果表明;BEV和IBV/MCV的RNA聚合酶的氨基酸序列的同源性最高。RNA聚合酶基因分裂成两个ORF(ORF 1a和ORF1b),其中有12个核苷酸重叠,这说明RNA聚合酶蛋白是由核糖体的移码进行翻译的。与冠状病毒相同,BEV mRNA是共末端的,但在它们的5'末端未发现普通的领头序列<sup>[12]</sup>。

约70%的植物病毒是正链RNA病毒。基于RNA聚合酶的结构可分为类细小核糖核酸病毒组和类黄病毒组。这类病毒的RNA聚合酶基因的发现,证明了未感染植物细胞内以前认为由病毒感染激活的依赖RNA的RNA聚合酶的推断有误<sup>[13]</sup>。

无RNA的RNA聚合酶已经从三片段病毒,包括豇豆褪绿斑驳病毒(CCMV)、雀麦花叶病毒(BMV)和苜蓿花叶病毒(AMV)等病毒感染的植物中纯化。三片段病毒的RNA聚合酶含有两种病毒蛋白,分别在两个大的vRNA片段中编码。从BMV感染细胞中制备的RNA聚合酶含有12个多肽,其中两个多肽相当于病毒编码的非结构蛋白1a、2a。CCMV和AMV编码的RNA聚合酶基因也有两个产物:蛋白1a、2a(CCMV),P1、P2(AMV)。序列比较表明:1a相当黄病毒的NS1和NS2蛋白,2a相当于NS4。NTP结合位点和螺旋酶活性的保守区位于1a上,而GDD保守区在2a出现,这两种成份对于RNA聚合酶的功能都是必需的。一些植物病毒RNA的3'端能折叠成类似tRNA的结构,它被细胞的酶类氨基酰化,于是能和氨基酰化tRNA作用的宿主蛋白质也能和病毒RNA结合,这表明病毒RNA的复制在某种程度上需要宿主因子的参与。BMV RNA的5'末端和tRNA内控区的顺式序列的同源性说明了宿主RNA聚合酶III转录因子可能结合在BMV反式序列上<sup>[8]</sup>。AMV RNA聚合酶在体外只能合

成与模板碱基完全配对的正链和负链全长RNA,但不能完成整个复制周期<sup>[14]</sup>。

单片段基因组的烟草花叶病毒(TMV)的RNA聚合酶由126 kDa多肽和183 kDa多肽两部分组成。NTP结合位点位于126 kDa蛋白上,GDD保守区仅在183 kDa蛋白的C-端出现。假设的芜菁黄化花叶病毒(TYMV)RNA聚合酶基因先翻译成206 kDa的聚蛋白,然后产生三个片段:N-端120 kDa蛋白具有甲基转移酶活性,30 kDa蛋白具有螺旋酶功能,而C-端78 kDa蛋白含有保守的GDD区<sup>[15]</sup>。

甘薯温和斑驳病毒(SPMV)基因组3'端2108个核苷酸经PCR克隆后,序列分析揭示有一个1797核苷酸的开放阅读框编码599个氨基酸,推测紧随311核苷酸非编码区的氨基酸序列相当于马铃薯Y病毒组的RNA聚合酶<sup>[16]</sup>。

烟草脉斑病毒(TVWV)编码的RNA聚合酶在酵母细胞中不仅和病毒外壳蛋白(CP)、也和病毒的结构蛋白V<sub>p</sub>作用,保守的GDD区的变异削弱了酶和CP的反应,但并不削弱酶和V<sub>p</sub>的反应,酶和CP的结合能力对高度保守的GDD区的变化是敏感的<sup>[17]</sup>。

双片段病毒基因组的RNA聚合酶编码在单个RNA分子上。豇豆花叶病毒(CPMV)vRNA片段1先被翻译成200 kDa多肽,然后产生一个58 kDa假定的螺旋酶,一个4 kDa VP<sub>g</sub>和一个C-端具有保守GDD序列的110 kDa蛋白<sup>[18]</sup>。

## 2 双股RNA病毒的RNA聚合酶

φ6是含3片段双股RNA基因组的具囊膜噬菌体,在噬菌体成熟时,基因组RNA被装入由四种早期病毒蛋白P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>和P<sub>7</sub>组成的空壳(前衣壳)内,具有RNA聚合酶活性并充满RNA的前衣壳再用病毒蛋白P<sub>8</sub>包被形成核衣壳,聚合酶活性随之关闭。φ6双股RNA的转录采取类似DNA的半保留复制机制,明显有别于呼肠孤病毒和轮状病毒双股RNA的保留复制机制。P<sub>2</sub>蛋白序列与其它病毒RNA聚合酶的序列相同,它具有催化RNA聚合反应和装配病毒核心的双重功能<sup>[19]</sup>。

呼肠孤病毒(Reo)基因组由10个或10个以上双股RNA片段组成。双股RNA的转录由定位在核衣壳上的RNA聚合酶催化,酶的活性仅仅在感染发生以后才表现出来。在感染初期,转录是不对称的,即仅合成正链RNA,新合成的RNA没有从模板复合物中释放出来,子代双股RNA的合成是以新合成的正链RNA为模板转录而成的,这种双股RNA的保留复制机制完全不同于噬菌体φ6的半保留复制机制。用热休克处理或蛋白酶部分消化能够使病毒结合的RNA聚合酶在体外表达活性。K<sup>+</sup>离子有激活酶的功能而Na<sup>+</sup>则有抑制作用。在酶激活期间,外衣壳蛋白被除去,当病毒被完全破坏时,酶的活性丧失<sup>[4]</sup>。

牛轮状病毒RNA片段1编码的VP<sub>1</sub>蛋白含有RNA聚合酶的保守序列,RNA片段2编码的VP<sub>2</sub>也是RNA聚合酶的基本成份<sup>[20]</sup>,传染性的粘液囊病病毒(IBDV)的VP<sub>2</sub>含有鸟苷转移酶和甲基转移酶活性<sup>[21]</sup>。

体外转录研究含RNA聚合酶编码基因的轮状病毒SA-11温度敏感突变株(tsC),结果表明,假设的VP<sub>1</sub>区以不同的方式影响正链和负链的转录,又影响负链RNA的合成,在感染的细胞培养物中,tsC似乎主要影响正链RNA的合成<sup>[22]</sup>。

兰舌病毒2、11、13、17血清型的L1ds-RNA片段含有3944核苷酸残基,单一的开放阅读框能编码1302个氨基酸的VP<sub>1</sub>,假设的RNA聚合酶(149 kDa)是VP<sub>1</sub>的基本单位,它含有7个保守的疏水区<sup>[23]</sup>。

植物呼肠孤病毒、斐济病毒和潜隐病毒(Cryptoviruses)的RNA聚合酶,以及参与RNA帽状结构形成的酶(如甲基转移酶),都是和病毒粒子结合在一起的,甲基供体S-腺苷甲硫氨酸的加入可激活体外转录的进行,这说明帽的形成与RNA合成是偶联的。由于植物呼肠孤病毒RNA片段5'和3'端之间的序列是保守的,并显示某些互补性,它们可能分别作为RNA聚合酶转录的启动和复制的起始位点<sup>[24]</sup>。

伞菌属的等轴34-nm病毒的双股基因L1的表达产物(121 kDa, 1 078氨基酸)的氨基酸序列分析结果表明,它与其它dsRNA病毒的RNA聚合酶有明显的同源性<sup>[25]</sup>。

### 3 单股负链RNA病毒的RNA聚合酶

这组病毒根据基因是否分段分为两类,基因组是反义的,不能作为mRNA用于翻译,裸露的单一vRNA还不足以启动感染,必须有RNA聚合酶强制性地参与。负链RNA病毒RNA聚合酶独特的性质之一是仅仅以核衣壳的酶形式对基因组进行转录。

有关整段基因组病毒的转录和复制的信息,多数来自弹状病毒科的水泡性口炎病毒(VSV),VSV基因组是一个分子量为11.2 kb的单股线形RNA,其核糖核蛋白(RNP)核心含有核衣壳蛋白(NP)、两个较小的蛋白L(酶的 $\beta$ 亚单位)和NS( $\alpha$ 单位)以及基因RNA,单独的L和NS无活性,当它们结合在一起时重新得到依赖负链N-vRNA复合物合成RNA的活性,这表明L和NS是VSV RNA聚合酶全酶的亚单位<sup>[4]</sup>。

体外转录产生的RNA是帽化和聚腺苷化的。纯化的VSV病毒粒子含有RNA修饰酶系统。RNA修饰酶和RNA聚合酶全酶(NS-L或 $\alpha\beta$ 复合物)结合在一起。L蛋白是多功能的, RNA合成的催化活性定位其上,它含有使NS蛋白磷酸化的蛋白激酶活性,蛋白质磷酸化作用不仅控制RNA合成,而且也控制病毒的脱壳<sup>[26]</sup>。RNA聚合酶的另一功能是合成全长cRNA作为vRNA合成模板。RNA聚合酶的转录和复制功能在病毒感染周期中是均衡的<sup>[4]</sup>。对于以vRNA作为RNA合成的模板来说,N蛋白是需要的。但过量的与新生RNA结合的N-vRNA复合物的形成能减弱转录作用。NS是一种延伸磷酸化作用的特异蛋白质,不仅和L相互作用,而且也 and NP作用,它含有33个磷酸化的潜在位置,12个苏氨酸、21个丝氨酸位于近N-末端区。L-NS的相互作用由NS磷酸化的水平所控制,强磷酸化和强酸性的N-末端区组成了类似于RNA磷酸骨架和NP紧密结合的特殊结构。NS-NP复合物的形成防止自由NP的自身集合,NS以定位的方式置换结合在RNA上的NP,让RNA聚合酶接近模板RNA<sup>[8]</sup>。

副粘病毒的感染与弹状病毒特征基本相同,RNP核心含有整段的vRNA分子、约2 500个分子的NP蛋白、100~300个分子的50~55 kDa P蛋白(相当于VSV的NS)和50~100个分子的200 kDa的L蛋白。RNA聚合酶由L( $\beta$ )和P( $\alpha$ )蛋白组成,加入细胞因子能激活体外转录<sup>[4]</sup>。

流感病毒基因组由8个(A、B型)或7个(C型)片段组成。在感染早期,产生两种形式的RNA拷贝:有5'帽状结构和3'poly(A)尾的mRNA,没有帽状结构和poly(A)尾的全长cRNA。在感染后期,子代vRNA由cRNA拷贝而成。流感病毒的增殖是独特的,因为宿主细胞RNA的连续合成对于病毒转录的发生是必需的。由RNA聚合酶II合成的RNA分子则用于流感病毒最初转录的引物<sup>[4]</sup>。帽化RNA引导转录的第一步,是帽化RNA被RNA聚合酶结合的“帽化RNA内切酶”在距帽状结构下游13个核苷酸处进行酶解<sup>[27]</sup>。用这种帽化的聚核苷酸作为引物启动病毒基因组RNA的转录。这种不寻常的转录“抢帽机制(cap snatching mechanism)”被其它的具囊膜的分段负链病毒和双义病毒所采用。结合在病毒粒子上的RNA聚合

酶仅仅催化 mRNA 合成,分离的具有 RNA 合成活性的 RNP 核心含有 4 种病毒特异蛋白:NP 蛋白、碱性蛋白 PB1 和 PB2、酸性蛋白 PA。帽化 RNA 的切割、依赖 RNA 引物的 RNA 合成的启动、RNA 链的延长、转录的终止和聚腺苷化等过程全都由上述蛋白复合物完成。遗传分析表明,PB1 在 RNA 合成中起主要作用,而 PB2 参与帽化 RNA 的核苷酸内切割。流感病毒 RNA 聚合酶能够置换新生 RNA 分子延长端的碱基,这种明显的校读功能在其它 RNA 聚合酶中未发现<sup>[28]</sup>。PB1 在缺少 PB2 和 PA 时能单独催化 RNA 的合成,但对于 RNA 的复制,三个蛋白的全套装置是需要的<sup>[29]</sup>。体外转录的结果表明,流感病毒 RNA 3' 末端和 5' 末端的锅柄(panhandle)结构的稳定性及顶端的开和关,对于 RNA 聚合酶的转录效率是非常重要的<sup>[30]</sup>。

在植物弹状病毒组小麦花叶矮缩病毒(WRSV)中,用去污剂处理病毒粒子,分离的核衣壳显示了 RNA 聚合酶活性,混合 L 和 NS 蛋白,用 N-RNA 作为模板能重新得到酶的活性。和病毒粒子结合的 RNA 聚合酶,在体外合成的产物为全长基因 RNA 和单股 cRNA<sup>[8]</sup>。

#### 4 双义 RNA 病毒的 RNA 聚合酶

双义动物病毒包括布里安病毒科和嵌沙样病毒科。布里安病毒基因组含有 3 个 RNA 片段:L、M、S。三个 RNA 片段的 3' 端和 5' 端序列在 11~13 核苷酸之间有序列同源性,彼此有互补性,可形成锅柄结构。布里安病毒采用了如流感病毒那样的“抢帽机制”,表明该病毒属于负链 RNA 病毒。

Panta Toro 病毒基因的 S 片段的序列分析表明,尽管 S-cRNA(反基因组 RNA)近 5' 端的一半编码 N 蛋白,但 S-vRNA 近 5' 端的一半编码非结构蛋白 NSs。这种 vRNA 和 cRNA 都含有编码序列的 RNA,建议称为“双义 RNA”。双义编码阶段在嵌沙样病毒科的 Pichide 病毒得到证实。结合在病毒上的 RNA 聚合酶催化 vRNA 的转录,并得以在感染早期表达 c-RNA 编码的 NSs<sup>[4]</sup>。

布里安病毒组的植物病毒番茄斑矮病毒(TSWV)、纤细病毒组的水稻条纹叶枯病毒(RSV)和水稻丛矮病毒(RGSV)均以单股的双义 RNA 为基因组。RSV 的 4 个 RNA 片段中至少有 3 个显示有双义编码阶段<sup>[31]</sup>。vRNA 和 cRNA 假定的 ORF 的表达已经在体外转录系统得到证实。用 CsCl 离心方法从纯化的 RSV 粒子中分离了 RNA 聚合酶,其活性部分含有两个病毒结构蛋白,30 kDa 的核衣壳蛋白和 230 kDa 假定的聚合酶蛋白。目前对双义病毒的转录/复制调控机制还知之甚少<sup>[8]</sup>。

#### 5 RNA 聚合酶的分子构型

病毒 RNA 聚合酶的氨基酸序列比较研究证实保守区域有下面三种功能:包括 RNA 聚合、三磷酸核苷酸(NTP)结合、模板和产物结合的 RNA 聚合酶功能;对分子内二级结构或模板-产物双倍体的 RNA 进行解链的螺旋酶功能;RNA 戴帽的甲基转移酶功能。

典型的 GDD 三肽现在被认为是 RNA 聚合酶的明显标记,许多情况下,GDD 由酪氨酸领头定位在疏水氨基酸的延伸处。(Y)GDD 周围的序列在复制阶段相同的每组病毒中具有同源性。复制过程中来源于不同正链和负链病毒的 RNA 聚合酶,即使在最保守的 GDD 区也有差异。分段负链病毒的保守序列是 SDD,而非分段的负链病毒的则是 GDN(Q)。双股病毒的保守序列更接近于正链病毒,被修改成(Y)MDD<sup>[8]</sup>。

Poch 等认为 RNA 聚合酶由四个主要的区域组成:A 区 D<sub>xxxxxD</sub> 为酸性区,B 区

GxxxTxxx(N/E)(S/T)是核苷酸结合的核心区,C区(Y)GDD是催化功能核心区,D区LKR为碱性区。这些区域经常被易变的绞链(hinges)结构有规则地分隔并联成一个连锁区域<sup>[32]</sup>。

人免疫缺损病毒(HIV)-I型反转录酶的结构中,保守的(Y)GDD区存在于酶活性中心的 $\beta$ -发夹中<sup>[33]</sup>。Inokuchi等假定这个区参与了金属离子结合于酶催化位置的过程,这在 $\theta_3$ 和脊髓灰质炎病毒的RNA聚合酶中得到了证实。这个区域突变能导致酶活性丧失。某些病毒RNA聚合酶该区域的一两个位置上含有不同的氨基酸残基,如:(Y)GDD的酪氨酸在类细小核糖核酸病毒的RNA聚合酶中是严格保守的,但在类黄病毒中则是易变的。用蛋氨酸取代脊髓灰质炎病毒的(Y)GDD区的酪氨酸则导致功能丧失的突变,这种突变也能被分子内二次突变所抑制<sup>[6]</sup>。半胱氨酸在TMV、蛋氨酸在南方菜豆花叶病毒(SBMV)、丝氨酸在黄热病毒(YFV)、BMV和AMV的保守区中发现,这个区域氨基酸的改变,可能被其它地方同样分子的二次突变所抑制<sup>[8]</sup>。

有两个非常保守的区域和嘌呤三核苷酸结合活性相关,A区(G/AxxxxGKS/T)和位于A区下游约20~40个氨基酸处的B区(DEAD)。B区与依赖RNA或DNA的NTP酶活性关联的Mg-NTP复合体中的Mg离子相互作用。两种DNA螺旋酶参与了复制、重组和DNA修复<sup>[26]</sup>。

依赖RNA的RNA聚合酶是特殊的复合物,不仅作为RNA复制酶,而且也作为转录酶。不仅催化RNA的聚合,而且也进行RNA的修饰。对它的深入研究将继续朝着两个方向发展:参与每一反应的功能区域的图谱分析,探索复制酶和转录酶之间内部转换的分子机制。

### 参 考 文 献

- 1 Blumenthal T, Carmichael GG. RNA replication: Function and structure of Q $\beta$  replicase. *Annu Rev Biochem*, 1979, 48:525~548
- 2 Cole PE, Sawchyn I, Guerrier-Takada C. Q $\beta$  replicase containing altered forms of ribosomal protein S1. *J Biol Chem*, 1982, 257:12929~12934
- 3 Inokuchi K, Hirashima A. Interference with viral infection by defective RNA replicase. *J Virol*, 1987, 61:3946~3949
- 4 Ishihama A, Nagata K. Viral RNA polymerase. *CRC Crit Rev Biochem*, 1988, 23:27~76
- 5 Bauton DJ, Moras BJ, Eisner-Smerage L *et al*. Poliovirus RNA polymerase mutation 3D-M394T results in a temperature-sensitive defect in RNA synthesis. *Virology*, 1996, 217:459~469
- 6 Jablonski SA, Morrow CD. Enzymatic activity of poliovirus RNA polymerases with mutations at the tyrosine residue of the conserved YGDD motif: Isolation characterization of poliovirus containing RNA polymerases with FGDD and MGDD sequences. *J Virol*, 1993, 67:373~381
- 7 Walker DE, McPherson D, Jablonski SA *et al*. An aspartic acid at amino acid 108 is required to rescue infectious virus after transfection of a poliovirus cDNA containing a YGDD but not SGDD amino acid motif in 3D<sup>pol</sup>. *J Virol*, 1995, 69:8173~8177
- 8 Ishihama A, Barbier P. Molecular anatomy of viral RNA-directed RNA polymerase. *Arch Virol*, 1994, 134:235~258
- 9 Cross RK. Identification of a unique guanine 7-methyltransferase in Semliki Forest virus (SFV) infected cell extracts. *Virology*, 1983, 130:452~463
- 10 De Groot RJ, Rumenaph T, Kuhn RJ *et al*. Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:8967~8971
- 11 Koonin EV. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*, 1991, 72:2197~2206
- 12 Snijder EJ, Boon JA, Bredenbeek PJ *et al*. The carboxy-terminal part of the putative Berne virus polymerase is expressed by ribosomal frameshifting and contains sequence motifs which indicate that toro- and coronaviruses are evolutionally related. Nu-

- cleic Acids Res, 1990, 18:4535~4552
- 13 David C, Gargouri-Bouzid R, Haenni AL. RNA replication of plant viruses containing an RNA genome. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol*, 1992, 42:157~227
  - 14 De Graaff M, Houwing CJ, Lukacs N *et al*. RNA duplex unwinding activity of alfalfa mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *FEBS Lett*, 1995, 371:219~222
  - 15 Mouches C, Candresse T, Bove JM. Turnip yellow mosaic virus RNA-replicase contains host and virus-encoded subunits. *Virology*, 1984, 134:78~90
  - 16 Colmet D, Kummert J, Lepoivre P. Molecular evidence that the whitefly-transmitted sweetpotato mild mottle virus belongs to a distinct genus of the potyviridae. *Arch Virol*, 1996, 141:125~135
  - 17 Hong J, Levay K, Murphy JF *et al*. A polyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology*, 1995, 214:159~166
  - 18 Dorssers L, van der Krol S, van der Meer J *et al*. Purification of cowpea mosaic virus RNA replication complex: Identification of a virus-encoded 110 000-dalton polypeptide responsible for RNA chain elongation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81:1951~1955
  - 19 Olkkonen VM, Ojala PM, Bamford DH. Generation of infectious nucleocapsids by *in vitro* assembly of the shell protein on to the polymerase complex of the dsRNA bacteriophage  $\phi$ 6. *J Mol Biol*, 1991, 218:569~581
  - 20 Mansel EA, Patton JT. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *J Virol*, 1990, 64:4988~4996
  - 21 Spies U, Muller H. Demonstration of enzyme activities required for cap formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J Gen Virol*, 1990, 71:977~981
  - 22 Munoz M, Rios M, Spencer E. Characteristics of single- and double-stranded RNA synthesis by a rotavirus SA-11 mutant thermosensitive in the RNA polymerase gene. *Intervirology*, 1995, 38:256~263
  - 23 Huang L-L, Hwang G-Y, Yang Y-Y *et al*. Sequence analysis and antigenic epitope mapping of the putative RNA-directed RNA polymerase of five U A bluetongue viruses. *Virology*, 1995, 214:280~288
  - 24 Marzachi C, Accotto GP, d'Aquilio M *et al*. *In vitro* transcription of the dsRNA genome of maize rough dwarf virus (*Reoviridae*). *J Gen Virol*, 1990, 71:707~711
  - 25 Van der Lende TR, Duitman EH, Gunnwijk MGW *et al*. Functional analysis of dsRNAs (L1, L3, L5 and M2) associated with isometric 34nm virions of white button mushroom. *Virology*, 1996, 217(1):88~96
  - 26 Witt DJ, Naeve CW, Summers DF. Phosphorylation of vesicular stomatitis virus protein as a possible contributing factor in virion uncoating. *J Gen Virol*, 1981, 56:383~391
  - 27 Galarza JM, Peng Q, Shi L *et al*. Influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase: Analysis of RNA synthesis *in vitro*. *J Virol*, 1996, 70:2360~2368
  - 28 Ishihama A, Mizumoto K, Kawakami K *et al*. Proofreading function associated with the RNA-dependent RNA polymerase from influenza virus. *J Biol Chem*, 1986, 261:10417~10421
  - 29 Kobayashi M, Toyoda T, Ishihama A. Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch Virology*, 1996, 141:525~539
  - 30 Lee Y-S, Seong BL. Mutational analysis of influenza B virus RNA transcription *in vitro*. *J Virol*, 1996, 70:1232~1236
  - 31 Takahashi M, Tomyama S, Hamamatsu C *et al*. Nucleotide sequence and possible ambisense coding strategy of rice stripe virus RNA segment 2. *J Gen Virol*, 1991, 74:769~773
  - 32 Poch O, Sauvaget I, Delarue M *et al*. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*, 1989, 8:3867~3874
  - 33 Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexes with an inhibitor. *Science*, 1992, 256:1783~1790
  - 34 Gorbalenya AE, Koonin EV, Doncheko AP *et al*. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17:4713~4730