

98, 13(4) ①
281-291 1998, 13(4): 281-372
281-372
2951.4
弹状病毒研究的新进展

II. 病毒的结构蛋白、转录、复制和核衣壳化的研究

沈加丽 龚祖焄

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

Advances of Research on Molecular Biology of Rhabdoviridae

II. Viral Structural Protein, Transcription, Replication and Capsidation

Shen Jianli Gong Zuxun

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

关键词 弹状病毒, 结构蛋白, 转录, 复制, 核衣壳化**Key words** Rhabdoviridae, Structural protein, Transcription, Replication, Capsidation

我们曾报道过弹状病毒的基因组结构研究的新进展, 本文将对弹状病毒的结构蛋白及其功能区、转录与复制和核衣壳化研究的新进展作进一步的报道。

根据弹状病毒在细胞内复制及装配的位置, 可分为两个亚组。第一亚组其复制和装配在细胞质内, 水泡性口炎病毒(VSV)为其代表, 病毒含有5种结构蛋白, 分子量最大的为L蛋白, 它具有多种功能, 而最主要的功能是作为病毒本身携带的RNA聚合酶; 其次为组成病毒外壳突起的糖蛋白G蛋白; N蛋白和基因组RNA紧密结合作为RNA合成的模板; 比N蛋白分子量略小、过去曾错误地命名为非结构蛋白即Ns蛋白, 因它是磷酸化蛋白, 目前文献中也称为P蛋白, 分子量最小的是位于包膜中的膜蛋白M。第二亚组中, 病毒的复制和装配在细胞核内, 其代表病毒为狂犬病毒(RV), 其结构蛋白的差异仅在于未发现有P蛋白, 但膜蛋白有M₁和M₂两种。

1 弹状病毒结构蛋白及其功能区**1.1 L蛋白**

到1991年为止, 已有9种负链RNA病毒的L蛋白基因进行了克隆和序列测定, 由此推出了它们的氨基酸序列。它们是3种VSV血清型病毒(新泽西型、Hazel-hurst、新泽西型Ogden和新泽西型)、狂犬病毒、副流感病毒(Parainfluenza Virus)、仙台病毒(Sendai Virus)、新城疫病毒(Newcastle Disease Virus)、呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus)和麻疹病毒

(Measles Virus)。

通过比较 L 蛋白的氨基酸序列发现,它们在大小和氨基酸组成上都相似,并含有保守区域 BoxA 到 BoxD^[1]。这些蛋白的 N 端保守性较高,而 C 端保守性较低。结构域 I 的第 3 个伸展区(stretche)处有高保守的 GHP,其中的组氨酸是构成转角所必须的;结构域 II 和结构域 III 主要是一些带电荷的氨基酸残基,其中结构域 II 中的 KEKE(X)。K 是构成两亲性 α 螺旋的成分,参与识别模板 RNA;结构域 III 中的 QGDNQ 是 RNA 聚合酶的活性区;结构域 IV 中含有保守的脯氨酸,是形成转角的区域。结构域 V 存在丰富的组氨酸和半胱氨酸,是结合金属离子的区域;结构域 VI 中的 KGXGXG,与一些蛋白激酶的相应特征结构(motif)类似,是表现蛋白激酶活性的区域。与 ATP 结合的 G-X-G-X-G,在该序列的上游 18 到 20 个氨基酸残基处有丰富的赖氨酸^[2],而许多与 ATP 结合的蛋白激酶中都含有这一特征结构,所以认为该区是 L 蛋白表现蛋白激酶的区域。此外,作者还认为它是 L 蛋白的多聚腺苷酸化的区域,推测它可在不同的条件下对 dATP 表现不同的亲合性。在 BoxA 的结构域 II 中有一个高碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)丰富的区域,其结构特点是 22 个氨基酸残基呈现疏水氨基酸-碱性氨基酸相间排列的两亲性 α 螺旋结构,其碱性氨基酸残基面对 RNA,此区域可能与 L 蛋白和模板 RNA 的结合有关,因为许多调节转录的蛋白质因子都含有精氨酸丰富的序列,而且也有相似的两亲性 α 螺旋。在结构域 III 中发现了它们含有相同的不变序列 QGDNQ^[3,4],在许多依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶中,Kamer 和 Argos^[5]于 1984 年发现都含有相同的二肽序列 DD,推测在弹状病毒中 L 蛋白中该 5 肽序列为 RNA 聚合酶活性位点所在。

1994 年,Parks^[6]等通过在 cDNA 水平上进行点突变的实验证明,L 蛋白的 N 端区域是它与 P 蛋白形成复合物的区域。同时,N 端也是 L 蛋白对 mRNA 进行多聚腺苷酸化的功能区所在,而 C 端可能与 N 蛋白相作用^[7,8]。

1.2 G 蛋白

不同弹状病毒的 G 蛋白尽管大小、糖基化位点与数目和跨膜区长度等有所不同,但都含有信号肽区、跨膜区和糖基化位点。

图 1 是几种已知的 G 蛋白同源性比较。它列出了 6 种 G 蛋白的氨基酸序列,其中半胱氨酸、脯氨酸和甘氨酸残基高度保守,见图中阴影部分,图中高保守残基用附加字母表示,糖基化位点下划短线表示;星号表示功能相似的残基。

G 蛋白是糖基化蛋白,糖基化是病毒颗粒在成熟过程中由宿主细胞内分泌到细胞外所必需的^[10]。有实验说明,水泡性口炎病毒 G 蛋白的穿膜区之后的 29 个氨基酸残基,关系到 G 蛋白能否有效地从粗面内质网转运到高尔基体^[11]。

近年来发现,在被牛流行热病毒感染的寄主细胞中存在第二种形式的 G 蛋白,即 G_{Ns} ^[12],由 586 个氨基酸残基组成,估算分子量为 68 806 道尔顿,pI 为 8.41,它与存在于被感染细胞中的 G 蛋白前体(67 kD)相似^[13]。 G_{Ns} 的 8 个 N-糖基化位点已被鉴定,它们都位于膜外。其基因位于 G 蛋白基因的下游^[9],这一现象在 ARV 中也有发现。由此认为这两种病毒都由一个共同的原始祖先进化而来^[14]。由于 G_{Ns} 在结构上与别的弹状病毒 G 蛋白有同源性,可以预测它应有相类似的功能。

狂犬病毒 G 蛋白的一段序列与蛇毒液中的一种叫做番木鳖样的神经毒蛋白的全序列有惊人的相似性。在该神经毒中由 20 个氨基酸残基组成的“毒环”位于分子的中央,它与乙酰胆

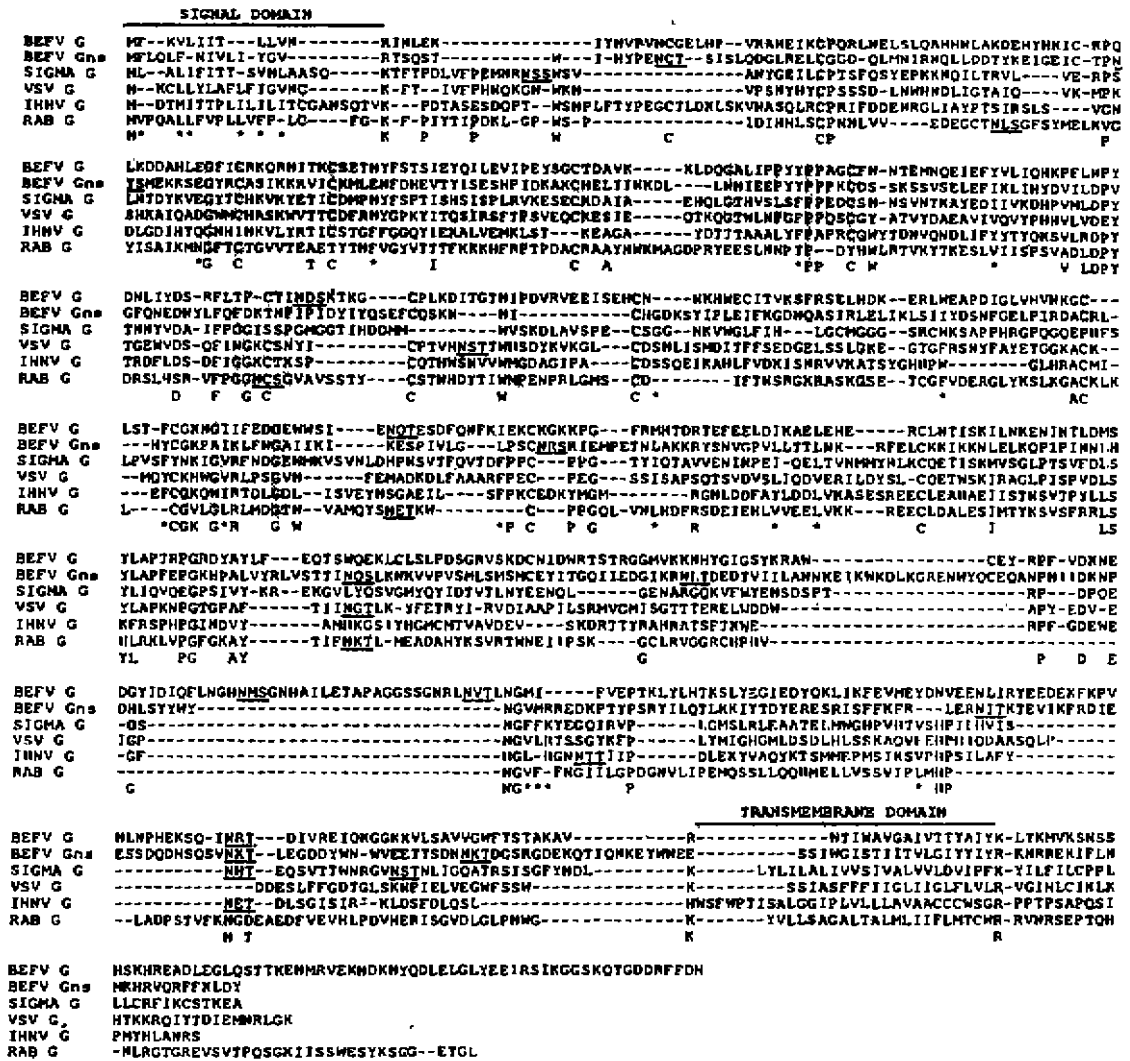


图 1 几种弹状病毒的 G 蛋白同源性比较^[9]

Fig. 1 Comparison of homologous amino acid sequences of G proteins in some rhabdoviruses^[9]

碱受体上的相应位点作用。也许 G 蛋白上的相应区域是该病毒嗜神经的关键所在^[15]。

1.3 N 蛋白

比较几种弹状病毒 N 蛋白氨基酸的同源性发现:牛流行热病毒与水泡性口炎病毒印第安那型有较高的同源性(28.1%),其次是狂犬病毒(17.6%),但与传染性造血器官坏死病毒(IHNV)和苦苣菜黄脉病毒(SYNV)无同源性。水泡性口炎病毒印第安那型与牛流行热病毒的同源域主要在其蛋白的中央区域,见图 2。

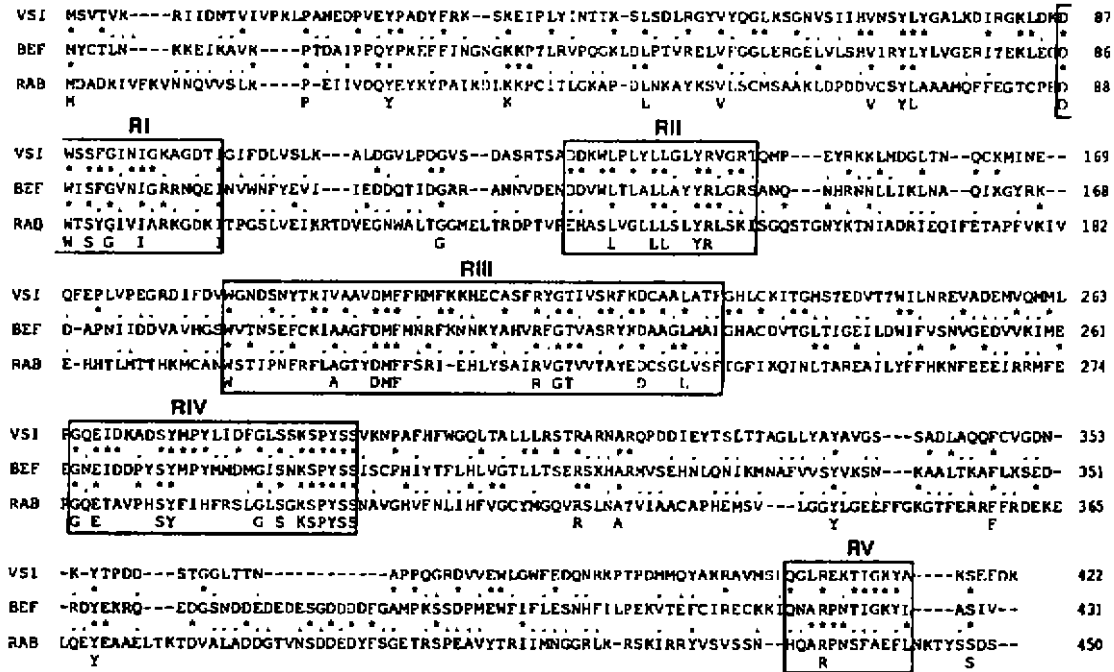


图 2 几种弹状病毒 N 蛋白的比较^[13]

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of N proteins in some rhabdoviruses^[13]

比较水泡性口炎病毒、牛流行热病毒和狂犬病毒的 N 蛋白氨基酸序列发现,它们含有保守区,见图 2 的保守区 I (RI) 到保守区 V (RV)。保守区 II (RII) 是疏水核;保守区 III (RIII) 在高级结构上的同源性高达 70%, 该区为 α 螺旋;牛流行热病毒和水泡性口炎病毒印第安那型在保守区 IV (RIV) 有 66.7% 的保守残基;牛流行热病毒与狂犬病毒相比有 48.1% 的保守残基,而且此区中特征结构 G(L/I)SXKSPYSS 在牛流行热病毒、水泡性口炎病毒和狂犬病毒中均是保守的,但在传染性造血器官坏死病毒和苦苣菜黄脉病毒中却不是。保守区 V 是残基高保守区,位于近 C 末端,在牛流行热病毒、水泡性口炎病毒和狂犬病毒中,只有保守区 V 有一个残基不同。N 蛋白的保守区主要集中在蛋白的中部,该区被认为是 N 蛋白与基因组 RNA 发生作用的区域^[16-19]。特征结构 G(I/L)SXKSPYSS 在所有已测定序列的水泡性口炎病毒、副流感病毒和表皮热病毒中都是保守的。同源性高的区域主要是亲水性较高的 C 末端。实验发现,水泡性口炎病毒 N 蛋白的 C 末端是它与前导 RNA(leader RNA)相作用而发生核化的区域^[20],而 N 蛋白与 P 蛋白的相互作用有可能是阻止 N 蛋白与非特异性的 RNA 相互作用。狂犬病毒中在此区含有单一的磷酸化位点(丝氨酸)^[21],而且 N 蛋白的抗原决定簇也在此区并与特征序列 G(I/L)SXKSPYSS 相邻。在流行热病毒中 N 蛋白也有磷酸化位点。弹状病毒 N 蛋白磷酸化的有:牛流行热病毒、狂犬病毒、Mokola Virus、Lagos Bat Virus、Spring Virus of Carp、Kern Canyon Virus、和 Flanders Virus^[22,23]。在牛流行热病毒中还有 3 个氨基酸残基可被 CK II 磷酸化酶磷酸化,其中之一是丝氨酸 371,但磷酸化的功能还不知道。

弹状病毒 N 蛋白是一种结构蛋白,它的主要功能是:(1) 参与核衣壳的组装;(2) 与基因

组 RNA 一道作为转录的模板;(3) 对转录和复制有调节作用。

1992年, Das 等为了检验在 *E. coli* 中表达的水泡性口炎病毒 N 蛋白是否有与前导 RNA 结合的能力, 实验将表达后纯化的 N 蛋白与前导 RNA 相作用后, 再用核酸酶消化, 结果发现前导 RNA 有抗核酸酶的功能; 而用在 BL21(DE3) 中表达的 P 蛋白重复相同的实验, 则不能抗核酸酶。实验还发现, 如果 N 蛋白浓度超出最佳值, 结合能力下降。在体外转译系统中合成的 N 蛋白也有与前导 RNA 结合的能力^[24]。

1.4 P 蛋白

水泡性口炎病毒的 P 蛋白在结构上被分为三个功能区域, 位于 N 端的结构域 I, 它是高酸性的区域, 含有酸性的精氨酸和谷氨酰胺以及组成型的磷酸化位点, 见图 3。1993 年, Adrienne 等发现该区参与了和模板中 N 蛋白的结合^[20]。

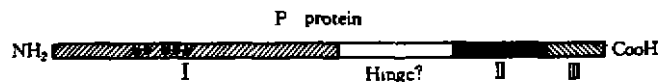


图3 VSV P 蛋白的三个结构域^[22]

Fig. 3 The three domains in P protein of VSV^[25]

与结构域 I 不同, 结构域 II 和结构域 III 是碱性区域。结构域 II 的功能是与 L 蛋白结合, 结构域 III 的功能是与模板 RNA 结合^[26]。结构域 I 的保守性高于结构域 II 和 III^[27, 28]。在几种副流感病毒中也发现有类似的蛋白^[29, 30], 它们也是高碱性和含有丰富精氨酸的小分子量多肽, 套存于 P 蛋白 mRNA 的 5' 端, 但它们的确切功能仍不明。

通过比较 18 种不同的新泽西血清型 P 蛋白发现它们在氨基酸的分布上有相似性^[31], 在结构域 I 和结构域 II 之间为高可变区, 可能为活性区域提供一个关节点(hinge)或为活性区域的空间安排提供一个正确的空间, 因为有实验发现, 若在此高可变区进行点突变, 则导致 P 蛋白转录活性降低^[28, 32]。有趣的是, 尽管不同血清型的水泡性口炎病毒 P 蛋白差别较大, 可是它们在亲水性和疏水性结构域的分布上却非常相似, 由此推断它们的空间结构可能是相似的^[33]。

在体外转录和表达系统中分析点突变和缺失的 P 蛋白 cDNA 后发现, 水泡性口炎病毒新泽西型 P 蛋白结构域 II 中, 两个保守的丝氨酸残基(236 位和 242 位)可被 L 蛋白具有的蛋白激酶活性磷酸化, 磷酸化后的 P 蛋白对它与 N-RNA 模板的结合和其转录活性至关重要, 由此推测这两个残基是其活性部位的组成成分^[27, 44]。对结构域 II 进行缺失分析时发现, 所产生的 P 蛋白与 L 蛋白的结合能力丧失。若使其 C 端的 11 个氨基酸残基(结构域 III)缺失, 则产生的 P 蛋白不能与 N-RNA 模板结合^[33]。在体外实验中与 P 蛋白 C 端的 21 个氨基酸残基相同的寡肽可抑制水泡性口炎病毒的转录活性^[34]。P 蛋白的结构域 II 可能跟它与 L 蛋白结合后的转录活性有关, 而碱性的结构域 III 可能是与 RNA 结合的区域。结构域 III 还是调节转录变成复制的关节点, 这一转变可能是通过它与前导 RNA 的结合实现的, 甲基化保护实验已证明 P 蛋白上存在与前导 RNA 结合的特异区域^[35]。结构域 III 可能与 N 蛋白的相互紧密作用有关。

如果将结构域 I 的两个碱性氨基酸残基突变成中性残基(赖氨酸 6 和精氨酸 8 变成丙氨酸), 将使结构域 I 变成一个强的反式作用因子^[36], 同时, 这种改变使水泡性口炎病毒 P 蛋白

在转录中的作用丧失。

1991年, Barik 等用³²P标记培养大肠杆菌后发现所表达的 P 蛋白不磷酸化, 用这种 P 蛋白进行体外实验发现它仍具有转录功能, 而且它还可以在体外由 L 蛋白催化磷酸化; 磷酸化后的 P 蛋白仍然可以与模板结合^[2]。

1.5 M 蛋白

与水疱性口炎病毒的其它结构蛋白相比, M 蛋白的结构与功能的关系知道得很少。已知 M 蛋白与病毒颗粒的组装和出芽有关^[37]。

M 蛋白与病毒颗粒组装的起始有关, 这种起始作用一方面是通过它与已组装的 N-RNA 复合物相作用来实现的, 另一方面与宿主细胞膜上已含有的 G 蛋白有关^[38,39], 而 M 蛋白在病毒颗粒的组装中是通过与 N-RNA 中的 N 蛋白的 N 端相作用来实现的。

1991年, Lenard 等用光亲和标记的探针证明 M 蛋白的 N 端 10 个氨基酸残基直接参与了与膜的结合, 它与病毒颗粒的出芽过程有关^[40]。

2 弹状病毒基因的转录、复制与核衣壳化

2.1 转录

水疱性口炎病毒是弹状病毒进行转录、复制和核衣壳化研究的原型。它转录的特点是转录模板为核糖核蛋白体(即 N-RNA)。RNA 的转录开始于负链基因组的 3' 端^[41], 并顺序产生 (+) leader RNA、N、P、M、G 和 L 蛋白的 mRNA。转录有极性和衰减现象, 而且在基因间隔区有暂停现象^[42]。

1975年, Emerson 和 Yu 创立了体外重组转录系统^[43], 用纯化的 L、P 蛋白和模板 N-RNA 在体外转录系统中成功地进行了转录, 同时还发现了 L 蛋白的 RNA 聚合酶功能需要 P 蛋白的存在, 若无 P 蛋白, 则只能合成非全长的 RNA 基因组; 若只有 P 蛋白和模板, 则不能发生转录, 即使后来加入 L 蛋白也不能合成寡核苷酸^[43,44]。由此推断 L 蛋白与转录的起始有关, 而 P 蛋白在起始后的步骤中起作用。体外转录系统实验表明, 转录的最佳分子比是 1/70^[44]。P 蛋白是高酸性的蛋白, 功能可能是暂时使 N 蛋白离开 RNA, 以利于 L 蛋白进入 RNA, 并在 RNA 中移动。

1988年, 孙伟和龚祖坝^[45]发现, 在体外转录系统中以小麦丛矮病毒(WRSV) N-RNA 为模板、用纯化的小麦丛矮病毒 L 和 N_s 蛋白成功地转录了病毒基因组 RNA; 系统中只有 N_s 蛋白而没有 L 蛋白则没有转录产物, 反之亦然; 同时, 和 RNA 结合的 N 蛋白对保持模板活力也是必需的。

用体外合成 RNA 研究转录发现: 当合成完整的、含有 50(实际为 47)个核苷酸的前导 RNA, 并以病毒颗粒来源的 N-RNA 作模板、L 和 P 蛋白作聚合酶进行转录, 结果产生了完整的 RNA; 若去掉前导 RNA 中部的 15 个核苷酸或去掉 5' 端的 13 个核苷酸, 则转录产物较短, 说明前导 RNA 对转录至关重要^[46]。

前文已经提到水疱性口炎病毒 RNA 的头 22 个核苷酸是保守的。1993年 Smollwood 等发现, 随着合成它的 RNA 3' 端核苷酸数目的减少, 转录效率降低^[46]。例如, 只有 3 到 8 个核苷酸时, 则分别只转录基因组的 3% 和 12%; 而合成的核苷酸长度为 17 到 22 个时, 则 86% 的基因组 RNA 被转录; 合成 12 到 15 个核苷酸时, 则 28% 到 39% 的基因组 RNA 被转录; 如果合成前导 RNA 在 3' 端加上多余的几个核苷酸, 则 97% 的转录被抑制。说明病毒来源的 RNA 聚

合酶不能忍受任何加在基因组 3'端的核苷酸。

用单核苷酸突变的方法来研究水泡性口炎病毒前导 RNA 中的 22 个保守核苷酸对转录的影响发现,若单核苷酸突变发生在前导 RNA 3'端的头 3 个核苷酸处,则转录不发生。说明这三个核苷酸是至关重要的和不可变的,它是 RNA 聚合酶进入的位置所在,尤其是 3'UGCS'。将第 16 和 17 位的 GG 变成 AA,则转录所受影响较小,说明这两个 GG 是转录非必需的^[46]。

关于转录的终止信号,1994 年 Walker 等^[13]比较了几种弹状病毒的前导 RNA 与 N 蛋白基因起始密码之前的基因组 RNA 序列后发现,除了牛流行热病毒和狂犬病毒以外,都有保守的 3'UGUUS'顺序。在弹状病毒其它结构蛋白基因间转录的终止信号是终止密码及其后的多个 U。至于终止密码与寡聚 U 之间的核苷酸数目,不同的弹状病毒各不相同,而下游基因转录的起始信号除了 LNYV 以外,苦苣菜黄脉病毒、水泡性口炎病毒和狂犬病毒等皆是 3'U-UGUS',而莴苣坏死黄化病毒是 3'CACA5'。

关于转录过程中 RNA 聚合酶在基因组上的结合位点也有报道。1982 年 Issaac 等^[47]发现,在水泡性口炎病毒中 RNA 聚合酶结合于基因组 3'端第 16 到 30 个核苷酸之间(即其基因组保守的 3'UUUGGUS'之后)。

由于对水泡性口炎病毒 RNA 聚合酶复合体的结构还不了解,故其转录的详细机制也不清楚。例如, RNA 聚合酶复合体中究竟要多少 L 和 P 蛋白分子才能有效地发挥作用? P 和 L 蛋白在转录中是如何进行再循环的? N 蛋白在转录中是如何接近 L 和 P 蛋白的? 不同形式的磷酸化 P 蛋白对转录活性的影响如何? 都有待进一步研究。

2.2 复制和核衣壳化

水泡性口炎病毒基因的复制过程是先合成与(-)基因组 RNA 互补的(+)RNA,然后该(+)RNA 再成为模板,以便合成更多的(-)RNA 基因组,只有到最后这种(-)RNA 才能核衣壳化成为成熟的病毒粒子。

关于复制的模型来源于 1981 年 Blumberg 等的体外实验。在实验中他们发现水泡性口炎病毒有关复制的如下事实:第一产物是前导 RNA,之后出现核衣壳化。于是他们提出复制的模型:病毒 N 蛋白与新生的前导 RNA 结合,从而阻止了 RNA 聚合酶在前导 RNA 与 N 蛋白基因间连接区的终止作用,这一作用导致了 RNA 合成由转录到复制的转变, N 蛋白在各个蛋白基因间连接区中充当抗终止物的作用。由于 N 蛋白的需求量在核衣壳化中相对较大,所以复制只可能发生在病毒生活周期的晚期,只有晚期才有足够的 N 蛋白的合成。复制期足量 N 蛋白的合成与随之而来的核衣壳化,也避免了非复制期不能核衣壳化的基因组 RNA 被核酸酶降解所造成的浪费^[48]。

以上模型在以后的体内和体外实验中得到了证实。可溶性 N 蛋白与前导 RNA 可形成特异复合物,该复合物在 CsCl 梯度中呈现的浮力密度与病毒核糖核蛋白相似^[49]。从被病毒感染的宿主细胞中抽提到的可溶性抽提物,在体外实验中可支持病毒基因组 RNA 的复制^[50,51],而且复制的产物具有与病毒核糖核蛋白相似的浮力密度和抗核酸酶特性^[52]。用抗 N 蛋白的抗体免疫沉淀除去无细胞抽提物中的 N 蛋白或 N-RNA 中的 N 蛋白,则复制不能进行^[50,53]。用胶过滤法从被感染细胞中纯化 N-RNA 并加入去 N 蛋白的体系中,则复制又恢复^[52]。1991 年, Moyer 等用人工合成的 RNAs 在体外实验中证明了在水泡性口炎病毒基因组的 5'端含有

结合 N 蛋白的位点^[54]。1993 年, Smallwood 和 Moyer 等^[46]又证明了水泡性口炎病毒基因组上存在与 RNA 聚合酶结合的启动子。1992 年, Pattniak 等^[55]在体内实验中, 又证明了在水泡性口炎病毒基因的 5' 端和 3' 端含有结合 N 蛋白的位点和与 RNA 聚合酶相结合的启动子位置。这些结构区域中有保守序列 3' UGCU 5' 和多个(一般是 5 个)U, 揭示在核衣壳的形成和 RNA 聚合酶的识别上, 基因组本身就存在结构上的信号。

1983 年, Blumberg 等^[49]在水泡性口炎病毒中发现核衣壳化的信号位于水泡性口炎病毒基因组 RNA 3' 端的头 14 个核苷酸中, 由 5 次重复的 U 组成, 即从基因组的 3' 端算起, 在每 3 个核苷酸中第一个核苷酸总是 U。在 1991 年和 1993 年又有两个实验室发现在水泡性口炎病毒中核衣壳化的信号不但位于基因组的 3' 端, 而且包括了 5' 端的 26 个核苷酸^[46, 54]。在流感病毒和副流感病毒系统中, 只有病毒 RNA 的末端区域对核衣壳的形成是必须的^[56, 57]。用体外合成的 RNA 来研究水泡性口炎病毒基因组 5' 端和 3' 端区域 RNA 与核衣壳化关系的实验表明, 当合成完整的、含有前导 RNA 的 50 个核苷酸(水泡性口炎病毒前导 RNA 为 47 个核苷酸)、并利用从病毒中分离到的模板和 RNA 聚合酶进行转录, 结果产生了完整基因组长度的 RNA, 并发生了核衣壳化; 若去掉前导 RNA 中部的一段长 15 个核苷酸序列, 或者去掉其 5' 端的 13 个核苷酸, 则不能核衣壳化; 若只合成前导 RNA 的头 22 个核苷酸(它在目前已知的弹状病毒基因组中是保守的), 则发生了核衣壳化; 如果只合成前导 RNA 的头 10 个核苷酸, 则不能发生核衣壳化。由此证明前导 RNA 中保守的 22 个核苷酸是形成核衣壳的关键所在。

3 结束语

从几种不同的弹状病毒分子水平研究发现, 它们无论是在基因组上还是在蛋白质上都有许多共同点, 由此决定了它们在功能上的相似性。

随着研究的深入, 近年来发现了被感染细胞中存在非结构蛋白的基因, 例如前面提到的几种存在于弹状病毒基因组中 G 蛋白基因与 L 蛋白基因间的 G_N 基因, 狂犬病毒基因组中位于相同区域的 Ψ 基因, 它们的功能还有待进行研究。此外, 弹状病毒 RNA 聚合酶结构的研究, 对了解弹状病毒基因组的转录、复制和核衣壳化的详细机制将会有很大的帮助。P 蛋白分别被宿主细胞中的蛋白激酶 C II 磷酸化, 和随之被病毒颗粒 L 蛋白磷酸化, 对病毒基因组的转录和复制的意义, 也是今后研究的一个方面。另外, 弹状病毒基因组在转录、复制和核衣壳化过程中, 是否有宿主细胞因子的参与和如何参与, 也是今后研究的一个领域。对于以上问题的回答将会使人们对弹状病毒基因从转录、复制到核衣壳化有一个更全面的了解; 对有害病毒疫苗的研制也有很大的帮助。

参 考 文 献

- 1 Poch O, Blumberg B M, Bougueleret C. Sequence comparison of five polymerase (L protein) of unsegmented negative-strand RNA virus: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol.* 1990, 71(5): 1153-1162
- 2 Barik S, Banerjee A K. Cloning and expression of the Vesicular Stomatitis Virus phosphoprotein gene in *Escherichia coli*: Analysis of phosphorylation status versus transcriptional activity. *J Virol.* 1991, 56(4): 1719-1726
- 3 Barik S, Rud E W, Banerjee A K *et al*. Nucleotide sequence analysis of the L gene of Vesicular Stomatitis Virus (New Jersey Serotype): Identification of conserved domains in L proteins of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology.* 1990, 175(1): 332-337

- 4 Galins M S, Mink A A, Pons M W. Molecular cloning and sequence analysis of the human parainfluenza 3 virus gene encoding the L protein. *Virology*, 1988, 165(2): 499 - 510
- 5 Karter G, Argos P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerase from plant, animal and bacterial virus. *Nucleic Acid Research*, 1984, 12(18): 7269 - 7282
- 6 Parks G D. Mapping of a region of the paramyxovirus L protein required for the formation of a stable complex with the viral phosphoprotein P. *J Virol*, 1994, 68(8): 4862 - 4872
- 7 Parterson R G, Harris T J R, Lamb R A. Analysis and gene assignment of mRNA of a paramyxovirus, Simian Virus 5. *Virology*, 1984, 138(2): 310 - 323
- 8 Sleat D, Banerjee A K. Transcriptional activity and mutational analysis of recombinant Vesicular Stomatitis Virus RNA polymerase. *J Virol*, 1993, 67(3): 1334 - 1339
- 9 Walker P J, Byrne K A, Riding G A *et al* . The genome of Bovine Ephemeral Fever Rhabdo Virus contains two related glycoprotein genes. *Virology*, 1992, 191(1): 49 - 61
- 10 Leavitt R, Schlesinger S, Kornfeld S. Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of sindbis and Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol*, 1977, 21(1): 375 - 385
- 11 Roe J K, Bergmann J E. Altered cytoplasmic domains affect intracellular transport of the Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein. *Cell*, 1983, 34(2): 513 - 524
- 12 Walker P J, Byrne K A, Cybinski D H *et al* . Proteins of Bovine Ephemeral Fever Virus. *J Gen Virol*, 1991, 72(1): 67 - 74
- 13 Walker P J, Yonghong Wang, Cowley J A. Structural and antigenic analysis of the nucleoprotein of Bovine Ephemeral Fever Rhabdovirus. *J Gen Virol*, 1994, 75(8): 1889 - 1899
- 14 Walker P J, Wang Y, McWilliam S. Abstract of IXth International Congress of Virology. 1993. 46
- 15 Lentz T L, Wilson P T, Hawtor E. Amino acid sequence similarity between virus glycoprotein and snake venom curareminetic neurotoxins. *Science*, 1984, 226(4676): 847 - 848
- 16 Thomas D, Newcomb W W, Brown J C *et al* . Mass and molecular composition of Vesicular Stomatitis Virus: a scanning transmission electron microscopy analysis. *J Virol*, 1985, 54(2): 598 - 607
- 17 Tordo N, Poch O, Ermine A. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein in genes of the rabies virus genome: segmented homology with Vesicular Stomatitis Virus. *Nucleic Acids Res*, 1986b, 14(6): 2671 - 2683
- 18 Crysler J G, Lee P, Reindersm M. The sequence of the nucleocapsid protein (N) protein of Vesicular Stomatitis Viruses. *J Gen Virol*, 1990, 71(9): 2191 - 2194
- 19 Bourhy H, Kiss B, Tord N. Molecular diversity of the Lyssavirus genes. *Virology*, 1993, 194(1): 70 - 81
- 20 Takacs A M, Das T, Banerjee A K. Mapping of interacting domains between the nucleocapsid protein and the phosphoprotein of Vesicular Stomatitis Virus by using a two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(21): 10375 - 10379
- 21 Dietzschold B, Lafon M, Wang H. Localization and immunological characterization of antigenic domain of the rabies virus internal N and Ns protein. *Virus Research*, 1987, 8(2): 103 - 125
- 22 Sokol F, Clark H F. Phosphoprotein, structural components of rhabdoviruses. *Virology*, 1973, 52(1): 246 - 263
- 23 Boyd K R, Whitaker-Dowling P. Flanders Virus replication and protein synthesis. *Virology*, 1988, 163(2): 349 - 358
- 24 Das T, Banerjee A K. Role of the phosphoprotein (P) in the encapsidation of presynthesized and *de novo* synthesized Vesicular Stomatitis Virus RNA by the nucleocapsid protein N *in vitro*. *Cell Mol Biol*, 1992, 38(1): 17 - 26
- 25 Banerjee A K, De B P. Gene expression of nonsegmented negative strand RNA virus. *Pharmac Ther*, 1991, 51(1): 47 - 70
- 26 Emerson S U, Schubert M. Location of the binding domains for the RNA polymerase I. and the ribonucleocapsid template within different halves of the Ns phosphoprotein of Vesicular Stomatitis Virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(16): 5655 - 5659
- 27 Chattopadhyay D, Banerjee A K. Phosphorylation within a specific domain of the phosphoprotein of Vesicular Stomatitis Virus regulates transcription *in vitro*. *Cell*, 1987a, 49(3): 407 - 414
- 28 Chattopadhyay D, Banerjee A K. Two separate domains within Vesicular Stomatitis Virus phosphoprotein support transcription when added in trans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987b, 84(24): 8932 - 8936

- 29 Bellini W J, Engludd G, Rozenblatt S *et al* . Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol*, 1985, 53(3):908 - 919
- 30 Curran J, Richardson C, Kolakofsky D. Ribosomal initiation at alternate AUGs on the Sendai Virus P/C mRNA. *J Virol*, 1986, 57(2):684 - 687
- 31 Bilsel P M, Nichols S T. Polymerase errors accumulating during natural evolution of the glycoprotein gene of Vesicular Stomatitis Virus Indiana serotype isolates. *J Virol*, 1990, 64(10):4873 - 4883
- 32 Chattopadhyay D, Banerjee A K. NH₂-terminal acidic region of the phosphoprotein of Vesicular Stomatitis Virus can be functionally replaced by tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(21):7977 - 7981
- 33 Gill D S, Chattopadhyay D, Banerjee A K. Identification of a domain within the phosphoprotein of Vesicular Stomatitis Virus that is essential for transcription *in vitro* . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(23):8873 - 8877
- 34 Yamashita T, Kawai A. Vesicular Stomatitis Virus-associated transcriptase activity was suppressed *in vitro* by a synthetic 21 amino acid oligopeptide prepared to mimic the carboxy-terminus of Ns protein. *Virology*, 1990, 178(1):166 - 173
- 35 Keene J D, Thornton B J, Emerson S U. Sequence-specific contacts between the RNA polymerase of Vesicular Stomatitis Virus and the leader RNA gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(10):6191 - 6195
- 36 Takacs A M, Das T, Banerjee A K. Mapping of interacting domains between the nucleocapsid protein and the phosphoprotein of Vesicular Stomatitis Virus by using a two-hybrid system, *Proc Nat Acad Sci USA*, 1993, 90(21):10375 - 10379
- 37 Ono K, Dubois-Dalcq M_E, Schubert M. A mutated membrane protein of Vesicular Stomatitis Virus has an abnormal distribution within the infected cell and causes defective budding. *J Virol*, 1987, 61(5):1332 - 1341
- 38 Mancarella D, Lenard J. Interactions of wild-type and mutant M protein of Vesicular Stomatitis Virus with viral nucleocapsid and envelope in intact virions. Evidence from ¹²⁵I Iodophthyl azide labeling and specific cross-linking, *Biochem*. 1981, 20(24): 6872 - 6877
- 39 Reidler J A, Keller P M, Elson E. A fluorescence photobleaching study of Vesicular Stomatitis Virus infected BHK cells modulation of G protein mobility by M protein. *J Biochem*, 1981, 20(5):1345 - 1349
- 40 Lenard J, Vanderoef R. Localization of the membrane-associated region of Vesicular Stomatitis Virus M protein at the N-terminus, using the hydrophobic phosphoreactive probe ¹²⁵I-TID. *J Virol*, 1990, 64(7):3486 - 3491
- 41 Emerson S U. Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the Vesicular Stomatitis Virus genome. *Cell*, 1982, 31(3):635 - 642
- 42 Banerjee A K. The transcription complex of Vesicular Stomatitis Virus. *Cell*, 1987, 48(3):363 - 364
- 43 Emerson S U, Yu H Y. Both Ns and L proteins are required for *in vitro* RNA synthesis by Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol*, 1975, 15(6):1348 - 1356
- 44 Banerjee A K. Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiol Rev*, 1987, 51(1):66 - 87
- 45 Sun Wei, Gong Zu Xun. *In vitro* studies on the nucleocapsid-associated RNA polymerase of Wheat Rosette Stunt Virus. *Intervirology*, 1988, 29(3):154 - 161
- 46 Smallwood S, Moyer S A. Promoter analysis of the Vesicular Stomatitis Virus RNA polymerase. *Virology*, 1993, 192(1): 254 - 267
- 47 Isaac C I., Keene J D, RNA polymerase associated interactions near template promoter sequences of defective interfering particles of Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol*, 1982, 43(1):241 - 249
- 48 Blumberg B M, Leppert M, Kolakofsky D. Interaction of Vesicular Stomatitis Virus leader RNA and nucleocapsid protein may control Vesicular Stomatitis Virus genome replication. *Cell*, 1981, 23(3): 837 - 845
- 49 Blumberg B M, Giorgi C, Kolakofsky D. N protein of Vesicular Stomatitis Virus selectively encapsidated leader RNA *in vitro*. *Cell*, 1983, 32(2):559 - 567
- 50 Hill V M, Summers D F. Synthesis of Vesicular Stomatitis Virus *in vitro* by cellular Vesicular Stomatitis Virus RNP's added to uninfected Hela cell extracts: VSV protein requirements for replication *in vitro*. *Virology*, 1982, 123(2):407 - 419
- 51 Patton J T, Davis N L, Wertz G W. Cell-free synthesis and assembly of Vesicular Stomatitis Virus nucleocapsids. *J Virol*, 1983, 45(1):155 - 164
- 52 Mirakhur B, Peluso R W. *In vitro* assembly of a functional nucleocapsid from the negative-stranded genome RNA of a defec-

52. ...
tive interfering particle of Vesicular Stomatitis Virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(20):7511 - 7515
- 53 Peluso R W, Moyer S A. Initiation and replication of Vesicular Stomatitis Virus genome RNA in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(10):3198 - 3202
- 54 Moyer S A, Smallwood-Kentro S, Handdad A. Assembly and transcription of synthetic Vesicular Stomatitis Virus nucleocapsids. *J Virol*, 1991, 65(5):2170 - 2178
- 55 Pattniak A K, Ball L A, LeGrone A W. Infectious defective interfering particles of Vesicular Stomatitis Virus from transcripts of a cDNA clone. *Cell*, 1992, 69(6):1011 - 1020
- 56 Park K H, Huang T, Correia F F *et al* . Rescue of a foreign gene by Sendai Virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(13):5537 - 5541
- 57 Collins P L, Mink M A, Stec D S. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(21):9663 - 9667