

83, 14(3)
185-188

杆状病毒增效蛋白研究进展*

马永平 欧 洋 孟小林** 徐进平 叶林柏

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072)

15. 28
Q513
SK32.41
Q5+3

Research Advances on Baculovirus Enhancin

Ma Yongping Ou Yang Meng Xiaolin Xu Jinping Ye Linbai

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

关键词 杆状病毒, 增效蛋白, 舞毒蛾核型多角体病毒, 颗粒体病毒

Key words Baculovirus, Enhancin, *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV), Granulosis virus (GV)

昆虫杆状病毒增效蛋白(enhancin)曾被称为病毒促进因子(synergistic factor, SyF)或病毒增效因子(viral enhancing factor, VEF),它长期以来被认为只存在于昆虫颗粒体病毒(Granulosis virus, GV)中的一类蛋白质,已知有8种GV中含有增效蛋白。自Tanada^[1-4]1959年从美洲一星粘虫(*Pseudaletia unipuncta*, Pu)GV中分离出增效蛋白并证实它有增强PuMNPV的感染力后,一直很受人们关注。从它的作用机理到氨基酸序列和基因结构等方面都进行了大量研究。90年代初,Hashimoto^[5]和Roelvink^[6]等人先后分别对粉纹夜蛾GV(*Trichoplusia ni* GV, TnGV)和PuGV、棉铃虫GV(*Heliothis armigera*, HaGV)的增效蛋白基因进行了克隆和测序,并对它们的氨基酸序列进行了分析,发现三者间有很大的同源性和相似性。Roelvink^[6]等人还在另外两种GV:小菜粉蝶GV(*Pieris rapae*, Pira GV)和旋幽夜蛾GV(*Scotogramma trifolii* GV, Sctr GV)中检出有增效蛋白的存在。虽然在昆虫痘病毒(entomopoxvirus, EPV)中也有类似的具增效作用的蛋白成分^[7],但它与GV的增效蛋白不同,而在核型多角体病毒(Nuclear polyhedrosis virus, NPV)中长期未见报道。直至1997年,Bischoff^[8]等人从一种舞毒蛾NPV(*Lymantria dispar* MNPV, LdMNPV)基因组中克隆出一个增效蛋白基因,并对它进行了核苷酸和氨基酸序列分析,发现LdMNPV的增效蛋白基因结构和已测序的3种GV(Tn GV, PuGV, HaGV)的增效蛋白基因结构很相似;它与GV的氨基酸序列也有29%的同源性。随后,他们又对LdMNPV的增效蛋白基因进行了表达^[9]。在NPV中发现增效蛋白及其基因尚属首例,这一发现对增效蛋白及对GV与MNPV之间关系的研究有重大

收稿日期:1998-05-05, 修回日期:1998-07-13

* 国家自然科学基金资助课题(39570034)

** 课题负责人

意义。本文主要对 LdMNPV 增效蛋白的基因结构、氨基酸序列作一介绍,并与已知的 3 种 GV 作一比较。

1 增效蛋白的性质

增效蛋白是由病毒基因编码的一种磷脂蛋白,分子量大小在 89~110 kD,它不但能增强多种核型多角体病毒(NPV)对昆虫幼虫的感染力,也能增强 NPV 对体外培养细胞的感染力,而且还能提高 Bt 等其它生物杀虫剂的功效^[10]。在 GV 中,增效蛋白存在于包涵体包膜蛋白中^[11],约占 GV 蛋白质的 5%。在 LdMNPV 中,它存在于多角体蛋白中。现已证明,增效蛋白具有金属蛋白酶活性^[12],能降解昆虫中肠围食膜, PuGV 的增效蛋白还具有酯酶活性^[13]。就目前所知,增效蛋白以两种模式起增效作用:第一种是发挥金属蛋白酶活性,降解昆虫中肠的围食膜,破坏中肠粘膜的物理屏障,使病毒粒子更容易进入细胞,增加病毒的相对感染量;另一种是直接作用于质膜和病毒包涵体膜上的增效蛋白受体位点,促进病毒粒子与质膜的融合^[14-18],增加 NPV 的感染力。

2 LdMNPV 的增效蛋白及其基因

LdMNPV 的基因组大小为 162 kb,虽然它的基因组未全部被测序,但与 AcMNPV 共有的几个基因已被测定。与 AcMNPV 相比,LdMNPV DNA 中额外存在 29 kb 的碱基对,它提示该病毒可能带有几个 AcMNPV 中不存在的基因,现已证明有两个基因:宿主范围因子-1(hrf-1)基因和 G₂₂基因是 LdMNPV 所特有的,此外,还发现了 LdMNPV 的增效蛋白基因也是 AcMNPV 所没有的。

2.1 LdMNPV 增效蛋白基因

LdMNPV 增效蛋白基因位于 25 kD FP(few polyhedron)基因和 hrf-1 基因之间,整个 ORF 位于 Sst II 片段内,大小约 4.2 kb。有一个 2 346 bp 的 ORF,编码分子量为 89 kD、氨基酸残基数为 782 的蛋白质,它与 3 种 GV 的增效蛋白比较见表 1。

表 1 4 种病毒增效蛋白及基因比较

Table 1 Comparison of the four enhancims and its genes

病毒	ORF	氨基酸数	所在酶切片段及大小	分子量
LdMNPV	2 346 bp	782	Sst II, 4.2 kb	89 kD
TnGV	2 703 bp	901	Hind III-M, 3.5 kb	104 kD
PuGV	2 703 bp	901	Hind III-M, 3.5 kb	104 kD
HaGV	2 706 bp	902	BamHI, 5.2 kb	110 kD

LdMNPV 增效蛋白的 ORF 开始于 +49,止于 +2 395 位核苷酸,在 ORF 上游 +36 处有一可能是杆状病毒晚期启动子的序列 TTAAG,与三种 GV 的增效蛋白基因结构很相似。晚期启动子序列在 TnGV 中,是 ATAAG^[5],在 PuGV 和 HaGV 中分别是 ATAAG^[6]和 TTAAG^[6],这说明 LdMNPV 与 GV 的增效蛋白可能有相同的启动机理,也暗示它们有相似的起源。另外,在 TnGV 的 ATAAG 上游有 3 个重复的 TTACAAGA 序列,而在 LdMNPV 和 PuGV、HaGV 的增效蛋白基因中却没有发现,说明它们的基因组结构又有变化。

LdMNPV 增效蛋白基因下游与 hrf-1 基因之间没有 Poly(A)信号序列,这一点也与 3 种 GV 的增效蛋白基因相似。进一步比较发现,尽管 LdMNPV 与 GV 的增效蛋白基因下游结构相似,但 LdMNPV 的 hrf-1 与 GV 的 ORF₂ 之间没有任何同源性。

2.2 LdMNPV 增效蛋白的氨基酸序列分析

LdMNPV 增效蛋白基因编码的蛋白质分子较 GV 的小,具体区别见表 1。将已知的 4 种增效蛋白的氨基酸序列进行比较,发现在 N-末端有同源性,而 C-末端的同源性很小。LdMNPV 增效蛋白序列与每种 GV 增效蛋白氨基酸之间有 31% 的同源性(与 TnGV 为 32.1%,与 PuGV 为 32.2%,与 HaGV 为 31.4%),有 55% 的相似性(与 TnGV 为 54.7%,与 PuGV 为 55.2%,与 HaGV 为 55.6%),而 GV 增效蛋白之间氨基酸的同源性达 81%~98%,相似性达 90%,说明 MNPV 与 GV 的增效蛋白基因已发生了分化。

增效蛋白的一个显著特点是在氨基酸序列中有一个典型的金属蛋白酶锌结合保守区氨基酸序列 HEXXH,在 LdMNPV 中于 241~246 位之间,在 3 种 GV 的增效蛋白中于 244~248 位之间,因此,这 4 种增效蛋白都是金属蛋白酶超家族成员^[19]。在这类酶中,Zn²⁺ 与 HEXXH 序列中的两个 H 残基络合,然后再与该序列下游 20~120 氨基酸间的 D、H、C、E 中的任一氨基酸残基络合。比较 4 种增效蛋白的氨基酸序列发现,在 HEXXH 下游 20~120 位之间有两个 E 残基和两个 D 残基非常保守,其中任何一个氨基酸残基都可与 Zn²⁺ 结合。在金属蛋白酶 HEXXH 序列中,E 残基作为催化基团,使一个水分子极性化亲核攻击肽链上的肽键并使之断裂。1996 年,Lepore 等^[20]证明 TnGV 的增效蛋白是一个金属蛋白酶,能降解昆虫中肠(围食膜)的粘蛋白。由此推测,其它两种 GV 和 LdMNPV 的增效蛋白可能主要是以金属蛋白酶形式起增效作用的。这也就很容易解释为什么 TnGV 增效蛋白对 Bt 伴孢晶体和 β -外毒素等也有增效作用。

增效蛋白的另一个显著特点是有丰富的可能的糖基化序列——NXS/T。LdMNPV 有 9 个,TnGV 有 12 个,PuGV 有 11 个,HaGV 有 7 个。这些可能的糖基化位点在 GV 增效蛋白序列中表现出极大的位置保守性,而 TnGV、PuGV 中的保守性更大(见表 2),说明这些可能的糖基化位点对增效蛋白的活性是不可缺少的。LdMNPV 增效蛋白可能的糖基化位点与 GV 的不同。但有两个可能的糖基化位点距 HEXXH 下游的相对位置极相似,由此推断,这两个位点的糖基化可能对增效蛋白的功能是很重要的。

表 2 4 种增效蛋白中可能的糖基化位点比较

Table 2 The potential glycosylation sites in the peptides of the four enhancins

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
LdMNPV	-237	-166	-157	-104	-22	-16	-	-	-	-	-	+186	-	-	-	+406	+438	-	-
TnGV	-	-177	-	-	-	-	+18	-	+59	+92	+101	-	+292	+345	+372	+394	+435	+450	-
PuGV	-	-	-	-	-	-	+18	+31	+59	+92	+101	-	+292	+345	+372	+394	+435	+450	-
HaGV	-	-	-	-	-	-	+18	+31	-	+92	-	-	+292	+345	+371	-	-	-	+591

注:距 HEXXH 上游的相对位置用负号表示,下游的相对位置用正号表示。

增效蛋白的第三个显著特点是含有丰富的酸性氨基酸,4 种增效蛋白中酸性氨基酸占总氨基酸百分数分别为:LdMNPV 19.56%、TnGV 20.60%、PuGV 21.42%、HaGV 22.28%,平均为 20.97%。而碱性氨基酸所占的百分数较低,依次为 11.25%、11.43%、5.43% 和 12.41%,平均为 10.13%。增效蛋白的氨基酸组成也很相似,推测它可能由同一个共同的基因进化而来。

综上所述,无论从基因结构还是氨基酸序列,LdMNPV 与 GV 的增效蛋白都极其相似;那

么, LdMNPV 中增效蛋白的来源便是一个很有趣的问题。我们从现有的资料推测, LdMNPV 的增效蛋白基因很可能来自 GV, 是 MNPV 与 GV 在自然状态下基因重组的产物。其原因是: 第一, 迄今所知, 杆状病毒增效蛋白在 GV 中存在较 MNPV 中普遍, 无疑 GV 的基因组是增效蛋白的天然基因库; 第二, LdMNPV 增效蛋白基因结构与 GV 增效蛋白基因结构极其相似, 没有 MNPV 中已知基因的特征结构; 第三, LdMNPV 增效蛋白与 GV 增效蛋白有较大的同源性, 有共同的酶活性中心, 而与已知的其它蛋白间没有任何同源性^[10], 推测它不是 MNPV 中普遍存在的成分。

3 增效蛋白在害虫防治上应用的展望

增效蛋白因能增加多种 NPV 对昆虫的感染力而倍受关注, 纯化的 TnGV 增效蛋白与 AcMNPV 一同饲喂 *T. ni* 幼虫时, 能使 AcMNPV 对甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 感染力提高 12 倍^[21]; 与 Bt 混合使用, 能使 Bt 毒力提高 2~7 倍^[10]。因此, 增效蛋白在提高杆状病毒杀虫效率和拓宽害虫综合防治的领域显示出诱人的前景。上面所述两种增效机理, 对 MNPV 的增效作用二者兼有, 对 Bt 等其它杀虫剂的增效作用可能主要以第一种方式起作用。这就使增效蛋白的增效作用扩展到杆状病毒以外, 使其应用范围更加广阔。Bichoff^[8] 等人通过缺失突变 LdMNPV 增效蛋白基因证明, 增效蛋白只增加 MNPV 的感染力, 并不增加杀虫速度。增效蛋白的双重作用机制, 在实践上有极大的应用价值。

首先, 可以将增效蛋白基因重组在 AcMNPV 等广谱 MNPV 中, 生产广谱高效的重组病毒。LdMNPV 增效蛋白基因的发现, 使这一可能性变为现实, 说明将增效蛋白基因重组到 MNPV 中表达生效是可行的、有效的。我们认为, MNPV 的 P10 基因位点是理想的插入位点^[22-24], 这是因为: 第一, P10 基因是病毒复制非必需的最晚期表达基因; 第二, P10 启动子是非常强大的最晚期启动子之一; 第三, P10 蛋白缺失, 并不影响多角体的形成, 还能增加 AcMNPV 的感染力^[20], 使 NPV 的多角体蛋白更易被降解。这就能使昆虫在降解多角体的同时释放增效蛋白, 使二者同步发生作用, 减小病毒的使用量, 增加感染率, 缩短杀虫时间。

其次, 可以解决昆虫对转基因植物的抗性。业已证明增效蛋白对 Bt 有增效作用, 若在转入 Bt 伴孢晶体蛋白基因等毒素基因的同时转入增效蛋白基因, 既可增强转基因植物的抗虫能力, 又能防止昆虫对单一有效成分产生抗性, 这是一条经济有效的途径之一。

再次, 将增效蛋白基因导入 Bt 等细菌或其它真菌杀虫微生物中, 生产重组 Bt 等杀虫微生物, 这样一方面解决了病毒制剂难于大量生产和容易失活的难题, 又提高了 Bt 等药效, 缩短杀虫时间。更重要的是, Bt 等杀虫微生物可大批量发酵生产、成本低, 生产技术成熟、杀虫谱广, 有广阔的应用前景。

总之, 研制和开发无公害的高效生物杀虫剂以逐步减少化学农药用量, 是今后农林害虫综合防治的发展趋势, 杆状病毒增效蛋白的作用特点, 在这方面显示出极大的应用潜力。增效蛋白在生物农药中的实际应用, 是生物农药改良的重要途径之一。

参 考 文 献

- 1 Tanada Y. Synergism between two viruses of the armyworm. *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera; Noctuidae). *J Invertebr Pathol*, 1959, 1: 215~231

- 2 Tanada Y, Hess R T, Omi E M. Invasion of a nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, and the enhancement of a synergistic enzyme. *J Invertebr Pathol*, 1975, 26:99~104
- 3 Tanada Y, Hess R T, Omi E M *et al.* Localization of a synergistic factor of a granulosis virus by its esterase activity in the larvae midgut of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Microbio*, 1983, 37:87~93
- 4 Tanada Y. A synopsis of studies on the synergistic properties of an insect baculovirus: attribute to Edward A. steinhaus. *J Invertebr Pathol*, 1985, 45:125~138
- 5 Hasnhiroto Y, Corsaro B G, Granados R R. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *J Gen Virol*, 1991, 72:2645~2651
- 6 Roelvink P W, Corsaro B G, Granados R R. Characterization of the *Helicoverpa amigera* and *Pseudaletia unipuncta*. *J Gen Virol*, 1995, 76:2693~2705
- 7 Xu J H, Hukuhara T. Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata*, by a factor in the spheroids of an entomopoxvirus. *J Invertebr Pathol*, 1992, 60:259~264
- 8 Bischoff D S, Slavicek J M. Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 1997, 71:8133~8140
- 9 Bischoff D S, Slavicek J M. Overexpression of *Lymantria dispar* MNPV enhancin gene. Abstract from Soci for Invertebr Pathol 30th Annu Meeting. Canada, 1997.
- 10 Corsaro B G, Guzen M R, Wang P *et al.* Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis. In: Parasites and pathogens of insects, Vol 2. Pathogens. Academic Press, 1993, 127~145
- 11 Zhu Y F, Hukuhara T, Tamura K. Location of a synergistic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J Invertebr Pathol*, 1989, 54:49~56
- 12 Wang P, Granados R R. An intestinal mucin is the target for a baculovirus enhancin. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:6977~6982
- 13 Blissard G W, Granados R R. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol*, 1990, 35:127~155
- 14 Williams G V, Rohel D Z, Kuzio J *et al.* A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*, 1989, 70:187~202
- 15 Tanada Y, Inoue H, Hess R T *et al.* Site of action of a synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J Invertebr Pathol*, 1980, 35:249~255
- 16 Yamamoto T, Tanada Y. Physicochemical properties and location of capsule components, in particular the synergistic factor, in the occlusion body of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Virology*, 1980, 107:434~440
- 17 Uchima K, Harrey J P, Omi E M. Binding sites on the midgut cell membrane for the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Insec Biochem*, 1988, 18:645~650
- 18 Derkser A C G, Granados R R. Alteration of a lepidoptera peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*, 1988, 167:242~250
- 19 Jiang W, Bond J S. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett*, 1992, 312:110~114
- 20 Lepore L S, Roelvink P R, Granados R R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infection, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol*, 1996, 68:131~140
- 21 Wang P, Hammer D A, Granados R R. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four Lepidoptera insects. *J Gen Virol*, 1994, 75:1961~1967
- 22 张燕, 张颖, 张志芳等. 家蚕核型多角体病毒 P10 基因启动子结构与功能分析. *病毒学报*, 1995, 11(3):255~261
- 23 Duzio J, Rohel D Z, Curry C J *et al.* Nucleotide sequence of the P10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1984, 139:414~418
- 24 Leisy D, Rohrmann G F, Nesson M *et al.* Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus P10 gene. *Virology*, 1986, 153:157~167