

呼肠孤病毒内源性转录的结构基础*

方 勤**, 丁清泉

(中国科学院武汉病毒研究所, 中国科学院分子病毒重点实验室, 湖北武汉, 430071)

Structural Basis of Inner Transcription for Reovirus

FANG Qin, DING Qing-quan

(Molecular Virology Key Laboratory, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

关键词: 呼肠孤病毒; 内源性转录; 结构基础;

中图分类号: Q939.4

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0535-05

呼肠孤病毒为自然界特有的分段 dsRNA 基因组, 其宿主范围十分广泛, 包括哺乳动物、无脊椎动物、植物、真菌与细菌。随着结构生物学与信息处理等新技术的运用与发展, 近年来, 在呼肠孤病毒结构研究方面已取得突破性成果。特别是运用 X 射线晶体衍射及低温电镜与三维重构术对呼肠孤病毒核心蛋白与完整颗粒结构高分辨率的解析, 不仅揭示了呼肠孤病毒核衣壳蛋白所具有的转录酶活性, 同时阐明了内源性 RNA 转录与调节的结构基础。dsRNA 病毒颗粒内除含有高度保守的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RDRP), 还具备 RNA 转录后修饰与复制所需的全部酶类, 如负责 mRNA 5'末端加帽反应 ($^{7\text{m}}\text{GpppN}^{2\text{Om}}$) 的甲基化酶等。呼肠孤病毒科成员具有在完整病毒颗粒内进行内源性 mRNA 转录的特性, 并利用自身编码的酶类行使转录起始、延伸、5'加帽及新生 mRNA 的释放等功能^[1-5]。了解 dsRNA 病毒的颗粒构筑特点及在病毒侵染与复制过程中结构与功能的关系、各结构蛋白功能位点的构像变异与其相互作用, 将有助于认识其进化及结构与功能的关系, 阐明病毒的复制与侵染的分子机制。本文将介绍哺乳动物呼肠孤病毒 (*Mammalian orthoreovirus*, MRV) 与质多角体病毒 (*Cypovirus*, CPV) 为重点介绍呼肠孤病毒结构与内源性转录研究新进展。

1 呼肠孤病毒结构组成与内源性 RNA 转录性质

在呼肠孤病毒科现有 9 个属成员中, 哺乳动物

呼肠孤病毒为呼肠孤病毒科代表株, 已成功用于无包膜 dsRNA 病毒与细胞的相互作用及感染性病毒颗粒在致病作用过程中结构与功能的关系模型研究。MRV 基因组 10 个基因片段共编码 11 种蛋白 ($\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ 、 $\mu\text{L}/\mu\text{LC}$ 、 $\mu 2$ 、 μNS 、 $\sigma 1$ 、 $\sigma 1\text{S}$ 、 $\sigma 2$ 、 $\sigma 3$ 、 $\sigma\text{NS} 1$), 在这些蛋白中, 有 3 个组分为非结构蛋白(σNS , $\sigma 1\text{S}$, μNS), 它们仅在病毒复制时出现, 在病毒成熟时, 不构成病毒结构蛋白组分, 可能与 ssRNA 的转录起始与转录调节或病毒的包装机制有关^[6,7]。其它 8 种蛋白为结构多肽, 包装在病毒颗粒中, 每一种蛋白呈现一定数量的拷贝, 并在二十面体对称排列的衣壳上占有典型的对称相关位置。除 3 种衣壳蛋白 ($\mu\text{L}/\mu\text{LC}$ 、 $\sigma 1$ 、 $\sigma 3$) 与病毒起始侵染与进入细胞有关外^[8-12], 构成核心衣壳的其它 5 种蛋白既具框架作用, 又有十分重要的生物学活性, 在病毒的转录与复制中起着极为关键的作用。呼肠孤病毒科成员的结构蛋白通常构筑成双层或多层衣壳, 即内衣壳与外衣壳。但唯一例外的是 CPV, 其病毒颗粒仅由单一衣壳组成(多角体蛋白除外), 相当于其它属种的核心衣壳。与呼肠孤病毒科其它成员的核衣壳组成相似, CPV 衣壳蛋白主要由三种结构蛋白组成, 它们是衣壳蛋白 CSP (Capsid shell protein)、大突起蛋白 LPP(Large project protein)及塔式突起蛋白 TP(Turrent protein)。基于其结构与形态学上的功能, CSP 相当于 MRV $\lambda 1$ 及 BTV (Bluetongue virus) VP3 蛋白, LPP 与 MRV $\sigma 2$ 蛋白同源; TP 为 $\lambda 2$ 蛋白类似物。此外, 每一个 CPV 衣壳含有 60 个拷贝的 TP 及 120 个拷贝的 CSP 及 LPP (见图 1)。

收稿日期: 2004-03-25, 修回日期: 2004-05-09

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170730)

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 027-87198551, E-mail: qfang@pentium.whiov.ac.cn

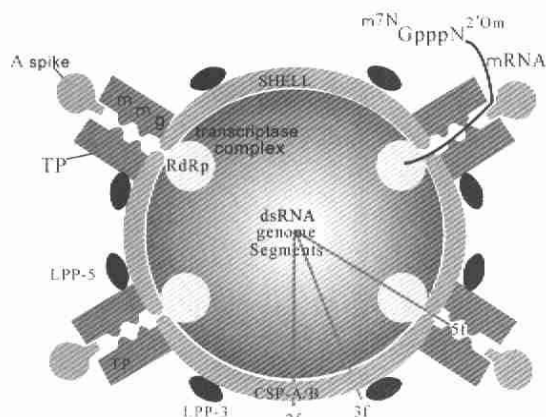


图1 质型多角体病毒粒子结构及mRNA合成示意图(引自文献^[14])

Fig.1 Schematic of the cytoplasmic polyhedrosis virus particle, an mRNA synthesis machine(reference^[14])

LPP: 大突起蛋白(Large Protrusion Proteins); TP:塔式突起蛋白(Turret Proteins); CSP:衣壳蛋白(Capsid Shell Protein); 2f/3f/5f: 2、3、5次对称轴

采用X射线晶体衍射技术对MRV核衣壳结构进行分析,揭示呼肠孤病毒双层衣壳蛋白按特异的、完全非等量形式进行接触,这是由于其两层蛋白几个不同的接触位点决定的。MRV核心蛋白的功能与轮状病毒、蓝舌病毒核心衣壳十分相似,但也有些不同的特征。蓝舌病毒核心分为2层,蛋白VP3(T2),由120亚单位自动组装成薄的内核衣壳。蛋白VP7(T13)则由260个3聚体形成外衣壳,而MRV λ 1蛋白由 σ 2亚单位修饰^[11];最新的对CPV 8 Å分辨率结构研究揭示,CPV单一衣壳蛋白除了具有封闭dsRNA基因组与保护转录酶活性外,同时进化为具有结构蛋白的作用,其功能同于其它dsRNA病毒的外层衣壳^[13]。Zhou等通过分析CSP与LPP之间广泛的非等价接触,独特的CSP突起结构域及精密的CSP内部分子表面间的补足,阐明其衣壳结构的稳定性。此外,CPV含有额外的钉状物(A spike)附着在turrets(B spike)及120大的突起蛋白LPP上,推测LPP的功能与MRV 150个 σ 2结构相类似。钉状物A是否同MRV σ 1蛋白具有相同的受体结合功能,及激活dsRNA起始转录的作用,有待进一步证实^[14]。

在呼肠孤病毒科9个属的成员中,具有转录活性的内层衣壳子粒均享有类似于呼肠孤病毒 λ 1框架结构,其内包含有基因组dsRNA及进行RNA转录复制所需的全部酶类,这样新合成的mRNA产物得以在某一特定的通道进行帽化与释放(图1)。MRV λ 1蛋白具有类似于BTV VP3蛋白的功能;此外,双链RNA细菌病毒和真菌病毒基因组也有同样的核外鞘结构。有趣的是,虽然呼肠孤病毒 λ 1蛋白

在240-1275氨基酸位点与蓝舌病毒VP3无序列同源性,但他们有相似的板形结构(plate-like shape)。在每一个蛋白中, α 螺旋束距五次轴最近, β 折叠域远离五次对称轴。有关核衣壳蛋白结构的研究,目前已基本阐明他们的结构与功能。3.6 Å X-射线晶体衍射分析,建立了三种主要核心衣壳蛋白(λ 1、 λ 2和 σ 2)功能结构域原子模型: λ 1在二十面体颗粒中呈T=1对称排列, λ 2为5次对称轴上塔式钉状物突起, σ 2具有夹钳样的作用,用于加强 λ 1和 λ 2间的相互关联^[11]。为得到复制与转录关键因子 λ 3蛋白(RNA聚合酶)原子模型,体外表达的重组MRV λ 3晶体2.5 Å结构相继得到解析^[15]。研究结果表明,Reovirus λ 3蛋白与其它病毒RNA聚合酶相类似(如噬菌体 ϕ 6、HCV等),为球状右旋式蛋白,其N端及C端精密围绕在手掌形(fingers-palm-thumb core)亚结构域周围,这样形成了象笼子样的结构,引导出四个通道通向催化活性位点。位于 λ 3聚合酶表面的5'端帽化结合位点,暗示RNA转录过程中模板滞留机制:即模板RNA 5'端正链与聚合酶复合物结合促进了3'负链进入模板通道的机会。在这四个通道中,其中二个通道为入口,即一条为ssRNA模板通道,一条为NTP供给通道。另外二个为释放出口,即dsRNA复制产物及正链RNA转录物的释放通道。近期Baker等成功将MRV λ 3RNA聚合酶晶体蛋白结构嵌入7.6 Å MRV低温电镜与三维结构重构密度图谱,揭示了每一 λ 3分子锚定内衣壳表面,除与3个 λ 1分子产生主要的接触外,与5次轴非中心位点重复折叠,由此说明为什么仅一个 λ 3拷贝与此位点相连,并阐明在转录与复制过程中 λ 1蛋白与 λ 3蛋白(RNA聚合酶)的相互作用方式^[16]。在5种核心结构蛋白中,虽然还未获得 μ 2的晶体结构,但其纯化蛋白的体外转录活性分析结果表明 μ 2蛋白具有与 λ 3相互作用关系,推测 μ 2在MRV核心具有酶活性,在其内源性RNA合成过程中具有辅助 λ 3进行转录合成的RNA 5'三磷酸酶活性^[17]。

2 呼肠孤病毒转录与调节的结构基础

业已证实,MRV呼肠孤病毒核心至少催化5种不同的酶活性反应。除了 λ 3蛋白具有RNA聚合酶活性外^[15],在5'mRNA帽化过程中还有4种酶参与反应,即RNA 5'三磷酸酶(RTPase)、RNA 7-N-鸟核苷酸转移酶、RNA 7-N-鸟核苷酸甲基化酶(Methyltransferase 1)和RNA 2'-O-核糖甲基化酶(Methyltransferase 2)。RTPase活性已定位于 λ 1蛋白,塔式突起 λ 2蛋白含有RNA 鸟核苷酸转移酶与甲基化酶活性^[18,19],其功能

为完成新生的mRNA转录产物的帽化反应及为mRNA提供输出通道。早期研究已证实, 病毒核心还具有催化从NTP去除 γ -磷酸基团的反应。

MRV的转录与复制首先由脱壳而激活^[20], 然后进行ssRNA的转录, 整个过程在亚病毒颗粒中进行, 由病毒核心所携带的RNA聚合酶和其它复制酶共同完成。在病毒核心内, 由亲代dsRNA负链转录产生的正链RNA是复制dsRNA的负链的模板, 合成自单一位点起始, 以5'-3'方向进行, 负链合成一旦完成, 便与正链结合形成子代双链RNA。复制酶依赖负链模板合成正链mRNA, 通过亚病毒颗粒的 $\lambda 2$ 蛋白通道上的帽化结构域进行加帽反应^[11]。帽化mRNA产物一方面可作为正链与负链结合用于基因组包装, 另一方面运送到细胞质中, 在聚核糖体上翻译产生不同的蛋白质^[4]。在MRV RNA转录与帽化过程中, RDRP的催化复合物结构特征与已知结构的其它RNA聚合酶结构特性十分相似^[21, 22]。为保证呼肠孤病毒拥挤的核衣壳内部(包括基因组RNA)时空上的协调性, $\lambda 3$ 聚合酶结构呈现明显的进化特征。MRV $\lambda 3$ 的2.5 Å分辨率晶体结构显示, RNA聚合酶催化位点位于连接4个通道的笼子中心, 有一个向外的位点用于5'-m⁷G帽化反应以限定聚合酶的活动范围(图2)。RDPR在dsRNA病毒蛋白中具有高度保守性, 对正链或负链RNA病毒而言, 也拥有基本相同的折叠, 如丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV) RNA聚合酶等^[22]。

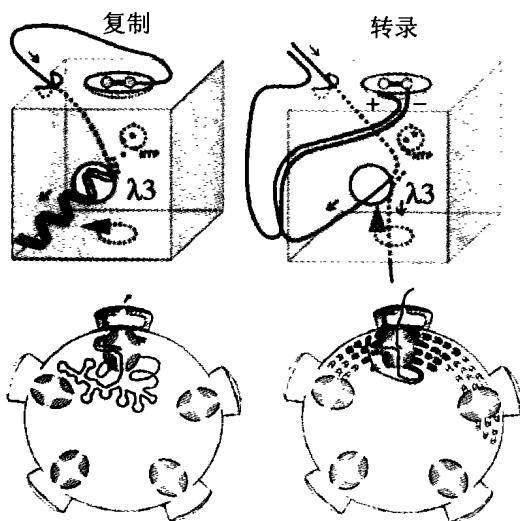


图2 多核苷酸合成的空间结构模型(引自文献^[15])

Fig.2 Model for spatial organization of polynucleotide synthesis (from reference^[15])

为进一步揭示转录酶同底物RNA/产物mRNA相互作用方式, Xia等通过对CPV完整的与空的衣壳

的13 Å分辨率密度图谱分析, 获得了病毒颗粒中心高度螺旋的dsRNA与内衣壳位点转录酶蛋白形成的锥型环绕转录酶复合物(TEC)模型, 提出了RNA复制与转录过程的模板移动机制^[2]。早期的生物化学与结构研究认为, dsRNA模板在TEC作用下转录获得新生的mRNA, 然后通过TP塔式突起蛋白加帽后运送到寄主细胞质。Xia等获得CPV新的结构信息, 勾画了在活性转录中允许内部基因组排序的详细的逐级转录机制。在静态时, RNA基因组负链的3'与TEC接触形成转录起始复合物; 转录一旦开始, 位于衣壳蛋白上的解旋酶结构域解开dsRNA两条链, 这样负链RNA得以插入TEC内小的RNA结合缝隙, 在位于RNA聚合酶附近的RNA结合结构域负链与正链汇合形成二聚物。在延伸处理过程中, TEC提供了结构框架引导新形成的dsRNA产物向衣壳中心域帽化酶连接, 接着新合成的mRNA通过TP塔式突起释放。这一机制为dsRNA病毒高效有序的内源性RNA转录提供了依据。

基于CPV单一衣壳结构的特殊性, Zhou等通过对CPV8 Å分辨率低温电镜与三维构像图谱的分析, 阐明了CPV结构的稳定性与mRNA转录调节的结构基础。研究发现, 在每一个CPV衣壳上的120个LPP将内部二聚体界面与交互二聚体界面邻近的CSP完全锁住。LPP间及内层CSP间的相互作用, 与更广泛的TP-CSP相互作用结合在一起, 这样加强了CPV的稳定性(图1)。基于上述结构特征, 与其它相对多孔的呼肠孤病毒衣壳结构不同的是, 仅在CPV TP突起下面, 有一个既能关闭又能开启的小孔。在CPV颗粒处于静止状态时, 孔是关闭的。在mRNA释放时, 通过构像的改变打开小孔。CPV衣壳蛋白分子间特有的相互作用形式(如多化合价的, 易变的及混杂的特性), 可能有助于转录合成过程中衣壳蛋白构像改变的需要。这一发现, 提供了一个在内源性RNA转录过程中促进构像转换及调节RNA合成与释放的机制。基于对CPV核蛋白结构基础及与RNA相互作用的关系的揭示, Zhou等提出高度有序的RNA转录、合成及释放过程的调节, 是通过光圈样收缩有序化开启或关闭5次对称轴上一层衣壳小孔及二层塔式突起通道上功能结构域得以完成的^[13, 23]。这一假说与其它呼肠孤病毒转录与合成机制相类似, 但需要进一步的实验依据。

3 病毒结构与进化的关系

基因组序列的同源性分析表明, 呼肠孤病毒科现有9个属的成员在系统进化上存在显著的分歧,

但它们在病毒结构上拥有很多共性：1) 病毒粒子无包膜；2) 病毒衣壳按同心轴形式排列为 2 层或 3 层；3) 病毒基因组 10-12 片段以超螺旋形式紧密排列于病毒颗粒中心；4) 病毒外层衣壳按不完全的 T=13 对称排列，病毒内层衣壳按 T=1 对称排列；5) 呼肠孤病毒结构蛋白不仅能识别细胞表面受体位点，引导病毒颗粒穿入细胞膜双分子层，起动侵染，而且能提供病毒的 mRNA 转录与复制所需的酶类。

尽管呼肠孤病毒科不同成员在结构与功能上有许多相似之处，但在结构多肽或亚基的组成以及排列方式上亦表现出许多差异。其它的基因组为 dsRNA 病毒，如双 RNA 病毒(*Birnavirus*)与单 RNA 片段真菌病毒 *Totivirus* (酵母 L-A virus)，在基因水平上表现出更大的分化，因为这些病毒的基因组已分化为仅有 1-2 条 RNA 的片段。尽管如此，但在结构与功能上与呼肠孤病毒拥有许多共性，如双 RNA 病毒仅有单层立体对称的衣壳，但结构仍为 T=13 立体对称。这些相似性不仅能反应 dsRNA 家族成员进化的亲缘关系，还体现在复制周期中由衣壳蛋白按 T=13 或 T=1 对称结构介导的相似方式所行使的转录与复制机制。呼肠孤病毒科不同属种的结构演变，如病毒的衣壳蛋白排列与某种结构蛋白构象的改变，是与其功能相适应的。

呼肠孤病毒结构的共有特征是由 60 个二聚体组成的内衣壳蛋白按 T=1 晶格形式排列。蓝舌病毒(BTV)、哺乳动物呼肠孤病毒与质多角体病毒的高分辨率结构研究表明，衣壳蛋白的 $\alpha + \beta$ 折叠是十分保守的^[1,13,24]。然而，内层衣壳以外的结构在进化上具有十分显著的差异，并呈现出 LPP 拷贝数的增加或减少及外衣壳的层数变化。保守的内衣壳与多变的外衣壳为 dsRNA 病毒共有的原始祖先及在进化过程中广泛的宿主范围提供了强有力的证据。内衣壳蛋白的保守性还为遗传物质的稳定性及内源性 RNA 转录调节提供了合适的场所。尽管这些 dsRNA 病毒 CSP 蛋白所有的折叠具普遍的相似性，但通过多重或双重同源性比较分析，有趣的是在这些蛋白中未发现具有显著的序列同源性，表明 CSP 分子进化过程中经历了实质性的修饰，其最显著的修饰是 CSP 分子上的插入或缺失。这样，在外壳蛋白结构分化与寄主适应性选择压力相联系时，内衣壳蛋白的修饰很可能是与各种病毒复制所需要的结构组成相适应的。

研究表明，结构相似的病毒种类在进化历程上可能更为接近。依据对呼肠孤病毒科 9 个属成员核

衣壳三维结构研究，可进一步将呼肠孤病毒分为两大类：第一类为核衣壳带有钉状物突起的病毒类群，亦称表面粗糙型，其特点是 CSP 由 120 个分子组成，核心表面的衣壳呈现 T=1 对称结构，钉状物突起位于核衣壳五次对称轴位置上，其功能为 RNA 帽化与释放通道^[1, 13]；这种结构的病毒核心一般由 T=13 不完全对称的外衣壳蛋白所包围，以此形成病毒外鞘衣壳；这种结构完整的病毒颗粒通常为双层衣壳组成；此类病毒的唯一例外是 CPV (*Cypovirus*)，其病毒颗粒仅由单一衣壳组成，相当于其它属种的核心衣壳，而这种单一衣壳的完整质型多角体病毒颗粒除具有转录酶活性外，其结构相当稳定^[24]。与表面粗糙的类型相比较，另一类表面光滑的病毒核壳相对脆弱，其核心表面层蛋白由 1 层或 2 层 120 个 CSP 分子组成，按完全的 T=13 对称排列，如 BTV、RDV 及轮状病毒，推测这种结构可能有助于加强核心内具有转录活性的病毒核壳的强度^[25]。

除了内部的框架结构外，dsRNA 病毒结构的分化反应了病毒复制包装与入侵机制的异同。MRV 有突起的核壳 ICP (internal capsid particle)，帽化复合物 $\lambda 2$ 为有规则的结构位于 $\lambda 1$ 外面， $\sigma 2$ 具有夹子的作用，其小节位于 $\sigma 2i$ 和 $\sigma 2ii$ 相应位置，而 $\sigma 2ii$ 位点的蛋白可能是病毒组装时需要的夹子，其功能为加强 $\lambda 1$ 和 $\lambda 2$ 间的相互关联。裴济病毒、胞浆多角体病毒、水生呼肠孤病毒、水稻病毒具有象 MRV $\lambda 2$ 蛋白相似的突起结构，其中质型多角体病毒、水生呼肠孤病毒、水稻病毒的这一特点已为低温电镜研究所证实。相反，环状病毒属、轮状病毒、植物呼肠孤病毒、科罗拉多蜚虱热病毒为无突起的外衣壳颗粒结构，它们的帽化酶位于普通颗粒核壳内层，可能与聚合酶密切相关，由此暗示存在不同 RNA 释放途径。dsRNA 的复制是在亚病毒颗粒中进行，整个过程需要蛋白质的持续合成，以提供病毒复制所需的酶类，其次是作为模板合成负链 RNA，并合成组装病毒骨架的病毒结构蛋白，重新组成子代病毒基因组，再装配新的子代颗粒^[26]。

参考文献

- [1] Reinisch K M, Nibert M L, Harrison S C. Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution[J]. *Nature*, 2000, 404: 960-967.
- [2] Xia Q, Jakana J, Zhang J Q, et al. Structural comparisons of empty and full cytoplasmic polyhedrosis virus: protein-RNA interactions and implications for endogenous RNA transcription mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 1094-1100.
- [3] Lawton J A, Estes M K, Prasad B V. Mechanism of genome

- transcription in segmented dsRNA viruses[J]. *Adv Virus Res*, 2000, 55: 185-229.
- [4] Nibert M L, Schiff L A. Reoviruses and their replication[A]. In: *Fields Virology*[M], Knipe, D M, Howley P M, Griffin D E, R.A. eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 1679-1728.
- [5] Patton J T, Spencer E. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses[J]. *Virology*, 2000, 277: 217-225.
- [6] Broering T J, McCutcheon A M, Centonze VE, *et al.* Reovirus nonstructural protein μ NS binds to core particles but does not inhibit their transcription and capping activities[J]. *J Virol*, 2000, 74: 5516-5524.
- [7] Gillian A L, Schmechel S C, Livny J, *et al.* Reovirus protein σ NS binds in multiple copies to single-stranded RNA and shares properties with single-stranded DNA binding proteins[J]. *J Virol*, 2000, 74:5939-5948.
- [8] Liemann S, Chandran K, Baker TS, *et al.* Structure of the reovirus membrane-penetration protein, μ 1, in a complex with its protector protein, σ 3[J]. *Cell*, 2002 :108:283-295.
- [9] Chandran K, Zhang X, Olson N H, *et al.* Complete in vitro assembly of the reovirus outer capsid produces highly infectious particles suitable for genetic studies of the receptor-binding protein[J]. *J Virol*, 2001, 75:5335-5342.
- [10] Chappell J D, Duong J L, Wright B W, *et al.* Identification of carbohydrate-binding domains in the attachment proteins of type 1 and type 3 reoviruses[J]. *J Virol*, 2000: 74:8472-8479.
- [11] Middleton J K, Severson T F, Chandran K, *et al.* Thermostability of reovirus disassembly intermediates (ISVPs) correlates with genetic, biochemical, and thermodynamic properties of major surface protein μ 1[J]. *J Virol*, 2002, 76:1051-1061.
- [12] Olland A M, Jane-Valbuena J, Schiff L A, *et al.* Structure of the reovirus outer capsid and dsRNA-binding protein σ 3 at 1.8 Å resolution[J]. *EMBO J*, 2001, 20:979-998.
- [13] Zhou Z H, Zhang H, Jakana J, *et al.* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Structure at 8Å by Electron Cryomicroscopy: Structural Basis of Capsid Stability and mRNA Processing Regulation[J]. *Structure*, 2003, 11: 651-663.
- [14] Nibert M L. CPV, a Stable and Symmetrical Machine for mRNA Synthesis[J]. *Structure*, 2003, 11: 605-614.
- [15] Tao Y, Farsetta D L, Nibert M L, *et al.* RNA Synthesis in a cage-structural studies of reovirus polymerase 3[J]. *Cell*, 2002, 111: 733-745.
- [16] Zhang X, Walker S B, Chipman P R, *et al.* Reovirus polymerase 3 localized by cryo-electron microscopy of virions at a resolution of 7.6Å[J]. *Nature structural biology*, 2003, 10:1011-1018.
- [17] Kim J, Parker J S L, Murray K E, *et al.* Nucleoside and RNA Triphosphatase Activities of *Orthoreovirus* Transcriptase Cofactor μ 2 [J], *JBC*, 2004, 279: 4394-4403.
- [18] Breun L A, Broering T J, McCutcheon A M, *et al.* Mammalian reovirus L2 gene and λ 2 core spike protein sequences and whole-genome comparisons of reoviruses type 1 Lang, type 2 Jones, and type 3 Dearing[J]. *Virology*, 2001, 287:333-348.
- [19] Luongo C L, Reinisch K M, Harrison SC, *et al.* Identification of the guanylyltransferase region and active site in reovirus mRNA capping protein λ 2[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:2804-2810.
- [20] Farsetta D L, Chandran K, Nibert M L. Transcriptional activities of reovirus RNA polymerase in re-coated cores. Initiation and elongation are regulated by separate mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 39693-39701.
- [21] Butcher S J, Grimes J M, Makeyev E V, *et al.* A Mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization[J]. *Nature*, 2001, 410 (6825): 235-240.
- [22] Bressanelli S, Tomei L, Rey F A, *et al.* Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides[J]. *J Virol*, 2002, 76:3482-3492.
- [23] Bujnicki J M, Rychlewski L. Reassignment of specificities of two cap methyltransferase domains in the reovirus λ 2 protein[J]. *Genome Biol*, 2001, 2(9):1-6.
- [24] Zhang H, Yu X K, Lu X Y, *et al.* Molecular interactions and viral stability revealed by structural analyses of chemically treated cypovirus capsids[J]. *Virology*, 2002, 298: 45-52.
- [25] Mertens P P C, Arella M, Attoui H, *et al.* *Reoviridae*. In *Virus Taxonomy*. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses[M]. San Diego, CA: Academic Press, 2000. 395-480.
- [26] Kim J, Tao Y, Reinisch K M, *et al.* Orthoreovirus and Aquareovirus core proteins: conserved enzymatic surfaces, but not protein-protein interfaces[J]. *Virus Res*, 2004, 101:15-28.