

A 型流感病毒 RNA 聚合酶及其对基因组复制和转录的调控作用

陶攀, 潘兹书^{**}, 吴建国

(武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室, 中国武汉 430072)

Function of RNA-dependent RNA Polymerase of Influenza A Virus on the Regulation of Viral Genome Replication and Transcription

TAO Pan, PAN Zi-shu^{**}, WU Jian-guo

(State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

关键词: A 型流感病毒; RNA 聚合酶; 复制和转录

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0304-05

A 型流感病毒是正粘病毒科成员, 为单股负链分节段 RNA 病毒, 全基因组由八个节段组成, 分别编码八种结构蛋白 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1 和 M2) 和两种非结构蛋白 (NS1 和 NS2)。核蛋白 (NP) 和 RNA 聚合酶复合体与病毒的八个 RNA 节段组成八个螺旋丝状的病毒核衣壳 (RNP), 核衣壳被双层类脂膜包裹, 脂膜内为基质蛋白 (M1) 层, 膜上镶嵌着 HA、NA 和 M2 三种膜蛋白。HA 和 NA 为流感病毒的主要抗原。根据 HA 和 NA 抗原性的差异, A 型流感病毒可分 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型^[1]。A 型流感病毒具有广泛的宿主范围和超强的重组变异能力, 对人类健康的威胁日趋严重, 引起各国政府和科技工作者的广泛关注。研究 RNA 聚合酶的功能、揭示病毒复制和变异机理是目前抗流感病毒感染研究的热点之一。本文综述了流感病毒 RNA 聚合酶及其对病毒基因组复制和转录调控的研究进展。

1 流感病毒的复制

流感病毒通过囊膜糖蛋白 HA 吸附到细胞表面的唾液酸受体上, 然后病毒颗粒通过受体介导的胞吞作用进入细胞形成胞内体。位于病毒囊膜上的 M2 蛋白具有离子通道功能并被胞内体中的酸性环

境激活, 使离子进入病毒颗粒中, pH 由中性转变为酸性。同时在胞内体的酸性环境中, HA 构象发生改变, 暴露出疏水的融合肽, 介导病毒囊膜与胞内体的融合^[2]。病毒粒子内环境的酸化, 使 M1 与 RNP 核心之间的蛋白-蛋白相互作用减弱, 病毒 RNP 与 M1 解离^[3], 病毒完成脱壳, RNP 进入细胞质, 进而转运到细胞核。在核内, 病毒编码的 PB2、PB1 和 PA 三个亚基组成 RNA 聚合酶, 负责完成病毒基因组的复制和转录。在病毒基因组的复制过程中, RNA 聚合酶首先以病毒 RNA (vRNA) 为模板合成与其互补的 RNA (cRNA), 再以 cRNA 为模板拷贝出 vRNA。在病毒基因组的转录过程中, RNA 聚合酶以 vRNA 为模板, 以剪切宿主 mRNA 的帽子结构为引物起始转录, 在 vRNA 5' 端的一串 U 残基处发生“stutter”产生 Poly (A) 结构并终止转录, 从而产生含有帽子和 Poly (A) 结构的 mRNA, 运送到胞质中指导病毒蛋白质的合成。合成的 RNA 聚合酶、NP 和 M1 蛋白被转运到核内与 vRNA 一起装配成 vRNP-M1 复合物, 在 M1 的引导下该复合物被运送到出芽部位, 与 HA、NA 和 M2 一起装配, 形成成熟的病毒粒子并释放到细胞外, 从而开始新一轮的复制^[3]。

收稿日期: 2005-11-02, 修回日期: 2005-12-19

作者简介: 陶攀(1983-), 男, 安徽省籍, 博士生, 主要从事流感病毒研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 027-68752833, Email: zspan@whu.edu.cn

2 流感病毒 RNA 聚合酶

2.1 RNA 聚合酶及复制、转录复合体

流感病毒 RNA 聚合酶是由 PB2、PB1 和 PA 三个亚基组成的异源多聚体。该多聚体非常稳定，通

过亲和层析纯化可获得完整的 RNA 聚合酶复合体。通过三维重构技术得到的聚合酶复合体的结构相当紧凑, 各亚基之间无明显界限。PB2 的 N 端区域和 PA 的 C 端区域均暴露在聚合酶的表面, PB1 的 C 端区域位于 RNA 聚合酶与 NP 的结合面上^[4]。流感病毒基因组的复制和转录在 RNP 复合体状态下完成^[5]。NP 单体能够结合 vRNA 的核糖-磷酸骨架, 一个流感病毒基因片断可与多个 NP 单体结合, 形成 NP-vRNA 复合物。RNA 聚合酶的加入使得 NP-vRNA 复合物上的碱基具有一定的空间自由, 以致 RNA 聚合酶能直接以 NP-vRNA 复合物中的 RNA 为模板完成 RNA 的复制或转录而无需解离出 RNA^[5]。RNA 聚合酶中可能存在沟状结构, 通过该结构与模板 RNA 结合, 将正在延长的新生链向外释放^[4]。

对 RNA 聚合酶各亚基的装配及亚基之间的相互作用位点, 也有较多的研究和报道。Deng 等报道, 在体外单独表达的 PB2 能够与共表达的 PB1-PA 二聚体组装成有转录活性的复合物, 且 PB1-PA 二聚体在 PB2 装配之前, 先与病毒启动子结合。这暗示着 RNA 聚合酶的分级装配, 即 PB1 和 PA 首先装配成二聚体, 然后 PB1-PA 二聚体和 PB2 分别运输到核内, 再装配成完整的聚合酶复合物^[6]。单独表达的 PB2 只在核内积累, 而单独表达的 PA 和 PB1 在细胞质和细胞核中均有分布, 但 PB1 的有效入核运输需要 PA 的存在^[7]。在 RNA 聚合酶装配过程中, PB1 作为聚合酶的骨架既能和 PA 结合也能与 PB2 结合。PB1 的 N 端 12 个氨基酸残基为 PB1 上参与形成 PB1-PA 复合物的主要位点^[8], PA 上参与形成该复合物的主要位点则位于 668-692 上^[9]。参与形成 PB1-PB2 复合物的位点分别是 PB1 上的 600-757 部位和 PB2 上的 51-259 部位, 其中 PB1 上的 718-732 部位和 PB2 上的 206-259 部位是形成该复合物的关键区域, 缺失该区域会导致 PB1-PB2 结合能力的丧失^[9]。

2.2 RNA 聚合酶及各亚单位的功能

流感病毒 RNA 聚合酶具有执行病毒基因组的复制和转录双重功能。将 PB2、PB1 和 PA 以及 NP 基因分别克隆到质粒载体中, 用这些质粒和含有 T7 RNA 聚合酶的重组痘病毒共转染细胞, 以含有 NS 基因两末端序列、长 240 个核苷酸的 vNSZ-RNA 或 cNSZ-RNA 作为病毒复制和转录的模板 RNA。结果表明, 只有三个亚单位共转染、表达完整 RNA 聚合酶复合体时, cRNA 或 vRNA 才能有效合成^[10]。

现在认为, PB1 是 RNA 聚合酶的催化中心^[11]。体外实验表明, PB1 能够特异结合 cRNA 或 vRNA, 能够识别并特异结合到 vRNA 5' 和 3' 端的发夹结构, 且 vRNA 5' 端似乎是 PB1 的主要结合位点^[12]。PB1 上两个彼此分开的 vRNA 结合位点分别位于 N 端区域和 C 端 493 位氨基酸残基的下游区域^[12]。PB1 对 cRNA 的结合也是特异的, 对 cRNA 5' 和 3' 端的发夹结构有相同的亲和力, 结合位点分别位于 N 端的前 139 个氨基酸残基和 267-493 位区域^[12]。PB1 与 vRNA 和 cRNA 的不同结合特性提示, RNA 聚合酶在病毒基因组的复制和转录过程中可能存在构象变换。当 PB1 处于与 vRNA 结合的构象时, 合成 cRNA 或 mRNA。当 PB1 处于与 cRNA 结合的构象时, 合成 vRNA^[12]。此外, Weisan 等报道, 聚合酶亚单位 PB1 基因中, 存在一个小的开放读码框, 编码一种称之为 PB1-F2 小分子蛋白^[13]。该蛋白主要定位在内质网内膜, 且在不同细胞中的表达量有很大差异, 体外研究证明该蛋白是流感病毒复制非必须的^[13, 14]。目前已知该蛋白以依赖细胞类型的方式增强病毒诱导的细胞死亡, 其机理还有待进一步研究^[13, 14]。

PA 是一种磷酸化蛋白, Ser 和 Thr 是磷酸化位点。该蛋白具有诱导蛋白水解活性, 因此可以降低自身蛋白和与其共表达的异源蛋白质的累积水平。PA 亚基 N 端前 247 位氨基酸构成了该活性的功能区域^[15]。PA 157 位 Thr→Glu 的突变使其丧失了诱导蛋白水解的功能。以该突变基因重构的 RNA 聚合酶丧失了由 vRNA 合成 cRNA 的能力, 但转录 vRNA 功能不受到影响。PA162 位 Thr→Ala 的突变导致其诱导蛋白水解的能力降低, 但没有完全丧失, 其 RNA 聚合酶的聚合活性也表现出中等水平。这表明, RNA 聚合酶活性与 PA 介导的蛋白水解活性存在正相关^[16]。进一步研究表明, 含有 PA162 突变体亚基的病毒表现出野生型的表型, 而含有 PA157 突变体亚基的病毒无论在低感染剂量还是在高感染剂量下, 病毒的繁殖能力均降低, 该突变体病毒在小鼠体内也呈现出减毒的特征^[17]。Maite 等证实, 降低 PA 蛋白水解能力可导致病毒复制能力受损, 但仍保持正常的转录活性^[18]。将 A/WSN/33 株 PA 的 C 末端区域的 PA510 His 突变为 Ala 后, RNA 聚合酶能完成基因组复制, 但转录活性受到抑制, 这可能是由于聚合酶复合体的内切酶活性缺陷所致^[19]。在流感病毒感染的细胞中, 经甘油密度梯度分析发现, 病毒 RNA 聚合酶存在三种组成形式: H、

M 和 L 带^[20]。H 带由 RNP 复合物组成、M 带由具有活性的 RNA 聚合酶组成但不含 vRNA、L 带由无活性的 RNA 聚合酶组成。脉冲实验表明构成 L 带的 RNA 聚合酶能转变成 M 带。在温度敏感株 A/WSN/33 中,非允许条件下, RNA 聚合酶积累在 L 带。该株的温度敏感性是由 PA226Leu→Pro 的突变所致,暗示 PA 很可能参与 RNA 聚合酶从无活性的中间体向有活性的过程转变^[20]。另外 PA 还可能参与 RNA 聚合酶与 RNA 的相互作用^[21]。在 A/WSN/33 株中, PA638 Arg→Ala 的突变使得在 RNA 延伸过程中, RNA 聚合酶-RNA 相互作用变得不稳定,因此促进干扰缺陷型 RNA 的产生,从而极大减弱了该突变体病毒在培养细胞中的生长能力。有趣的是, PA453Cys→Arg 突变却能弥补 638 位突变所引起的缺陷^[21]。PA 还可能与毒力有关。Catchpole 等对 PA 的启动子区域进行突变,发现该突变体在感染 MDCK 细胞后, PA-vRNA 和 PA-mRNA 的合成量明显下降,并表现出减毒的特征^[22]。此外, Hara 等报道, PA 还具有糜蛋白酶活性, 624 位的丝氨酸是维持其活性的关键位点^[23]。但这种蛋白酶活性在病毒生命周期中的确切功能目前还不清楚。

PB2 亚基是多功能的蛋白质。病毒基因组在转录时,以剪切的宿主 mRNA 帽子结构为引物,据认为 PB2 在此过程中发挥重要作用。将病毒 NS 基因和 CAT 基因的融合后(NS-CATvRNA)转染到表达 PB1、PA 和 NP 的细胞系 Clone64 中,用地塞米松诱导 PB1、PA 和 NP 表达,能在转染细胞中检测出 PolyA⁺-CAT RNA,但却检测不到 CAT 活性。将 PolyA⁺-CAT RNA 提取后加入到体外翻译体系中,该体系含有酵母纯化的 mRNA 加帽酶,便能翻译出蛋白质。这表明, PB1、PA 和 NP 既能完成基因组的复制,也能翻译 PolyA⁺-RNA,而 PB2 则是合成有帽子结构 RNA 所必须的^[24]。现在知道, PB2 负责识别和结合宿主细胞 mRNA 的帽子结构^[25-26]。位于 PB2 上 363 和 404 位的 Phe 残基是 PB2 结合帽子结构的关键位点,这两个芳香族氨基酸在 A、B 和 C 型流感病毒中高度保守^[25]。帽子结构的剪切还需要帽依赖的内切核酸酶活性,该活性位于 PB1 亚基上,包括 3 个必须的酸性氨基酸残基^[26]。PB2 似乎还与病毒毒力相关。Subbaro 等报道,突变 A/AA/6/60 株 PB2 上 265 位氨基酸产生一株减毒的温度敏感株^[27]。当在 PB2 第 265 位突变的基础上,再在 112、556 和 658 等位点上引入单个或双个突

变,结果双位点突变比 265 位单突变表现更强的温度敏感性,毒力也进一步降低,三位点突变的上述性状又比双突变更明显,暗示 PB2 在病毒毒力方面起重要作用,并且 PB2 的减毒特性与温度敏感性相关^[28]。Hatta 等报道,在香港分离的两株 H5N1 病毒 HK486 和 HK483 中, PB2 基因有 8 个氨基酸的差异。其中 HK483 为强毒株, HK486 为弱毒株。突变分析表明,在 PB2 第 627Lys→Gln 的替换使得 HK483 致弱^[29]。PB2 也是决定流感病毒宿主范围的重要因素。在禽流感病毒中 PB2 上第 627 位多为 Glu,而在人流感中多为 Lys,改变禽流感 PB2 上该位点的氨基酸,能使禽流感病毒能在哺乳动物细胞中有效复制^[30,31]。但也有例外, Yao 等用既能在 CEF (鸡胚纤维细胞)又能在哺乳细胞 BHK 中复制的流感病毒 Dobson 4H 株和只能在 CEF 中复制的 Rostock 株为研究对象,发现 Dobson 4H 株 PB2 上第 362-582 区段是决定禽流感在哺乳细胞中有效复制的关键区域,而的 627 位氨基酸残基在两株中却是一致的^[32]。

3 影响流感病毒基因组复制或转录的顺式元件

流感病毒 RNA 聚合酶活性的发挥有赖于病毒基因组上的顺式元件。体外实验表明,单独的 RNA 聚合酶复合体既无内切核酸酶活性也无聚合酶活性,当加入病毒样的 RNA (含有流感病毒 RNA5'和 3'保守序列)模板时, RNA 聚合酶随即获得内切酶活性和聚合酶活性。这是因为只有当 vRNA 的 5'端和 3'端依次结合到 RNA 聚合酶上时,才能激活 RNA 聚合酶活性^[31]。其中, vRNA 5'端序列能激活 RNA 聚合酶的帽结合活性,内切酶活性的激活还需 vRNA3'末端序列的加入^[26,33,34]。不过, cRNA 的两末端序列只能激活 RNA 聚合酶的帽结合功能,不能有效激活内切酶活性^[34]。vRNA 的 5'端和 3'端的“Corkscrew”结构被认为是激活内切酶活性所必须的^[35-36]。RNA 聚合酶与 vRNA 5'端和 3'端的关键结合部位分别位于 PB1 第 571-572 两个氨基酸和 250-260 氨基酸残基之间。其中 251 和 254 位的 Phe 氨基酸残基是与 vRNA 3'端结合所必须的^[33]。Li 等推测^[33],当 vRNA 5'端与 PB1 第 571-572 两个 Arg 残基结合时,导致 RNA 聚合酶构象发生改变。这种构象的改变,一方面使 PB1 获得结合 mRNA5'端帽子结构的活性。另一方面使 PB1 获得结合 vRNA 3'端的能力。PB1 与 vRNA 3'端的结合

导致 RNA 聚合酶的构象再次发生改变, 激活 RNA 聚合酶的内切核酸酶活性, 切割细胞 mRNA 的帽子结构作为转录病毒 mRNA 的引物。最近发现, vRNA 5'端和 3'端首先形成二级结构, 然后一起与 RNA 聚合酶结合^[37]。当以在切割位点含有 CA 序列的 RNA 作为内切酶的底物时, vRNA 5'端和 cRNA5'端单独均能激活 RNA 聚合酶的内切核酸酶活性^[38]。

经过多年探索, 人们对流感病毒 RNA 聚合酶结构及其在病毒基因组复制和转录中的作用等有了较多的认识, 但病毒基因组复制、转录及其调控的许多分子机制有待进一步阐明。深入研究流感病毒 RNA 聚合酶与基因组复制和转录调控的分子机理, 对揭示流感病毒感染和遗传变异及分子演化规律, 研制新型抗流感病毒药物和新一代抗流感疫苗有着极为重要的意义。

References

- [1] Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from blackheaded gulls [J]. *J Virol* 2005, 79: 2814-2822.
- [2] Skehel J J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin [J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 531-569.
- [3] Nayak D P, Hui E K W, Barman S. Assembly and budding of influenza virus[J]. *Virus Res*, 2004, 106: 147-165.
- [4] Area E, Benito J M, Gastaminza P. *et al.* 3D structure of the influenza virus polymerase complex: Localization of subunit domains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 308-313.
- [5] Klumpp K, Ruigrok R W, Baudin F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure [J]. *EMBO J*, 1997, 16 (6): 1248-1257.
- [6] Deng T, Sharps J, Fodor E, *et al.* In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex [J]. *J Virol*, 2005, 79 (13) : 8669-8674.
- [7] Fodor E, Smith M. The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex [J]. *J Virol*, 2004, 78 (17) : 9144-9153.
- [8] Perez D R, Donis R O. Functional analysis of PA binding by influenza a virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity [J]. *J Virol*, 2001, 75 (17): 8127-8136.
- [9] Ohtsu Y, Hoda Y, Sakata Y, *et al.* Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46 (3): 167-175.
- [10] Perales B, Ortin J. The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA [J]. *J Virol*, 1997, 71(2): 1381-1385.
- [11] Honda A, Mizumoto K, Ishihama A. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (20): 13166-13171.
- [12] Gonzalez S, Ortin J. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates [J]. *EMBO J*, 1999, 18 (13): 3767-3775.
- [13] Weisan C, Calvo P A, Daniela M, *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death [J]. *Nature Medicine*, 2001, 7 : 1306-1372.
- [14] James S G, Daniela M, Felicita H, *et al.* The Influenza A Virus PB1-F2 Protein Targets the Inner Mitochondrial Membrane via a Predicted Basic Amphipathic Helix That Disrupts Mitochondrial Function [J]. *J Virol*, 2003, 77(13): 7214-7224.
- [15] Ezquerro J J, Zurcher T, de la Luna S, *et al.* The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis [J]. *J Virol*, 1996, 70 (3) : 1905-1911.
- [16] Perales B, Ezquerro J J, Gastaminza P, *et al.* The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis [J]. *J Virol*, 2000, 74 (3) : 1307-1312.
- [17] Huarte M, Falcon A, Nakaya Y, *et al.* Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses [J]. *J Virol*, 2003, 77 (10) : 6007-6013.
- [18] Huarte M, Ezquerro J J, Roncal F, *et al.* PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators [J]. *J Virol*, 2001, 75 (18) : 8597-8604.
- [19] Fodor E, Crow M, Mingay L J, *et al.* A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs [J]. *J Virol*, 2002, 76 (18) : 8989-9001.
- [20] Kawaguchi A, Naito T, Nagata K. Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes [J]. *J Virol*, 2005, 79 (2) : 732-744.
- [21] Fodor E, Mingay L J, Crow M, *et al.* A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs [J]. *J Virol*, 2003, 77 (8) : 5017-5020.
- [22] Catchpole A P, Mingay L J, Fodor E, *et al.* Alternative base pairs attenuate influenza A virus when introduced into the duplex region of the conserved viral RNA promoter of either the NS or the PA gene [J].

- J Gen Virol, 2003, 84: 507-515.
- [23] Hara K, Shiota M, Kido H, *et al.* Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site [J]. Genes Cells, 2001, 6 (2): 87-97.
- [24] Nakagawa Y, Kimura N, Toyoda T, *et al.* The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis [J]. J Virol, 1995, 69 (2) : 728-733.
- [25] Fechter P, Mingay L, Sharps J, *et al.* Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (22) : 20381-20388.
- [26] Li M.L, Rao P, Krug R M. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits [J]. EMBO J, 2001, 20 (8) : 2078-2086.
- [27] Subbarao E K, Kawaoka Y, Murphy BR. Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature-sensitive and attenuating mutation [J]. J Virol, 1993, 67 (12) : 7223-7228.
- [28] Subbarao E K, Park E J, Lawson C M. *et al.* Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine [J]. J Virol, 1995, 69 (10) : 5969-5977.
- [29] Hatta M, Gao P, Halfmann P. *et al.* Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses [J]. Science, 2001, 293 (5536) : 1840-1842.
- [30] Massin P, van der Werf S, Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a determinant of cold sensitivity in RNA replication of avian influenza viruses [J]. J Virol, 2001, 75 (11): 5398-5404.
- [31] Subbarao E K, London W, Murphy B R. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range [J]. J Virol, 1993, 67 (4): 1761-1764.
- [32] Yao Y, Mingay L J, McCauley JW, *et al.* Sequences in influenza A virus PB2 protein that determine productive infection for an avian influenza virus in mouse and human cell lines [J]. J Virol, 2001, 75 (11): 5410-5415.
- [33] Li M L, Ramirez B C, Krug R M. RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites [J]. EMBO J, 1998, 17 (19) : 5844-5852.
- [34] Honda A, Endo A, Mizumoto K, *et al.* Differential roles of viral RNA and cRNA in functional modulation of the influenza virus RNA polymerase [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (33): 31179-31185.
- [35] Leahy M B, Pritlove D C M, Poon L L, *et al.* Mutagenic Analysis of the 5' Arm of the Influenza A Virus Virion RNA Promoter Defines the Sequence Requirements for Endonuclease Activity [J]. J Virol, 2001, 75 (1) : 134-142.
- [36] Leahy M B, Dobbyn H C, Brownlee G G. Hairpin Loop Structure in the 3' Arm of the Influenza A Virus Virion RNA Promoter Is Required for Endonuclease Activity [J]. J Virol, 2001, 75 (5) : 7042-7049.
- [37] Michael Lee M T, Klumpp K, Digard P, *et al.* Activation of influenza virus RNA polymerase by the 5' and 3' terminal duplex of genomic RNA [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(6): 1624-1632.
- [38] Rao P, Yuan W, Robert M K. Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis [J]. EMBO J, 2003, 22 (5) : 1188-1198.