

# 昆虫病毒 *gp37/fusolin* 基因研究进展\*

李朝飞 庞 义\*\*

(中山大学生物防治国家重点实验室/昆虫学研究所 广州 510275)

**摘要** 昆虫病毒 *gp37/fusolin* 基因属病毒复制非必需基因,其编码的蛋白能形成一种纺锤形包涵体(spindle bodies, SBs),该包涵体内不含有病毒粒子。Fusolin 蛋白形成的 SBs 与纯化的 Fusolin 蛋白均能提高靶昆虫对杆状病毒的敏感性,推测 GP37 蛋白也具有类似的功能。对 *gp37/fusolin* 基因的深入研究,有可能开发出新型病毒增效剂。

**关键词** 杆状病毒 痘病毒 *gp37/fusolin* 基因 病毒增效剂

昆虫杆状病毒与昆虫痘病毒分属杆状病毒科(Baculoviridae)和痘病毒科(Poxviridae),二者均为大分子环状双链 DNA 病毒。这 2 类病毒在感染的细胞中都能形成 2 种类型的包涵体,其中较大的一种,在杆状病毒中称为多角体包涵体(polyhedra),而在痘病毒中则称为球形包涵体(spheroids),病毒粒子包埋在这些包涵体的晶体蛋白中。这种包涵体形式的病毒在蛋白基质的保护下能长期稳定存在,因而对幼虫的初始感染和虫体间的传播起着关键作用。组成该类包涵体基质的蛋白,在杆状病毒与痘病毒中分别为多角体蛋白(polyhedrin)和球形体蛋白(spheroidin)。在氨基酸水平上,这 2 种蛋白没有明显的同源性。另外一种较小的包涵体—纺锤形包涵体(spindle bodies, SBs),呈双金字塔形,不含有病毒颗粒。构成 SBs 的晶体蛋白,在杆状病毒中称为 GP37,在痘病毒中则称为 Fusolin。氨基酸序列分析表明,GP37 与 Fusolin 之间有 30%~40%的同源性。这些蛋白基本上都是糖蛋白,有很高的半胱氨酸含量,推测与晶体形成有关<sup>[1]</sup>。

目前已测定了 14 种杆状病毒 *gp37* 基因和 8 种痘病毒 *fusolin* 基因的序列,并且仅在昆虫杆状病毒与昆虫痘病毒中发现了 *gp37/fusolin* 基因,而在脊椎动物痘病毒中没有发现,表明这 2 个基因与病毒侵染宿主有关。

## 1 昆虫病毒 *gp37/fusolin* 的基因结构与蛋白质结构

### 1.1 昆虫病毒 *gp37/fusolin* 的基因结构

目前已测定的 *gp37/fusolin* 基因核苷酸序列长度约为 1kb,预计编码的蛋白大小为 30~40kDa。在 *gp37* 基因 ORF 翻译起始密码子上游 200bp 内有 1~2 个典型的杆状病毒晚期启动子 G/T TAAG,在该区域内一般还存在 1~2 个 TATA 盒。此外,起始密码子上游 5'端约 150bp 的非编码区为 AT 富集区,其 AT 可高达 70%,推测这一区域含有转录调控信号。翻译终止密码子下游约 100bp 的非编码区也为 AT 富含区,其 AT 在棉铃虫单粒核多角体病毒[*Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus (HaSNPV)] *gp37* 序列内可高达 72%,相对于编码区内 55% 的 AT 高很多,但其功能还不清楚<sup>[2,3]</sup>。在这一段区域内大多数 *gp37* 基因存在典型的 poly(A) 信号,只有少数,如 HaSNPV *gp37* 基因未发现这一信号。而在 *fusolin* 基因 ORF 翻译起始密码子上游 200bp 内一般存在一个典型的痘病毒晚期转录启动子 TAAATG,相对于 *gp37* 基因, *fusolin* 基因的 AT 百分比比较高,其中双年色卷蛾痘病毒[*Charistonera biennis* entomopoxvirus (CbEPV)] *fusolin* 基因 AT 高达 67%,而且富含的 AT 碱基多数处于密码子的摆动位置,表明 *gp37/fusolin* 基因对含嘌呤碱基密码子的偏好性<sup>[4]</sup>。转录和翻译分析表明, *gp37/fusolin* 基因在病毒感染后 6h 或 24h 开始表达,其峰值出现在感染后 48~72h。初步明确了 *gp37/fusolin* 属病毒晚期基因<sup>[2,3,5]</sup>。

收稿日期: 2003-07-07 修回日期: 2003-08-25

\* 国家“973”重点基础规划研究资助项目(G2000016209)

\*\* 通讯作者, 电话: 86 20 84113860, 电子信箱: lsl2@zsu.edu.cn

## 1.2 昆虫病毒 GP37/Fusolin 蛋白的一级结构

同源性比较发现, gp37 与 fusolin 的氨基酸序列同源性约为 40%。氨基酸序列分析表明, GP37/Fusolin 序列由 3 个明显不同的区域组成。其中, N-端区域较短, 一般含有 16~26 个氨基酸残基, 在成熟的 GP37/Fusolin 蛋白中没有发现该区域的存在, 推测该区段作为信号肽, 在蛋白质翻译后的细胞内转运过程中被切割。N-端端接信号肽的三肽基元 His-Gly-Tyr(HGY) 在所有已知的 GP37/Fusolin 蛋白中均保守存在, 推测这是蛋白分泌信号的切割位点<sup>[6,7]</sup>。GP37/Fusolin 序列的中间区域由大约 230 个氨基酸残基组成, 该区域在 GP37/Fusolin 蛋白之间的同源性为 40%~96%。此外, 该区域与细菌几丁质结合蛋白具有 30% 左右的氨基酸序列同源性, 但其意义仍不清楚<sup>[3]</sup>。中间区域内含 5 个序列保守区, 在不同源的地方, 其氨基酸的性质基本保持相同<sup>[8]</sup>。此外, 在该区域内都含有: 6 个绝对保守的半胱氨酸(Cys), 可能与形成二硫键及蛋白的空间构象相关; 9~19 个保守的脯氨酸(Pro), 这些 Pro 与上述 Cys 彼此交叉分隔出现, 推测 Pro 使 GP37/Fusolin 蛋白形成  $\beta$ -转角, 从而维持其三维构象的稳定; 1~2 个潜在的 DXS/T(X 为除 Pro 以外的任何氨基酸) N-连接糖基化位点, 但其具体位置在不同种病毒 GP37/Fusolin 蛋白之间变化较大。中间区域一般终止于第 5 个保守区以外 5 个氨基酸残基之后的一个芳香族氨基酸残基苯丙氨酸(F) 或酪氨酸(Y)。GP37/Fusolin 蛋白的 C-端不具有保守性, 并且与已知的其他蛋白没有同源关系。此外, 该区域的序列长短高度变化, 较小的 GP37 蛋白, 如舞毒蛾核多角体病毒[*Lymantria dispar* (Ld) MNPV] GP37(267aa)、斜纹夜蛾核多角体病毒[*Spodoptera litura* (Splt) MNPV] GP37(256aa), 普遍缺乏多变的 C-端区。这种序列长短的差异是否与特定 GP37/Fusolin 的功能相关, 尚不清楚<sup>[3,9]</sup>。

## 2 GP37/Fusolin 蛋白的合成与定位

GP37/Fusolin 蛋白在核糖体上合成后转运至内质网进行 N-糖基化修饰。免疫荧光和免疫电镜分析结果表明, GP37/Fusolin 蛋白通常分布于宿主细胞的内质网、内质网小泡、细胞质膜或核膜周围的区域内<sup>[10]</sup>。

研究发现, 昆虫痘病毒的 Fusolin 蛋白在其分布的空间内不断聚集和结晶, 形成一种纺锤形包涵

体(spindle bodies, SBs), 在这种包涵体内并不包含有病毒粒子<sup>[10]</sup>。在有些痘病毒中, 如 CbEPV, *Oncoperna alboguttata* (Oa) EPV, 成熟的 SBs 被球形包涵体(spheroids) 包被, 从而定位于球形包涵体的基质中。最近的研究发现, 在昆虫杆状病毒, 如紫色卷蛾核多角体病毒[*Choristoneura murinana* (Cm) NPV] 和 棕色卷蛾核多角病毒[*Choristoneura fumiferana* (Cf) MNPV] 感染细胞的胞质中也存在由 GP37 蛋白形成的 SBs, 并且类似于 Fusolin 蛋白, 这些 GP37 蛋白仅分布于细胞质内。例外的是, 苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒[*Autographa californica* (Ac) MNPV] GP37 在被感染的细胞中既能从内质网又能从核内检测到, 并发现该蛋白没有形成 SBs, 而是分散存在于多角体包膜上<sup>[12]</sup>。推测该蛋白可能在内质网上糖基化后, 转移至细胞核内。

## 3 GP37/Fusolin 蛋白的功能

氨基酸序列同源性比较表明, gp37 与 fusolin 2 种基因可能来源于同一祖先, 但是否具有相同的生物活性还不清楚。研究发现, 桑灯蛾痘病毒[*Amsacta moorei* (Am) EPV] 与血黑蝗痘病毒[*Melanoplus sanguinipes* (Ms) EPV] 基因组中不存在 fusolin 基因, 而且已知从鞘翅目昆虫中分离到的痘病毒中均不存在 SBs<sup>[11,12]</sup>。进一步的研究发现, 缺失 fusolin 基因以后, HaEPV 在离体条件下都能感染和复制。因此, 并非所有的 EPV 都产生 SBs, fusolin 基因不是痘病毒复制所必需的<sup>[13]</sup>。最近的研究表明, gp37 基因对于 AcMNPV 的复制也是非必需的。缺失该基因以后, AcMNPV 的感染力没有明显的变化<sup>[14]</sup>。

目前仅在昆虫杆状病毒与昆虫痘病毒中发现了 gp37/fusolin 基因, 而在脊椎动物痘病毒中却没有发现, 表明这 2 个基因所表达的蛋白可能与病毒侵染宿主昆虫的效力有关。已有的研究表明, 口服感染时, 提纯的 SBs 与原核表达的 Fusolin 蛋白, 能显著增强昆虫核多角体病毒的毒力<sup>[15,16]</sup>, 其中大绿丽金龟痘病毒[*Anomala cuprea* (Ac) EPV] SBs 能够将家蚕核多角体病毒[*Bombyx mori* (Bm) NPV] 感染家蚕的毒力提高 10 000 倍<sup>[17]</sup>。此外, 将美洲粘虫痘病毒[*Pseudaletia separata* (Ps) EPV] fusolin 基因导入水稻基因组 DNA 上, 获得的转基因水稻能提高目标昆虫对杆状病毒的敏感性<sup>[18]</sup>。但是, Fusolin 对于自身病毒的功能以及 GP37 蛋白是否具有类似

的增效作用尚未有研究报道。最近,我们的研究结果表明,体外条件下,纯化的 SpltMNPV GP37 蛋白能与几丁质结合;而 Western 印迹结果表明,该蛋白能与斜纹夜蛾幼虫中肠围食膜中的几丁质成分结合,推测 GP37 蛋白在病毒侵染过程中可能与中肠围食膜中几丁质成分结合以促进病毒感染<sup>[9]</sup>。

#### 4 结 语

目前,尽管对 Fusolin 蛋白提高杆状病毒毒力以及 GP37 蛋白是否具有类似功能仍不清楚,但是对 *gp37/fusolin* 基因的深入研究仍具有诱人的前景。首先, *gp37/fusolin* 是病毒复制非必需基因,这为构建新型重组杆状病毒与重组痘病毒提供了又一可供选择的基因位点;其次,如果 GP37 蛋白也能提高目标昆虫对昆虫病毒的敏感性,那么可以选择 GP37/Fusolin 蛋白作为新型“病毒增效剂”加以利用。相信,在不久的将来,对 *gp37/fusolin* 基因的深入研究将会取得突破性进展。

#### 参考文献

- [ 1 ] Miller D P, Dall D J, O' Reilly D R. Insect pest control by viruses. In Encyclopedia of Virology. 2nd. Edited by R Webster & A Granoff. San Diego: Academic Press, 1999, 139~ 141
- [ 2 ] Gross C H, Wolgamot G M, Russell R L Q, et al. A 37-kilodalton glycoprotein from a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata* is localized to cytoplasmic inclusion bodies. J Virol, 1993, 67: 469~ 475
- [ 3 ] Phanis C G, Miller D P, Casam S C, et al. Identification and expression of two baculovirus *gp37* genes. J Gen Virol, 1999, 80: 1823~ 1831
- [ 4 ] Gauthier L, Cousserans F, Veyrunes J C, et al. The *Melolontha melolontha* entomopoxvirus (MmEPV) fusolin is related to the fusolins of Lepidoptera EPVs and the 37k baculovirus glycoprotein. Virology, 1995, 208: 427~ 436
- [ 5 ] Liu J J, Carstens E B. Identification, molecular cloning and transcription analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear

- polyhedrosis virus spindle like protein gene. Virology, 1996, 223: 396~ 400
- [ 6 ] Dall D J, Sriskantha A, Vera A P, et al. A gene encoding a highly expressed spindle body protein of *Heliothis armigera* entomopoxvirus. J Gen Virol, 1993, 74: 1811~ 1818
- [ 7 ] Yuen L, Dionne J, Arif B, et al. Identification and sequencing of the spheroidin gene of *Choristoneura biennis* entomopoxvirus. Virology, 1990, 175: 427~ 433
- [ 8 ] Vialard J E, Yuen L, Richardson C D. Identification and characterization of a baculovirus occlusion body glycoprotein which resembles spheroidin, an entomopoxvirus protein. J Virol, 1990, 64: 5804~ 5811
- [ 9 ] Li Z, Gong Y, Yin C, et al. Characterization of a novel ubiquitin-fusion gene Uba256 from *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. Gene, 2003, 303: 111~ 119
- [ 10 ] Lai Fook J, Dall D J. Spindle bodies of *Heliothis armigera* entomopoxvirus develop in structure associated with host cell endoplasmic reticulum. J Invertebr Pathol, 2000, 75: 183~ 192
- [ 11 ] Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, et al. The genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus. J Virol, 1999, 73( 1): 533~ 552
- [ 12 ] Hall R L, Moyer R W. Identification of an Amsacta spheroidin like protein within the occlusion bodies of *Choristoneura* entomopoxvirus. Virology, 1993, 192: 179~ 187
- [ 13 ] Dall D, Luque T, O' Reilly D. Insect-virus relationship: sifting by informatics. Bioessays, 2001, 23: 184~ 193
- [ 14 ] Cheng X W, Krell P J, Arif B M. P34. 8 (GP37) is not essential for baculovirus replication. J Gen Virol, 2001, 82( 2): 299~ 305
- [ 15 ] Hukuhara T, Hayakawa T, Wijnarko A. A bacterially produced virus enhancing factor from an entomopoxvirus enhances nucleopolyhedrovirus infection in armyworm larvae. J Invertebr Pathol, 2001, 78: 25~ 30
- [ 16 ] Xu J, Hukuhara T. Biochemical properties of an enhancing factor of an entomopoxvirus. J Invertebr Pathol, 1994, 63: 14~ 18
- [ 17 ] Mitsuhashi W, Furuta Y, Sato M. The spindles of an entomopoxvirus of *Coleoptera* (*Anomala cuprea*) strongly enhance the infectivity of a nucleopolyhedrovirus in *lepidoptera*. J Invertebr Pathol, 1998, 71: 186~ 188
- [ 18 ] Hukuhara T, Hayakawa T, Wijnarko A. Increased baculovirus susceptibility of armyworm larvae feeding on transgenic rice plants expressing an entomopoxvirus gene. Nature Biotech, 1999, 17: 1122 ~ 1124
- [ 19 ] Li Z, Li C, Yang K, et al. Characterization of a chitin binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. Virus Research, 2003, (in press)

## Progress in the Studies of *gp37/fusolin* Genes of Insect Viruses

Li Zhaofei Pang Yi

(State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University Guangzhou 510275)

**Abstract** Insect baculovirus and entomopoxvirus *gp37/fusolin* genes are unessential in virus replication, which encode GP37/Fusolin proteins that form spindle bodies (SBs). SBs formed by Fusolin and purified Fusolin protein can improve the sensitivities of target insects to baculoviruses. It was proposed that GP37 proteins, like Fusolin, have an accessory function that is not required for viral replication and it may be possible to adapt the function of GP37/Fusolin for human advantage by using the presence of increased or alternate GP37/Fusolin proteins as “adjuvants” for viral biopesticides.

**Key words** Baculovirus Entomopoxvirus *gp37/fusolin* genes Adjuvants of viral biopesticides