

杆状病毒 p35 蛋白抗凋亡作用及机理

修梅红 彭建新* 洪华珠

(华中师范大学昆虫学研究所 武汉 430079)

摘要 杆状病毒入侵可以诱导昆虫细胞凋亡,作为对抗宿主防御体系的一种策略,病毒自身编码具有抗细胞凋亡活性的蛋白,如 p35 蛋白和 IAP。杆状病毒 p35 蛋白是一种广泛有效的凋亡抑制因子,能在哺乳纲、昆虫纲和线虫纲中抑制细胞凋亡作用,推测其与细胞凋亡途径上保守的成分 Caspase 起作用。研究表明,p35 蛋白正是通过蛋白酶间的相互作用和 p35 蛋白的剪切而起作用的。就最近几年在 p35 蛋白抗凋亡作用机理方面的研究作一综述。

关键词 杆状病毒 p35 蛋白 抗凋亡 作用机理

细胞凋亡(apoptosis),是指在一定的生理和病理条件下,机体为维护内环境的稳定,发生的受基因控制的、自动有序的死亡方式^[1]。细胞凋亡与其它生理过程不同,具不可逆性,在生命周期中只发生一次,因此受到精确调控。凋亡对于多细胞生物的正常发育和维持内环境的稳定是十分必要的,同时也可以防御病毒入侵和肿瘤发生。细胞凋亡是生物学上与细胞周期、细胞调控同样重要的研究热点。凋亡的诱因很多,其中病毒感染是常见的因素之一。杆状病毒已作为杀虫剂开发利用,同时已成为应用最广泛的外源基因表达载体系统,因此研究杆状病毒与宿主间的凋亡关系不仅有理论价值,也有实际应用意义。最近几年,在杆状病毒与昆虫细胞凋亡的研究多集中于抗凋亡方面。目前已鉴定出的抗凋亡基因可分为 iap 基因和 p35 基因^[2],p35 基因由于具广泛的抗凋亡活性而成为研究的重点。本文就近几年 p35 基因抗凋亡及机理的研究进展作一综述。

1 杆状病毒 p35 蛋白的抗凋亡作用

p35 基因是 1991 年由 Clem 等在苜蓿银纹夜蛾多粒包埋核型多角体病毒(*Autographa californica* MNPV, AcMNPV)中分离并鉴定出的凋亡抑制基因^[3]。p35 基因位于 EcoR I-S 片断(86.8~87.8mu,图谱单位),下游是增强子 hr5,上游是 P94

基因,其 ORF 由 897 个碱基对组成,基因表达产物分子量为 35kD^[4]。序列测定表明,p35 与已知的死亡调节子没有明显的相似性。随后,Kamita 等在家蚕(*Bombyx mori*, Bm)中报道发现 p35 的同源物,两者核苷酸同源性达 96.6%,表达产物氨基酸同源性达 89.6%,但后者的抗凋亡水平却比较低^[2]。粉纹夜蛾核型多角体病毒(*Trichoplusia ni* MNPV, TnMNPV) p35 基因和粘虫核型多角体病毒(*Leucanica Sperate* NPV, LsNPV) p35 基因分别由我国的中山大学和武汉大学发现和鉴定的,与 AcMNPV p35 基因核苷酸同源性为 100% 和 80.4%。

p35 蛋白由 299 个氨基酸构成,在结构上并没有明显的基元序列(motif),其结构中唯一明显的特征是分子中几个带电残基的集簇,如分子中央及 C 末端富含赖氨酸的结构域和 N 末端的高电荷结构域^[5],Bertin 等将 N 末端的高电荷结构域分成 CHR1、CHR2 和 CHR3^[6]。据疏水性计算,高电荷结构域位于分子的外表面,可能参与蛋白质和蛋白质之间的相互作用。高电荷结构域对于突变特别敏感,任一高电荷结构域的突变都会导致抗凋亡功能的丧失。N 末端有一个特殊的高电荷结构域,能充当 p35 功能的显性失活抑制子。Cartier 等用实验表明,在感染有野生型 AcMNPV 的 Sf-21 细胞中稳定转染含 p35 N 末端 1~76 氨基酸的一种突变体(truncation mutant, p35¹⁻⁷⁶)时,细胞同样经历了凋亡,说明 p35¹⁻⁷⁶ 不仅不具有抗凋亡作用,同时干扰了 p35 的抗凋亡活性^[7]。

p35 的抗凋亡作用很广泛,能在不同的动物中

收稿日期:2002-07-29 修回日期:2002-09-29

* 通讯作者,电子信箱: jianxinpeng@21cn.com

抑制细胞凋亡。Sugimoto 等的研究表明 p35 在秀丽隐杆线虫中能抑制凋亡^[8], 又有人证明了鳞翅目昆虫细胞中的凋亡抑制现象, 同时 Hay 等在黑腹果蝇和哺乳动物神经细胞中观察到了 p35 的抗凋亡作用^[9]。可见, AcMNPV 编码的 p35 能在线虫纲、昆虫纲和哺乳纲中抑制细胞凋亡, 推测其极可能在凋亡途径上与一种相对比较保守的成分起作用, 即执行死亡的 Caspase 酶类。

2 p35 蛋白对不同生物 Caspase 酶的作用

2.1 p35 对于秀丽隐杆线虫细胞死亡蛋白酶 CED-3 的抑制

Xue 等研究表明, p35 能抑制秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 杀手蛋白酶 CED-3 的活性^[10]。p35 是 CED-3 的底物, 用 ³⁵S 标记的 p35 能被 CED-3 剪切成 10kD 和 25kD 的 2 个片段, p35 主要是通过竞争性抑制机理来抑制 CED-3 的活性。当 PARP (CED-3 的底物之一) 与过量的 p35、CED-3 同时存在时, PARP 的断裂会被抑制, 而对照组则无此现象。微量测序 25kD 的 N 末端, 由其上的 GHDSI 序列可知, p35 是在 87 位上的 Asp 和 88 位的 Gly 间断裂的, 而这个位点极类似于 CED-3 的剪切位点(在 Asp 和 Gly 或 Ala 间)。

单独用 p35 的产物片段 10kD 和 25kD 感染秀丽隐杆线虫幼虫时并未出现凋亡抑制现象, 说明抑制凋亡的不是 p35 的产物片段。有人在发生突变的 p35 蛋白上再引入一个突变, 即将 127 位的赖氨酸用甘氨酸取代后, 转染秀丽隐杆线虫幼虫细胞, 此细胞经历了凋亡, 表明双突变体 p35 蛋白中有一个酶切位点, 这个酶切位点是由 127 位氨基酸突变产生的。另一种 Caspase 酶抑制剂牛痘病毒蛋白 CmA 对哺乳纲细胞有凋亡抑制作用, 但对秀丽隐杆线虫细胞却无抗凋亡作用, 若 CmA 上的 ICE 剪切位点被 p35 的 CED-3 的剪切位点取代, CmA 能作为 CED-3 的底物且能抑制 *C. elegant* 幼虫中的凋亡。由此可见, 在秀丽隐杆线虫细胞中凋亡的抑制只需要 CED-3 剪切位点, 并不需要整个 p35 蛋白。

2.2 p35 蛋白对于 ICE 蛋白酶家族的抑制

Hay 等在 1994 年提出来自 AcMNPV 的 p35 基因能在哺乳动物细胞株中编码一种抑制因子来抑制哺乳纲细胞的凋亡。Bump 等推测可能是 p35 对凋亡途径上相对保守的成分 ICE 蛋白酶起抑制作用从而抑制凋亡。Bump 等用 CoS-1 起源的细胞株

中表达白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的能力来检测 p35 蛋白对 ICE 蛋白酶活性的抑制, 他们逐渐增加能编码 p35 的质粒后和白细胞共转染, 发现成熟 IL-1 β 的释放量减少, 表明了 p35 蛋白确实对 ICE 蛋白酶活性有抑制作用^[9]。哺乳纲细胞的凋亡现象比较复杂, Li 等用 ICE 缺陷的小鼠做实验时发现小鼠呈现出典型的凋亡特征, 推测在哺乳动物细胞中可能不需要一种 ICE 类蛋白酶的参与。在哺乳纲和昆虫纲细胞株中 ICE 或相关蛋白 ICE-CED-3 同系物 1 (ICH-1)、ICH-2 或 CPP32 中任一种被过量表达时都会诱导细胞凋亡^[11]。与 CED-3 不同, 用免疫定位和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 等方法表明 p35 蛋白是酶的一种不可逆性抑制剂而非竞争性抑制剂。ICE 和 p35 蛋白的断裂片段能形成一种复合物, 复合物共有 4 条带: 25kD、22kD、11kD 和 10kD, 22kD 和 10kD 来自于 ICE, 25kD 来自于 p35 蛋白。ICE 对 p35 蛋白的剪切是复合物 ICE-p35 形成和对酶的抑制所必需的, 复合物一旦形成二者间即具有稳定的相互作用, 但 ICE 和其天然底物 pro IL-1 之间并不需要这样的相互作用^[11]。

p35 对 ICE 的抑制也可能采取另一种方式。ICE 是以酶原形式在胞浆中合成的, ICE 激活需要蛋白水解掉酶原 N 末端的区域和 p10、p20 之间的连接区氨基酸, 所以 p35 极可能在体内抑制酶的自动激活, 从而有效地阻止了 ICE 类酶引起的凋亡。

2.3 p35 蛋白对于草地贪夜蛾 Caspase 酶活性的抑制

Ahmad 等于 1997 年用 PCR 法从草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, Sf) 中分离到了参与细胞凋亡的酶并命名为 Sf caspase-1, 其在序列和特异性上与 MCH3 和 CPP32 高度相关^[12]。Sf caspase-1 酶原由 299 个氨基酸组成, 分子量为 35 kD, 在大肠杆菌中 Asp 28、Asp 184、Asp 195 三个部位自我催化形成具有两个亚单位的异二聚体, 此二聚体具有酶的活性, 纯化重组体 Sf caspase-1 与 ³⁵S 标记的 p35 各温育了不同的时间, 产生了预期的 10kD 和 25kD 片段, 表明 Sf caspase-1 对 p35 具有剪切作用, 作用产物表明剪切位点同样是在 Asp 87。体外实验中, 纯化的重组体 p35 以一种剂量依赖的方式抑制 Sf caspase-1, 是酶的竞争性抑制剂。在 Sf 9 凋亡提取物中的蛋白酶活性也会被抑制并表现相似的剂量依赖性, 与重组体 Sf caspase-1 不同的是, Sf 9 凋亡提取物中蛋白酶活性并未完全被高浓度 p35 抑制,

推测可能在提取物中还存在另一种蛋白酶活性,也是病毒感染所激活的一种新型酶,对 p35 不敏感。与 CED-3 相似, CmA 与 p35 相同的条件下对 Sf caspase-1 没有抑制作用。

3 p35 蛋白的抗凋亡作用机理

目前的证据表明,不同信号激活在凋亡程序上关键的 caspase,可见对于 caspase 的正确调控对于凋亡性死亡的执行或阻止是重要的^[13]。p35 正是通过对 caspase 的抑制而起到抗凋亡作用的。Bertin 等将 2 个密码子插入在整个 p35 中,构建了一系列插入突变体,通过标记挽救实验证明了 p35 的 C 末端和 N 末端对于 p35 功能的重要性, p35 N 末端(1~152)对于突变最敏感,在 9 个插入突变体中 8 个能引起 p35 功能的消失。为进一步确定 N 末端的功能性区域,再构建一系列的 ca(酸性或碱性残基用丙氨酸取代)突变体,标记挽救实验表明, p35 的功能性结构域是 CHR1 和 CHR2 而非 CHR3。位于 p35 的 CHR2 中的 P₁(Asp 87)对于 p35 断裂和病毒诱导的凋亡抑制是必要的, p35 在此处的剪切效率与它的抗凋亡活性有关。但单有 P₁ 位点的断裂不足以抑制细胞内的凋亡现象,必须同时具备 P₄(Asp 84)位点的断裂,使 p35 能结合到 ICE 上形成复合物。P₄ 对于凋亡抑制是必需的,但不是蛋白水解所必需的,其作用为: (1) P₄ 影响了对蛋白酶抑制所需的断裂后事件,如蛋白酶引起的 p35 断裂产物的滞留; (2) P₄ 影响到了 ICE 底物特异性^[4], P₄ 取代能将 p35 从一个底物抑制子转变成一个单独的底物; (3) P₄ 可以影响 p35 结合到 Sf caspase 上, P₄ 取代可以减少 p35 和蛋白酶的结合而使其低于需要的完全蛋白酶抑制和随之的凋亡抑制。

Bertin 等根据他们的研究提出一种假说来解释 p35 的抗凋亡机理,他们认为 p35 同 CED-3/ICE 蛋白酶相互作用,结果 p35 在 DQMD-87G 处或其附近被剪切,由其断裂产物介导抑制 CED-3/ICE 蛋白酶^[6], ICE-p35 复合物的形成证实了 p35 的抑制涉及到一种剪切产物抑制酶蛋白,此复合物类似于丝氨酸蛋白酶抑制剂在抑制期间形成的复合物,但 p35 与任何已知的丝氨酸蛋白酶抑制剂并无序列相似性。Zhou 等提出 p35 中关键的结构决定簇是 P₁ 和 P₄ 位点及附近的几个残基,称为环状区域(DQMDGEHD),环状区域可能通过与 caspase 类酶

活性位点的相互作用提供或取消 p35 的抑制功能,或是改变其特异性。若用 p35 的环来代替 CmA 的环(LVADCAST), CmA 即具有抑制 CED-3 的活性^[15]。可见,环状结构对于 p35 的抗凋亡功能具有重要的作用。Xu 等则提出 p35 对 Caspase 的抑制机理涉及到活性酶对底物的诱捕^[16]。p35 和 Caspase-8 复合物的结构性研究表明,在 Caspase-8 的 360 位半胱氨酸与 p35 的 87 位天冬氨酸间存在硫酯键。硫酯键对于热变性处理极不稳定,所以用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的方法观察不到 p35 和 Caspase-8 复合物^[17,18]。在正常的催化期间,硫酯键会被结合于 Caspase 上的水分子快速分解,但是在结合和剪切 p35 后 p35 的 N 末端靠到了酶的活性位点处,使溶剂无法进入有催化活性的二聚体,阻止了硫酯键的水解,导致了 Caspase 的不可逆抑制。p35 对于 Caspase 抑制的分子机理与在别的蛋白酶抑制子复合物中观察到的蛋白酶抑制模型完全不同^[19]。这些酶多是通过活性位点的非共价的相互作用来抑制的,长期以来,通过硫酯键形成的共价自杀性抑制只是在丝氨酸蛋白酶抑制剂中观察到,但机理不同,丝氨酸蛋白酶抑制剂的抑制机理涉及到酶活性位点的扭曲和由于抑制剂拉力产生的变形^[20]。相反, p35 通过溶剂排斥和催化残基的重新定位而提供了另一种蛋白酶抑制模式。

总之,所有的证据都支持 p35 抑制病毒激活的 CED-3/ICE 蛋白酶而抑制了病毒诱导的凋亡,其主要是通过蛋白酶间的相互作用和 p35 的断裂来实现的,详细机理仍待研究。

参考文献

- [1] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R, et al. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239~257
- [2] Kanita S G, Majima K, Maeda S, et al. Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J Virol*, 1993, 67: 455~463
- [3] Clem R J, Fechheimer M, Miller L K, et al. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 1991, 254: 1388~1390
- [4] Friesen P D, Miller L K. Divergent transcription of early 35 and 94 kilodalton protein genes encoded by the HindIII k genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 1987, 61: 2264~2272
- [5] Clem R J, Hardwick J M, Miller L K, et al. Antipapoptotic genes of

- baculoviruses. *Cell Death Diff*, 1996b, 3: 9~ 16
- [6] Bertin J, Mendysen S M, LaCount D J, et al. Apoptotic suppression by baculovirus p35 involves cleavage and inhibition of a virus induced CED-3/ICE like protease. *J Virol*, 1996, 70: 6251~ 6259
- [7] Cartier J L, Hershberger P A, Friesen P D, et al. Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus p35: dominant interference by N-terminal sequences p35¹⁻⁷⁶. *J Virol*, 1994, 68(12): 7728~ 7737
- [8] Sugimoto A, Friesen P D, Rathran J H, et al. Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ced-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*, 1994, 13: 2023~ 2028
- [9] Hay B A, Wolff J, Rulin G M, et al. Expression of baculovirus p35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development*, 1994, 120: 2121 ~ 2129
- [10] Xue D. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*, 1995, 377: 248~ 251
- [11] Bump N J. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, 1995, 269: 1885~ 1888
- [12] Ahmad M. *Spodoptera frugiperda* Caspase 1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *Communication*, 1996, 272: 1421~ 1424
- [13] Martin S J. Protease activation during apoptosis death by a thousand cuts?. *Cell*, 1995, 82: 349~ 352
- [14] Thomberry N A. Interleukin 1 β converting enzyme; a novel cysteine protease required for IL-1 β production and implicated in programmed cell death. *Protein Sci*, 1995, 4: 3~ 12
- [15] Zhou Q. Interaction of the baculovirus anti apoptotic protein p35 with caspase, specificity, kinetic and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry*, 1998, 37(30): 10757~ 10765
- [16] Xu G. Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature*, 2001, 410: 494~ 497
- [17] Fisher A J. Crystal structure of baculovirus p35: role of a novel reactive site loop in apoptotic caspase inhibition. *EMBO J*, 1999, 18: 2031~ 2039
- [18] Zoog S J. Caspase inhibition by baculovirus p35 requires interaction between the reactive site loop and the beta sheet core. *J Biol Chem*, 1999, 274: 25995~ 26002
- [19] Bode W. Structural basis of the endoproteinase protease interaction. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477: 241~ 252
- [20] Huntington J A. Structure of a serpin protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 2000, 407: 923~ 926

The Antiapoptosis Activity and Molecular Mechanism of Baculovirus Protein p35

Xiu Meihong Peng Jianxin Hong Huazhu

(Institute of Entomology, Central China Normal University Wuhan 430079)

Abstract Baculovirus invasion can induce insect cell apoptosis. As a strategy of countering the apparent antiviral defense by the host, virus encodes diverse protein with antiapoptotic activity, such as IAP and protein p35. The baculovirus protein p35 is a general and effective suppressor. It is estimated that p35 targets a highly conserved step in the death pathway. Collectly, p35 blocks virus-induced apoptosis by inhibiting a virus-activated CED-3/ICE-like protease through a mechanism that includes protease interaction and p35 cleavage.

Key words Baculovirus p35 protein Antiapoptosis Mechanism