

马传染性贫血病毒 Gag p9 蛋白功能研究进展*

魏丽丽^{1,2} 王晓钧^{1**} 王 盈² 李景鹏² 相文华¹ 沈荣显¹

(1 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 哈尔滨 150001 2 东北农业大学生命科学院 哈尔滨 150030)

摘要 对病毒复制机制研究的一个重要方面是病毒的组装和从细胞表面出芽。过去的 20 年大量研究证实反转录病毒 Gag 蛋白对病毒的组装和出芽起着决定性作用。Gag 蛋白的多个功能域已经被证明在病毒组装的不同时期发挥作用。马传染性贫血病毒(equine infectious anemia virus, EIAV) p9 是 Gag 蛋白 C 端的一个小蛋白,在其之上的 L 域是与病毒释放直接相关的蛋白功能区域, L 域的核心基序 YPDL 可与特异的病毒或细胞蛋白相互作用共同介导病毒粒子的组装和出芽作用,核心基序 YPDL 对病毒的复制能力有一定的影响。就近年来对 p9 功能区与病毒组装和释放关系的研究进展进行综述。

关键词 EIAV p9 出芽

马传染性贫血(equine infectious anemia, EIA)是由马传染性贫血病毒(EIAV)引起马属动物的一种急性烈性传染病。与人免疫缺陷病毒(HIV-1)同属反转录病毒科慢病毒属的重要成员,二者在基因组结构、复制方式和相似的蛋白种类及功能、传播方式和致病机理方面具有极高的相似性。EIAV 是基因组结构最简单的慢病毒,基因组包括 *gag*, *pol*, *env* 三个结构基因和 *rev*, *tat* 和 *S2* 三个辅助基因,在基因组的两端是长末端重复序列。EIAV 这种简单的基因结构为研究慢病毒的复制及病毒释放的机制提供了良好的模型。与所有的反转录病毒一样, EIAV 前病毒在感染细胞中表达三种基本的聚合蛋白,即 Gag、Gag-Pol 和 Env,进一步加工形成病毒粒子的结构基因和一些病毒生命周期所必需的酶类。EIAV Gag 聚合蛋白相对分子质量为 55kDa,具有在其它病毒蛋白缺失情况下组装未成熟病毒样粒子并促进出芽的作用^[1]。Gag 由基质蛋白(MA p15)、衣壳蛋白(CA p26)、核衣壳蛋白(NC p11)和核心蛋白(p9)组成。p9 是位于 Gag 蛋白末端的位于 *gag-pol* 移框阅读起始位点之后的一个小蛋白,在位置上非常类似于 HIV-1 的 p6 蛋白,但氨基酸序列与 HIV-1 p6 同源性不高,也和其他慢

病毒,如 HIV-2, SIV, CAEV, FIV 相似位置的蛋白有较大差异^[2]。尽管近 20 年对反转录病毒释放的机制进行了大量试验研究,但在病毒粒子的组装和释放过程中病毒和宿主的成分及加工过程仍然不明确。为了明确 Gag 蛋白在反转录病毒组装和释放过程中的作用,近年来又对此进行了大量试验研究,重新定义了 Gag p9 在病毒出芽和感染过程中的作用特点,现就其研究进展做一简要综述。

1 p9 L 域及与其相似基序对病毒粒子出芽和复制的影响

通过病毒从感染细胞释放的实验定义了 Gag 功能的几个特点,将其划分为几个功能区,即 M 域(M-domain), MA 蛋白 N 末端肉蔻酸残基可使病毒粒子插入细胞膜的作用^[3,4]; I 域(I-domain), CA 蛋白的多聚化作用^[5]; NC 蛋白在基因组 RNA 紧密结合中发挥一定的作用; L 域(L-domain),在病毒组装晚期介导病毒出芽的作用^[6]。在不同慢病毒中, L 域在功能氨基酸序列和 Gag 蛋白中的位置方面表现出不同于 MA、CA、NC 蛋白一定的多样性,但其主要作用是通过其核心基序 YPDL 使病毒粒子从囊膜表面释放出来。反转录病毒 L 域可特异性地介导病毒-细胞间的相互作用,这种相互作用直接导致宿主细胞的加工进而来完成病毒的组装和释放过程。最近研究表明,尽管很多不同的反转录病毒的氨基酸缺少相似性,但它们的 Gag 蛋白在结构

收稿日期: 2004-09-01 修回日期: 2004-09-27

* 国家自然科学基金青年基金资助项目(3020200)

** 通讯作者, 电子信箱: wxj74@sohu.com

和功能上均表现出一定的相似性。不同的反转录病毒可以利用不同的病毒蛋白和结构基序来完成相似的释放作用。例如, 人免疫缺陷 1 型病毒 (HIV-1)^[7], 劳斯肉瘤病毒 (RSV)^[8], Masori Pfizer 猴病毒 (MPMV)^[9], 人 T 细胞白血病 1 型病毒 (HTLV), 这些病毒在 Gag 蛋白中都有富含脯氨酸的 L 域, 由 PPPY 和 P(T/S)AP 基序组成。EIAV p9 L 域的 YPDL 基序在病毒出芽和感染过程中起着显著的作用, 同时 HIV-1 p6 的 PTAP 基序和 RSV p2b L 域的 PPPY 基序在病毒的感染过程中也起着重要的作用。YPDL、PTAP、PPPY 基序具有显著的病毒-细胞间的相互结合特异性, 可各自介导病毒粒子的出芽和感染。

通过 EIAV 前病毒突变研究 L 域复制特性的试验及 Gag 聚合蛋白出芽试验, 发现 EIAV L 域 YPDL 基序与异质的 RSV L 域 PPPY 基序和 HIV-1 PTAP 基序功能上的相似性, 同时也揭示了它们之间在位置上的独立性。在反转录病毒组装和病毒粒子从囊膜出芽的过程中, 其进入位点可能是不同的, 不同的 L 域基序可以利用不同的入口进入细胞^[10]。在 L 域 PTAP 或 PPPY 和 YPDL 基序之间功能的相似性暗示, 不同反转录病毒可能同相似的细胞蛋白相互联系, 同时从一个反转录病毒系统得出的结论应该适用于其他病毒。鉴于此, 研究其他不同种属的反转录病毒对于确定 EIAV 与病毒宿主细胞特异性关系很有帮助。

2 L 域在病毒侵入和释放时与病毒其它蛋白、细胞蛋白的相互作用

Craven 等发现, 在一些囊膜病毒中的 L 域也可检测到丰富的脯氨酸基序, 例如水疱性口腔炎病毒^[11], NS3 蓝舌病毒^[12], 在病毒释放过程中都具有一定的作用。通过体外试验研究, 富含脯氨酸的 L 域在体内可特异地结合细胞蛋白的 WW 域, WW 是 Yes 激酶相关蛋白, 且是 Nedd4 单体泛素化连接酶家族成员^[13], 但在感染细胞中并没有报道 L 域与相关蛋白的特异性相互作用。近年来, 有报告表明酪氨酸残基单体泛素化及其化合物在反转录病毒出芽过程中的作用。例如, 可降低细胞单体泛素化的某种蛋白抑制剂能抑制 HIV-1、HIV-2、RSV 的复制和出芽。另外, Carrus 等^[14]和 Strack 等^[15]提出 HIV-1 L 域 PTAP 与 Tsg101 (与单体泛素化结合的 E2 酶家族成员之一, 但缺乏 Cys 活性位点) 之间具

有特异的相互作用, RSV L 域 PPPY 与 Nedd4 家族相似的单体泛素化连接酶 E3 蛋白之间也具有特异的相互作用。这些只是推断, 并没有证据说明在 EIAV 出芽过程中涉及单体泛素化的作用。因此, 需要进一步的试验来明确单体泛素化在反转录病毒出芽和感染过程中的作用。

另外, p9 可与病毒出芽位点的细胞调节蛋白 AP-2 特异性结合^[16], p9 可能通过这种特异结合的作用来介导完成病毒粒子的释放。细胞调节蛋白是细胞完成内吞作用的重要组成蛋白, 同时也是病毒侵入细胞囊膜表面的结合位点, 所以 p9 蛋白通过细胞调节蛋白可特异地介导病毒囊膜与细胞囊膜的融合, 通过 L 域与病毒出芽有关的细胞蛋白相互作用, 作为病毒的核心进入细胞的入口。在病毒出芽和感染过程中 p9 可与不同的细胞内容物和外内容物相互作用来完成病毒的出芽, 目前正在对此机制进行研究。

Gag 聚合蛋白出芽试验对于 p9 作用的解释是在没有其他非 Gag 病毒蛋白的表达下定义的, 一些非 Gag 病毒蛋白可能对病毒的组装和释放也起一定的作用。例如, Gag 和 Env 的相互作用会影响病毒出芽和释放的极性^[17]。另外, 某种辅助基因蛋白, 像 Vif 对 HIV-1 和山羊关节炎脑炎病毒的病毒组装就有影响^[18], Vpu 能增强病毒粒子从 L 域释放作用^[19]。也有实验表明 HIV-1 p6 也与病毒蛋白、囊膜、聚合酶蛋白紧密结合。这些提示我们 EIAV p9 在病毒侵入和释放时与其他病毒蛋白、细胞蛋白具有复杂的相互作用。

3 EIAV p9 对病毒复制能力的影响

Li Feng 等^[10]通过构建改变 L 域特异性和位置的 EIAV 前病毒突变体, 研究 EIAV p9 蛋白和它的 YPDL L 域在病毒复制过程中的作用, 结果发现与 p9 相关的 L 域对于病毒在转染的 ED 细胞中复制是必需的, 同时在 Gag 聚合蛋白中缺少 p9 蛋白的 Gag 突变或 YPDL 缺失或 L 域特异的点突变在转染的细胞中都不能产生细胞外病毒粒子, 说明 L 域 YPDL 基序在病毒出芽过程中发挥着重要的作用。但最近通过切断感染性分子前病毒克隆株 EIAV_{uk} p9 和定点突变来研究 p9 与复制关系的试验揭示了 p9 在 EIAV 复制中新的作用特点, 与早期 Gag 聚合蛋白释放试验阐述的有所不同, 即在 p9 蛋白 51

个残基中仅 N 末端 31 个氨基酸在转染马细胞中与复制能力相关; 切断 p9 G 末端 20 个或少数氨基酸的前病毒突变, 仍保持良好的复制能力, 但如果切断 21 个或更多残基的突变, 则可导致复制能力完全丧失^[30]。我们可以推论, 从有复制能力到复制能力缺陷的转换是绝对的, 即仅一个额外氨基酸的切断。这说明在前病毒基因表达过程中 EIAV p9 蛋白对于病毒的释放不是绝对必需的, 而是其部分氨基酸起决定性的作用。有试验表明, 有复制能力的 p9 前病毒的突变与亲本克隆 EIAV_{UK} 前病毒相比, 其表现出迟缓的复制动力学和较低的复制水平, 而通过完整的蛋白作用修饰后可得到最优的 p9 功能, 说明即使存在 p9 前病毒的突变但其仍具有复制能力, 但复制水平会受到影响, 完整的 p9 蛋白在病毒的复制过程中具有重要的作用, 可以提高病毒复制的水平。试验结果显示, 所有有复制能力的 p9 截断突变都具有 p9 L 域 YPDL 基序, 缺少 YPDL 序列的截断突变, 其病毒释放水平比亲本 EIAV_{UK} 低三倍。然而, 一些复制能力缺陷的 p9 截断突变也包含 L 域 YPDL 基序, 这说明 p9 的其他功能区对于病毒的复制也可能是必要的, 不同的功能区共同作用来完成病毒的复制。

4 p9 对细胞外病毒粒子产生的影响

Chen 等^[20]通过转染有复制能力和因 p9 切断而无复制能力的突变体与母本 EIAV_{UK} 前病毒, 对比其各自在细胞外产生病毒粒子的水平, 结果显示有复制能力的 p9 L 域突变和母本 EIAV_{UK} 前病毒二者产生的胞外游离病毒粒子水平相似, 而在同样条件下 *gag* 基因中缺乏 L 域的前病毒构建体 (YPDL⁻) 中, 产生的胞外游离病毒粒子水平很低, 仅为母本 cmvEIAV_{UK} 粒子产量的 1%。这些结果提示, 造成复制缺陷的至少部分原因在于 p9 蛋白母本 L 域 YPDL 基序缺失降低了病毒粒子产量。但通过单独测定细胞外病毒粒子的产物时, 发现因 p9 截断突变引起的复制能力缺陷与病毒粒子产量之间没有必然的联系。同时实验资料表明, 这种因 p9 突变产生的病毒粒子有些不具有感染性。

5 小结

通过近些年的试验, 对 EIAV Gag p9 蛋白的功能进行了系统的研究, 对定义其功能有了新的视

点。EIAV p9 在病毒复制中至少有两种作用, 一是针对病毒出芽过程, 另一方面是病毒的感染。在病毒出芽和病毒感染过程中, p9 L 域起到主要的作用。对于在病毒感染靶细胞时, Gag 蛋白也具有重要的作用, 说明像 p9 这些相对较小的蛋白的多功能特性。因此, HIV-1 p6 和 EIAV p9 在病毒晚期的组装作用很有可能仅反应了 Gag 蛋白多功能特性的某一方面。鉴于此, 研究 Gag 蛋白在病毒复制中的特性对于揭示在病毒感染中与其他病毒蛋白和细胞蛋白的相互作用很重要。目前, 对 EIAV Gag p9 确切的作用机制尚不太清楚, 但可以肯定反转录病毒的 p9 蛋白及相似蛋白在完成病毒组装、从细胞中的释放、及有效地侵入等过程中行使重要的功能。

参考文献

- [1] Wills J W, Craven R C. Form, function, and use of retroviral gag proteins. *J AIDS*, 1991, 5: 639~ 654
- [2] Myers G, Wair Hobson S, Korber B, et al. Human retroviruses and AIDS. In: *Theoretical Biology and Biophysics*, Los Alamos, N. Mex, Los Alamos National Laboratory, 1994, 10~ 28
- [3] Accola M A, Strack B, Gottlinger H G. Efficient particle production by minimal Gag constructs which retain the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 capsid p2 and a late assembly domain. *J Virol*, 2000, 74(12): 5395~ 5402
- [4] Ono A, Orenstein J M, Freed E O. Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol*, 2000, 74(6): 2855~ 2866
- [5] Bumiston M T, Cimarelli A, Colgan J, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Gag polypeptide multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid dimer interface and the basic region of matrix protein. *J Virol*, 1999, 73(10): 8527~ 8540
- [6] Puffer B A, Parent L J, Wills J W, et al. Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J Virol*, 1997, 71(9): 6541~ 6546
- [7] Huang M, Orenstein J M, Martin M A, et al. p6Gag is required for particles production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol*, 1995, 69(10): 6810~ 6818
- [8] Parent L J, Bennett R P, Craven R C, et al. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol*, 1995, 69(5): 5455~ 5460
- [9] Yasuda J, Hunter E. A proline rich motif (PPPY) in the Gag

- polyprotein of Mason-Pfizer monkey virus plays a maturation independent role in virion release. *J Virol*, 1998, 72(5): 4095~4103
- [10] Li F, Chen C P, Bridget A, et al. Functional replacement and positional dependence of homologous and heterologous L domains in equine infectious anemia virus replication. *J Virol*, 2002, 76(4): 1569~ 1577
- [11] Craven R C, Harty R N, Paragas J, et al. Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras. *J Virol*, 1999, 73(4): 3359~ 3365
- [12] Strack B, Calistri A, Accola M A, et al. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2000, 97(24): 13063~ 13068
- [13] Harty R N, Paragas J, Sudol M, et al. A proline rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *J Virol*, 1999, 73(4): 2921~ 2929
- [14] Garrus J E, von Schwedler U K, Pornillos O W, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *J Cell*, 2001, 107(1): 55~ 65
- [15] Strack B, Calistri A, Craig S, et al. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *J Cell*, 2003, 114(6): 689~ 699
- [16] Puffer B A, Watkins S C, Montelaro R C. Equine infectious anemia virus Gag polyprotein late domain specifically recruits cellular AP-2 adapter protein complexes during virion assembly. *J Virol*, 1998, 72(12): 10218~ 10221
- [17] Houriaux C D, Brand P Y, Sizaret F, et al. Identification of the glycoprotein 41 (TM) cytoplasmic tail domains of human immunodeficiency virus type 1 that interact with Pr55Gag particles. *AIDS Res Hum Retrovir*, 2000, 16(12): 1141~ 1147
- [18] Hamache A, Bouyac M, Audoly G, et al. The *gfp* gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J Virol*, 1995, 69(6): 3247~ 3257
- [19] Schwartz M D, Geraghty R J, Panganiban A T, et al. HIV-1 particle release mediated by Vpu is distinct from that mediated by p6. *Virology*, 1996, 224(1): 302~ 309
- [20] Chen C, Li F, Montelaro R C. Functional roles of equine infectious anemia virus Gag p9 in viral budding and infection. *J Virol*, 2001, 75(20): 9762~ 9770

The Progress on the Studies of EIAV Gag p9

WEI Li-li^{1,2} WANG Xiao-jun¹ WANG Ying² LI Jing-peng² XIANG Wen-hua¹ SHEN Rong-xian¹

(1 Harbin Veterinary Research Institute, Harbin 150001, China)

(2 Northeast Agriculture University, College of Life Science, Harbin 150080, China)

Abstract One important aspect of virus replication mechanisms is the way how virion assembly and budding from cell membrane. Extensive studies had proved that in retrovirus Gag protein play very important roles in virus assembly and budding. Numerous of functions of domains in Gag protein have been demonstrated. EIAV p9 is a small protein lies on the C-terminal of Gag polyprotein and its L-domain performs key function in process of virus late budding. A critical YPDL motif on L-domain can be of highly specific virus-cell interactions that must occur to direct host cellular processes to achieve virus assembly and budding. Furthermore, this motif YPDL was associated with the replicative ability of virus. Here we reviewed the progress of studies on p9 in the mechanism of virion assembly and budding.

Key words EIAV p9 Budding