



马铃薯 Y 病毒属病毒外壳蛋白功能

苗艳梅, 赵 敏

(东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: Potyvirus 属于马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae), 是最大的植物病毒属, 给农业生产造成严重的经济损失。外壳蛋白 (Coat Protein 简称 CP) 是 Potyvirus 属病毒中相对较稳定、功能较复杂的编码蛋白, 涉及到病毒传播、运动、抗性、及症状表达。本文详细分析了外壳蛋白的功能, 包括参与病毒的蚜传、参与病毒的长距离运动和胞间运动、参与植物病毒病防治和参与病毒症状表达。对病毒蛋白功能的研究为该属病毒的研究发展提供重要的理论基础, 对 Potyvirus 侵染机制及抗病机理研究具有指导价值。

关键词: 马铃薯 Y 病毒属病毒; 外壳蛋白; 蛋白功能

马铃薯 Y 病毒 (Potyvirus) 属于马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae), 是感染马铃薯、烟草等多种茄科、豆科、葫芦科、藜科农作物的最重要病毒之一。该属病毒有大约 200 种约占已知植物病毒种类的 $1/3^{[1]}$, 其中马铃薯 Y 病毒、芜菁花叶病毒、烟草脉带花叶病毒在农作物中最为常见, 作物感染病毒常表现出花叶、褪绿、环斑、叶脉坏死等症状, 该属病毒的许多种会对农作物的产量产生极其恶劣的影响, 降低作物产量 $20\% \sim 80\%$, 更有甚者出现了绝收的状况^[2]。

该属病毒为弯曲的线状病毒粒子无外膜包被, 长 $680 \sim 900$ nm, 直径 $11 \sim 13$ nm, 螺旋对称结构, 螺距约 3.4 nm。该属病毒基因组长约 10 kb 为正义单链 RNA 病毒^[3]。该基因组只包含一个读码框, 编码一个大约 360 kD 的多聚蛋白, 该多聚蛋白通过蛋白酶酶切和移码翻译最终形成 11 个成熟蛋白^[4]。另外该属病毒蛋白的 $5'$ -末端共价结合基因组连接蛋白 (Viral protein, genome-linked, VPg) $3'$ -末端为多聚腺苷, 这两部分在病毒的蚜传、运动中均发挥了重要作用。病毒编码的蛋白在整个作用过程中发挥的功能十分复杂^[5]。外壳蛋白 (CP) 是一个由 267 个氨基酸组成大小为 $30 \sim 47$ kD 的结构蛋白。该蛋白由高度变异的 N 端、相对保守的中心区和 C 端 3 部分组成^[6]。由于 CP 的结构组成和保守性 CP 在病毒的抗性研究、血清学检测、病毒分类等方面均有

应用, 本文对 CP 在病毒的蚜虫传播、病毒运动、症状表达和抗性研究方面的功能进行综述。

1 CP 蛋白功能

1.1 CP 参与病毒的蚜传

马铃薯 Y 病毒属病毒以蚜虫为传播媒介进行病毒传播, 其方式是通过蚜虫口器刺吸感染植株从而具有传毒能力。研究发现病毒编码的 CP 蛋白在病毒蚜传过程中起到了重要的作用。之前已经提到 CP 由 N 端、中心区和 C 端 3 部分组成。其中裸露在病毒粒子表面的 N 端存在一段高度保守的 DAG 序列, 这段序列是一段 Asp-Ala-Gly 氨基酸三联体, 在蚜虫进行病毒传播时主要是这段基序发挥作用。病毒利用其编码的 HC-Pro 蛋白作为桥梁, 一端连接 CP 裸露在外的 DAG, 另一端连接蚜虫的口器进行病毒传播, 这也与 Gvoierand Kassanis 等提出的桥梁假理论相符。DAG 的 3 个氨基酸在蚜虫传播中作用不同, ASP 是一个非碱性氨基酸具有传播功能, Ala 是一个在传播过程中大小和极性都不能发生变化的小残基, 一旦发生改变传播都不能顺利进行, Gly 是蚜传的关键氨基酸, 一旦发生突变病毒的蚜传功能将不复存在^[7]。研究者以 TMV 作为研究对象利用体外实验的方法为这一理论也提供了有力证据^[8]。研究者通过点突变的方法使 DAG 氨基酸序列发生突变, 发现突变后的 CP 无法和 HC-Pro 连接从而病毒失去蚜传能力^[9]。通过放射性元素标记的方法也证明了 DAG 序列的存在与否与蚜虫的传毒能力是息息相关的^[10]。有研究发现 DAG 的左右序列也会对蚜虫的传毒效率产生影响, 将 DAG 下游的 Lys 用 Glu、Arg、Pro 分别进行替换, 发现都会对蚜传产生影响。随后又对包括 DAG 部分序列以及下游基因进行了敲除试

收稿日期: 2018-10-17

基金项目: 国家自然科学基金 (51678120, 31470489)。

第一作者简介: 苗艳梅 (1993-), 女, 在读硕士, 从事植物病理学研究。E-mail: 1185181064@qq.com。

通讯作者: 赵敏 (1964-), 男, 教授, 博导, 从事微生物学研究。E-mail: 82191513@163.com。

验,发现敲除后的病毒仍具有蚜传能力但能力减弱,而后对病毒蛋白进行纯化,纯化后的蛋白又恢复了蚜传能力。这说明 DAG 下游残基对病毒蚜传能力的影响可能还与病毒周期有关^[11]。CP 在病毒蚜传过程中起主要作用的即 N 端的 DAG,但蚜传并不是由 CP 独立完成的而是由多个蛋白参与完成,已经发现 CP、HC-Pro 均参与这一过程中。

1.2 CP 参与病毒的长距离运动和胞间运动

植物病毒一般以昆虫作为传播媒介感染植物,病毒由媒介昆虫的噬咬部位入侵寄主,通过运动传播使整个植物感病表现症状。植物病毒在寄主内的运动方式与动物病毒不同,是由病毒自身编码的特定运动蛋白(movement protein,MP)进行运动传播的^[12]。然而马铃薯 Y 病毒属病毒与其他植物病毒不同,它本身并不编码特定的运动蛋白,而是通过自身编码的其它多种蛋白共同作用完成病毒在寄主植物内的传输运动这一过程。已经有研究发现 VPg、CP、6K2 及 HC-Pro 等蛋白均在运动中起了一定的作用。CP 蛋白的中心功能区、C 端、N 端 3 部分在病毒运动中扮演不同角色^[13],通过构建替换掉核心域中的高度保守氨基酸 Ser122(称为 S122W)和删除 C 端 17 个氨基酸残基序列的突变株发现,核心功能区对于病毒的细胞间运动是必不可少的,而 C 端虽然对于胞间运动存在影响但并不是必不可少的,但 C 端的突变会直接影响病毒在系统中的长距离运动^[14-15]。Arazi 等^[16]则通过构建替换或删除 CP 的 N 端区域蛋白的突变株发现,突变后的植株依然会出现病毒的系统迁移从而证明了 CP 的 N 端对于病毒的系统运动并不是必不可少的,这个结果后来被 Kimalov 等^[17]进一步验证了其正确性。CP 蛋白对于病毒运动中的作用并不是独立完成的。研究已经证明,CP 和 HC-pro 作为已被认证的两个运动蛋白,在病毒传输过程中通过胞间连丝的穿透孔径共同调控病毒在寄主植物中的胞间和系统运动^[18]。这一理论在大豆普通花叶坏死病毒(Bean common mosaic necrosis virus, BCM-NV)、莴苣花叶病毒(Lettuce mosaic virus, LMV)中均都得到了验证^[19]。

1.3 CP 参与植物病毒病防治

基因工程技术的发展为植物病毒病提供了新的免疫防治思路。利用外壳蛋白、运动蛋白以及 RNA 的介导都可以获得转基因抗病毒植株^[20],其中由外壳蛋白基因片段构建的转基因植株是目

前应用较为广泛免疫效果较好的植物病毒病防治方式^[21]。Sanford 和 Johnston 在植物病原获得性抗性理论中指出,如果寄主植物能够获得病原基因重要部分的表达,那么将会破坏正常的病原在寄主内的表达情况,从而扰乱病原对寄主的感染减弱对寄主的伤害^[22]。基于这一理论可以发现外壳蛋白对于寄主植物是具有免疫能力的。外壳蛋白是病毒的结构蛋白,具有包裹核酸保护病毒遗传物质的作用。自 1986 年 Beachy 等首次报道了 TMV 在农杆菌的介导下导入烟草细胞可以使烟草产生 TMV 抗性后,植物病毒病的防治有了新途径,从那以后研究者至少发现 15~20 种病毒的 CP 表达载体可以赋予寄主植物抗性。郭兴启等^[23]通过构建翻译和非翻译的 PVY-CP 表达载体发现,PVY 病毒的 CP 基因不论能不能正常翻译都可以实现抗性植株的成功培育。研究发现 CP 的反向重复序列构建的抗性植株明显比正向序列构建的抗性植株效果更好,成功获得抗性的概率更高且 CP 片段缩短至 202 bp 时仍可成功获得有抗性的植株^[24]。以马铃薯 Y 病毒为研究对象发现转基因植物的抗病性与 CP 的拷贝数无关,CP 片段产物的积累量与抗性成负相关^[25],这与 Kaniewski 在田间发现的具有抗性的转基因 PVY 外壳蛋白植株中检测不到病毒积累的结果也是相符的。对 PVY 病毒 CP 在转基因植株中的积累量与抗性的关系进行了研究,结果发现积累量高的转基因植物反而抗性较弱,积累量少的植物反而表现出高抗性^[26]。利用 PVY-NTN 构建 CP 表达载体,利用根瘤农杆菌介导成功获得可以同时抵抗 PVY-NTN 和 PVY O 两种不同株系 PVY 病毒的抗病植物^[27]。刘静等^[28]对 HC-Pro CI NIB CP 介导的马铃薯 Y 病毒抗性进行了比较,4 种蛋白虽然都可以成功获得抗性株,但 CP 效果最好,为 84.21%,紧随其后的是 CI 介导抗性株达到 73.69%,HC-Pro Nib 分别为 55.34%和 61.54%。

1.4 CP 参与病毒症状表达

马铃薯 Y 病毒属病毒感染寄主后,两者在细胞和超细胞水平上发生互作,表达出现褪绿、花斑等症状,症状的引发机制尚不十分明确,但与病毒编码的植物细胞膜相关性蛋白的作用可能存在重要联系。Gunasinghe 等^[29]在感染 PVY 的寄主植物的叶绿体中发现了 CP 和 HC-Pro 的存在,进一步研究发现 PVY 的外壳蛋白与寄主植物的叶绿体膜和类囊体膜都存在相关性^[30]。付亚东

等^[31]利用 Western blot 和免疫胶体金细胞化学定位检测进一步证明了 CP 蛋白存在于叶绿体中。研究者利用 CP 基因构建了含 CP 的转基因植物,成功构建的 CP 转基因作物出现了与感染 PVY 病毒相同的褪绿症状,进一步证明了 CP 与病毒的症状表达具有相关性^[32]。但 CP 对病毒症状影响的原因还不是相当明确,推测 CP 对寄主植物症状产生影响的原因可能是外壳蛋白与寄主植物的叶绿体发生作用,破坏叶绿体结构从而植物出现褪绿症状^[33]。研究发现 PVY 的 CP 能与烟草叶绿体中的 Rbcl 蛋白发生互作,进而推测可能是 CP 与烟草的 Rbcl 蛋白相互作用影响了 Rbcl 的正常功能从而使得光合作用受到抑制,植物表现褪绿黄化等症^[34]。

2 总结与展望

马铃薯 Y 病毒属病毒虽然其基因组相对简单只编码一个多聚蛋白构成,但该多聚蛋白最终分解得到的 11 个成熟蛋白在整个生命周期中发挥的功能十分复杂,它们多数都是多功能蛋白,并且蛋白之间常常相互作用共同完成某一周期。CP 作为结构蛋白已有很多研究证明其在整个病毒生命周期中参与了病毒的传播、复制、扩增、抗性、胞间运动及长距离运动的重要过程,正是因为 CP 在各个过程中发挥作用的重要性也决定了该蛋白结构的相对保守性。近年来 CP 在实际生产中发挥的作用越来越受到关注,农杆菌介导的侵染性克隆技术的发展,血清学检测技术的逐步成熟都为 CP 在实际生产发挥作用提供了更广阔的平台。但对于 CP 的应用仍存在问题,一方面有研究者认为利用 CP 构建载体介导植物的抗性,可能会造成新的组装基因的感染危害,另一方面 CP 的抗性范围较窄。基于以上几点本研究认为新的 CP 功能研究将会朝着以下几点发展:①根据蛋白基因序列及种类和功能不同,构建蛋白功能分析数据包(包括:近缘病毒,感染对象,蛋白功能及相关作用蛋白功能),制作蛋白功能分析软件,为今后蛋白功能分析研究提供高效便捷工具。②在构建侵染性载体时,可选能将目标片段与载体结合后再转化为易分离的物质,当载体成功将目的蛋白基因转入植物基因后,分离纯蛋白基因再去载体。③利用多种方法联用已经显示出了出色的表现。近年出现的基因组学、蛋白组学、代谢组学在深入分析检测上的联合应用为蛋白功能基因功能研究提供了有力帮助。采用多种

技术联用,不仅可以扬长避短,优势互补,节约时间,而且可提高分析的效果和精确度。随着蛋白功能作用原理的升入进行,研究的难度也增大,需要快速、方便、灵敏准确、通用性好的研究分析方法。同时,对蛋白功能以及在农业上的实际应用也给研究人员提供了一个广阔研究空间。

随着人们对 CP 的作用机理和功能表现更清晰更明确的了解,利用蛋白基因构建出抗性强,产量高,毫无副作用的植株也不是不可能的。相信在不久的将来利用蛋白的功能可以解决更多植物病毒方面亟待解决的问题。

参考文献:

- [1] Nolte P, Whitworth J L, Thornton M K, et al. Effect of seed-borne potato virus Y on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody potato[J]. *Plant Disease*, 2007, 88(3): 248-252.
- [2] 杜利娟. 六种病毒外壳蛋白亚细胞定位及对烟草抗性影响的比较分析[D]. 重庆:西南大学, 2016.
- [3] Löhmus A, Hafrén A, Mäkinen K. Coat protein regulation by CK2, CPIP, HSP70 and CHIP is required for potato virus A replication and coat protein accumulation[J]. *Journal of Virology*, 2016, 91(3): JVI. 01316.
- [4] 高芳鑫, 常飞, 沈建国, 等. PVYNTN- NW 榆林分离物的全基因组序列测定与分析[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(2): 270-279.
- [5] 高芳鑫, 沈建国, 史凤阳, 等. 马铃薯 Y 病毒 pipo 基因的分子变异及结构特征分析[J]. *遗传*, 2013, 35(9): 1125-1134.
- [6] Ren F, Zhang Z, Fan X, et al. Construction of a plant expression vector of the Grapevine virus B coat protein gene and transformation into *Nicotiana tabacum*[J]. *Plant Protection*, 2018(3): 8-12.
- [7] Sahana N, Kaur H, Jain R K, et al. The asparagine residue in the FRNK box of potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(5): 1167-1177.
- [8] Maria T, Tsaniklidis G, Delis C, et al. Gene transcript accumulation and enzyme activity of β -amylases suggest involvement in the starch depletion during the ripening of cherry tomatoes[J]. *Plant Gene*, 2016, 5: 8-12.
- [9] Wei T, Pearson M N, Fletcher J D. Molecular confirmation of New Zealand garlic yellow streak virus as Leek yellow stripe virus[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2006, 35(3): 341-346.
- [10] Urcuqui-Inchima S, Haenni A L, Bernardi F. Potyvirus proteins: a wealth of functions[J]. *Virusresearch*, 2001, 74, (1-2): 157-175.
- [11] Ju J, Kim K, Lee K J, et al. Localization of barley yellow dwarf virus movement protein modulating programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant Pathology Journal*, 2017, 33(1): 53-65.
- [12] 崔晓艳. 马铃薯 Y 病毒属编码的膜相关蛋白的功能研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2010.

- [13] Heinlein M. Plant virus replication and movement[J]. Virology, 2015, 479-480: 657-671.
- [14] Eugene V Koonin, Valerian V Daljia, Mart Krupovic Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity[J]. Virology, 2015, 206(2): 2-25.
- [15] 崔晓艳, 陈新, 顾和平, 等. 马铃薯 Y 病毒属病毒 P3 和 P3-PiPo 蛋白功能研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39(1): 99-105.
- [16] Arazi T, Shibolet Y M, Gal-On A. A nonviral peptide can replace the entire N terminus of zucchini yellow mosaic potyvirus coat protein and permits viral systemic infection. [J]. Journal of Virology, 2011, 75(14): 6329-6336.
- [17] Carrington J C, Jensen P E, Schaad M C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement[J]. Plant Journal, 2010, 14(4): 393-400.
- [18] Hameed Amir, Tahir M N, Asad S. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato[J]. Molecular Biotechnology, 2017, 59(2-3): 73-83.
- [19] Valli A, Gallo A, Calvo M, et al. A novel role of the potyviral helper component proteinase contributes to enhance the yield of viral particles [J]. Journal of Virology, 2014, 88(17): 9808-9818.
- [20] Mochizuki T, Yamazaki R, Wada T, et al. Coat protein mutations in an attenuated Cucumber mosaic virus encoding mutant 2b protein that lacks RNA silencing suppressor activity induces chlorosis with photosynthesis gene repression and chloroplast abnormalities in infected tobacco plants[J]. Virology, 2014, 456-457: 292-299.
- [21] Spoustová P, Synková H, Valcke R. Chlorophyll a fluorescence as a tool for a study of the potato virus Y effects on photosynthesis of nontransgenic and transgenic Pssu-ipt tobacco[J]. Photosynthetica, 2013, 51(2): 191-201.
- [22] Zhongqiu T, Ye S, Jing L, et al. Construction and quality analysis of transgenic rehmanna glutinosa containing TMV and CMV coat protein[J]. Molecules, 2016, 21(9): 1134.
- [23] 郭兴启, 温孚江, 宋云枝, 等. 翻译和非翻译马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因介导的抗性研究比较[J]. 病毒学报, 2001, 17(4): 360-367.
- [24] 竺晓平. 马铃薯 Y 病毒 CP 基因的短片段及其反向重复转
- 基因烟草的 RNA 介导的抗病性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2003.
- [25] 李鹏, 宋云芝, 刘晓玲, 等. 马铃薯 Y 病毒 CP 基因 3'5'端反向重复结构介导的抗病性研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 69-76.
- [26] Scholthof K B G, Adkins Scott, Czosnek H. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(9): 938-954.
- [27] Stashevski Z, Il'Inskaya O N. Virus resistance of transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) bearing PVY NTN -CP gene of potato virus Y coat protein [J]. Russian Journal of Genetics Applied Research, 2011, 1 (2): 103-111.
- [28] 刘静, 陈雪梅, 宋云枝, 等. 马铃薯 Y 病毒 HC-Pro、CI、Nib 和 CP 基因介导的病毒抗性比较研究[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 57-65.
- [29] Gunasinghe U, Berger P. Association of potato virus Y gene products with chloroplasts in tobacco[J]. Mol Plant-Microbe Interact, 2009, 4: 452-457.
- [30] 马雪青, 王永刚, 周贤婧, 等. 马铃薯病毒研究新进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 429-434.
- [31] 付东亚. 植物病毒抑制寄主光合作用的机理和弱病毒保护研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [32] Liu H L, Liu Y W, Shen T L, et al. Characterization and application of a common epitope recognized by a broad-spectrum C4 monoclonal antibody against capsid proteins of plant potyviruses[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(4): 1853-1869.
- [33] Smith M L, Corbo T, Bernales J, et al. Assembly of trans-encapsidated recombinant viral vectors engineered from tobacco mosaic virus and Semliki Forest virus and their evaluation as immunogens [J]. Virology, 2012, 358 (2): 321-333.
- [34] Xue K E, Jun-Ying L I, Chao-Hua X U, et al. Effects of different light quality on anatomical structure, carboxylase activity of ribulose 1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase and expression of rbc and rca genes in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves [J]. Plant Physiology Journal, 2012, 48(3): 251-259.

Functional Characterization of Potyvirus-encoded Coat Protein

MIAO Yan-mei, ZHAO Min

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 15004, China)

Abstract: Potyvirus belonging to family Potyviridae, is the largest plant virus family, which can be responsible for severe economic losses to agriculture world-wide. Coat proteins of potyviruses show relatively steady in compared to other proteins among potyviruses and multi-functional, related with the transmission of the virus, movement, resistance and symptom expression. This paper analyzed the functions of coat protein, including participation in aphid transmission of virus, long-distance and intercellular movement of virus, participation in plant virus disease control and virus symptoms expression. The functional characterization of potyvirus-encoded proteins supported the understanding of potyviruses, and promoted the research of potyviruses infectious and resistant mechanisms.

Keywords: potyvirus; coat protein; protein function