第 36 卷 第 5 期 实验动物科学 Vol. 36 No. 5
2019 年 10 月 LABORATORY ANIMAL SCIENCE October 2019

研究进展

小鼠诺如病毒分子生物学研究进展*

赵 娜[1] 赵歆伊[2] 孟 琦[3] 邱雯贤[3] 何 滨[1] 马小龙[1] 张艳淑[3] 姚 林[1,3] 李 爽[1]

(1. 华北理工大学实验动物中心,唐山 063210)(2. 华北理工大学基础医学院,唐山 063210)
(3. 华北理工大学公共卫生学院,唐山 063210)

摘要:本文对小鼠诺如病毒的分子生物学及复制的研究进展做了比较系统的综述,为小鼠诺如病毒的病原学研究及感染的防控提供参考。

关键词:小鼠诺如病毒;分子生物学;复制;研究进展
中图分类号: R37 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006-6179(2019)05-0077-04
DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.015

实验动物的质量与动物实验能否顺利进行关系非常密切,我国《实验动物 微生物学等级及监测》(GB 14922.2—2011)规定无特定病原体(Specific pathogen Free,SPF)级别小鼠须排除 11 种病毒,但仍会因动物本身携带其他病原微生物而干扰实验结果。据报道,小鼠诺如病毒(Murine Norovirus,MNV)已经成为目前实验小鼠感染率较高的一种病毒,免疫缺陷小鼠感染后发生炎症反应甚至死亡[1],对科研工作危害极大[2-3]。本文就小鼠诺如病毒的分子生物学特点及其复制进行综述。

1 小鼠诺如病毒的分子生物学特点

1.1 基因组

小鼠诺如病毒属于嵌杯状病毒科(Caliciviride)诺如病毒属(Norivirus),与人源诺如病毒(Norwalk virus,NoV)的生物学及遗传特性相似。MNV 基因组长约 7.5 kb,为正义单链 RNA,在其 5′末端基因组和亚基因组 RNA 与病毒非结构蛋白 NS5 或病毒的末端结合蛋白(Viral protein genome-linked,VPg)共价连接,而 3′末端为 polyA 结构[4]。基因组由三个开放阅读框(Open reading frame,ORF)组成。之后有学者在 ORF2 内发现了 ORF4,其被认为编码毒力因子[5]。ORF1 编码 6 个非结构蛋白(5′-NS1-2-NS3-NS4-NS5-NS6-NS7-3′),其翻译成的一个多聚蛋白被蛋白酶 NS6 切割产生成熟的与复制相关的病毒蛋白。ORF2 和 ORF3 分别编码衣壳蛋白(Capsid protein,VP1 和 2),VP1 和 VP2 是组成病毒粒子的结构蛋白。ORF4 编码的毒力因子-1(Virulence factor-1,VF1)在感染小鼠中发挥重要作用,然而该蛋白在其他诺如病毒中未被发现。

1.2 病毒蛋白

1.2.1 非结构蛋白

目前,MNV 的许多单个蛋白的功能尚未被阐明,它们的作用通常是根据保守的基序和已知的亚细胞定位从相关的病毒和序列分析数据推断的,但肯定的是这些蛋白质与其他正义单链 RNA 病毒编码的蛋白质一样为多功能蛋白质。

尽管 NS1-2 的功能尚不明确,但是转染实验表明其定位于内质网(Endoplasmic reticulum,ER)和高尔基体,可能参与了高尔基体的分解[6]。研究发现 NS1-2 影响细胞内相关蛋白的运输和表达,Ettayebi 和 Hardy 的研究证明 NS1-2 能够阻止水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus,VSV)G-糖蛋白在细胞表面的表达,提示 NS1-2 可能具有潜在的免疫逃避作用。NS1-2 可通过与囊泡相关膜蛋白 A(Vesicle-

收稿日期:2019-03-22
* **基金项目**:河北省自然科学基金(No.C2018209056);河北省高等学校科学研究计划(No.QN2018086);河北省医学科学研究重点课题(No.20170192);河北省中医药类科研计划课题(No.2018173);华北理工大学博士科研启动项目(No.28407499)
作者简介:赵 娜(1986—),女,博士,讲师,研究方向:实验动物标准化研究.E-mail: zhaona0581@163.com
通信作者:李 爽(1984—),男,博士,讲师,研究方向:实验动物微生物质量控制研究.E-mail:lishuang_ncst@163.com

associated membrane protein A, VAP-A) 和分泌途径的其他组分的相互作用破坏细胞内蛋白质运输的能力[7]。ER 和高尔基体的重排被认为有助于募集宿主膜和蛋白质以促进病毒复制复合物(Replication complex, RC)的形成,有利于病毒复制[8]。在病毒感染过程中观察到 MNV NS1-2 在 RC 内的 ER 和 dsRNA 定位,表明 NS1-2 是 RC 的重要组成部分[9]。

NS3 为 2C 样蛋白,与小核衣壳蛋白家族的 2C 蛋白具有序列同源性和相似的基序,其包括核苷三磷酸酶(NTPase)基序,因此提示 NS3 可具有 NTPase 功能。Pfister 等[10]发现 NS3 可以在体外与三磷酸腺苷(ATP)结合,但是不具有解开合成的 DNA-RNA 异源双链的能力,因此显示它不具有解旋酶活性。尽管在感染期间这些结构还未被观察到,但已经证明单独的 MNV NS3 蛋白表达形成水泡状结构并引起细胞内膜的变化[6]。

通过对 NS4 内部疏水性区域的预测发现,它能与膜 C-末端结合,被认为是定位在 ER 的 p30 类似物[10]。与 NS4 类似的脊髓灰质炎病毒(Poliovirus) 3 A 蛋白可以通过抑制 ER-高尔基细胞运输引起免疫逃避[11]。研究发现 MNV NS4 转染细胞后定位于 ER 和高尔基膜,且与 NS5 能相互作用[12]。

NS5 在病毒转录、翻译和衣壳化中具有重要作用。与小核糖核酸病毒(Picornavirus)和杯状病毒科成员相似,gRNA 和 sgRNA 都与 5′端的帽结合蛋白(Cap-binding protein)类似物 NS5/ VPg 连接[13]。NS5/ VPg 的消耗或抑制的研究揭示其在翻译复合物的募集以及翻译起始中具有主要作用,结构解析研究已经显示 VPg 形成具有灵活的 N 端/ C 端的螺旋核心,这对蛋白质功能的多样性十分重要[14]。研究显示 MNV VPg 能够结合翻译起始因子 eIF3 和 eIF4G1,进一步说明 NS5 在翻译起始复合体中的作用[15]。

NS6 是病毒编码的半胱氨酸蛋白酶,可将 ORF 多聚蛋白切割成单独的蛋白质和一些中间产物(包括 NS6-7 前体)。NS6 和中间产物 NS6-7 可以优先在不同位点裂解 ORF1[16]。与其他 RNA 蛋白酶类似,NS6 以顺式和反式切割多聚蛋白以产生多聚蛋白和成熟的单个 NS 蛋白[17]。在包括 MNV 在内的杯状病毒科成员中,ORF1 内的 5 个切割位点已被确认为保守的切割位点[9]。在病毒感染期间,NS6 主要定位于 RC;当单独表达时,NS6 显示定位于线粒体[6],其功能可能与丙型肝炎病毒(HCV)和甲型肝炎病毒(HAV)蛋白酶相似,可以通过切割线粒体抗病毒信号传导蛋白(Mitochondrial antiviral signalling protein, MAVS)抑制抗病毒信号传导[18]。

在大多数情况下,病毒感染细胞中 NS6-NS7 前体蛋白被进一步加工产生病毒 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp) NS7。NS7 催化基因组和亚基因组的正反义 RNA 转录。NS7 和 NS6-7 前体蛋白在复制过程中已经被证明具有生物学活性,在复制周期中的不同时间点,它们都可能发挥着更重要的作用[19]。NS7 的晶体结构显示其不同条件下可表现出不同的酶活性[20]。

1.2.2 结构蛋白

VP1 是病毒主要的衣壳蛋白(58 ~ 60 kDa)。VP1 由 N 端臂,衣壳域(Shell domain, S)和突变域(Protruding domain, P)组成,形成“杯状”结构。S 和 P 通过一个灵活的铰链区域连接。病毒粒子需要衣壳蛋白的 180 个分子形成 38 nm 的衣壳,其显示为 T=3 的二十面体对称[21]。

ORF3 编码的 VP2 是一种小的碱性蛋白,与病毒粒子成熟相关。VP2 具有高度可变性,尽管关于其在复制中的作用知之甚少,但发现 VP2 在 VP1 表达和基因组的调节中起一定作用。研究显示尽管 VP2 对 VLP 组装是非必需的,但是对 VLP 的稳定性有一定影响。与 VP1 相比,VP2 的翻译速度慢且效率低,每个病毒粒子中仅存在 1 ~ 2 个 VP2 拷贝,而 VP1 有 180 个拷贝[22]。

2 小鼠诺如病毒的复制

病毒基因组复制必须借助宿主翻译机制翻译病毒非结构蛋白,特别是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(NS7)和蛋白酶(NS6)。基因组 RNA 作为非结构蛋白的初始翻译模板,而结构蛋白 VP1、VP2 和 VF1 分别主要是从亚基因组 RNA 中翻译[4]。

同正义单链 RNA 病毒一样,MNV 基因组复制依赖于产生的反义中间体作为正义基因组 RNA 的模板。正义或反义的基因组和亚基因组 RNA 复制的启动具有 VPg 依赖性。正义基因组 RNA 合成是由 VPg 启动通过病毒 RdRp(NS7)进行合成的,VPg 同时为反义模板 3′末端的蛋白质引物。RdRp 通过 MNV 中保守的酪氨酸残基(Y26)将 VPg 共价结合到基因组和亚基因组 RNA 的负义模板链的起始核苷酸上[23]。亚基因组 RNA 与最后 2.4 kb 的基因组

RNA 相同,与 VPg 和 ployA 连接。目前认为启动亚基因组 RNA 合成的机制有两种,分别是提前终止和内部启动。亚基因组 RNA 的启动子由高度保守的茎环结构组成,位于 NS7 编码区 VP1 的上游。Lin 等[24]发现该启动子以及一个短模板序列优先被 MNV 的 RdRp 识别,并确保能与 RdRp 稳定结合。MNV VPg 已经被证实与翻译复合物的组分相互作用,如 eIF4F,eIF3 和帽结合蛋白,其中 eIF4F 在 VPg 启动病毒蛋白翻译中的作用尤为重要[13]。VPg 和 eIF4G 的 C-末端之间的相互作用是高效翻译所需要的,另外 VPg 和 eIF4F 核心组分构成的 Poly A 结合蛋白(Poly-(A)-binding protein,PABP)在 MNV 复制中发挥重要作用。

此外,位于 ORF 编码区侧翼的非编码区(Untranslated regions,UTR)可能是通过与翻译调控相关的宿主蛋白(包括 La,PTB 和 DDX3)相互作用进行基因组 RNA 翻译。研究发现当 UTR 与宿主细胞蛋白的相互作用被抑制时病毒复制减少。这种相互作用被认为通过促进病毒 RNA 环化来诱导 5'和 3'末端 UTR 上互补序列的结合来促进病毒复制[25]。

一旦募集到宿主细胞翻译复合物,MNV 的非结构蛋白被翻译成单个多聚蛋白,进一步被病毒蛋白酶 NS6 切割成单独的 NS 蛋白。研究发现,MNV 的蛋白酶具有保守的残基 H30 和 C139,这些保守的氨基酸残基对维持蛋白酶活性必不可少。May 等[26]发现 NS6 在不同的切割位点的切割效率不同,导致 NS2-3 和 NS3-4 的切割速率高于 NS4-5,NS5-6 和 NS6-7。最近发现裂解位点上游的残基 P4-P2′是一个重要的切割信号,负责控制酶的效率,从而导致有偏向性的切割。病毒 RdRp 在内的非结构蛋白在成功翻译和加工后,含有所有 NS 蛋白以及 VP1 和 VP2 的病毒 RC 在宿主细胞的胞质中形成。MNV RC 为点状灶,定位于微管组织中心(Microtubule organizing center,MTOC)。其中 VP1 与乙酰化微管蛋白共定位,表明细胞骨架可能参与细胞内 RC 的定位。RC 与感染后形成的宿主细胞膜复合物和病毒诱导的膜囊泡相关,这些膜结构可能从宿主细胞的 ER 和高尔基体衍生而来,并被重新分配到 RC[27]。研究发现,MNV 的 NS1-2 和 NS4 在细胞中过表达时直接影响高尔基体和蛋白质分泌,两者共定位于 ER 和高尔基体,表明其在宿主的膜表达及再分配中发挥一定的作用[6]。

参 考 文 献

[1] Karst S M, Wobus C E, Lay M, *et al*. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus [J]. Science, 2003, 299: 1575-1578.

[2] Henderson K S. Murinenorovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice[J]. Lab Anim (NY), 2008, **37**(7):314-320.

[3] 王翠娥, 陈立超, 周倩,等. 实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析[J]. 实验动物科学, 2014, **31**(2):20-24.

[4] Thorne L G, Goodfellow I G. Norovirus geneexpression and replication[J]. J Gen Virol, 2014, **95**(Pt 2):278-291.

[5] Thackray L B, Holmes K V. Amino acid substitutions and an insertion in the spike glycoprotein extend the host range of the murine coronavirus MHV-A59[J]. Virology, 2004, **324**(2): 510-524.

[6] Hyde J L, Mackenzie J M. Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex[J]. Virology, 2010, **406**:138-148.

[7] Ettayebi K, Hardy M E. Norwalk Virus Nonstructural Protein p48 Forms a Complex with the SNARE Regulator VAP-A and Prevents Cell Surface Expression of Vesicular Stomatitis Virus G Protein[J]. J Virol, 2003, **77**(21):11790-11797.

[8] Fernandezvega V, Sosnovtsev S V, Belliot G, *et al*. Norwalk Virus N-Terminal Nonstructural Protein is Associated with Disassembly of the Golgi Complex in Transfected Cells[J]. J Virol, 2004, **78**(9):4827-4837.

[9] Sosnovtsev S V, Belliot G, Chang K O, *et al*. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells [J]. J Virol, 2006, **80** (16): 7816-7831.

[10] Pfister T, Jones K W, Wimmer E. A cysteine-rich motif in poliovirus protein 2C (ATPase) is involved in RNA replication and binds zinc in vitro[J]. J Virol, 2000, **74**(1):334-343.

[11] Choe S S, Dodd D A, Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins[J]. Virology, 2005, **337**: 18-29.

[12] Kaiser W J, Chaudhry Y, Sosnovtsev S V, *et al*. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex[J]. J Gen Virol, 2006, **87**(Pt 2):363-368.

[13] Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, *et al*. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E[J]. Embo Reports, 2005, **6**(10):968-972.

[14] Leen E N, Kwok K Y R, Birtley J R, *et al*. Structures of the Compact Helical Core Domains of Feline Calicivirus and Murine Norovirus VPg Proteins[J]. J Virol, 2013, **87**(10):5318-5330.

[15] Daughenbaugh K F, Fraser C S, Hershey J W, *et al*. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment

[J]. Embo Journal, 2003, **22**(11):2852-2859.

[16] Scheffler U, Rudolph W, Gebhardt J, *et al.* Differential cleavage of the norovirus polyprotein precursor by two active forms of the viral protease[J]. Journal of General Virology, 2007, **88**(Pt 7): 2013-2018.

[17] Hardy M E, Dokland T, Bella J, *et al.* X-ray Crystallographic Structure of the Norwalk Virus Capsid[J]. Science, 1999, **286** (5438):287-290.

[18] Li X D, Sun L, Seth R B, *et al.* Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, **102**(49):17717-17722.

[19] Machín Á, Martín Alonso J M, Dalton K P, *et al.* Functional differences between precursor and mature forms of the RNA-dependent RNA polymerase from rabbit hemorrhagic disease virus.[J]. J Gen Virol, 2009, **90**(9):2114-2118.

[20] Bull R A, Hyde J, Mackenzie J M, *et al.* Comparison of the replication properties of murine and human calicivirus RNA-dependent RNA polymerases[J]. Virus Genes, 2011, **42**(1): 16-27.

[21] Bertolotticiarlet A, White L J, Chen R, *et al.* Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles [J]. J Virol, 2002, **76**(8):4044-4055.

[22] Sosnovtsev S V, Green K Y. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions[J]. Virology, 2000, **277**(1):193-203.

[23] Subbareddy C V, Goodfellow I, Kao C C. VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay [J]. J Virol, 2011, **85** (24): 13027-13037.

[24] Lin X, Thorne L, Jin Z, *et al.* Subgenomic promoter recognition by the norovirus RNA-dependent RNA polymerases[J]. Nucleic Acids Res, 2015, **43**(1):446-460.

[25] López-Manríquez E, Vashist S, Ureña L, *et al.* Norovirus Genome Circularization and Efficient Replication Are Facilitated by Binding of PCBP2 and hnRNP A1[J]. J Virol, 2013, **87** (21):11371-11387.

[26] May J, Korba B, Medvedev A, *et al.* Enzyme kinetics of the human norovirus protease control virus polyprotein processing order[J]. Virology, 2013, **444**(1-2):218-224.

[27] Hyde J L, Sosnovtsev S V, Green K Y, *et al.* Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway [J]. J Virol, 2009, **83**(19):9709-9719.

Progress on Molecular Biology of Mouse Norovirus

ZHAO Na[1], ZHAO Xinyi[2], MENG Qi[3], QIU Wenxian[3], HE Bin[1], MA Xiaolong[1], ZHANG Yanshu[3], YAO Lin[1,3], LI Shuang[1]

(1. *Laboratory Animal Center, North China University of Science and Technology, Tangshan* 063210, , *China*)

(2. *School of Basic medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan* 063210, *China*)

(3. *School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan* 063210, *China*)

Abstract: This article elaborated the molecular biology and replication of mouse norovirus (MNV), It provides a theoretical basis for the research of prevention and control of MNV in mice.

Key words: Mouse norovirus; Molecular biology; replication; research progress