

小麦丛矮病毒 N 蛋白的酶加工现象

龚祖坝 郑巧兮

(中国科学院上海生物化学研究所)

摘 要

经 SDS-聚丙烯酰胺梯度电泳可以从提纯的小麦丛矮病毒中分离出五种结构蛋白。其中, 在 N 蛋白区域又可分辨出分子量相差 2KD 的两条蛋白带, $N_1 = 46K$, $N_2 = 44K$ 。从电泳中分离得到的 N_1 及 N_2 蛋白经同位素 ^{125}I 标记后的双向指纹图谱证明没有明显差异, 为同一种蛋白质。又通过 N 末端分析证明 N_1 的末端为 Ser., N_2 为 His, 初步断定 N_1 与 N_2 是前体与酶解产物之间的关系。实验还证明小麦丛矮病毒的核衣壳制剂具有专一酶解 N_1 至 N_2 的能力, 首次证明了植物弹状病毒的核衣壳具有蛋白水解酶的活力。本文还提出了 N 蛋白的酶加工现象在弹状病毒的复制和转录的调控过程中可能起重要作用的设想。

关键词: 弹状病毒, N 蛋白的酶加工, 核衣壳的蛋白水解酶。

植物弹状病毒是植物病毒中最为复杂的一个病毒组, 目前已经确切了解的约有 30 多种^[1]。从已知的病毒形态结构和病毒的生化性质, 可知它十分类似于动物的弹状病毒也是一种负链病毒, 目前对植物弹状病毒的复制和转录机制等了解极少, 对弹状病毒的这方面知识大都来自动物弹状病毒, 特别是水泡性口膜炎病毒, 认为和核衣壳结合的 N 蛋白, 是一种调控病毒的复制和转录过程的蛋白^[2]。本文报道了我们对我国植物弹状病毒小麦丛矮病毒的一些研究结果, 特别对弹状病毒的调控蛋白—N 蛋白可能存在翻译后的修饰, 病毒核衣壳具有蛋白水解酶的活力以及提出了 N 蛋白的修饰在调控中可能起的作用。

材 料 和 方 法

一、小麦丛矮病病株 (wheat rosette stunt disease) 病株材料由河北省农科院植保所及江苏省海安县植保站协助采自发病小麦田块。

二、小麦丛矮病毒 (wheat rosette stunt virus, 简称 WRSV) 的分离提纯 方法见文献[3]。

三、WRSV 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶平板电泳 见文献[3]。

四、从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离 N_1 及 N_2 蛋白 采用垂直电泳分离, 方法见文献[4]。

本文于 1985 年 6 月 25 日收到。

五、 N_1 及 N_2 蛋白的N末端分析 按照Chang^[5]等方法进行。

六、 ^{125}I 标记的 N_1 及 N_2 凝胶条带,胰蛋白酶和WRSV核衣壳处理后单向指纹图谱 将 ^{125}I 标记的 N_1 凝胶条带干燥处理后,浸入含有浓度不同的TPCK-胰蛋白酶的酶液(pH3,内含0.001M氯化钙,0.001N盐酸)中,酶浓度分别为:5 μ g/ml,1 μ g/ml,0.04 μ g/ml,37 $^{\circ}$ C保温5小时后,放入冰箱的冰格子内终止反应,根据Cleveland^[6]的方法,将化冻的酶处理凝胶条进行电泳,凝胶为7%—15%的梯度凝胶,同时用 ^{125}I 标记未经酶解的 N_1 和 N_2 作为对照同步进行电泳,电泳完毕后,将凝胶平板浸入40%甲醇、5%冰醋酸中过夜,然后用蒸馏水冲洗,经凝胶干燥器干燥处理后,放入国产X光片,并放入超低温冰箱进行放射自显影。将干燥处理的 ^{125}I 标记的 N_1 凝胶条,浸泡于新鲜制备的提纯WRSV核衣壳制剂中,于37 $^{\circ}$ C保温,经15,22,38,45小时不同时间处理后,将 N_1 凝胶条冰冻停止反应,凝胶条化冻后用来处理的 N_1 及 N_2 凝胶条作为对照同时进行电泳和放射自显影,方法同上。

七、 ^{125}I 标记的 N_1 及 N_2 的双向指纹图谱,见文献[4]。

结 果

一、 ^{125}I 标记的 N_1 及 N_2 蛋白的双向指纹图谱

我们以前的研究工作证明完整的WRSV颗粒经SDS-聚丙烯酰胺电泳后,可获得5种结构蛋白,即和核酸一起组成核衣壳的L、N和NS蛋白及外壳突起的糖蛋白G和膜蛋白M^[3](Fig.1)。提纯的核衣壳制剂则可获得L、N和NS三种蛋白^[7]。我们还发现,完整的WRSV在梯度电泳图谱上的N蛋白可以稳定地分辨二条分子量相差为2KD的染色的蛋白区带,分子量为46K和44K,分别称为 N_1 及 N_2 。

从SDS聚丙烯酰胺分离获得的 N_1 及 N_2 蛋白凝胶条,用氯胺T法直接标记 ^{125}I ,用胰蛋白酶处理后,硝酸纤维素平板双向指纹图谱结果显示, N_1 及 N_2 蛋白的双向指纹图谱非常相似,没有明显差异(Fig.2)。

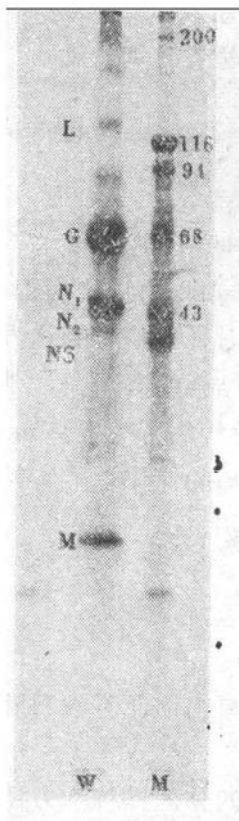


Fig.1 SDS-PAGE pattern of WRSV
W-WRSV
M-standard protein

二、 N_1 及 N_2 蛋白的N末端分析

从电泳中分离的 N_1 及 N_2 蛋白经微量的N末端分析测定, N_1 的N末端为Ser, N_2 的末端为His。

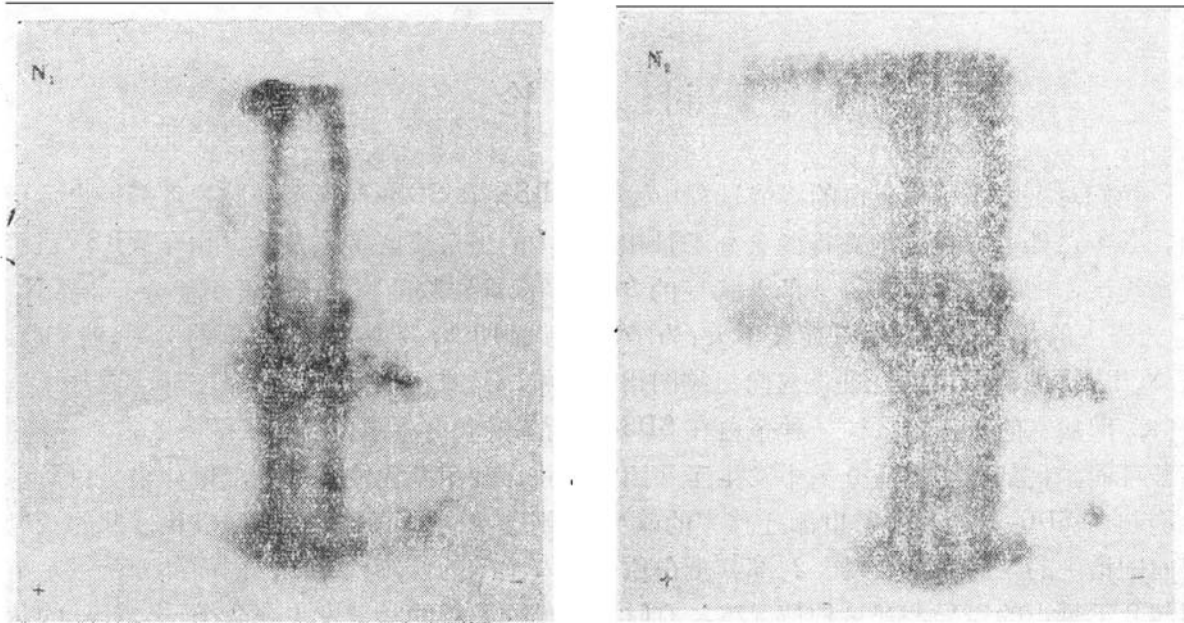


Fig.2 Two-dimensional fingerprintings of ^{125}I -labelled N_1 and N_2 proteins
a. N_1 b. N_2

三、 ^{125}I 标记的 N_1 蛋白经WRSV核衣壳制剂处理后的单向指纹图谱

^{125}I 标记的 N_1 蛋白经WRSV核衣壳制剂处理后,在短时间内, N_1 蛋白未见有变化, 处理45小时后, 在 N_1 蛋白带下面出现另一蛋白质区带, 其位置和未处理的 ^{125}I 标记的 N_2 蛋白相当 (Fig.3)。

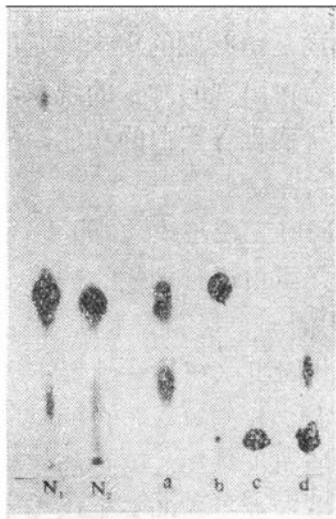


Fig.3 SDS-PAGE pattern of ^{125}I -labelled N_1 protein after treatment with WRSV-Np (nucleocapsid) and TPCK-trypsin solutions.

N_1 —— ^{125}I labelled N_1 protein

N_2 —— ^{125}I labelled N_2 protein

a. ^{125}I labelled N_1 protein after treatment with WRSV-Np for 45 hrs.

b.c.d. ^{125}I labelled N_1 protein after treatment with TPCK-trypsin at different enzyme concentration

b. $0.04\mu\text{g}/\text{ml}$ c. $1\mu\text{g}/\text{ml}$ d. $5\mu\text{g}/\text{ml}$

四、 ^{125}I 标记的 N_1 蛋白经胰蛋白酶处理后的单向指纹图谱 (Fig.3)

^{125}I 标记的 N_1 蛋白经不同浓度的胰蛋白酶溶液处理后可以发现, 在 $0.04\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胰蛋白酶处理时, N_1 蛋白主要部分未被水解, 但当胰蛋白酶用量增加时, N_1 蛋白水解成低分子量的多肽, 在此过程中均未出现分子量相当于 N_2 蛋白的区带。

讨 论

我们对WRSV结构蛋白的研究过程中发现WRSV在SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳图谱中，N蛋白处可以稳定地获得两条分子量相差2KD的蛋白质区带 N_1 及 N_2 。由于WRSV已经过分离提纯，而 N_1 及 N_2 在一般的非梯度的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时常不能分开，故 N_1 或 N_2 为寄主的杂蛋白条带的可能性不大；为了进一步证明 N_1 及 N_2 蛋白之间的关系，我们将 N_1 及 N_2 用 ^{125}I 进行标记后，进行双向指纹图谱的分析，结果证明两者无明显差异，同属于一种蛋白，即病毒的N蛋白。同一种蛋白在SDS-聚丙烯酰胺电泳图谱分开成两条区带，一般有两种可能：1.部分蛋白质分子中发生了基团的修饰，如甲基化或磷酸化，但如果蛋白质磷酸化引起在SDS-聚丙烯酰胺电泳迁移率的改变，则在双向图谱上，含有磷酸化残基的肽段在双向图谱上的位置将有变动。2.部分蛋白质分子发生酶的修饰或加工，因而部分肽链水解，引起分子量上的差异，在这种情况下，有时由于部分肽链的降解发生在分子量较大的肽段上，因此肽段的位置虽有一些变化，但可能不易觉察。我们测定了 N_1 及 N_2 的N末端，结果说明两者的末端不同，从而证明了第二种可能性。

我们在鉴定 N_1 及 N_2 蛋白的过程中，发现从WRSV核衣壳在SDS-PAGE后， N_1 蛋白及 N_2 蛋白的相对量会发生变化，新鲜的核衣壳制剂随着存放的时间的延长（4℃）， N_1 的量逐渐减少，而 N_2 的量增加；这一结果提示在核衣壳制剂中可能存在一种蛋白水解酶，能专一的水解 N_1 至 N_2 蛋白，为了证明这一可能性，我们将 ^{125}I 标记的 N_1 蛋白凝胶条带放置于新鲜制备的WRSV核衣壳制剂中处理，实验结果证明， N_1 蛋白经较长时间的WRSV核衣壳处理后，的确有 N_1 的水解产物—— N_2 产生，由于提纯的核衣壳制剂在SDS-聚丙烯酰胺电泳图谱上不能鉴定出其它的寄主杂蛋白，所以我们认为WRSV的核衣壳具有蛋白水解酶的活力，这一蛋白水解酶的活力是由已知的L、N及NS三种蛋白质携带，抑或是由其它的尚未鉴定的病毒结构的微量蛋白所具有，目前还不清楚；关于WRSV的N蛋白为何出现酶加工的现象，在病毒的复制繁殖中有何重要的生物意义尚待进一步工作；关于弹状病毒N蛋白的功能，从对VSV的研究中已有不少证据证明这是一个调控蛋白。

由于在VSV病毒中发现存在一种具有正或负链的前导RNA，同时无论正或负的前导RNA均和N蛋白相结合，引使Leppent和Kolakofsky等提出一个由N蛋白进行调控的病毒复制和转录模型^[8]。根据这模型认为病毒核酸的转录和基因的复制由同一个聚合酶来完成，无论聚合酶转录病毒负链核酸合成单基因的mRNA，或者复制病毒基因组（在VSV情况下即先合成42S全长度的互补核酸正链）完全由病毒N蛋白的浓度所控制。我们对N蛋白的研究结果提示，N蛋白的调控可能不是以浓度作为病毒核酸转录或调控的“板机”，调控的“板机”在于N蛋白的酶加工，因为蛋白质的酶加工现象无论在酶原的激活或激素的分泌中均是十分重要的，是一个广泛存在于生物界的调控手段。另外从对 ^{125}I 标记 N_1 蛋白用胰蛋白酶水解，不能产生 N_2 蛋白的结果说明 N_1 至 N_2 的转变的确不是一般的降解，而是专一的，2KD的肽链相当于十几个氨基酸，与激素的“信号肽”大小相当。为了进一步证明我们的N蛋白调控机制理论，关于植物弹状病毒是否存在有前导RNA， N_1 与 N_2 蛋白在什么情况下和病毒负链RNA以及前导RNA相结合，是两者均和负链核酸结合，还是只有一种，哪一种蛋白在

调控中起主要作用, 这些研究正在进行之中。

致谢: 承曹天钦教授对本工作的指导, 林南琴同志测定 N_1 和 N_2 末端氨基酸, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Peters D. *Descriptions of plant viruses*. (1981), No. 244, The Holywell Press Ltd. Oxford, England.
- [2] Blumberg B.M., Leppert M. and Kolakofsky D. (1981), *Cell*, 23, 837—845.
- [3] 龚祖坝, 郑巧兮 (1985), 《生物化学与生物物理学报》17(3), 248—252.
- [4] 郑巧兮, 龚祖坝 (1985), 《病毒学报》1(1), 55—59.
- [5] Chang J.Y., Brauer D. and Wittmaun-Lilbold B. (1978), *FEBS Letters*, 93(2), 205—214.
- [6] Cleveland D.W. et al. (1977), *J. of Biol. Chem.*, 252(3), 1102—1106.
- [7] 郑巧兮等 (1983), 《生物化学与生物物理学报》15(6), 562—567.
- [8] Leppert M. and Kolakofsky D. (1980), *J. Virol.*, 35, 704—709.

PROTEOLYTIC PROCESSING OF THE N-PROTEIN OF WHEAT ROSETTE STUNT VIRUS

Gong Zu-Xun Zheng Qiao-Xi

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Previous studies demonstrated that SDS-PAGE of WRSV revealed 5-viral structural proteins, L, G, N, N_s and M. The N-protein band can be separated into two bands N₁ and N₂ with molecular weights 46 K and 44 K respectively in SDS gradient polyacryamide electrophoretogram. In this study we have found that no apparent difference can be observed in the two dimensional fingerprints of purified and ¹²⁵I labelled N₁ and N₂. The experiments showed that the N-terminal amino acid residues for N₁ and N₂ are Ser and His. These results suggested that N₁ is the precursor of N₂.

The fact that ¹²⁵I labelled N₁ can be specifically digested to N₂ by the fresh WRSV nucleocapsid preparations directly indicates that the WRSV nucleocapsid may contain a proteinase activity.

The possible role of the proteolytic processing of the N-protein in the regulatory mechanism of both viral replication and transcription processes was discussed.

Key words: rhabdovirus, proteolytic processing of N-protein, proteinase activity of WRSV-nucleocapsid.