

[16] Fang, J. et al., 1992, *Cryobiology*, 29: 267—273.

[17] Redmond, D. E. et al., 1988, *Science*, 242: 768—771.

植物病毒的运动蛋白(Movement Protein)

郇永忠 王 钧

(中国科学院上海植物生理研究所 200032)

植物病毒一般通过伤口或媒体(如昆虫)进入植物细胞,然后经复制、运转到植物的各部分组织乃至整个植株。植物病毒在植物体内的运动分为两种:一种是细胞间运动(*cell-to-cell movement*),即从一个细胞到邻近细胞的运动;另一种是长距离运动(*long-distance movement*),这种运动在维管束组织中进行。植物病毒的细胞间运动研究较深入。已经知道胞间连丝是相邻植物细胞间唯一穿过细胞壁的通道,可能也是病毒细胞间运动的唯一途径。但是胞间连丝一般只能让小于1 kD的分子通过,其通透范围远小于病毒颗粒,也小于折叠的病毒核酸分子。这个问题的研究在发现了病毒有自身编码的蛋白参与细胞间运动之后,取得了很大进展。这里以烟草花叶病毒(TMV)的运动蛋白为主要例子作些介绍。

运动蛋白的存在

病毒自身编码的蛋白参与病毒细胞间运动是通过对TMV的几株温度敏感突变株的研究后发现的^[1]。其中TMV野生株L株的一种温度敏感突变株Lsl^[2]能在24℃系统感染感病烟草,而不能在33℃系统感染烟草,但仍能在这种烟草的原生质体中复制^[2,3]。L株和Lsl株TMV的蛋白在肽谱上只有一处差异^[4],后来发现这一差异发生在TMV的30 kD蛋白上^[6]。TMV RNA核酸序列推导的氨基酸序列表明仅S株30 kD蛋白上154位的Pro变成了Lsl株30 kD蛋白上的Ser。这些结果表明

30 kD蛋白与TMV运动有关。

更为直接的证据来自两方面。一方面是把TMV的RNA反转录成cDNA,在DNA水平上进行基因操作,用体外定位突变引起L株上与Lsl一样的突变,被点突变的DNA体外转录成RNA后感染感病烟草,结果定位突变的L株表型与Lsl一样,30 kD蛋白基因四种位点不同的移码突变和一种基因中间大部分缺失的突变体均使病毒不能感染植株,但能在植株的原生质体内复制。这证明TMV 30 kD蛋白与病毒运动有关,而与病毒复制无关^[6]。另一方面是利用转基因技术得到转30 kD蛋白基因的感病烟草,TMV Lsl株能在33℃时引起这种烟草系统感染^[7],这更直接证明30 kD蛋白参与TMV在细胞间的运动,因此把30 kD蛋白称为运动蛋白(*movement protein, MP*)^[1]。现已发现许多病毒也编码运动蛋白。

运动蛋白的结构和功能

1. 运动蛋白的结构特征

对TMV四个株系的30 kD蛋白以及烟草脆裂病毒(TRV)的29 kD蛋白序列比较后有五个区域,Ⅰ,Ⅱ区同源性高,Ⅲ,Ⅳ,Ⅴ区同源性低^[8]。在Ⅰ区,有一段由疏水氨基酸组成,两侧为Gly和Asp的序列,这段序列与核苷酸结合蛋白(包括一些蛋白激酶)相似。体外证明单链核酸结合区在Ⅰ区。病毒运动温度敏感突变位点和带Tm 2基因的番茄丧失对TMV L株抗性的突变均发生在Ⅱ区,认为Ⅱ

区可能是 30 kD 蛋白、29 kD 蛋白等运动蛋白与胞间连丝或别的寄主因子相互作用区。Ⅲ、Ⅴ区富含酸性氨基酸，而Ⅳ区富含碱性氨基酸。30 kD 蛋白比 29 kD 蛋白在 C 端多出一段氨基酸，把 TMV L 株的 30 kD 蛋白 264 个氨基酸去掉 C 端 31 个氨基酸的突变株 D 233 对病毒的运动没有影响^[9]。TMV OM 株 30 kD 蛋白 268 个氨基酸中 C 端 55 个氨基酸缺失既不影响病毒运动，也不影响运动蛋白在细胞壁上的积累，但去掉 C 端 73 个氨基酸(包括Ⅴ区和Ⅳ区的一半)时，就有影响^[10]。

2. 有些运动蛋白可能被磷酸化

从植物中分离到的 TMV 运动蛋白用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明其分子量明显比从核酸推导的要大，表明有翻译后修饰^[11]，有人认为 30 kD 运动蛋白被磷酸化^[1,14]。把 30 kD 蛋白基因序列置于能完成真核基因翻译后修饰的苜蓿 Y 纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)表达载体上^[13]，表达产物用抗血清检测到两条大约 34 kD 的带和一条 32 kD 的带，其中 34 kD 附近的较大带和较小带分别为磷酸化和非磷酸化形式，磷酸化形式的带与植物中表达的运动蛋白大小一样。

Mushegyan 等^[14]发现烟酸(在某些动物细胞中能降低 cAMP 量)能阻止 TMV 在叶片上的系统扩散和积累，但对烟草原生质体中 TMV 的量没有影响；加二丁酰-cAMP 能消除烟酸的这种作用，说明烟酸对病毒运动的抑制作用是通过降低细胞内的 cAMP 起作用的。cAMP 在真核细胞中作为第二信使能通过激活 cAMP 依赖的蛋白激酶使蛋白磷酸化。可以推测有一种 cAMP 依赖的蛋白激酶能特异识别 30 kD 蛋白，使 30 kD 蛋白磷酸化。前面已经提到，30 kD 蛋白的 I 区与核苷酸结合蛋白(包括一些蛋白激酶)相似的三磷酸结合区，所以 30 kD 蛋白本身也可能是一种蛋白激酶。

3. 运动蛋白可能是单链核酸结合蛋白

在大肠杆菌中表达的 30 kD 蛋白纯化后，在体外发现是单链核酸结合蛋白^[15]，有以下

特点：1) 高亲和性，大于 0.8 mol/L 的 NaCl 才能使之解离；2) 结合序列非特异性，每个运动蛋白单体与 4—7 个核苷酸结合；3) 协同性，即一旦有运动蛋白结合到单链核酸上，未结合的运动蛋白优先结合到已有运动蛋白结合的单链核酸上。片段缺失分析表明 30 kD 蛋白与单链核酸的结合区在 30 kD 蛋白第 65 个到第 86 个氨基酸，序列为 GYVCLAGLVVTGEWNL-PDNCRG，其中 LAGLV 和酵母中参与 RNA 拼接的线粒体蛋白的 N 端保守五肽 LAGLI 相似；这一段序列与具有“分子伴侣”(chaperone)活性的热休克蛋白 hSP 90 有同源性^[16]。推测 30 kD 蛋白的作用可能类似 chaperone，使可能折叠的单链核酸与之结合后形成线状结构的蛋白-核酸复合物，易于通过胞间连丝。

另外，花椰菜花叶病毒(CaMV)是植物双链 DNA 病毒，但在感染过程中有大分子 RNA-35 SRNA 及其反转录酶基因的存在。Citovsky 等发现^[17]，CaMV 基因 I 的产物(也是运动蛋白)是一个 RNA 结合蛋白，有力支持 CaMV 可能以 RNA 和运动蛋白的复合物形式转移。

4. 运动蛋白的定位及其对胞间连丝的修饰

TMV 30 kD 蛋白在细胞中的定位与所用材料有关。用抗体定位各细胞组分，发现在感病烟草中，30 kD 蛋白在粗提膜组分中暂时出现，在细胞壁组分中积累；在抗病烟草中，病斑出现之前也是如此，但在病斑出现之后，30 kD 蛋白量在细胞壁组分中很快下降^[18]。在转 30 kD 蛋白基因感病烟草中，30 kD 蛋白在细胞壁组分和可溶性组分中均有，分布及总量与叶片年龄有关^[11]。把 TMV 感染的叶片做成超薄切片后免疫金标记直接亚细胞定位^[19]观察到 30 kD 蛋白积累在胞间连丝上，24 小时后达到最大值，而且发现 30 kD 蛋白在胞间连丝的积累是在病毒大量运动之前。转 30 kD 蛋白基因植株中 30 kD 蛋白也定位于胞间连丝上^[13]。

植物正常的胞间连丝孔径比病毒小，因此

推测病毒经过胞间连丝时,胞间连丝被修饰扩大。是否运动蛋白能修饰胞间连丝呢? Wolf等^[20]把脂质体包装的荧光探针用微注射技术注入液泡,液泡膜和脂质体膜融合后荧光探针释放到细胞质中,然后观察荧光探针的胞间扩散运动。分子量9400 D的探针在对照植株中都不能扩散,而在转30 kD基因植株中93%仍能扩散,转30 kD基因植株中能扩散的分子半径提高了三倍多,所以30 kD蛋白与胞间连丝被扩大有关。

Wolf等^[21]又把一种类似TMV Lsl株30 kD蛋白的点突变运动蛋白MPP₁₆₄A基因转化感病烟草,转化植株在24℃时能使运动蛋白基因缺失的TMV恢复局部感染和系统感染,而在32℃时不行。对这种转化植株进行荧光探针微注射后检测到:在24℃时,分子量3900 D,9400 D的荧光探针均能进行胞间扩散,但在32℃6小时后,两种荧光探针都不能扩散。这说明特定构象的30 kD蛋白可以通过调节胞间连丝通透大小而影响物质运输,MPP₁₆₄A等运动蛋白温度敏感突变在32℃时由于蛋白质构象变化而不能修饰胞间连丝。

另外,把30 kD蛋白基因转化抗病烟草(基因型为NN,N基因在28℃以上失去功能)^[22],在24℃时,3900 D荧光分子能在转化植株胞间运动,而9400 D荧光探针不行。在33℃时,9400 D荧光分子也能进行胞间运动。这说明可能N基因减弱了30 kD运动蛋白修饰胞间连丝的能力。

5. 运动蛋白的表达及其对病毒运动的影响

在原生质体中,30 kD蛋白在感染2—9小时瞬间合成,然后逐渐下降,这与TMV编码的其他蛋白(126 kD/183 kD,外壳蛋白)的连续合成不同;利用温度变化控制使TMV近似同步感染的感病烟草中,30 kD蛋白的最高值是在感染21小时后,且存在时间较长^[23]。30 kD蛋白基因在原生质体和整体植株中表达的

不同可能与30 kD蛋白定位于胞间连丝上有关。总的来说,30 kD蛋白基因仅在病毒感染早期表达,并且不持久表达。

把TMV外壳蛋白亚基因启动子和前导序列置于TMV 30 kD蛋白基因的读码区前,30 kD蛋白的合成被推迟约2小时,结果病毒胞间运动被减弱,感病6—12天才达到野生型TMV感染的程度。所以30 kD蛋白作为运动蛋白,它的较早期表达对病毒在胞间运动很重要。另外,30 kD蛋白的合成量不少于野生型合成量的十分之一时,不影响病毒运动,说明在病毒运动中30 kD蛋白的需求量并不高,不需要持久的表达。有趣的是,转30 kD蛋白基因的抗病烟草(基因型NN)并不出现超敏反应,当运动蛋白缺失的TMV突变株感染这种转化烟草时,出现超敏反应,且超敏反应的程度(病斑大小)与转化植株的运动蛋白浓度有关,浓度越高,病斑越大。

运动蛋白参与病毒胞间运动的分子机制

根据TMV运动蛋白的特性和作用及病毒转移形态等现象,有人着眼于病毒如何通过胞间连丝提出了一种“牵引模型”^[15,26,27]。认为植物细胞可以让病毒复制但不能使病毒从一个细胞转移到邻近细胞,而病毒运动蛋白可以通过修饰胞间连丝而使病毒扩散:1)病毒进入植物细胞后复制,产生运动蛋白,运动蛋白与病毒RNA结合,形成无折叠的转移复合体;2)运动蛋白引导复合体到胞间连丝处;3)运动蛋白诱导胞间连丝孔径增大,这是一步需能反应;4)复合体通过胞间连丝或者解离的核酸通过胞间连丝,而运动蛋白留在胞间连丝上。

从目前对运动蛋白特性的研究状况看,牵引模型的证据较多。不足的是,牵引模型未对各种不同形态的病毒胞间运动机制的共性和差异进行说明,忽视了寄主因子在病毒运动中的

作用,对运动蛋白如何与相关的寄主因子相互作用而影响病毒运动还不清楚,有待于进一步研究和完善。

摘 要

植物病毒的运动蛋白是由病毒编码的一种蛋白,在病毒的细胞间运动中起重要作用。现在,发现的运动蛋白越来越多,对其一级结构、在植物体内的表达、定位和功能日益清楚。但运动蛋白在体内的修饰及其与运动蛋白功能的关系的研究还刚开始,对与运动蛋白作用的寄主因子了解很少。植物运动蛋白的研究对植物病毒细胞间运动和植物体内特有的胞间连丝的研究提供了很好的突破口。

参 考 文 献

- [1] Hull, R., 1989, *Annu. Rev. Phytopathol.*, pp. 213—240.
 [2] Nishiguchi, M. et al., 1978, *J. Gen. Virol.* 39: 53—61.
 [3] Nishiguchi, M. et al., 1980, *J. Gen. Virol.*, 46: 497—500.
 [4] Atabekov, J. G. and Morozov, S. Y., 1979, *Adv. Virus Res.*, 25: 1—91.
 [5] Leonard, D. A. and Zaitlin, M., 1982, *Virology*, 117: 416—424.
 [6] Meshi, T. et al., 1987, *EMBO J.*, 6: 2557—2563.
 [7] Doem, C. M. et al., 1987, *Science*, 237: 389—394.
 [8] Saito, T. et al., 1988, *Virology*, 167: 653—656.

- [9] Okada, Y. et al., 1990, *Viral Genes and Pathogenesis*, pp. 23—38.
 [10] Berna, A. et al., 1991, *Virology*, 182: 682—689.
 [11] Doem, C. M. et al., 1987, *Prac. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3284—3288.
 [12] Zaitlin, M. and Hull, R., 1987, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38: 291—315.
 [13] Atkins, D. et al., 1991, *J. Gen. Virol.*, 72(1): 209—211.
 [14] Mushegyan, A. R. et al., 1986, *Mol. Biol.*, 20: 1371—1376.
 [15] Citovsky, V. et al., 1990, *Cell*, 60: 637—647.
 [16] Koonin, E. V. et al., 1991, *J. Gen. Virol.*, 72: 2895—2903.
 [17] Citovsky, V. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 2476—2480.
 [18] Moser, O. et al., 1988, *J. Gen. Virol.*, 69: 1367—1373.
 [19] Tomenius, K. et al., 1987, *Virology*, 160: 363—604.
 [20] Wolf, S. et al., 1989, *Science*, 240: 377—379.
 [21] Wolf, S. et al., 1991, *The Plant Cell*, 3: 593—604.
 [22] Doem, C. M. et al., 1991, *Virology*, 180: 251—256.
 [23] Lehto, K. et al., 1990, *Virology*, 174: 290—293.
 [24] Lehto, K. et al., 1990, *Virology*, 174: 145—157.
 [25] Dawson, W. O., 1990, *Viral Genes and Plant Pathogenesis*, pp. 39—52.
 [26] Atabekov, J. G. and Dorokhov, Yu. L., 1984, *Adv. Virus Res.*, 33: 313—363.
 [27] Atabekov, J. G. and Taliensky, M. E., 1990, *Adv. Virus Res.*, 38: 201—248.

欢迎订阅 《细胞生物学新动态》

《细胞生物学新动态》着重介绍90年代以来,国际上细胞生物学的最新发展趋势及目前引起很大注意的前沿问题的最新动态,特别是从基因和分子水平研究细胞生命活动所取得的成果。其内容选材新颖,是国内首次较系统地报道细胞生物学新进展的一本好书。本书撰稿人都是有关问题的专家,掌握了最新的国际文献资料和本人的成果,引用《自然》、《科学》、《Cell》等权威杂志90年代至今的最新文献。本书由上海科学技术出版社出版,面向全国征订发行,16开本,定价11.50元,欲购者请将款汇至中国科学院上海文献情报中心财务室。开户银行上海工行徐办淮分理处。帐号221-08900920(请不要邮汇)。地址:上海岳阳路319号中国科学院上海文献情报中心内(邮编200031)

《细胞生物学新动态》编辑委员会

1994年2月4日