

# 轮状病毒 NSP1 和 VP3 先天免疫拮抗作用研究进展

赵天宇,杜江龙,常凡凡,万雪梅,蔡葵蒸\*

西北民族大学生命科学与工程学院,兰州 730030

**摘要:**轮状病毒是引起儿童胃肠炎的重要原因,也是呼肠孤病毒科分节双链 RNA 病毒家族的一员,编码至少两种宿主天然免疫的直接拮抗剂:NSP1 和 VP3。NSP1 是一种推测的 E3 泛素连接酶,它介导参与 IFN 诱导和下游信号转导的细胞因子的降解。VP3 是病毒的盖帽酶,它利用一个 2H-磷酸二酯酶结构域来阻止细胞内寡腺苷酸合成酶/核糖核酸酶 L 通路的激活。通过计算、分子和生化研究揭示了 NSP1 和 VP3 的天然免疫拮抗作用提供了重要的结构和机制基础。

**关键词:**轮状病毒;NSP1;VP3;免疫拮抗作用

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0186-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.031

## Innate immune antagonism of rotavirus NSP1 and VP3

ZHAO Tian-yu, DU Jiang-long, CHANG Fan-fan, WAN Xue-mei, CAI Kui-zheng\*

Northwest University For Nationalities In Gansu Province 730030, China

**Abstract:** Rotavirus is an important cause of gastroenteritis in children and a member of the segmented double-stranded RNA virus family of reovirus family, encoding at least two direct antagonists of host innate immunity: NSP1 and VP3. NSP1 is a putative E3 ubiquitin ligase, which mediates the degradation of cytokines involved in IFN induction and downstream signal transduction. VP3 is a capping enzyme of the virus. It uses a 2H-phosphodiesterase domain to prevent the activation of intracellular oligoadenylate synthase/ribonuclease L pathway. Computational, molecular and biochemical studies have revealed that the innate immune antagonism of NSP1 and VP3 provides an important structural and mechanism basis.

**Key words:** rotavirus; NSP1; VP3; immune antagonism

先天免疫反应是病原体突破物理屏障进入宿主后的第一道防线<sup>[1]</sup>。被称为模式识别受 (PRRs) 的细胞病原体传感器-包括 Toll 样受体 (TLRs)、视黄酸诱导基因 1 (RIG-I) 样受体和核苷酸脱脂组织结构域 (NOD) 样受体-检测保守的微生物抗原或病原体相关分子模式 (PAMPs)。激活上调促炎细胞因子(如干扰素)表达的转录因子。在病毒感染时, ALL 细胞可产生 I 型(干扰素- $\alpha/\beta$ ) 和 III 型(干扰素- $\lambda$ ) IFN-IFN。通过 Janus 激酶 (JAK)-信号转导和转录激活因子 (STAT) 途径以自分泌和旁分泌的方式上调数百个 IFN 刺激的基因 (ISG) 的表达并诱导抗病毒状态<sup>[3]</sup>。ISGS 可以在病毒生命周期的所有

阶段限制发病:进入和解包被、转录和翻译、组装和退出<sup>[2]</sup>。病毒已经进化出了一系列策略来逃避 PRR 的检测,并直接对抗宿主的先天免疫反应,这有助于它们的持续成功。

### 1 轮状病毒生物学

轮状病毒 (RV) 是呼肠孤病毒科的一种双链 RNA (DsRNA) 病毒,是导致儿童胃肠炎的重要原因,每年造成 45 万人死亡<sup>[4]</sup>。这种无包膜、三层结构的 RV 病毒粒子包括 11 段基因组,编码 6 种结构蛋白 (VP1-VP4、VP6、VP7) 和 6 种非结构蛋白 (NSP1-NSP6)<sup>[5]</sup>。RV 主要在小肠上皮绒毛顶端的成熟肠细胞中复制。在附着和内吞之后, RV 脱落其外层(附着蛋白 VP4 和糖蛋白 VP7),并释放一个转录活性的双层颗粒 (DLP) 到细胞质中。病毒盖帽酶 VP3 在病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) VP1 转录时,将 mRNAs 修饰为 50 帽,并从 DLP 中挤出。通过 VP3 盖帽是不完全有效的,这导致了未

收稿日期:2019-05-13 接受日期:2019-05-28

基金项目:西北民族大学中央高校基本科研业务费专项(31920180030);西北民族大学研究生科研(实践)创新项目(Yxm2018136);国家自然科学基金(81760287,31700763)

\* 通信作者 Tel:86-013893223143; E-mail:ckz000@126.com

覆盖和部分覆盖的病毒转录本的种群,这些转录本通过 RNA 感应的 PRRs RIG-I 和黑色素瘤分化相关蛋白 5(MDA5)激活宿主的先天免疫反应<sup>[6]</sup>。基因组复制和病毒粒子组装是在细胞质包涵体或病毒质内协调进行的,这可能有助于隐藏 dsRNA 基因片段,使其不被宿主 PRR 机制检测到<sup>[7]</sup>。新合成的 DLPs 通过内质网出芽获得其外层的 VP4/VP7 层,随后子代病毒粒子通过裂解或胞吐离开细胞<sup>[5]</sup>。在整个复制周期中,RV 必须与宿主的免疫反应相抗衡。

## 2 RVA NSP1 的结构与功能

RV 基因片段 5 的产物是非结构蛋白 NSP1<sup>[5]</sup>。在人类大多数轮状病毒感染的病毒种类 A(RVA)中,NSP1 是一种 57 kDa 的蛋白,其长度从 486 到 496 个氨基酸不等。NSP1 是 RVA 蛋白质组中最不保守的成员,在 C-末端的一半中序列变异性最高<sup>[8]</sup>。NSP1 序列根据宿主种类聚在一起,这表明 NSP1 可能在宿主范围限制中发挥作用,这一点已在鼠类中得到证实,但在其他动物模型中未得到证实。完整的 NSP1 蛋白对于 RV 在允许细胞培养中的增殖是不可少的,许多实验室菌株包含一个重新排列的基因 5,该基因编码一个 C 末端截短的 NSP1。这些菌株可以通过亲本(野生型基因 5)在高度感染的情况下传代而产生。

尽管 NSP1 蛋白之间的序列差异很大,但系统发育和生化分析已经确定了关键的结构和功能区域。NSP1 含有一个保守的锌结合的、推定的 C4-H-C3 环结构域(公认序列: CX2-C-X8-C-X2-C-X3-H-X-C-X2-C-X5-C),在大多数序列中跨越 42-72 个残基<sup>[9]</sup>。猿猴的 SA11-4F NSP1 的前 81 个残基,包括环结构域,介导了与病毒 mRNAs 的 50 个末端的特定相互作用,这可能阻止了细胞 RNA 传感器的激活。SA11-4F NSP1 在感染过程中定位于细胞质,并通过一个跨越 84-176 个残基的区域与细胞骨架相关联;该序列的缺失导致了 NSP1 的核移位。通过其可变的 C 末端,NSP1 与许多宿主蛋白相互作用,以依赖于蛋白酶体的方式典型地诱导它们的降解,而 N 端环结构域的保守有力地表明 NSP1 作为 E3 泛素连接酶发挥作用<sup>[10]</sup>。该环结构域被预测与一种 E2 泛素结合酶相互作用,导致在 NSP1 C 末端结合的目标蛋白发生多泛素化。然而,纯化用于泛素化分析的重组 NSP1 的困难阻碍了这一活性的确认。

## 3 非 RVA NSP1 的结构与功能

根据编码中间衣壳蛋白 VP6 的基因片段序列,RV 被分为 8 种(RVA ~ RVH)<sup>[11]</sup>。所有 RV 物种都感染动物,但目前已知只有 RVA ~ RVC 和 RVH 感染人类<sup>[12]</sup>。并且在人类中,RVH 仅在成人中发现,而 RVA ~ RVC 在成人和儿童中均有发现。RVD、RVF 和 RVG 完全是从鸟类物种中分离出来的<sup>[13]</sup>。

与 RVA NSP1 一样蛋白共有一个 N 端推测的环状结构域(共有序列: C-X2-C-X8-C-X2-C-X3-H-X-C-X2-CX4-7-C);唯一的差别是最后一对半胱氨酸残基之间的间隔区(4 ~ 7 个氨基酸)。然而,除了 RVA NSP1 之外,还不知道这些蛋白是否介导细胞因子的降解。RVD NSP1(574 个残基)与鸟类 RVA NSP1 同源性最高;鸟类和哺乳动物 RVA NSP1 之间的低序列同源性可能表明过去 RVD 和鸟类 RVA NSP1 之间的重新组合事件<sup>[13]</sup>。RVD 和禽类 RVA NSP1 保留了转录起始因子 IIE $\alpha$  亚基(TFA-1)超家族的一个结构域(19% ~ 35% 的氨基酸同源性),它跨越 RVD NSP1 中的 341-416 个残基。RVF NSP1(547 个残基)与 RVD 和禽类 RVA NSP1 的 N-末端一半具有部分序列同源性。

编码类似 RVB 的 NSP1 的基因包含两个重叠的开放阅读框架;这与编码非结构蛋白 NSP5 和 NSP6 的 RVA 基因片段 11 相似<sup>[5]</sup>。在体外检测系统中,RVB ORF2 产物比 ORF1 产物更稳定地被检测到,并被 RVB 感染大鼠的免疫血清识别,表明 ORF2 蛋白是在感染过程中产生的<sup>[14]</sup>。RVB NSP1 序列根据寄主种类聚在一起,这表明 NSP1 在 RVB 宿主范围限制中的作用。ORF1 编码的蛋白质(RVB,101 ~ 107 个残基;RVG,104 ~ 106 个残基)不包含任何明显的结构特征,但含有一个疏水/非极性序列(残基 39 ~ 61),可能是一个 TM 结构域;在 RVB NSP1 中,该区域也与一个短的富含 Cys 的序列(残基 57 ~ 66)重叠<sup>[15]</sup>。ORF2 蛋白(RVB,320 ~ 321 个残基;RVG,310 ~ 324 个残基)在 N 端(RVB,64 ~ 76 个残基;RVG,63 ~ 78 个残基)附近含有一个短的富含 Cys/His 的序列。一些 RVB 分离株含有一个假定的 ORF3,但是这个 ORF 在长度上有很大差异(65 ~ 146 个残基),并且缺乏任何明显的特征。

RVH NSP1(395 个残基)与 RVB NSP1 的 ORF2 关系最密切,包含一个 C 末端的 dsRNA 结合基序(DSRM;残基 327 ~ 395),该基序紧随微微神经病毒 2A 样序列<sup>[16]</sup>。2A-like 序列终止于一个 NPGP 基

序,它诱导甘氨酸和第二个脯氨酸残基之间的核糖体跳跃,产生两个多肽。RVC的NSP3蛋白还含有一个C末端的DSRM,前面有一个2A类似的序列;RVC NSP3被“切割”成两个多肽,DSRM通过与dsRNA的结合阻止ISG蛋白激酶R(PKR)的激活<sup>[17]</sup>。推测RVC NSP1的DSRM的功能是相同的,因为在N-末端没有明显的Cys/His序列可能作为一个环结构域发挥作用。

#### 4 RVA VP3的结构与功能

RV基因片段3的产物是结构蛋白VP3<sup>[5]</sup>。RVA VP3是一种含有835个氨基酸残基,分子量为98 kDa的蛋白,在低拷贝数下被包装成病毒粒子。利用重组遗传学,VP3与小鼠和仔猪感染模型中的物种特异性毒力特性相关联,这表明在宿主范围限制方面可能发挥作用。用纯化的RV亚病毒颗粒进行的研究表明,VP3具有与RNA盖帽酶相一致的生化特性。首先,VP3结合单链RNA(SsRNA),偏好被覆盖的物种<sup>[18]</sup>。其次,VP3与GMP以共价可逆的方式结合,并能将这一部分转移到焦磷酸盐或GDP,这与鸟苷酸转移酶(GT)的活性是一致的。最后,RV亚病毒颗粒在S-腺苷蛋氨酸(SAM)存在下能在体外产生甲基化的CAPS;在这些颗粒中,VP3可以与SAM发生化学交联,这与SAM依赖的甲基转移酶(MT)的活性是一致的<sup>[18]</sup>。尽管RV的盖帽和甲基化效率不高,但VP3的修饰可能有助于阻止细胞天然免疫分子检测RV mRNAs,包括识别50-三磷酸RNA的RIG-I和识别并抑制缺乏20-O-甲基化的mRNAs翻译的干扰素诱导的带有四肽重复序列1(Ifit1)的蛋白。除了它的盖帽活性外,RVA VP3还能切割20,50-寡腺苷酸(2-5as),这是由细胞质dsRNA传感器寡腺苷酸合成酶(Oas)产生的信号分子,它激活潜在的核糖核酸酶(RNase L)来切割单链病毒和细胞RNA。RNaseL产生的RNA片段通过激活RLRs扩增IFN的产生和诱导细胞凋亡来消除感染细胞,从而减少病毒的复制。因此,多功能的RVA VP3蛋白可能通过间接机制(病毒mRNACapping)和直接机制(2-5A裂解)促进天然免疫逃逸和毒力。

由于缺乏VP3的结构信息,纯化重组蛋白的困难,以及缺乏RV反向遗传系统,对这些活动的分子基础的了解一直受到限制。有报道VP3结构同源物的同源性:呼肠孤病毒科成员蓝舌病病毒(BTV VP4;VP3残基39~634)、痘苗病毒(VACV VP39;

VP3残基257~333)和2H磷酸酯酶超家族的成员,包括细胞A激酶锚定蛋白7(AKAP7;VP3残基697~800)的盖帽酶(BTV VP4;VP3残基39~634),以及2H磷酸酯酶超家族的成员,包括细胞A激酶锚定蛋白7(AKAP7;VP3残基697~800)<sup>[19]</sup>。RVA VP3预计包含五个结构不同的结构域:功能未知的N-末端结构域(NTD);插入20-OMT的鸟嘌呤-N7-MT;结合的RNA 50-三磷酸酶(RTP)/GT;和C末端20,50-磷酸二酯酶(PDE)<sup>[19]</sup>。

#### 5 非RVA VP3的结构与功能

有研究比较表明,VP3的结构域与其他RV物种不同<sup>[20]</sup>。RVB和RVG VP3序列在预测的N7-MT结构域中插入的片段比其他物种的预测的20-O-MT结构域短。因此,预测除RVB和RVG外的所有物种的VP3中心区域都与VACV VP39具有高度的同源性。与RVA VP3一样,RVB和RVG VP3包含一个CTD,它延伸到预测的帽状区之外,可能作为一个20,50-PDE发挥作用,这是基于预测的与AKAP7的同源性-尽管没有RVA VP3的那么自信-以及HΦ(S/T)Φ基序的明显保守性。然而,RVGV3的第二个HΦ(S/T)Φ基序的多态性可能排除了催化活性。虽然预测的VP3的20-O-MTase和20,50-PDE结构域的差异可能导致逃避IFIT和oas/rnase L通路的抗病毒作用的能力不同,但宿主物种或病理生物学上的差异可能使这些效应在病毒适合度方面对不同的RV物种或多或少重要。

#### 6 结论

NSP1和VP3的结构和机制允许这些蛋白直接对抗宿主的先天免疫应答。NSP1是一种推测的E3泛素连接酶,可介导多种细胞目标的降解,包括作为先天免疫传感器(RIG-I)、信号中间产物(TRAF2、MAVS和β-TrCP)、转录因子(IRF)以及宿主存活通路的介质(PI3K和p53)。在许多方面,VP3是由RV DLPs产生的病毒转录本的两个蛋白,这可能阻止宿主RNA传感器的激活,并且它通过切割信号分子2-5A直接拮抗dsRNA反应的OA/RNase L通路。在感染过程中,VP3也可能在细胞的两个不同区域发挥作用:在病毒颗粒内作为盖帽酶,也可能在细胞质内作为一种直接天然免疫拮抗剂。NSP1和VP3的不同功能突出了细胞对RNA病毒的天然免疫防御的多样性和重要性,可能反映了病毒基因组必需的紧凑性。

## 参考文献

- 1 Pandey S, et al. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors [J]. *Csh Perspect Biol*, 2015, 7(1): a016246.
  - 2 Chan YK, et al. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14: 360.
  - 3 James SJ, et al. MAPK phosphatase 5 expression induced by influenza and other RNA virus infection negatively regulates IRF3 activation and type I interferon response [J]. *Cell Rep*, 2015, 10: 1722-1734.
  - 4 Enane LA, et al. Impact of rotavirus vaccination on hospitalizations and deaths from childhood gastroenteritis in Botswana [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62: 168-174.
  - 5 Bányai K, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 48: 19-26.
  - 6 Sen A, et al. Rotavirus NSP1 protein inhibits interferon-mediated STAT1 activation [J]. *J Virol*, 2014, 88(1): 41-53.
  - 7 Criglar JM, et al. A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly [J]. *J Virol*, 2014, 88: 786-798.
  - 8 Rainsford EW, et al. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11 [J]. *Virus Res*, 2007, 130: 193-201.
  - 9 Mitzel DN, et al. Translational regulation of rotavirus gene expression [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84: 383-391.
  - 10 Arnold MM, et al. Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain [J]. *J Virol*, 2013, 87: 9813-9821.
  - 11 Bányai K, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 48: 19-26.
  - 12 Bailey KE, et al. Equine rotaviruses—current understanding and continuing challenges [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 167: 135-144.
  - 13 Bezerra DAM, et al. Detection, epidemiology and characterization of VP6 and VP7 genes of group D rotavirus in broiler chickens [J]. *Avian Pathol*, 2014, 43: 238-243.
  - 14 Reimer T, et al. Stimulation-specific contribution of p38 and JNK to IFN- $\beta$  gene expression in human macrophages [J]. *J Interf Cytok Res*, 2007, 27: 751-756.
  - 15 Yamamoto D, et al. Analysis of genetic diversity and molecular evolution of human group B rotaviruses based on whole genome segments [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91: 1772-1781.
  - 16 Kindler E, et al. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G [J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 14: 58-67.
  - 17 Langland JO, et al. Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N- and C-terminal domains of E3L [J]. *Virology*, 2004, 324: 419-429.
  - 18 Chen D, et al. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase [J]. *Virology*, 1999, 265: 120-130.
  - 19 Ogden KM, et al. Structural basis for 2'-5'-oligoadenylate binding and enzyme activity of a viral RNase L antagonist [J]. *J Virol*, 2015, 89: 6633-6645.
- ~~~~~
- (上接第 90 页)
- 2 Liu YM. Pharmacography of Uighur: Part one (维吾尔药志: 上册) [M]. Urumqi: Xinjiang Science Technology (Hygiene Publishing House), 1999: 119-121.
  - 3 Liu RN, Wang W, Xie WD, et al. *Nymphaea candida* flavonoids: Antioxidation and ischemic injury effect on neurons [J]. *World Sci Tec-Mod Trad Chin Med* (世界科学技术-中医药现代化), 2006, 8: 33-36.
  - 4 Zhao J, Xu F, Ji TF, et al. Advances in the study on chemical constituents and biological activities in *Nymphaea* genus [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 142-147.
  - 5 Zhang SL, You SP, Liu T, et al. Preventive effects of total flavonoids from *Nymphaea candida* on CCl<sub>4</sub> induced acute liver injury in mice [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 2017-2020.
  - 6 Wang X, Yang QL, Zhao J, et al. Hepatoprotective effects of extract from *Nymphaea candida* Presl on experimental liver injury in mice [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2015, 38: 139-143.
  - 7 Li Q, Li CY, Zhan YJ, et al. Inhibitory action of extracts from water lily flower on tyrosinase activity and its kinetics [J]. *China Surf Det Cosmetics* (日用化学工业), 2017, 4: 219-222.
  - 8 Zhao J, Xu F, Ji TF, et al. Studies on phenolic compounds from buds of *Nymphaea candida* Presl [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 916-918.
  - 9 Maierdan T, Li CF, Liu T, et al. Preventive effect of isotriectin from *Nymphaea candida* on acute liver injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice and its antioxidant activities *in vitro* [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2018, 41: 321-325.
  - 10 Wang ZG, Lu XW, Cu P. Adsorption and purification of toosendanin by macroporous resin [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 1080-1083.