

乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶蛋白中 RNase H 研究进展

陈国凤, 成军, 李莉, 王琳, 张玲霞

陈国凤, 成军, 李莉, 王琳, 张玲霞, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九五”科技攻关项目 No.98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No.01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No.01MB135.

项目负责人: 成军, 10039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

陈国凤, 成军, 李莉, 王琳, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶蛋白中 RNase H 研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(4):925-927

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/925.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝 DNA 病毒的一种, HBV DNA 的长度为 3.2 kb, 具有 4 个开放读码框架(ORF), 分别编码 HBV 的表面抗原蛋白、核心/e 抗原蛋白, X 蛋白以及 HBV DNA 聚合酶(HBV DNA P)^[1]. HBV DNA P 基因在 ORF 中最长, 并且与 C、S、X 基因区有重叠, 其编码的 P 蛋白含有 3 个功能域和 1 个无意义的隔离片(spacer), 目前对聚合酶及其所编码的各个功能区域蛋白质的功能的认识虽然还不是很清楚, 但已经取得了一定的进展.

1 HBV DNA P RNase H 结构和功能

嗜肝病毒逆转录酶(聚合酶)含有的 4 个结构域, 排列顺序为 N-末端蛋白(TP), 隔离片(spacer, SP), 逆转录酶(RT)/DNA 多聚酶和 RNase H. 各区段分别在 2 307-2 840 nt、2 841-0-132 nt、133-1 128 nt、1 129-1 621 nt^[2]. TP 和 SP 对嗜肝病毒聚合酶是独特的, TP 内的第 96 位酪氨酸残基可引导 DNA 合成, 并使聚合酶与病毒 DNA 共价结合, SP 无已知的功能, 只是将末端蛋白和其他分子连接起来, 逆转录酶(RT)和 RNase H 包含两个已知的酶活性位点, 后二者与其他相关的逆转录病毒和逆转录因子的聚合酶是一致的^[3-14]. Kim et al 对人 HBV 聚合酶的 N-末端或 C-末端和结构域同时删除形成变异株, 并将变异株和野毒株一起在大肠杆菌中表达, 经直链淀粉柱层析法纯化后, 二者纯化蛋白的 DNA 依赖性的 DNA 聚合酶活性进行比较, 证明 TP 或隔离片删除分别可以使酶活性减少到 70%, 而 RNase H 删除对聚合酶活性的影响要大于前二者, 单个 DNA 聚合酶或 DNA 聚合酶 N-末端删除仍能保持酶活性, 说明就 HBV 多聚酶的聚合活性而言, 小的结构域的聚合活性要小于聚合酶结构域的活性^[15]. Lin et al 研究两个自然发生的 HBV

颗粒(isolate) 56 和 2-18, 核酸序列有 98.7% 的同源性, 但是复制效率不同. 转染到 HepG2 细胞后, 从 56 转染细胞的细胞内病毒核心颗粒分离出的 HBV DNA 明显高于 2-18. 用功能域基因替代法研究二者复制效率差异的结构基础. 将 2-18 中的完整 P 基因和 TP、SP、RT 和 RNase H 分别用 56 相应区域替代形成长嵌合基因组. 细胞转染分析提示, 2-18 的全部 P 基因组用 56 的 P 基因替代使病毒复制轻度增强. 惟一获得像 56 颗粒体的高复制效率的嵌合基因组是用 56 的 RT 替代 2-18 的 RT 的基因组. 在 RT 区域内, 2-18 与 56 的氨基酸差异在 617 位(蛋氨酸对亮氨酸), 652 位(丝氨酸对脯氨酸), 682 位(缬氨酸对亮氨酸). 652 位氨基酸上的点突变是这种复制效率差异的原因. HBV RT 结构域的同源性模型研究提示 652 位氨基酸残基从脯氨酸到丝氨酸突变可能影响对模板-引物相互作用的 HBV RT 的构造, 导致多聚酶活性减弱^[16]. Kim et al 将人的 HBV 聚合酶在兔网状细胞裂解系统中表达. 表达蛋白显示出 DNA 依赖性的 DNA 聚合酶活性, 在体外转录和翻译产生分子量大约 100 kD 的大蛋白. HBV DNA 聚合酶可以被阿菲迪霉素(抗病毒抗生素)和 NEM 抑制, 在 pH7.5 和温度 37 °C 时聚合反应最佳, 同时, 聚合酶活性需要有 MgCl_2 或 $\text{MgCl}_2(\text{MnCl}_2$ 更佳). 在 75 mM NaCl 或 100 mM KCl 存在时活性较好(75 mM NaCl 更佳)^[17]. 目前, 兔网织红细胞裂解液(RRL)是惟一能在体外试验条件下产生由病毒逆转录酶(P 蛋白), pgRNA 的 RNA 茎环结构(ϵ)和细胞蛋白共同组成的核蛋白复合物, 进行 DHBV P 蛋白的翻译的体系. 这一系统也能提供必要的因子. 然而, 他有限的翻译能力限制了对蛋白复合物的深入研究. 为克服这种限制, Beck et al 先在大肠杆菌内表达产生大量的 DHBV P 蛋白, 然后再在 RRL 中的进行核蛋白复合物的重构. 因为以往在细菌中产生全长 P 蛋白的尝试没有成功, 于是单独在大肠杆菌中表达 TP 和逆转录酶-RNase H(RT-RH). 结果 TP 和 C 末端经微小修改后的 RT-RH, 也能有相当量的表达, 当加入到 RRL 时, 能进行 ϵ -依赖性 DNA 引物合成, 证明翻译后的活化^[18]. Lott et al 用昆虫细胞同时感染独立表达核心蛋白和多聚酶的杆状病毒. 结果发现核心蛋白与多聚酶相互作用的特征之一是核心蛋白与表达全长的多聚酶及多聚酶的 TP、RT、RNase H 每个区域共同沉淀. 其中构建了迷你 RNase H (FRNH)质粒, 氨基酸范围在 680-780 aa, 含有一个 FLAG 抗原决定基. 用抗-FLAG 抗体与 FRNH 免疫沉淀, Western blot 分析抗-FLAG 和抗核心抗体, 证明核心蛋白与迷你 RNase H 多肽共沉淀^[19].

2 RNase H 与细胞因子

嗜肝病毒逆转录酶与前基因组 RNA 模板上的 RNA 信号 ϵ 特异结合, 并且靠 RT 自身引导(蛋白引导). 蛋白引导不仅需要病毒逆转录酶和 ϵ RNA 模板, 也需要特异的宿主细胞因子(细胞蛋白), 包括热休克蛋白

HSP90, 多种共陪伴(cochaperone)蛋白, 还有一些不清楚的成分共同组成的核蛋白复合物. 有功能的复合物催化合成短链DNA引物, 该引物又作为 ϵ 与TP共价结合的模板. Cho et al 认为HSP90及其相关产物在DHBV感染通过RNA信号 ϵ 与DHBV聚合酶结合对DHBV复制起重要作用. 同理, 用兔网状细胞裂解液中合成人HBV聚合酶蛋白在体外与HSP90形成联合体, HSP90用MBP共纯化, 聚合酶蛋白在HepG2细胞中表达, 提示在体内人的HBV聚合酶与HSP90相关. 为了对HSP90的作用位点进行定位, HBV聚合酶翻译的几个删除突变与抗HSP90抗体在体外共沉淀, 结果提示TP的C-末端和RT单独与HSP90发生作用^[20]. HBV聚合酶单独与HSP90的N-末端和C-末端相互作用, HSP90的N-末端片段(1-302 aa)与HBV聚合酶的TP和RP都有相互作用, 而C-末端片段(438-723 aa)仅与RT相互作用, 其中间片段(327-438 aa)则与HBV聚合酶无相互作用^[21]. Hu et al 构建两个迷你RT(miniRT)表达片段, pcDNA-miniRT1(miniRT1)将改建后的DHBV RT多肽的N-末端(1-17 aa), C-末端(734-786 aa), 隔离片(245-352 aa)切除, 含564 aa(野毒株786 aa), pcDNA-miniRT2(miniRT2)在miniRT1基础上将C-末端进一步截短(575-786 aa), 含394 aa. MiniRT1与野毒株RT一样具有蛋白引导功能, MiniRT2具有完整的 ϵ 结合的活性, 但是仅有极少的蛋白引导活性(为野毒株的1-5%). 这两个mini-RT蛋白含有与HSP90和p23相关的结合域. 结果(1)HSP90能识别TP和RT域上的两个特异区域, 含有两个陪伴结合区域的mini-RT蛋白保留了全部的 ϵ 结合活性, RT和RNase H区域外的序列在蛋白引导时起作用, 很可能在催化DNA合成时需要. (2)在体外用高浓度的盐和非离子洗涤剂使RT和细胞因子(HSP90)解离, 单独表达RT, 纯化的RT失去了 ϵ 结合和蛋白引导的功能. 但含有HSP90和ATP的网状细胞裂解液能恢复这种功能. HSP90对RT与RNA的结合, 不仅起到建立的功能, 而且还有维护的功能. (3)在RT合成过程中不需要HSP90, 但HSP90可激活转译后的RT^[22]. DHBV RT需要宿主细胞因子的辅助进行RT与 ϵ 的特异结合和蛋白引导功能. RT与 ϵ 交互作用和蛋白引导需要HSP90. HSP90的几个辅因子在体外足以保持重组DHBV RT的 ϵ 结合和蛋白引导活性, 重组RT活性需要HSP90、HSP70、HSP40、Hop/p60四种蛋白, 蛋白p23可进一步提高重组RT的动力学. RT被陪伴蛋白激活是一个动力学过程, 需要ATP水解和HSP90 ATP酶活性. HSP90和HSP70是ATP酶, 在ATP结合和水解时易于折叠, HSP40能刺激HSP70的ATP酶活性和调节HSP70的伴护功能. p60能与HSP90和HSP70结合, p23, 小的, 酸性磷蛋白质, 与HSP90结合, 进一步提高重组动力学. 说明对RT活化来说, 宿主因子的最小补充是必要的和充分的. 两个截短的迷你型DHBV RT与谷胱甘肽S-转移酶(GST)形成融合蛋白GST-

miniRT1和GST-miniRT2, 在大肠杆菌中表达并纯化, 另外还构建了有两个氨基酸替换而不能与 ϵ RNA结合的突变型MiniRT2/CA29和在RT的活性位点两个氨基酸替换(YMDD变成YMHA), 使RT失去活性的MiniRT1/YMHA. 在重构蛋白引导反应中, 显示在兔网状细胞裂解液中, 依靠HSP90的存在, GST-miniRT1在体外有强烈的蛋白引导活性. 用已知的HSP90陪伴联合体的组成成分代替兔的网状细胞裂解液, 刺激蛋白引导, 结果HSP90、HSP70、Hop、Ydj1(HSP40), 在一起能重新组成蛋白引导反应, 单独或任何两个或三个蛋白组合是无效的, 偶尔HSP70加Ydj1能微弱刺激蛋白引导反应, 但比四种相加效力小得多. 同时, 这种蛋白引导反应与陪伴蛋白浓度呈正相关. 四种纯化的陪伴蛋白重新组成的蛋白引导活性较网状细胞裂解液要低, 可能是二者动力学差异所致. 适当延长作用时间, 可以使陪伴蛋白的引导活性提高. p23可以提高蛋白引导的重新组成. 与RT的催化活性有关, 失去了活性位点的突变RT完全没有蛋白引导的作用^[23]. Park et al 研究证明HSP90可以被抗-HSP90抗体抑制; 在体外HSP90被含有1%NP-40的1 M氯化钠解吸后几乎完全失去了对在昆虫细胞内表达的HBV聚合酶的引导活性. 人HBV聚合酶与前基因组RNA结合与鸭HBV聚合酶不同, HSP90不仅维持人HBV聚合酶与前基因组RNA结合的联合体, 而且使HBV聚合酶能胜任在体外引导作用. HSP70是HSP90联合体组成成分, 但HSP70可能直接与HBV聚合酶结合不需要HSP90参与^[24]. 构建杆状病毒载体pFPolE, 编码人HBV聚合酶开放读码框架(ORF)和3'-非翻译区(NTR)含有DR2、DR1和 ϵ 茎环, ϵ 茎环对引导HBV复制起模板作用. 构建的含HBV聚合酶的重组质粒经M2琼脂珠纯化, SDS-PAGE电泳及考马斯亮蓝染色后, 可得一条约60 kDa的蛋白质带, 经N-末端氨基酸测序及BLAST程序进行同源性分析, 然后进行免疫斑点分析和体外引导试验, 结果提示陪伴蛋白(chaperonin)HSP60与HBV Pol之间有特异性的相互作用关系. HSP60与HBV聚合酶相互作用, 是使HBV聚合酶变成活性状态的重要阶段. HSP60在体外强烈影响HBV聚合酶活性. (1)通过蛋白特异性抗体封闭HSP60, 可降低HBV聚合酶活性; (2)在ATP存在的情况下增加HSP60, 可提高聚合酶活性; (3)ATP与HSP60共同激活HBV聚合酶. 体内试验显示, 通过C Δ 540(变异的HSP60)抑制细胞内的HSP60, 可导致HBV聚合酶活性的降低. 因此, HSP60与HBV聚合酶相互作用对激活HBV聚合酶是有明显意义的^[25]. 进一步在昆虫细胞中使用重组杆状病毒表达聚合酶的几个删除突变的蛋白质, 然后用M2免疫共沉淀, 显示HSP60结合到HBV P需要两个在Pol上的最小位点: TP(1-199 aa)和RH(680-842 aa). 在人的HBV宿主细胞HepG2中显示HBV Pol也可以与HSP60结合; HSP60通过与TP和RH位

点结合激活 HBV Pol, 而 Pol 与 HSP60 结合不需要前基因组 RNA^[26].

3 RNase H 与病毒复制

Walton et al 认为核糖核酸酶(RNase H) 在HBV复制过程中能识别并有效裂开 DNA-RNA 杂交的 RNA 链, 但是缺乏序列选择性. 然而, DNA-RNA 杂交链的构成又需要特异性的序列识别. 在这种前提下, 为了解与靶 RNA (共价连接到 RNase H) 互补的反义寡核苷酸能否用于引导 RNase H 进行特异性杂交链的裂开. DNA 寡核苷酸与 RNase H 联合使得核糖核酸酶活性对 HBV mRNA 具有特异性. 一个改良的, 对 HBV mRNA 的 DR1 是特异性的 13 碱基寡核苷酸, 用水溶性交联剂与改良的大肠杆菌 RNase H 连接. 含 1 200 碱基, 包括 DR1 的 HBV RNA 片段被合成作为 T7 RNA 聚合酶的底物. RNase H- 寡核苷酸交联物与 HBV mRNA 裂开产生的 RNA 片段在不同浓度下发生反应, 在最合适条件下 85% 的底物裂开, 用于对照的包括单用 RNase H、寡核苷酸和无裂解活性的不相关的 mRNA 底物. RNase H 与 HBV 反义寡核苷酸连接能特异性裂解靶 HBV 片段^[27]. HBV 虽然是 DNA 病毒, 但其复制需要 HBV 多聚酶基因编码的逆转录酶, 而 HBV 多聚酶的生化结构不能从核壳体释放酶活性蛋白. Qadri et al 用酵母为基础的遗传学方法表达 HBV 逆转录酶. 通过 HBV 逆转录酶基因替代酵母逆转座子 (retrotransposon) Ty1 成分的逆转录酶产生杂交的 Ty1/HBV. 另外, 构建了与杂交 Ty1/HBV RT 的转录物反义方向的指示基因 his3AI. his3AI 的拼接、Ty1/HBV RT RNA cDNA 的合成及整合都依赖于逆转录酶的活性, Ty1/HBV RT his3AI 转录物被同源性重组或整合酶介导的插入和之后的 HIS3 基因的表达, 由一系列的逆转录产生的组氨酸原养型微生物(protozoophs)产物. 用这种方法成功地检测内源性 Ty1 表达缺陷的酵母菌中 HBV 逆转录酶活性, 同负链 DNA 合成的具有蛋白引导活性的 HBV 多聚酶是一致的. HBV 逆转录酶或 RNase H 的删除, 可以导致组氨酸原养型微生物的明显减少, 在体外由逆转录酶刺激的病毒样颗粒内 HBV 编码的 HBx 蛋白成倍增加. 再者, 在拉米夫定存在条件下, 没有观察到组氨酸原养型微生物(His protrophs)的酵母组氨酸 (yeast His⁺) 生长. 因此, 这种在酵母中基因选择的方法, 是安全、经济、可靠的方法, 具有大量进行辅因子和 HBV 多聚酶功能抑制剂筛选的潜力^[28].

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版, 北京: 人民军医出版社, 1997:83-103
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 2001:27-8
- 3 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in Hepadnavirus Assembly and Replication. *J Biol Chem* 2002; 277:24361-24367
- 4 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF,

- Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 5 zu Putlitz J, Lanford RE, Carlson RI, Notvall L, de la Monte SM, Wands JR. Properties of monoclonal antibodies directed against hepatitis B virus polymerase protein. *J Virol* 1999;73: 4188-4196
- 6 Wang XT, Hu JM. Distinct requirement for two stages of protein-primed initiation of reverse transcription in hepadnaviruses. *J Virol* 2002;76:5857-5865
- 7 刘妍, 成军, 董菁, 夏小兵, 李克, 杨继珍. 截短型乙肝病病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. *肝脏* 2001;6:8-10
- 8 刘妍, 成军, 陆荫英, 李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10: 217-219
- 9 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:426-429
- 10 刘妍, 董菁, 黄甫竞坤, 成军, 王刚, 王琳, 李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及对其反式激活功能的影响. *解放军医学杂志* 2002; 27:125-127
- 11 刘妍, 董菁, 成军, 夏小兵, 李克, 王琳, 施双双, 段惠娟, 杨继珍. 40 乙肝病病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:404-406
- 12 董菁, 成军, 黄甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙肝病病毒个体准种表现的初步研究. *解放军医学杂志* 2002;27: 119-121
- 13 董菁, 刘妍, 黄甫竞坤, 施双双, 王刚, 洪源, 陈国凤, 李莉, 陈菊梅. 慢性乙肝病病毒感染患者乙肝病病毒表面抗原基本结构多态性研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;11:130-135
- 14 成军, 刘妍, 陆荫英, 李克, 王琳. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:472-474
- 15 Kim Y, Hong YB, Jung G. Hepatitis B virus: DNA polymerase activity of deletion mutants. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47:301-308
- 16 Lin X, Yuan ZH, Wu L, Ding JP, Wen YM. A single amino acid in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus affects virus replication efficiency. *J Virol* 2001;75:11827-11833
- 17 Kim Y, Jung G. Active human hepatitis B viral polymerase expressed in rabbit reticulocyte lysate system. *Virus Genes* 1999;19:123-130
- 18 Beck J, Nassal M. Reconstitution of a functional duck hepatitis B virus replication initiation complex from separate reverse transcriptase domains expressed in Escherichia coli. *J Virol* 2001;75:7410-7419
- 19 Lott L, Beames B, Notvall L, Lanford RE. Interaction between hepatitis B virus core protein and reverse transcriptase. *J Virol* 2000;74:11479-11489
- 20 Cho G, Park SG, Jung G. Localization of HSP90 binding sites in the human hepatitis B virus polymerase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:191-196
- 21 Cho G, Suh SW, Jung G. HBV polymerase interacts independently with N-terminal and C-terminal fragments of HSP90beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 203-211
- 22 Hu JM, Anselmo D. In vitro reconstitution of a functional duck hepatitis b virus reverse transcriptase: posttranslational activation by HSP90. *J Virol* 2000;74:11447-11448
- 23 Hu JM, Toft D, Anselmo D, Wang XT. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol* 2002;76:269-279
- 24 Park SG, Kyung RJ, Jung G. HSP90 makes the human HBV Pol competent for in vitro priming rather than maintaining the human HBV Pol/pregenomic RNA complex. *Arch Biochem Biophys* 2002;401:99-107
- 25 Park SG, Jung GH. Human hepatitis b virus polymerase interacts with the molecular chaperonin HSP60. *J Virol* 2001;75: 6962-6968
- 26 Park SG, Lim SO, Jung G. Binding site analysis of human HBV pol for molecular chaperonin, HSP60. *Virology* 2002; 298:116-123
- 27 Walton CM, Wu CH, Wu GY. A ribonuclease H-oligo DNA conjugate that specifically cleaves hepatitis B viral messenger RNA. *Bioconjug Chem* 2001;12:770-775
- 28 Qadri I, Siddiqui A. Expression of Hepatitis B Virus Polymerase in Ty1-his3AI Retroelement of Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* 1999; 274: 31359-31365