

RNA沉默的病毒抑制子*

崔晓峰 周雪平**

(浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要 RNA沉默是一种在真核生物体内普遍保守的、通过核酸序列特异性的相互作用来抑制基因表达的调控机制. RNA沉默的一种重要生物学效应是防御病毒的侵染, 而针对寄主的这种防御机制, 许多植物病毒已演化通过编码RNA沉默的抑制子来克服这种防御反应. 目前, 已从植物、动物和人类病毒中鉴定了20多种RNA沉默的抑制子, 围绕抑制子的鉴定和作用机理研究已成为病毒学研究的一个热点. 对RNA沉默抑制子的发现、鉴定方法、作用机理及与病毒病症状形成的关系、动物病毒的沉默抑制子等方面的最新进展做了综述, 并对沉默抑制子的应用和存在的问题进行了讨论.

关键词 RNA沉默, 病毒, 抑制子

学科分类号 R5

RNA沉默(RNA silencing)是一种在真核生物体内普遍保守的, 发生在RNA水平的, 基于核酸序列特异性的相互作用来抑制基因表达的调控机制. 在植物中RNA沉默也称为转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS), 在动物中称为RNA干扰(RNA interference, RNAi), 而在真菌中则称为基因消除(quelling)^[1]. 双链(ds)RNA是RNA沉默起始的关键分子, dsRNA首先被Dicer(RNA酶Ⅲ样的核酸酶)降解为不同长度的小RNA, 然后这些小RNA整合入RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)中, 并引导RISC降解同源mRNA或抑制翻译. dsRNA的降解产物分为两类: 一类是21~22 nt核苷酸的单链小RNA(micro RNA, miRNA), 它是从内源的hairpin RNA前体降解而来; 另一类是3'端具有2 nt突出的21~26 nt的双链小干扰性RNA(small interfering RNA, siRNA)^[2]. 目前发现RNA沉默主要存在2类生物学效应: 一类是由miRNA介导的对内源mRNA转录和翻译的调控, 与生物体的发育有关; 另一类是siRNA介导的对病毒、转基因和转座子等外来入侵核酸序列特异性的RNA降解, 在防御病毒侵染和监视外来核酸中起作用. 在与寄主长期进化过程中, 许多植物病毒为了成功侵染, 已演化通过编码RNA沉默的抑制子(suppressor)来克服这种防御反应^[3].

1 RNA沉默抑制子的发现和多样性

1.1 RNA沉默抑制子的发现

RNA沉默抑制子的发现得益于对植物病毒间

协生现象的研究. 对马铃薯X病毒属(*Potexvirus*)病毒与马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*)病毒间协生作用的研究发现, *Potyvirus*属病毒编码的HC-Pro蛋白在协生中起致病增强作用^[4]. 此后, Ruiz等^[5]发现当用携带GFP基因的马铃薯X病毒(PVX)(PVX-GFP)感染GFP转基因烟草时, 在GFP沉默的同时PVX的积累也大大减少, 寄主似乎通过RNA沉默对PVX起防卫反应. 因而, 推测RNA沉默作为植物的防卫反应在*Potexvirus*属病毒单独侵染时限制了病毒的积累, 而当与*Potyvirus*属病毒共侵染时, HC-Pro蛋白可能充当RNA沉默的抑制子. 紧接着, 3个独立的研究小组采用不同的研究方法证实了这一推测, 同时发现黄瓜花叶病毒(CMV)的2b蛋白也为RNA沉默的病毒抑制子^[6-8]. 沉默抑制子的发现对于认识RNA沉默在植物防御病毒侵染中的作用和病毒反防御的机制具有重要意义. 目前, 已从植物病毒、动物和人类病毒中鉴定了20多种RNA沉默的病毒抑制子(表1), 分布于包括动物和人类病毒在内的RNA和DNA病毒的不同属, 它们之间没有序列同源性, 结构上也表现高度多样性, 抑制RNA沉默的分子机理也不尽相同.

1.2 RNA沉默抑制子的鉴定方法

1.2.1 病毒载体表达和整株植物中转基因诱导基因沉默的回复. 通常的做法是先用病毒接种报告基因

*国家杰出青年基金(30125032)和国家自然科学基金(30270062)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0571-86971680, E-mail: zzhou@zju.edu.cn

收稿日期: 2004-09-22, 接受日期: 2004-10-28

已发生沉默的转基因植物，观察报告基因能否回复表达，然后用表达待鉴定病毒基因的病毒载体接种转基因植物，观察病毒载体引起的症状是否加重和报告基因能否回复表达。用这种方法鉴定了 HC-Pro、2b、AC2/C2 和 P19 等沉默抑制子^[37]。但利用病毒载体表达存在如下的缺点：a. PVX、烟草

花叶病毒 (TMV) 等常用病毒载体本身可能编码沉默抑制子，如 PVX 编码的 P25 蛋白^[9]和 TMV 编码的 126 ku 蛋白^[10]；b. 有些病毒基因用病毒载体表达可能不加重症状，如 2b 蛋白的突变体 (2bΔ5 和 2bΔ16) 不加重 PVX 的症状但能抑制 RNA 沉默^[11]。

Table 1 Viral suppressors of RNA silencing found in diverse types of viruses and their known functional features.
表 1 已鉴定的 RNA 沉默的病毒抑制子及其特性

病毒属	病毒	寄主范围	抑制子	其他已知的功能	鉴定方法	可能的作用机制
马铃薯 Y 病毒属 <i>Potyvirus</i>	TuMV/TEV/PVY	双子叶	HC-Pro	蚜传 / 基因组扩增 / 长距离移动 / 多聚蛋白加工	A,C	影响 siRNA 积累, 干扰 RISC 的形成
黄瓜花叶病毒属 <i>Cucumovirus</i>	CMV/TAV	双子叶	2b	致病因子 / 长距离移动	A	干扰系统沉默信号传导
番茄丛矮病毒属 <i>Tombusvirus</i>	TBSV/CymRSV	双子叶	P19	致病因子 / 移动	A	结合 siRNA 和 miRNA, 干扰 miRNA 介导的发育调控
南方菜豆花叶病毒属 <i>Sobemovirus</i>	RYMV/CiMV	单子叶	P1	病毒积累 / 长距离移动 / 致病因子	A	干扰 24 nt siRNA 积累和抑制系统沉默
菜豆金色花叶病毒属 <i>Begomovirus</i>	ACMV/TYLCCNV	双子叶	AC2/C2	致病因子 / DNA 结合 / 转录激活	A	
花生丛簇病毒属 <i>Pecluvirus</i>	PCV	单、双子叶	P15	基因组扩增 / 移动	A,B	干扰 miRNA 介导的 mRNA 降解
甜菜坏死黄脉病毒属 <i>Benyvirus</i>	BNYVV	单、双子叶	P14	胞间移动	B	
马铃薯 X 病毒属 <i>Potexvirus</i>	PVX	双子叶	P25	RNA 螺旋酶 / 胞间移动	B	干扰系统沉默信号传导
大麦病毒属 <i>Hordeivirus</i>	BSMV/PSLV	单、双子叶	γb	致病因子 / 长距离移动	A,D	
纤细病毒属 <i>Tenuivirus</i>	RHBV	单、双子叶	NS3	功能未知	B	干扰沉默的起始
马铃薯卷叶病毒属 <i>Polerivirus</i>	BWYV/PLRV/CABYV	双子叶	P0	症状决定因子	B	
香石竹斑驳病毒属 <i>Carmovirus</i>	TCV	双子叶	CP (P38)	基因组包壳和移动	B	干扰沉默的起始
番茄斑萎病毒属 <i>Tospovirus</i>	TSWV	双子叶	NSs	症状决定因子 / 推定的移动蛋白	B	干扰沉默的起始
长线形病毒属 <i>Closterovirus</i>	BYV/BYSV	双子叶	P21/P22	复制增强子	B	结合 siRNA 和 miRNA 双体, 干扰 miRNA 介导发育调控
烟草花叶病毒属 <i>Tobamovirus</i>	ToMV/TMV	双子叶	P130	复制酶	B	
芜菁黄花叶病毒属 <i>Tymovirus</i>	TYMV	双子叶	P69	移动 / 症状决定因子	C	作用于 dsRNA 的上游, 增强 miRNA 介导的 mRNA 降解
豇豆花叶病毒属 <i>Comovirus</i>	CPMV	双子叶	SCP	包壳	B	
野田村病毒属 <i>Nodavirus</i>	FHV/NoV	昆虫 / 单、双子叶	B2	功能未知	B	
正呼肠孤病毒属 <i>Orthoreovirus</i>	Reovirus	动物和人	σ3		B	
流感病毒属 <i>Influenzavirus</i>	Influenza virus A,B,C	动物和人	NS1		B,D	结合 siRNA
正痘病毒属 <i>Orthopoxvirus</i>	Vicinia virus	动物和人	E3L		D	

A:病毒载体表达和沉默恢复; B:农杆菌共浸润; C:转基因植物杂交; D:其他方法.

1.2.2 农杆菌共浸润瞬时抑制试验.这一系统首先由 Baucombe 实验室发展并用来鉴定 HC-Pro、2b 等沉默抑制子. 基本做法是将待鉴定的病毒基因置于植物表达载体的 35 S 启动子下游 (称为抑制子构建), 然后将此构建导入农杆菌, 与含 35 S 驱动的 GFP 构建的农杆菌等比例混合, 浸润接种表达报告基因的转基因植物 (如 GFP16c) 叶片, 在 T-DNA 发生转移后, 沉默诱导子 (外源报告基因) 会诱导转基因植物中报告基因的沉默, 报告基因的 mRNA 会快速降解, 积累量很低; 如果与之共浸润的病毒基因产物能抑制基因沉默, 则在叶局部浸润区不会发生报告基因的沉默, 报告基因 mRNA 积累稳定甚至增加, 从而可鉴定此病毒蛋白为沉默抑制子^[7]. 此方法简便、快速, 已被广泛应用. 作者实验室利用这种方法发现, 中国番茄黄化曲叶病毒 (TYLCCNV) 和烟草曲茎病毒 (TbCSV) 的 AC2 和 AC4 蛋白及伴随卫星 DNA β 分子编码的 β C1 蛋白为 RNA 沉默抑制子 (待发表).

1.2.3 转基因植物的杂交和嫁接试验.利用这种方法首先要获得稳定表达待鉴定病毒基因和报告基因已发生沉默的转基因植物, 然后将 2 种转基因植物进行杂交, 在杂交后代观察报告基因能否回复表达. 利用转基因植物杂交试验, HC-Pro 也被鉴定为沉默抑制子^[9]. 将转基因植物的杂交和嫁接试验结合, 可以用来研究抑制子在系统沉默中的作用, 如发现 CMV 2b 干扰沉默信号的长距离传导^[2]. 转基因植物杂交和嫁接试验的优点是不受农杆菌、病毒载体等干扰, 结果可靠, 并可以用来研究抑制子的作用机理.

除了以上 3 种方法, 利用抑制子的异源互补和抑制 RNA 介导的交叉保护等方法也可间接地鉴定沉默抑制子.

2 RNA 沉默抑制子的作用机理及与植物病毒病症状形成的关系

2.1 RNA 沉默抑制子的作用机理

超过 20 种 RNA 沉默的病毒抑制子已被鉴定, 抑制子蛋白的结构和功能多样性也反映了在进化过程中病毒为了适应不同的寄主, 利用不同的蛋白质在 RNA 沉默途径的不同步骤, 抑制寄主的防卫反应, 可能的作用方式包括: a. 抑制病毒 siRNA 的产生; b. 阻碍 siRNA 整合入 RISC; c. 干扰 RISC 降解同源 mRNA (图 1).

2.1.1 马铃薯 Y 病毒属 HC-Pro 干扰 RISC 的形成.

Potyvirus 属病毒 HC-Pro 是一个多功能蛋白质, 病毒载体表达、瞬时共浸润和转基因植物杂交试验研究表明, HC-Pro 为 RNA 沉默的抑制子^[6-8]. HC-Pro 既能抑制沉默的建立, 也能恢复已建立的沉默, 因而可能在 RNA 沉默的维持阶段起作用^[3]. 转基因植物杂交和嫁接及瞬时共浸润抑制试验都表明 HC-Pro 干扰 siRNA 的积累, 在共浸润试验中减少 21 nt 和 24 nt siRNA 的积累^[4]. 在转 HC-Pro 基因的烟草和拟南芥中, 内源 miRNA 的积累增加, 表明 HC-Pro 影响 siRNA 和 miRNA 的功能和生物合成^[15]. HC-Pro 抑制 miRNA 指导的基因表达调控和 siRNA 介导的转基因或病毒诱导的 RNA 沉默, 可能干扰了二者调控的一个共同反应. 由于 RISC 复合物不仅涉及 miRNA 也涉及 siRNA 介导的 mRNA 降解, HC-Pro 可能通过抑制 RISC 沉默效应复合物形成抑制沉默^[19]. 利用酵母双杂交系统发现烟草蚀纹病毒 (TEV) HC-Pro 与植物钙调素相关蛋白互作 (rgs-CaM). 瞬时或在转基因植物中过度表达 rgs-CaM, 能象 HC-Pro 一样抑制 RNA 沉默, 表明 rgs-CaM 可能充当 RNA 沉默的内源抑制子. HC-Pro 与 rgs-CaM 互作抑制沉默的可能机理是 HC-Pro 作为 RNA 沉默的强抑制子, 能增加 rgs-CaM 的积累, 在 HC-Pro 水平降低时, 通过内源的 rgs-CaM 干扰 RISC 的形成起抑制沉默的作用. 另一种可能是 rgs-CaM 为 RISC 的组分, HC-Pro 通过与 rgs-CaM 互作干扰 RISC 的形成. 过度表达 rgs-CaM 的转基因植物也产生能像转 HC-Pro 基因一样的畸形, 表明可能与 HC-Pro 类似干扰了 miRNA 介导的发育调控^[16].

2.1.2 番茄丛矮病毒属的 P19 阻碍 siRNA 整合入 RISC.*Tombuvirus* 属病毒 P19 不仅是转基因诱导, 也是病毒载体诱导的 RNA 沉默的强抑制子^[17,18]. P19 为 *Tombuvirus* 属病毒系统侵染所必需, 建兰环斑病毒 (CymRSV) 能系统侵染本氏烟, 该病毒 P19 功能丧失的突变体尽管能系统侵染但被局限于系统叶的叶脉. 因而, *Tombuvirus* 的成功侵染和症状诱导需要 P19 介导系统沉默的抑制. 在病毒侵染的植物中, siRNA 积累到很高水平, 因而 P19 可能在 DICER 的下游抑制沉默. 尽管 P19 蛋白不含有 dsRNA 结合结构域, 但体外结合试验表明 P19 能结合 21 nt 的 siRNA. P19 蛋白的晶体结构已被解析, 二聚体形式的 P19 结合 21 nt siRNA 的双体. 免疫共沉淀试验也表明 P19 能在植物体内、果蝇和人 HeLa 细胞中结合 siRNA 的双体^[19,20]. 在病毒侵染

的细胞中, P19 可能通过结合病毒 siRNA, 使其不能整合入 RISC 来达到病毒侵染的目的^[21]. 与此相一致, 在病毒侵染的植物中, 病毒 siRNA 主要存在于 P19 复合物中. P19 抑制 RNA 沉默与蛋白质的积累量有关, P19 蛋白的高水平表达能有效抑制沉默, 而在高温下当 siRNA 大量产生时, 病毒产生的 P19 蛋白不足以抑制 RNA 沉默^[17].

2.1.3 CMV 2b 干扰沉默信号的长距离移动. RNA 沉默是一个非细胞自发 (non-cell-autonomous) 的过程, 局部诱导的沉默可通过沉默信号的运输引发系统获得性沉默. 在 GFP 沉默回复试验中, CMV 仅能在新叶恢复 GFP 基因的表达, 含 2b 基因的 PVX 载体能在新叶抑制 RNA 沉默的起始. 进一步转基因植物的杂交和嫁接试验表明 CMV 2b 蛋白只能抑制系统沉默, 推测 2b 蛋白可能干扰沉默信号的长距离移动^[22]. 在农杆菌共浸润试验中, Guo 和 Ding (2002 年) 报道 CMV 2b 能抑制系统沉默, 而 Hamilton 等^[24]报道 2b 仅能延迟沉默而不阻止系统沉默. 原因可能是农杆菌共浸润瞬时抑制试验中, 沉默诱导子和抑制子的比率差异和难以预料的表达部位差异. RNA 沉默过程中目标 mRNA 的降解发生在细胞质中. 利用 GFP 融合发现 CMV 2b 蛋白定位在核内, 含有一个有功能的核定位信号(NLS)^{22KRRRRR}²⁷, NLS 的突变导致 2b 蛋白不能抑制 RNA 沉默, 因而 2b 可能与内源因子的互作, 影响

系统沉默信号的多个过程^[12].

2.2 RNA 沉默抑制子与植物病毒病症形成的关系

已鉴定的沉默抑制子大多为致病相关因子, 不为病毒复制所必需但能促进病毒的运动或积累. 表达芜菁花叶病毒 (TuMV) HC-Pro 基因的转基因拟南芥, 出现类似 dcl1 突变体 (DCL1 丧失功能突变体) 的表型. 由于 miRNA 的产生需要 DCL1, 在 dcl1 突变体中 miRNA 难以被检测, 而 miRNA 调控的转录物是过度表达的. 在 HC-Pro 转基因植物中, 即使 miRNA 很丰富, miRNA 的目标 mRNA 积累水平也很高. 因而, HC-Pro 抑制 miRNA 介导的调控, 在 miRNA 产生的下游起作用. 在 TuMV 侵染的拟南芥中, miRNA 的目标 mRNA 也是过度表达的, 在病毒侵染的植物中 HC-Pro 也能抑制 miRNA 介导的基因调控. miRNA 目标基因的过度表达可能在 dcl1 突变体、HC-Pro 转基因植物和 TuMV 侵染的植物中引起相似的发育缺陷^[15].

在病毒侵染过程中, P19 可能通过结合 siRNA 抑制植物 RNA 沉默以达到成功侵染的目的. 另一方面, P19 也可能结合内源 siRNA 和 miRNA 等小 RNA, 调控寄主基因的表达, 对病毒病的症状起直接作用. 与这一推测相一致, 表达 P19 的转基因植物叶产生曲叶等表型. 进一步研究发现 P19 结合 siRNA 和 miRNA 的双体形式. 因而, P19 抑制 RNA 沉默可能是这 2 类小 RNA 失活的结果, 导致

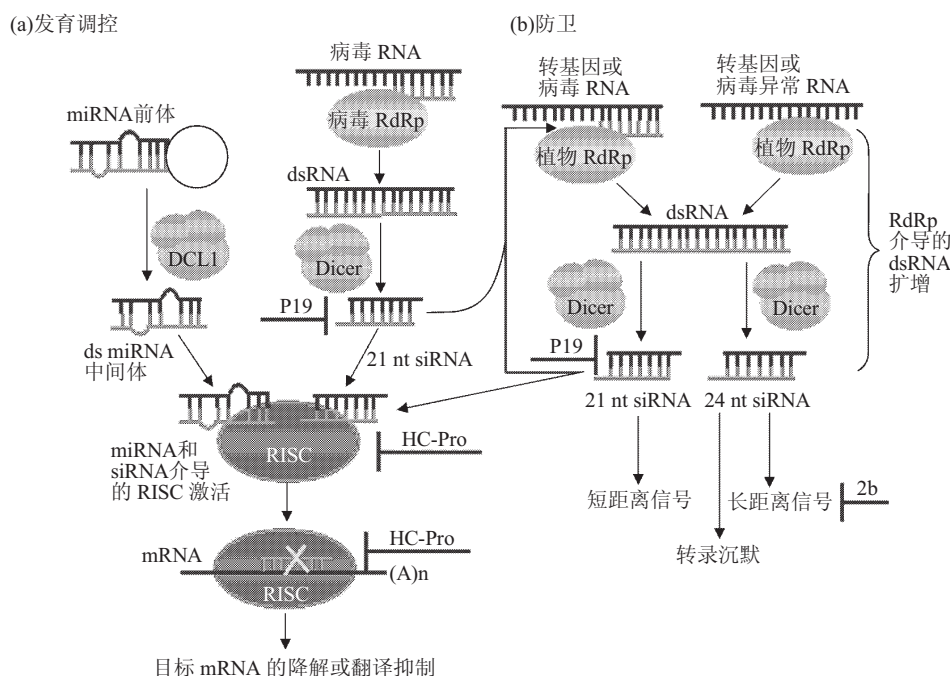


图 1 病毒沉默抑制子在 siRNA 和 miRNA 途径的作用目标^[22]

Fig.1 The target steps of viral suppressors in the siRNA and miRNA pathways^[22]

病毒病症状的产生^[22,23]. 表达芜菁黄化叶病毒 (TYMV) P69 的转基因拟南芥也产生病毒病样症状, 在 P69 转基因植物中 Dicer mRNA 和 miRNA 水平升高, miRNA 介导降解的 2 个寄主基因 mRNA (SCL-IV 和 SPL3) 活性增强. 研究已表明 P69 充当症状严重度决定因子, 在 dsRNA 形成的上游抑制 siRNA 介导的 RNA 沉默, 因而 P69 抑制 RNA 沉默, 并通过上调 miRNA 介导的寄主 mRNA 降解导致产生症状^[24]. 作者实验室的研究发现, 表达 TYLCCNV 伴随卫星 DNA β 分子 $\beta C1$ 基因的转基因植物也产生类似病毒病的症状(待发表), 因而 $\beta C1$ 蛋白做为 RNA 沉默的抑制子, 也可能干扰 miRNA 介导的发育调控. 病毒抑制子可能通过抑制 siRNA 途径对病毒 RNA 的降解而使病毒成功侵染, 或(和)通过干扰 miRNA 调控的发育产生病毒病症状.

3 动物病毒的 RNA 沉默抑制子

3.1 动物病毒 RNA 沉默抑制子的鉴定

在植物病毒 RNA 沉默抑制子发现以后, 人们推测动物病毒也编码类似的抑制子蛋白. 猫鼻气管炎(*Flock house virus*, FHV) 是一种昆虫病毒, 但能在多种植物中复制, 且能在表达烟草花叶病毒 (TMV) 运动蛋白 (MP) 的转基因植物中系统移动, FHV B2 基因的突变不影响病毒的复制, 但导致病毒不能系统移动, 而用 B2 基因置换 CMV 2b 基因不影响 CMV 的侵染性, 这为利用植物系统研究动物病毒的沉默抑制子提供了线索. 在 GFP 转基因植物中, 农杆菌共浸润抑制试验表明, FHV B2 蛋白能像 CMV 2b 一样在转基因植物中抑制 GFP 沉默^[25]. 在培养的果蝇 (*Drosophila*) S2 细胞中, FHV 感染导致产生 22 nt FHV 特异序列的 siRNA, 表明在动物中也可能存在抗病毒作用的 RNA 沉默机制. 当用 RNAi 技术对 RISC 的组分——AGO2 进行干涉, FHV 在果蝇细胞中积累到很高水平. 在野生型果蝇细胞中, 不能检测到 B2 缺失的 FHV 突变体的复制, 然而当在野生型细胞中用质粒表达 B2 或在 AGO2 被干涉的情况下, B2 缺失突变体能大量积累. 进一步研究发现, FHV 和同属的野田村病毒 (NoV) B2 蛋白能在果蝇细胞中抑制 GFP 的沉默, 表明 B2 能抑制 RNA 沉默介导的抗病毒反应, 为 RNA 沉默的抑制子^[25]. 此后, 利用农杆菌共浸润抑制试验和 PVX 表达等方法相继发现, 流感病毒 NS1 蛋白^[26,27]、哺乳动物呼肠孤病毒 $\sigma 3$ 蛋白^[28]能在

GFP 转基因植物中抑制 GFP 沉默. 最近, Ding 实验室发展了一种在果蝇细胞中鉴定动物病毒 RNA 沉默抑制子的体系. 他们利用 GFP 基因置换 FHV 的 B2 基因产生重组病毒 pFR1gfp, 当在野生型果蝇细胞中单独转染 pFR1gfp 时, 不能检测到 GFP 的表达, 而当 pFR1gfp 与表达 FHV B2 的质粒共转染时, GFP 表达并大量积累, 很容易被观察到. 将 pFR1gfp 与含有候选抑制子基因的质粒共转染果蝇细胞, 通过 GFP 的观察能有效鉴定动物病毒的抑制子. 利用这种方法, 甲型、乙型和丙型流感病毒的 NS1 蛋白及痘苗病毒的 E3L 蛋白被鉴定为 RNA 沉默的病毒抑制子^[29].

3.2 动物病毒 RNA 沉默抑制子的作用机理

在 GFP 转基因植物中进行共浸润试验, 发现 FHV B2 能像 CMV 2b 一样抑制 siRNA 的产生. 在哺乳动物和昆虫细胞, B2 基因的表达能增加病毒 RNA 的积累, B2 基因的突变导致 FHV 侵染性大大降低. NS1、E3L 和 $\sigma 3$ 等动物病毒的沉默抑制子为 dsRNA 结合蛋白, 因而推测许多病毒的 dsRNA 结合蛋白可能是潜在的 RNA 沉默抑制子^[28,29]. GFP 转基因植物中进行的共浸润试验表明, NS1 蛋白能抑制 siRNA 的积累且能增加 PVX 侵染的症状, 体外结合试验表明 NS1 蛋白能结合 siRNA^[27-29], 这表明 NS1 蛋白抑制 RNA 沉默的机理不可能由简单的结合 dsRNA 引起, 很可能与 P19 有相似之处. NS1 蛋白 N 端的 dsRNA 结合结构域对于抑制 RNA 沉默是必需的, 此结构域足以抑制 RNA 沉默但抑制能力低于野生型 NS1 蛋白. 甲型流感病毒 NS1 蛋白第 92 位氨基酸位于 dsRNA 结合结构域的 C 端附近, 此位点由天冬氨酸 (D) 突变为谷氨酸 (E) 时, NS1 蛋白抑制 RNA 沉默的能力提高了近 2 倍. 在 1997 年发现的甲型流感病毒 H5N1 致死株中就存在 92 位 D→E 突变, 这一突变可能有利于其从动物传播给人^[29]. 目前, 仅鉴定了少数几个动物病毒的 RNA 沉默抑制子, 这些抑制子蛋白作用于沉默途径的靶标还不清楚, 它们抑制 RNA 沉默的机理及其与病毒毒性的关系还需要深入研究.

4 RNA 沉默抑制子的应用

4.1 解析 RNA 沉默的途径

当用 35S :GFP 诱导 GFP 转基因本氏烟 (GFP16c) 发生沉默后产生 2 类不同长度的 siRNA, 即 21 nt 和 24 nt 的 siRNA. 当用水稻黄斑驳病毒 (RYMV) 的 P1 抑制子与 GFP 共浸润时仅产生 21 nt

的 siRNA, GFP 的局部沉默和细胞间传导不被抑制, 然而 P1 能阻止沉默在维管组织的长距离传导. 当用 P19 共浸润时 2 类 siRNA 都不产生, 局部沉默和系统沉默都被抑制. 因而, 21 nt siRNA 的产生很可能指导同源 RNA 的降解和沉默的细胞间传导, 而 24 nt 的 siRNA 可能与沉默的长距离传导有关^[4]. 最近, Dunoyer 等^[21]利用已鉴定的 5 个沉默抑制子 (HC-Pro、P19、P15、P38 和 P25) 在拟南芥中建立了用于解析 siRNA 和 miRNA 途径的体系. 他们将 5 个抑制子分别转入拟南芥, 发现 HC-Pro 和 P19 诱导发育缺陷, miRNA 的积累也发生改变, P15 也诱导一定的发育缺陷但不影响 miRNA 的积累. 进一步分析发现, HC-Pro、P19 和 P15 能阻止 miRNA 对目标 RNA 的降解, 表明这 3 个抑制子可能干扰 miRNA 介导的发育调控. 因而, 利用沉默抑制子是解析 siRNA 和 miRNA 途径的有力工具.

4.2 增强外源蛋白的表达

用表达 TEV HC-Pro 的转基因烟草与表达 GUS 的 PVX amplicon 转基因植物杂交, 杂交后代的成熟叶片中 GUS 蛋白积累量高达总可溶性蛋白的 3%. 利用抑制子也能在农杆菌介导的瞬时表达系统中增加外源蛋白的表达. 利用 TBSV 的 P19 蛋白与 GFP、马铃薯 Y 病毒 (PVY) NIa 蛋白酶等多种蛋白质共浸润, 发现外源蛋白表达量能增加 50 倍以上. 当 GFP 与 P19 共浸润时, GFP 蛋白积累量高达总可溶性蛋白的 7%^[30].

5 展 望

RNA 沉默在保护植物和动物防御病毒感染方面起重要作用. 在植物中已发现了 10 多种抑制子, 一些抑制子如 HC-Pro 和 P19 干扰 miRNA 介导的发育调控, 然而大多数的抑制子是否干扰植物的发育还不得而知. 鉴定沉默抑制子作用于 siRNA 途径和 miRNA 途径的靶标, 不但有利于弄清它们抑制 RNA 沉默的机理, 对深入了解 RNA 沉默的机制也具有重要意义. 动物体内也存在防御病毒侵染的 RNA 沉默机制, 然而对于动物病毒所编码的沉默抑制子的种类和作用机制还很不清楚. 利用植物和果蝇系统鉴定动物病毒的沉默抑制子已被证实是可行的, 通过沉默抑制子的鉴定并弄清它们的作用机理, 可为利用 RNA 沉默原理控制病毒感染或设计针对沉默抑制子的抗病毒策略提供依据. 一些植物内源的 RNA 沉默抑制子已被鉴定, 如 rgs-CaM, 推测一些病毒抑制子可能通过与植物内源抑制子互

作来抑制 RNA 沉默. 无论对于植物病毒还是动物病毒, 鉴定与抑制子蛋白互作的寄主因子对于了解 RNA 沉默的作用途径和 RNA 沉默抑制的机理都具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trend Genet*, 1999, **15**(9): 358~363
- 2 Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, **301**(5631): 336~338
- 3 Voinnet O, Pinto Y M, Baulcombe D C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (24): 14147~14152
- 4 Pruss G, Ge X, Shi X M, *et al.* Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, 1997, **9** (6):859~868
- 5 Ruiz M T, Voinnet O, Baulcombe D C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 1998, **10**(6): 937~946
- 6 Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X, *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (22): 13079~13084
- 7 Brigneti G, Voinnet O, Li W X, *et al.* Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J*, 1998, **17**(22): 6739~6746
- 8 Kasschau K D, Carrington J C. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 1998, **95**(4): 461~470
- 9 Voinnet O, Lederer C, Baulcombe D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 2000, **103**(1): 157~167
- 10 Kubota K, Tsuda S, Tamai A, *et al.* Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J Virol*, 2003, **77**(20): 11016~11026
- 11 Lucy A P, Guo H S, Li W X, *et al.* Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J*, 2000, **19**(7): 1672~1680
- 12 Guo H S, Ding S W. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J*, 2002, **21**(3): 398~407
- 13 Llave C, Kasschau K D, Carrington J C. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (24): 13401~13406
- 14 Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, *et al.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*, 2002, **21** (17): 4671~4679
- 15 Kasschau K D, Xie Z, Allen E, *et al.* P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Cell*, 2003, **4**(2): 205~217
- 16 Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, *et al.* A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants.

- Science, 2000, **290**(5489): 142~144
- 17 Qiu W, Park J W, Scholthof H B. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2002, **15**(3): 269~280
 - 18 Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, *et al.* A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J*, 2002, **21**(12): 3070~3080
 - 19 Vargason J M, Szittyi G, Burgyan J, *et al.* Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, 2003, **115** (7): 799~811
 - 20 Ye K, Malinina L, Patel D J. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, 2003, **426**(6968): 874~878
 - 21 Dunoyer P, Lecellier C H, Parizotto E A, *et al.* Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, 2004, **16**(5): 1235~1250
 - 22 Silhavy D, Burgyan J. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trend Plant Sci*, 2004, **9**(2): 76~83
 - 23 Chapman E J, Prokhnovsky A I, Gopinath K, *et al.* Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*, 2004, **18**(10): 1179~1186
 - 24 Chen J, Li W X, Xie D, *et al.* Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of micro RNA in host gene expression. *Plant Cell*, 2004, **16**(5):1302~1313
 - 25 Li H, Li W X, Ding S W. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, 2002, **296**(5571): 1319~1321
 - 26 Delgadillo M O, Saenz P, Salvador B, *et al.* Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol*, 2004, **85**(4): 993~999
 - 27 Bucher E, Hemmes H, de Haan P, *et al.* The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol*, 2004, **85**(4): 983~991
 - 28 Lichner Z, Silhavy D, Burgyan J. Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *J Gen Virol*, 2003, **84**(4): 975~980
 - 29 Li W X, Li H, Lu R, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(5): 1350~1355
 - 30 Voinnet O, Rivas S, Mestre P, *et al.* An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, 2003, **33**(5): 949~956

Viral Suppressor of RNA Silencing*

CUI Xiao-Feng, ZHOU Xue-Ping**

(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Conserved in many eukaryotic cells, RNA silencing is a mechanism that suppresses gene expression through RNA-mediated sequence-specific interactions. In plants, RNA silencing plays an important role against virus infection. A counter-defensive strategy in plant viruses has evolved by encoding suppressor proteins to overcome RNA silencing. Up to date, over twenty suppressors encoded by plant, animal and human viruses had been identified. A hot topic in virology has been focused on the identification of suppressors of RNA silencing and the mechanism for inducing silencing. The discovery and identification of viral suppressors of RNA silencing, possible mechanisms involved in RNA silencing suppression and its relationship with symptom formation of viral diseases, and suppressors of animal viruses were reviewed. The applications of these suppressors in plant biological and biotechnological research were also discussed.

Key words RNA silencing, virus, suppressor

*This work was supported by grants from The National Outstanding Youth Foundation of China (30125032) and The National Natural Science Foundation of China (30270062).

**Corresponding author . Tel: 86-571-86971680, E-mail: zzhou@zju.edu.cn

Received: September 22, 2004 Accepted: October 28, 2004