

NL63 冠状病毒木瓜样蛋白酶去泛素化酶活性和对宿主抗病毒天然免疫反应调节作用*

孙 莉** 杨宇东** 刘殿波 邢雅玲 陈晓娟 陈忠斌***

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 引起人类呼吸道感染的冠状病毒已多达 5 种。冠状病毒与宿主相互作用决定了其致病性和免疫特性。冠状病毒感染后宿主会立即启动抗病毒天然免疫反应, 而人类冠状病毒往往会编码特定蛋白逃逸或抑制宿主的天然免疫反应。NL63 冠状病毒是一种新型人类冠状病毒, 其非结构蛋白 ns3 编码 2 个木瓜样蛋白酶(PLP)核心结构域 PLP1 和 PLP2。前期研究发现, 人类冠状病毒 PLP2 是一种病毒编码的去泛素化酶(DUB), 但是对其 DUB 特性和功能还不清楚。研究发现, NL63 冠状病毒 PLP1 和 PLP2 两个核心结构域中只有 PLP2 具有 DUB 活性, 而且, PLP2 的 DUB 活性对 K48 和 K63 连接的多聚泛素化修饰不表现明显特异性。同时, 蛋白酶活性催化位点 C1678 和 H1836 突变后对其 DUB 活性有明显抑制作用, 而蛋白酶活性催化位点 D1849 突变后对 DUB 活性无影响。其次, PLP2 而非 PLP1 核心结构域能够明显抑制仙台病毒和重要信号蛋白(RIG-I、ERIS/STING/MITA)激活的干扰素表达, 表明 PLP2 是一种冠状病毒编码的干扰素拮抗剂, 而且 PLP2 的干扰素拮抗作用不完全依赖其蛋白酶活性。机制研究表明, PLP2 能够与干扰素表达通路中的重要调节蛋白 RIG-I 和 ERIS 发生相互作用, 通过对 RIG-I 和 ERIS 的去泛素化负调控宿主抗病毒天然免疫反应。此外, PLP2 除利用 DUB 活性抑制干扰素表达外, 很可能存在不依赖自身催化活性的其他组分共同抑制干扰素的产生。以上研究对阐明人类新发冠状病毒免疫和致病机理以及抗病毒药物研发具有重要参考价值。

关键词 冠状病毒 NL63, 木瓜样蛋白酶, 去泛素化酶, 干扰素拮抗剂, ERIS/STING

学科分类号 Q5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00111

天然免疫反应是机体抵抗微生物等病原入侵、保护自身的第一道防线。近年来病毒性疾病频频发生, 2003 年 SARS 病毒的爆发令人们重新认识冠状病毒的致病性和危害性。同时, 人类新发冠状病毒调控宿主抗病毒天然免疫反应机制研究也成为人们关注的焦点。目前为止, 引起人类呼吸道感染的冠状病毒已多达 5 种。继 SARS 冠状病毒后又出现了 NL63 和 HKU1 两种人类新发冠状病毒。NL63 冠状病毒是 2004 年由荷兰学者 Van der Hoek L 等^[1]首先报道的一种新型人类冠状病毒已成为人类呼吸道感染的主要新发病原之一。系统发育学分析表明, 冠状病毒 NL63 和 229E 最为接近^[2], 但是两种病毒感染靶细胞的受体却不同, 229E 冠状病毒的靶细胞受体为 CD13^[3], NL63 冠状病毒的受体与 SARS 病毒的细胞受体相同, 为血管紧张素转换酶 2(ACE2)。NL63 病毒虽然与 SARS 病毒享有同

样的细胞受体, 但是二者的感染性、免疫特性和致病性等却存在很大差异^[4]。冠状病毒的多样性及感染和免疫特异性使得病毒逃逸宿主抗病毒天然免疫反应机制更加复杂。

冠状病毒蛋白酶在病毒复制周期中执行多种功能, 除剪切病毒的多聚蛋白外, 还切割或抑制天然免疫反应中的重要蛋白。例如, 小核糖核酸病毒 3C 蛋白酶不仅剪切复制聚合酶前体, 而且在抑制

* 国家自然科学基金(30870536, 30972761), 国家科技重大专项(2008ZX10004-015), 北京市自然科学基金(7092075)和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。Tel: 010-66930297, Fax: 010-88272105

E-mail: chenzhongbin@yahoo.com, chenzb@bmi.ac.cn

收稿日期: 2010-03-13, 接受日期: 2010-05-05

RIG-I 和 NF- κ B 方面发挥重要作用^[5-9]. 我们前期研究发现, SARS 冠状病毒木瓜样蛋白酶(PLP)是一种多功能蛋白酶, 除剪切病毒的多聚蛋白外, 还具有去泛素化酶(DUB)活性^[7], 同时作为干扰素拮抗剂通过抑制 IRF3 的磷酸化及核转入, 调控宿主抗病毒天然免疫反应^[8]. 我们最近研究发现, NL63 冠状病毒 nsp3 编码的木瓜样蛋白酶 PLP 包括两个功能性核心结构域 PLP1 和 PLP2, 是病毒复制周期中的重要蛋白酶之一, 而且 PLP2 同样具有 DUB 活性和干扰素拮抗作用, 是一种典型的多功能蛋白酶^[9-11]. 除了 SARS 病毒只有一个 PLP_{pro} 核心结构域外, 其他人类冠状病毒如 NL63 等都含有两个 PLP 核心结构域(PLP1 和 PLP2). 目前还不清楚, 冠状病毒两个 PLP 核心结构域除了均具有蛋白酶活性外, 在其他功能活性上是否存在差异. 围绕这一问题, 该研究旨在阐明 NL63 冠状病毒 PLP 蛋白酶核心结构域(PLP1 和 PLP2)的多功能活性以及 PLP 调控宿主抗病毒天然免疫反应机制, 为病毒性疾病治疗提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 细胞培养、转染试剂和抗体

人胚胎肾上皮细胞(HEK293T)由军事医学科学院生物工程研究所叶棋浓博士惠赠. HeLa 细胞由军事医学科学院放射与辐射医学研究所保存. 293T 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液于 37°C, 5% 二氧化碳孵箱培养. DMEM 培养基、Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; Flag 抗体购自 Sigma 公司; V5、HA、Myc 抗体均购自 MBL 公司; actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG(二抗)、Agarose A+G、双荧光素酶测定试剂盒均购自上海碧云天公司; 限制性内切酶、DNA 连接酶、Taq 酶购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化试剂盒、蓝色预染蛋白 Marker 购自博迈德公司. 仙台病毒由华中农业大学肖少波教授馈赠.

1.2 质粒

IFN β , NF- κ B 和 PRD(III-I)₄ 荧光素酶报告基因分别由 Dr. John Hiscott (Jewish General Hospital, Montreal, Canada) 和 Dr. Kui Li (University of Tennessee, Memphis Tennessee, USA) 提供. Flag-hIPS-1 (也称为 MAVS), BOS-Myc-hIRF3, Flag-hTBK1, Flag-hRIG-I 均由 Dr. Himanshu Kuma and Dr. Shizuo Akira (Immunology Frontier Research

Center Osaka University, Osaka, Japan) 提供. pCMV-Flag-mA20 由 Dr. Averil Ma (The University of California, San Francisco, CA, USA) 提供. pcDNA3.1-HA-ERIS (也称为 STING/MITA) 和 pCMV14-Flag-ERIS 由蒋争凡博士(北京大学生命科学学院)惠赠. pcDNA3-Myc6-mISG15 由 Dr. Min-Jung Kim (Pohang University of Science and Technology, Pohang, Republic of Korea) 提供. pcDNA3-Ube1L (E1) 和 pcDNA3-UbcH8 (E2) 由 Robert M. Krug (University of Texas, USA) 提供. pcDNA3.1-HA-Ub, pcDNA3.1-HA-Ub K48, pcDNA3.1-HA-Ub K63 由 Dr. Edward W. Harhaj (University of Miami School of Medicine, Miami, FL, USA) 提供.

1.3 PLP1、PLP2 特定位点 D 突变载体的构建和表达鉴定

利用我们构建的人类冠状病毒 NL63 的核心结构域(克隆到 pcDNA3.1-V5/HisB 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点之间)和特定位点突变体 PLP1 C1062A、PLP1 H1212A、PLP2 C1678A、PLP2 H1836A 进行该实验研究^[9]. 同时为构建特定位点突变表达载体 PLP1 D1225A、PLP2 D1849A, 分别设计引物. PLP1 D1225A 上游引物: 5' GCC ATC GCC GGC TTC GGC GTG TTC GAC ATC AAG AAC 3', 下游引物: 5' GAA GCC GGC GAT GGC CTT GTT GAA GCT GTA CAG G 3'; PLP2 D1849A 上游引物: 5' GTG TAC GCC GGC GCC CGG CTG TTC AGC AGC GAC 3', 下游引物: 5' GGC GCC GGC GTA CAC GGC GTT GTT GGC GGC GTC 3'. 根据位点快速突变试剂盒(QuikChange site-directed mutagenesis protocol, Stratagene, La Jolla, CA)分别制备 PLP1、PLP2 特定位点 D 突变体. 所有突变体均送往博迈德公司进行测序. 为鉴定 PLP1、PLP2 特定位点表达载体的表达情况, 将 PLP1 D1225A、PLP2 D1849A 分别转染 293T 细胞, 28 h 收集细胞, 进行 Western blot 检测, 利用特异性抗 V5 抗体检测蛋白质表达条带.

1.4 去泛素化酶(DUB)和去 ISG 活性测定

依据 Evans 等^[12]对泛素检测方法的描述, 进行木瓜样蛋白酶 DUB 活性检测. 具体实验操作如下: 将 PLP1(1 μ g)、PLP2(1 μ g)与 HA-Ub(1 μ g)共同转染 60 mm 培养皿中的 293T 细胞, 28 h 后, 收集细胞裂解液, 进行 Western blot 检测, 并分别利用抗 V5 (1:2 000) 抗体检测木瓜样蛋白酶 PLP1 和 PLP2 及突变体的表达, 利用抗 HA(1:1 000)的

抗体检测泛素化蛋白, 利用抗 actin 抗体检测上样蛋白质量的控制.

依据 Zhao 等^[13]对 ISG 检测方法的描述, 进行 PLP2 蛋白酶对类泛素分子(ISG15)的去 ISG 活性检测. 具体实验操作如下: Myc-ISG15(0.5 μ g), pcDNA3-Ube1L(0.25 μ g), pcDNA3-UbcH8(0.25 μ g) 和 PLP2、PLP2 C1678A、PLP2 H1836A、PLP2 D1849A (各 1 μ g) 共同转染 293T 细胞, 28 h 后, 收集细胞裂解液, 进行 Western blot 检测, 利用抗 Myc (1:1 000)抗体检测 ISG 化蛋白条带, 同时检测 PLP2 及突变体的表达情况, 并进行上样量的控制.

1.5 荧光素酶报告基因测定分析

将 IFN β 、NF- κ B、PRD(III-I)₄ 荧光素酶报告基因分别与 PLP1/PLP2 及其突变体共同转染 HEK293T 细胞, 同时转入海肾虫荧光素酶报告基因作为内参, 转染 24 h 后, 利用 100HAU/ml 的仙台病毒感染细胞, 18 h 后利用双荧光素酶报告基因测定试剂盒测定荧光素酶活性. 也可以利用信号蛋白 RIG-I/MAVS/ERIS/TBK1/IRF3 与 PLP1/PLP2 共同转染 HEK293T 细胞, 代替仙台病毒激活干扰素通路, 转染 28 h 后收集细胞并测定荧光素酶活性.

1.6 免疫共沉淀分析

将 HEK 293T 细胞种于直径 10 cm 的培养皿中, 细胞密度为 1×10^6 . 12 h 后, 将 Flag-ERIS, PLP2 共同转染 293T 细胞, 转染 28 h 后, 利用 1% Triton X-100, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl 并含有 cocktail 蛋白酶抑制剂的裂解液收集细胞, 于低温超速离心机离心 10 min (12 000 r/min), 取上清进行蛋白质定量, 取 500 μ g 蛋白质用于后续 IP 实验. 首先, 用普通 IgG 和 Agarose A+G 对蛋白质样品预处理 2 h, 离心 (3 000 r/min) 10 min, 弃沉淀. 向预处理过的蛋白质样品中加入抗 Flag 抗体, 于 4 $^{\circ}$ C 摇转仪反应过夜, 24 h 后, 加入 Agarose A+G 耦联抗体 6 h. 用裂解液洗涤珠子 2 次, 弃上清. 加入 2 $\times$ 样品缓冲液煮沸 10 min, 离心后上样, 进行 SDS-PAGE. 分别利用抗 V5, 抗 Flag 抗体检测 ERIS 拉下的 PLP2 和 ERIS 条带. 同时检测阳性裂解液中蛋白质表达情况. 在检测 PLP2 破坏 ERIS 和 RIG-I 泛素化修饰时, 将 HA-Ub、Flag-ERIS/Flag-RIG-I 和 PLP2 或 PLP2 突变体共同转染 293T 细胞, 24 h 后加入 MG132 处理 4 h, 再收集细胞进行后续免疫沉淀,

并利用抗 HA 抗体检测泛素化的蛋白质条带, 同时用特异性抗体检测其他蛋白质的表达情况.

1.7 免疫荧光染色分析

HeLa 细胞被种于 8 孔暗格之中, 密度为 60%, 将 Flag-ERIS(0.5 μ g) 与 PLP2(0.5 μ g) 共同转染 HeLa 细胞, 转染 24 h 后进行免疫荧光染色. 首先, 利用 3.7% 甲醛固定细胞 30 min, 含有 10 mmol/L 甘氨酸的 PBS 洗涤 3 次后, 用 0.1% Triton X-100 的 PBS 通透 10 min. 其次, 为防止非特异性结合, 用含 5% 血清的 PBS 室温封闭 30 min. 去除封闭液后, 用抗 V5(1:200)和抗 Flag(1:50)的抗体室温孵育 2 h. 洗涤 3 次后, 用 Cy3 标记羊抗兔 IgG 抗体和羊抗鼠 Alexa Fluor 488 二抗避光孵育 1 h. 洗涤 4 次后用 DAKO 防淬灭剂包埋, 盖上盖玻片, 利用激光扫描共聚焦显微镜 LSM-510 进行镜检.

2 结 果

2.1 PLP2 是 NL63 冠状病毒编码的一种病毒来源去泛素化酶

人类新发冠状病毒 NL63 的非结构蛋白 nsp3 编码的木瓜样蛋白酶具有两个核心结构域, PLP1 和 PLP2 (图 1a). 在构建 PLP1、PLP2 的表达载体及酶活性缺失突变体 PLP1 C1062A、PLP1 H1212A、PLP2 C1678A 和 PLP2 H1836A 的基础上^[9], 又构建 PLP1 D1225A、PLP2 D1849A(图 1b).

已知 NL63 冠状病毒的木瓜样蛋白酶的核心结构域 PLP1 和 PLP2 中, PLP2 具有去泛素化酶活性^[9], 为进一步验证 PLP1 是否也具有去泛素化酶活性, 将 PLP1 及其突变体与泛素共同转染 293T 细胞, 通过 Western blot 检测, 发现 PLP1 及其突变体 PLP1 C1062A、PLP1 H1212A 均不能降低细胞中蛋白质的泛素化水平, 而 PLP2 则明显降低细胞蛋白质的泛素化修饰(图 1c). 同时对 PLP2 野生型和突变体 PLP2 C1678A、PLP2 H1836A 进行 DUB 活性检测, 结果显示, PLP2 C1678A 和 PLP2 H1836A 没有去泛素化酶活性, 而 PLP2 D1849A 仍保留去泛素化酶活性(图 1d). 以上说明, NL63 冠状病毒 PLP 的两个核心结构域中, 只有 PLP2 具有 DUB 活性, 而且 PLP2 的 DUB 活性不完全依赖其蛋白酶催化活性, 提示 PLP2 的 DUB 活性可能与其蛋白酶活性位点以外的结构元件有关.

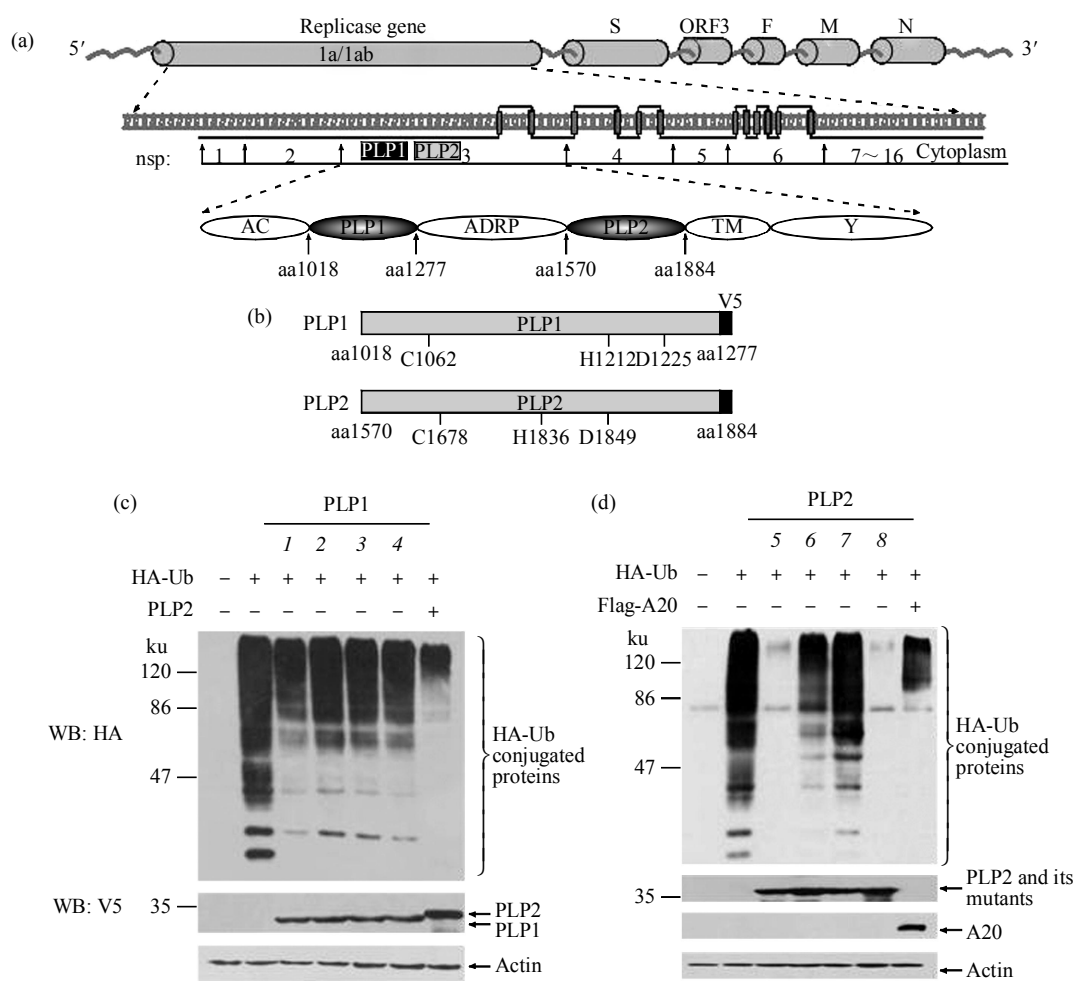


Fig. 1 PLP2, but not PLP1, has deubiquitination activities

(a) Schematic diagram illustrating HCoV-NL63 ORFs, the predicted processing of replicase polyproteins to nsp's. The conserved domains in nsp3: AC (acidic domain); PLP1; ADRP (ADP-ribose-1"-phosphatase); PLP2; TM (transmembrane domain) and Y (Y domain) are indicated. (b) Schematic representation of the core domain of PLP1 and PLP2 constructs used in the study. The catalytic sites of PLP1 and PLP2 are indicated. (c) Deubiquitination activity of PLP1 and its mutants. 1: PLP1 WT; 2: PLP1 C1062A; 3: PLP1 H1212A; 4: PLP1 D1225A. (d) Deubiquitination activity of PLP2 and its mutants. 5: PLP2 WT; 6: PLP2 C1678A; 7: PLP2 H1836A; 8: PLP2 D1849A.

2.2 PLP2 DUB 的底物特异性

泛素化修饰存在多种形式, 例如 K48 和 K63 连接的多聚泛素链修饰. 为验证 PLP2 对 K48 和 K63 连接的多聚泛素化修饰同样具有去泛素化酶活性, 将 UbK48 和 UbK63 分别与 PLP2 及突变体共同转染 293T 细胞, 28 h 后收集细胞裂解液, 进行 Western blot 检测, 发现 PLP2 对于 K48 和 K63 连接的多聚泛素化修饰均表现出明显的 DUB 活性. 而 PLP2 突变体除 PLP2 D1849A 对 K48 和 K63 连接的多聚泛素化修饰仍保留 DUB 活性外, PLP2 C1678A, PLP2 H1836A 与 PLP2 野生型相比, 对 K48 和 K63 连接的泛素化修饰均表现为较弱的 DUB 活性(图 2a, 2b), 作为阳性对照的 A20 也表现较强的 DUB 活性. 说明, 关于 K48 和 K63 连接的泛素化修饰, PLP2 DUB 活性仅对 C1678A、

H1836A 具有一定的依赖性.

生物中还存在多种类泛素分子, 它们与泛素分子的三级结构非常相似, 可以对蛋白质进行类泛素化修饰. 为检验 PLP2 对类泛素分子(Ubl)是否具有 DUB 活性, 我们将 Myc-ISG15 同 PLP2 及其 3 种酶活性缺失突变体共同转染 293T 细胞, 用抗 Myc 的抗体检测 ISG 化修饰的蛋白质条带, 结果显示, 与细胞去泛素化酶 A20 不同, PLP2 具有明显的去 ISG 活性, 且 PLP2 的突变体中只有 PLP2 D1849A 具有去 ISG 活性, 而 PLP2 C1678A、PLP2 H1836A 均失去了去 ISG 活性(图 2c). 提示 PLP2 是一种新型的去泛素化酶, 除作用于泛素外, 还作用于类泛素分子 ISG, 具有去 ISG(DeISGylation)活性, 而且该活性依赖于蛋白酶功能位点 C1678、H1836.

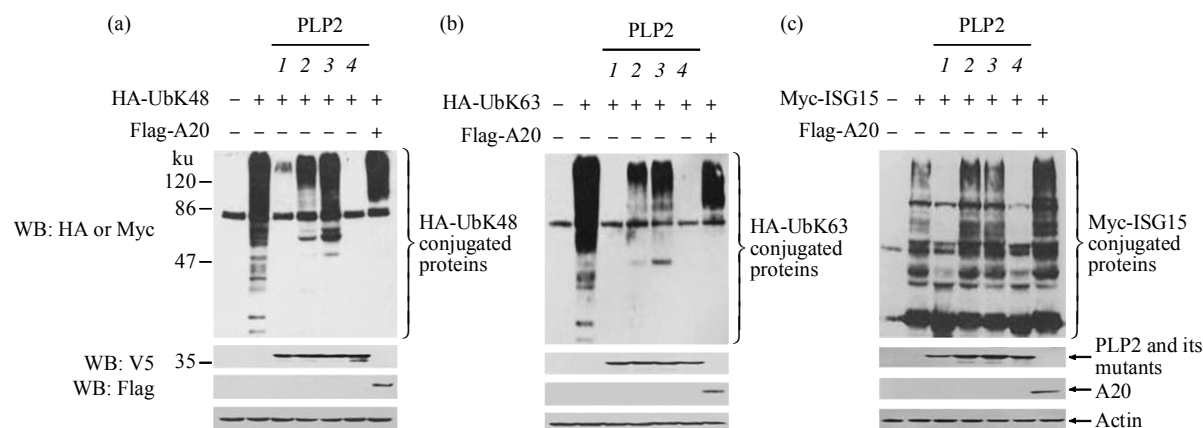


Fig. 2 PLP2-TM has DUB activity against both K48- and K63-linked polyubiquitin and DeISGylation activity dependent on its protease C1678A and H1836A catalytic activity

(a) Deubiquitinase activity of PLP2 for K48-linked poly-ubiquitin. (b) Deubiquitinase activity of PLP2 for K63-linked poly-ubiquitin. (c) DeISGylation activity of PLP2 and its mutants. 1: PLP2 WT; 2: PLP2 C1678A; 3: PLP2 H1836A; 4: PLP2 D1849A.

2.3 PLP2 是 NL63 冠状病毒编码的干扰素拮抗蛋白(IFN antagonism)

病毒感染细胞会引发一系列的自然免疫反应,而病毒往往通过各种方式逃逸或抑制宿主的抗病毒天然免疫反应。我们最近研究表明,同 SARS 冠状病毒一样,冠状病毒 NL63 感染细胞后只能引发微弱的天然免疫反应^[1]。我们推测 NL63 木瓜样蛋白酶核心结构域 PLP2 负调控宿主抗病毒天然免疫反

应。为验证这一假设,将 IFN β , NF- κ B, PRD(III-I)₄ 荧光素酶报告基因,同 PLP1、PLP2 及 PLP2 突变体共同转染 293T 细胞(以 TK 作为内参),转染 24 h 后,仙台病毒感染细胞激活干扰素通路,通过双荧光素酶活性测定,阐明 PLP 对 IFN β 、NF- κ B、IRF3(PRD(III-I)₄)表达的影响。结果显示,NL63 冠状病毒木瓜样蛋白酶的核心结构域 PLP1 及其突变体均不抑制干扰素的表达(图 3a),而 PLP2 明显

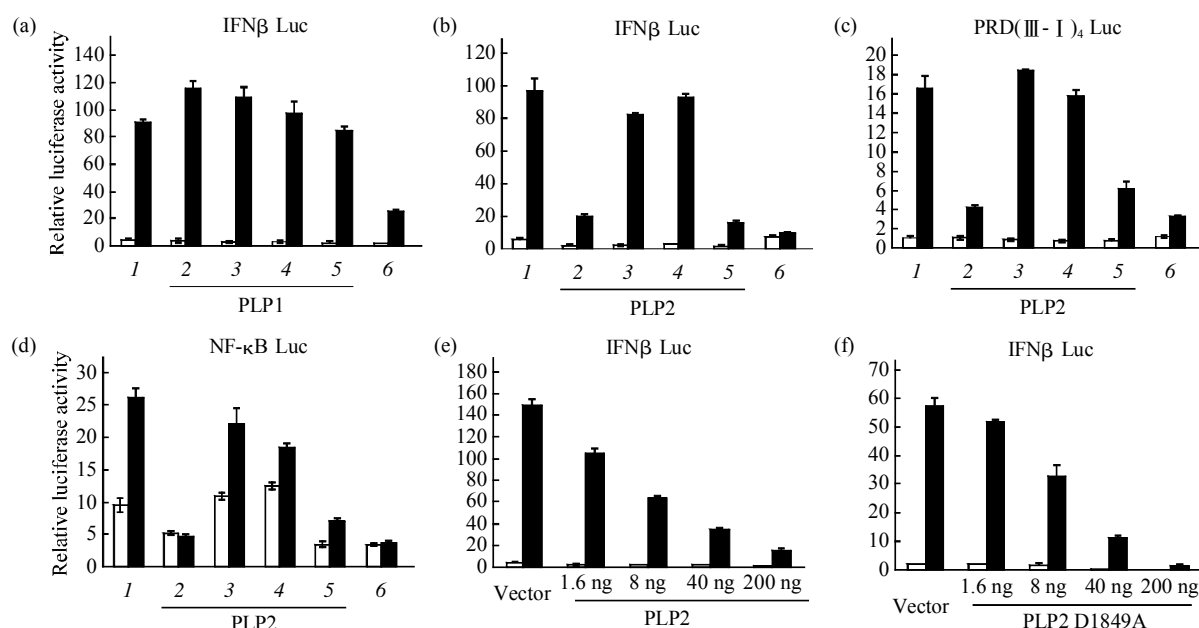


Fig. 3 Negative regulation of antiviral innate immunity responses by HCoV-NL63 PLP2

(a) PLP1 don't inhibit IFN β expression. 1: Vector; 2: PLP1 WT; 3: PLP1 C1062A; 4: PLP1 H1212A; 5: PLP1 D1225A; 6: PLP2. (b) PLP2 and its mutants inhibit IFN β expression activated by SenV infection. 1: Vector; 2: PLP2 WT; 3: PLP2 C1678A; 4: PLP2 H1836A; 5: PLP2 D1849A; 6: A20. (c) PLP2 and its mutants inhibit IRF3-dependent IFN expression activated by SenV infection. 1: Vector; 2: PLP2 WT; 3: PLP2 C1678A; 4: PLP2 H1836A; 5: PLP2 D1849A; 6: A20. (d) PLP2 and its mutants inhibit NF- κ B-dependent expression activated by SenV infection. 1: Vector; 2: PLP2 WT; 3: PLP2 C1678A; 4: PLP2 H1836A; 5: PLP2 D1849A; 6: A20. (e) PLP2 has a dose-dependent activity in inhibiting IFN β expression. (f) PLP2 D1849A has a dose-dependent activity in inhibiting IFN β expression. □: MOCK; ■: SenV.

抑制干扰素的表达, 当对 PLP2 位点 D1849 突变后, 其抑制干扰素表达的活性不受影响, 但是对 PLP2 C1678 和 PLP2 H1836 突变后对其干扰素表达抑制活性有一定影响(图 3b). 此外, PLP2 对于仙台病毒激活的 NF- κ B, IRF3 (PRD(III-I)₄ 为报告基因) 的表达也呈现抑制作用, 位点 C1678 和 H1836 对 PLP2 抑制天然免疫作用影响较大(图 3c, 3d). 可见, PLP2 是一种病毒编码的干扰素拮抗蛋白.

为探讨 PLP2 抑制干扰素表达的特异性, 将 IFN β 荧光素酶报告基因与不同剂量的 PLP2 及 PLP2 D1849A 共同转染 293T 细胞, 通过双荧光素酶活性测定发现, PLP2 和 PLP2 D1849A 抑制干扰素 β 的表达且存在明显的剂量效应(图 3e, 3f). 提示, PLP2 能够特异性抑制仙台病毒诱导的干扰素 β 表达. 另外, 我们最新发现 PLP2 C1678A 和 PLP2 H1836A 对 RIG-IN 激活的干扰素通路同样呈现抑制作用, 且存在剂量效应^[11]. 以上结果表明, PLP2 是一种干扰素拮抗剂, 而且该拮抗作用不严格依赖其蛋白酶活性, PLP2 C1678A 和 PLP2 H1836A 对干扰素表达的抑制作用明显弱于野生型和 PLP2 D1849A, 说明 C1678A 和 H1836A 对于 PLP2 的干扰素拮抗作用具有一定的影响.

2.4 PLP2 抑制 RIG-I 和 ERIS 激活的干扰素表达信号通路

为进一步探讨 PLP2 抑制干扰素表达的作用机制, 挑选信号通路中的一系列信号蛋白(RIG-I、IPS-1、ERIS、TBK1)等进行研究. 其中 RIG-I 为细胞质中的模式识别受体, 通过识别病毒 RNA 的 5'三磷酸区分自我和非我, 启动天然免疫反应, 而 TRIM25 介导 RIG-I 的泛素化修饰利于 RIG-I 和衔接蛋白 IPS-1 间的 CARD 区同型互作^[14]; ERIS (endoplasmic reticulum (ER) IFN stimulator, 也叫 MITA/STING)是最新发现的定位于内质网膜或线粒体膜上的干扰素刺激因子, N 端具有信号肽及 4~5 个跨膜域, 在外界刺激或 TBK1/IKK ϵ 过表达后, ERIS 会进行一系列翻译后修饰(二聚化、泛素化及磷酸化)进而促进 I 型干扰素的表达^[15-18]. 将干扰素通路中的关键信号分子(RIG-I/IPS-1/ERIS 等)同 IFN β 荧光素酶报告基因共同转染 293T 细胞. 分别设立 PLP2 实验组(转染 PLP2)和 MOCK 组(不转染 PLP2). 通过双荧光素酶活性测定发现, 空载体样品中, PLP2 组比 MOCK 组抑制了 86.46%倍, 而 RIG-IN、ERIS 样品中, PLP2 组比 MOCK 组分别抑制了 98.96%和 89.6%倍(图 4a). 可见 PLP2 抑制

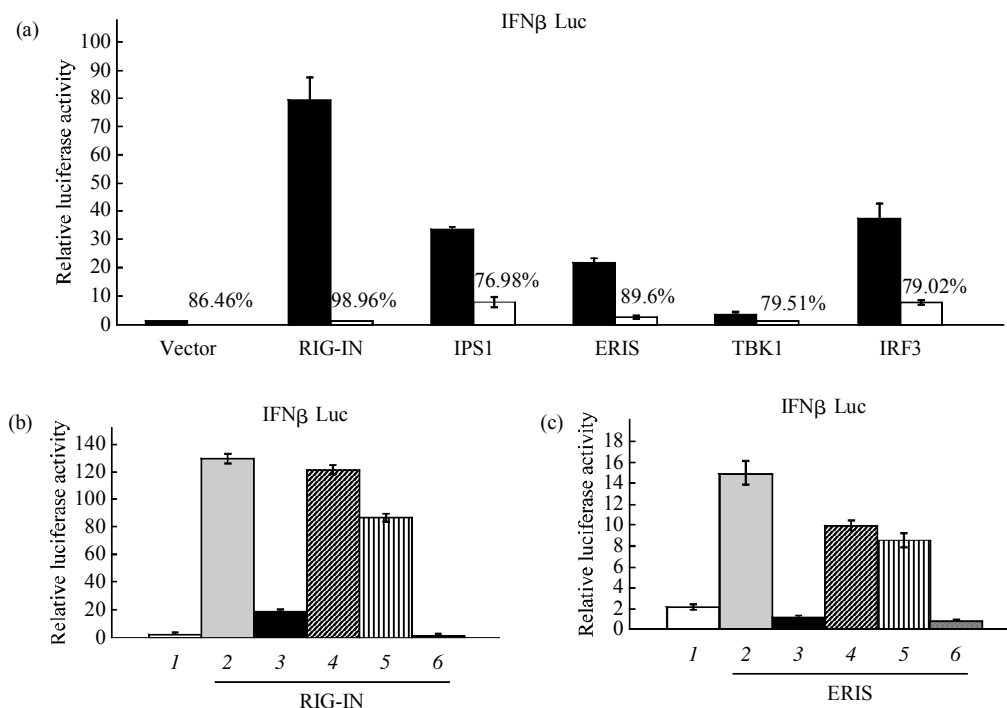


Fig. 4 PLP2 and its mutants modulate IFN expression pathway activated by the key regulation proteins

(a) PLP2 inhibits IFN expression by acting on the points of RIG-I and ERIS/STING. ■: MOCK; □: PLP2. (b) PLP2 and its mutants inhibit RIG-I-mediated IFN expression. (c) PLP2 and its mutants inhibit ERIS/STING-mediated IFN expression. 1: Mock; 2: Vector; 3: PLP2; 4: PLP2 C1678A; 5: PLP2 H1836A; 6: PLP2 D1849A.

RIG-I、ERIS 激活的干扰素表达。

此外,为进一步确认 PLP2 对 RIG-I、ERIS 激活的干扰素表达,将干扰素荧光素酶报告基因同 PLP2 及突变体共同转染 293T 细胞,同时利用 RIG-IN 和 ERIS 分别激活干扰素通路。发现 PLP2 野生型和 PLP2 D1849A 明显抑制 RIG-I、ERIS 激活的干扰素表达,而 PLP2 C1678A,PLP2 H1836A 对干扰素的抑制作用相对较弱(图 4b, 4c)。以上实验证实,PLP2 抑制 RIG-I 和 ERIS 激活的干扰素表达,且这种抑制作用不完全依赖其蛋白酶催化活性。

2.5 PLP2 通过对 RIG-I 和 ERIS 的去泛素化作用负调控宿主干扰素表达信号通路

究竟 PLP2 如何调控 RIG-I 和 ERIS 激活的干

扰素通路?我们推测 PLP2 与 RIG-I 和 ERIS 相互作用抑制干扰素的表达。为证实这一假设,将 RIG-I 和干扰素刺激因子 ERIS 分别与 PLP2 共同转染 293T 细胞。利用免疫荧光技术和免疫共沉淀技术,同时证明 PLP2 确实分别与 RIG-I、ERIS 发生相互作用(图 5a, 5b, 5c)。那么 PLP2 究竟如何通过 RIG-I 和 ERIS 相互作用发挥干扰素拮抗功能?由于泛素化修饰在信号通路调控中具有重要作用,而 RIG-I 和 ERIS 同是通过泛素化修饰的^[14, 16]。PLP2 是否利用其 DUB 活性与 RIG-I、ERIS 相互作用?分别将 RIG-I、ERIS 同泛素及 PLP2 共同转染 293T 细胞,利用免疫共沉淀证实:PLP2 通过去除 RIG-I 和 ERIS 泛素化修饰负调节天然免疫反应(图 5d, 5e)。

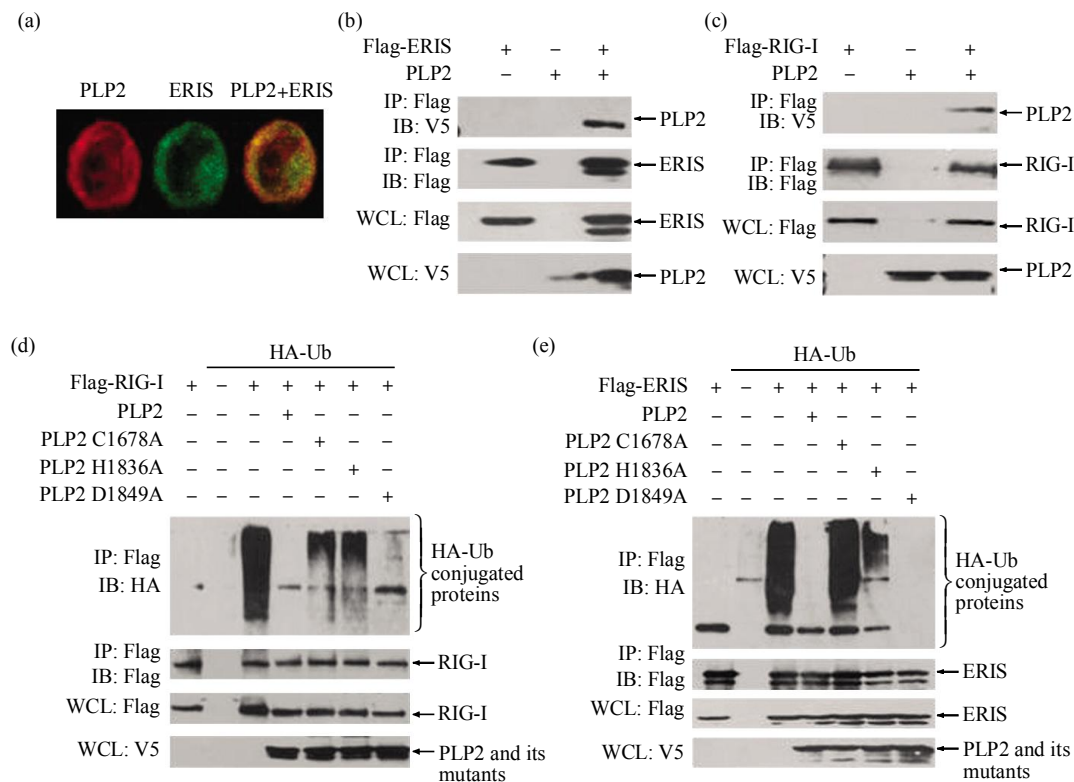


Fig. 5 PLP2 inhibits IFN expression by interacting with and deubiquitinating ERIS/STING

The interaction between PLP2 and ERIS/STING assayed by immunofluorescence (a) and coimmunoprecipitation (b). (c) PLP2 interacts with RIG-I detected by coimmunoprecipitation. PLP2 deubiquitinates the ubiquitination of RIG-I (d) and ERIS/STING (e) dependent on C1678 and H1836 catalytic residues, but not dedepend on D1849 catalytic site.

3 讨 论

抗感染免疫是机体免疫系统识别和清除病原体的一种生理性防御机制。病毒一旦侵染机体会触发

免疫系统产生免疫防御应答,其中天然免疫反应是抗病毒感染第一道防线。近年来随着抗病毒天然免疫中模式识别分子的发现和识别机制的研究,对病毒天然免疫的分子识别和调节机制等方面有了深

入的认识. 病毒通过多种机制逃逸宿主天然免疫反应. 泛素化-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome system, UPS)在天然免疫反应中具有重要作用, 病毒通常会利用泛素化-去泛素化体系调控宿主天然免疫反应. 例如, Gack 等^[19]研究发现, A 型流感病毒编码的 NS1 与 TRIM25 的 CCD 相互作用抑制 TRIM25 的多聚化, 从而破坏 RIG-I 中 CARD 结构域的泛素化, 最终阻止 RIG-I 与 IPS-1 间互作并影响信号的传递. 人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, RSV)编码的 NS1、NS2 蛋白通过介导 STAT2 的降解从而下调干扰素信号通路^[20]. Zheng^[21]等指出, MHV A59 nsp3 编码的 PLP2 通过阻止 IRF3 的泛素化及核转入抑制宿主抗病毒天然免疫反应. 人类去泛素化酶 CYLD 破坏 RIG-I、TBK1 和 IKK ϵ 的泛素化, 而另一种人类去泛素化酶 DUBA 作用于 TRAF3 的泛素化修饰, 最终负调节抗病毒天然免疫反应^[22-23].

病毒在进化过程中通过编码多功能蛋白, 一方面调控病毒自身复制, 另一方面通过特定病毒蛋白逃逸或抑制宿主抗病毒天然免疫反应. 冠状病毒编码的木瓜样蛋白酶 PLP 就是最近发现的一种多功能蛋白酶. 木瓜样蛋白酶 PLP 除具有经典的蛋白酶活性外, 最近研究发现还具有其他方面的功能. Frieman 等^[24]证实, SARS 编码的 PLpro 具有干扰素拮抗活性, 去除催化位点上游的 Ubl 结构域后, PLpro 丧失干扰素拮抗活性但仍保留 DUB 活性. 我们的研究证实^[7], SARS 冠状病毒 PLpro 蛋白酶通过与 IRF3 相互作用, 阻止 IRF3 的磷酸化、二聚化及核转入从而拮抗 IFN 表达, 但是不能阻碍 NF- κ B 激活的 IFN 表达通路. 此外, 利用药理学途径分析表明, 抑制 PLP 蛋白酶活性和 DUB 活性后, 不会改变依赖于 IRF3 报告基因的拮抗作用, 但是影响依赖 NF- κ B 的拮抗作用^[11].

前期研究表明^[9], 人类新发冠状病毒 NL63 木瓜样蛋白酶 PLP 也是一种多功能蛋白酶, 其核心结构域 PLP2 具有 DUB 活性. 由于 NL63 冠状病毒的 nsp3 上含有两个具有蛋白酶活性的核心结构域 PLP1 和 PLP2^[9], 目前对其除了蛋白酶活性外的其他生物学特性和功能还不很清楚. 为进一步阐释 PLP2 DUB 活性的特性及调控宿主的天然免疫反应作用机制, 以冠状病毒 NL63 木瓜样蛋白酶 PLP 为研究对象, 本研究证实 PLP 两个核心结构域中, PLP2 核心结构具有去泛素化酶活性. 同时, PLP2 D1849A 突变体仍具有去泛素化酶活性, 相

反, C1678A 和 H1849A 突变均对 PLP2 DUB 活性产生明显抑制作用. 提示 PLP2 蛋白酶的 DUB 活性并不完全依赖于其蛋白酶催化活性, 其中 C 和 H 既是蛋白酶功能位点, 也是其 DUB 活性的关键位点.

由于冠状病毒 NL63 感染细胞仅诱发微弱的干扰素反应, 那么冠状病毒 NL63 木瓜样蛋白酶核心结构 PLP2 是否同冠状病毒 SARS 的 PLpro 一样负调控干扰素表达? 通过实验发现, PLP 两个核心结构域中, PLP2 核心结构具有抑制宿主 IFN 表达生物活性. PLP2 负调节干扰素 β 的表达, 随着 PLP2 表达量的增多, 抑制干扰素效果越明显; 同时, 除 PLP2 D1849A 突变体同 PLP2 野生型一样明显抑制干扰素表达外, PLP2 C1678A 和 PLP2 H1849A 突变体抑制干扰素效果不明显, 只有当突变体表达量增加后, 其抑制效果才逐渐显现. 这些数据表明, 一方面, PLP2 是一种病毒来源的新的干扰素拮抗剂, 且该拮抗活性不严格依赖其蛋白酶活性, 另一方面, PLP2 C1678A、PLP2 H1836A 在丧失 DUB 活性外仍然微弱地抑制干扰素表达, 可见 PLP2 的 DUB 活性与其干扰素拮抗活性具有一定的相关性, 但是除 DUB 活性外, PLP2 可能还存在抑制干扰素活性的其他结构元件或者通过其他机制抑制宿主 IFN 表达.

为进一步探索 PLP2 负调控天然免疫反应机制, 利用一系列天然免疫反应通路中的信号蛋白(包括识别蛋白 RIG-I, 衔接蛋白 IPS-1, 重要干扰素刺激因子 ERIS, 激酶 TBK1 等)激活干扰素 β 的表达, 发现 NL63 木瓜样蛋白酶核心结构域 PLP2 抑制 RIG-I、ERIS 激活的干扰素 β 表达, 而且这种抑制不完全依赖其蛋白酶活性. 究竟 PLP2 是如何通过与 RIG-I 和 ERIS 的相互作用达到负调节天然免疫的作用? 我们推测 PLP2 通过破坏 RIG-I 和 ERIS 的泛素化抑制干扰素表达. 实验证实, PLP2 与 RIG-I、ERIS 确实存在相互作用. 同时发现 PLP2 能够对 IFN 表达信号通路中重要蛋白 RIG-I、ERIS 发生去泛素化. 这一发现提示了冠状病毒 PLP 蛋白酶负调节宿主抗病毒天然免疫反应的一种新机制.

综上所述, 本文证实了人类新发冠状病毒 NL63 PLP 是一种多功能蛋白酶, PLP1 和 PLP2 两个核心结构域除具有蛋白酶切割活性外, 其中核心结构域 PLP2 还具有 DUB 活性, 同时 PLP2 也作为一种病毒编码的干扰素拮抗剂参与调控宿主抗病毒天然免

疫反应. 以上研究对阐明人类新发冠状病毒免疫和致病机理以及抗病毒药物研发具有重要参考价值.

参 考 文 献

- [1] Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink M F, *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, 2004, **10**(4): 368-373
- [2] Dijkman R, Van der Hoek L. Human coronaviruses 229E and NL63: close yet still so far. *J Formos Med Assoc*, 2009, **108**(4): 270-279
- [3] Hofmann H, Pyrc K, Van der Hoek L, *et al.* Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(22): 7988-7993
- [4] Pyrc K, Berkhout B, Van der Hoek L. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J Virology*, 2007, **81**(7): 3051-3057
- [5] Barral P M, Sarkar D, Fisher P B, *et al.* RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology*, 2009, **391**(2): 171-176
- [6] Neznanov N, Chumakov K M, Neznanova L, *et al.* Proteolytic cleavage of the p65-RelA subunit of NF-kappaB during poliovirus infection. *J Biol Chem*, 2005, **280**(25): 24153-24158
- [7] Barretto N, Jukneliene D, Ratia K, *et al.* The papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus has deubiquitinating activity. *J Virology*, 2005, **79**(24): 15189-15198
- [8] Devaraj S J, Wang N, Chen Z B, *et al.* Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the Papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem*, 2007, **282**(44): 32208-32221
- [9] Chen Z B, Wang Y H, Baker S C, *et al.* Proteolytic processing and deubiquitinating activity of papain-like protease of human coronavirus NL63. *J Virology*, 2007, **81**(11): 6007-6018
- [10] 孙莉, 刘殿波, 杨宇东, 等. 人类冠状病毒调节宿主抗病毒天然免疫分子机制. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(2): 1-6
Sun L, Liu D B, Yang Y D, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(2): 1-6
- [11] Clementz M A, Chen Z B, Banach B S, *et al.* Deubiquitinating and interferon antagonism activities of 3 coronavirus papain-like proteases. *J Virology*, 2010, **84**(9): 4619-4629
- [12] Evans P C, Ovaa H, Hamon M, *et al.* Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *J Biol Chem*, 2004, **378**(3): 727-734
- [13] Zhao C, Denison C, Huibregtse J M, *et al.* Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(29):10200-10205
- [14] Nakhaei P, Genind P, Civasd A, *et al.* RIG-I-like receptors: Sensing and responding to RNA virus infection. *Semin Immunol*, 2009, **21**(4): 215-222
- [15] Zeng W W, Chen Z J. MITAgating viral infection. *Immunity*, 2008, **29**(4): 513-515
- [16] Sun W X, Li Y, Chen L, *et al.* ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(21): 8653-8658
- [17] Zhong B, Yang Y, Li S, *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*, 2008, **29**(4): 538-550
- [18] Ishikawa H, Barber G N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, 2008, **455** (7213): 674-678
- [19] Gack M U, Albrecht R A, Urano T, *et al.* Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host & Microbe*, 2009, **5**(5): 439-449
- [20] Ling Z H, Tran K C, Teng M N. Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I. *J Virology*, 2009, **83**(8): 3734-3742
- [21] Zheng D H, Chen G, Guo B C, *et al.* PLP2, a potent deubiquitinase from murine hepatitis virus, strongly inhibits cellular type I interferon production. *Cell Research*, 2008, **18**(11): 1105-1113
- [22] Friedman C S, O'Donnell M A, Legarda-Addison D, *et al.* The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Reports*, 2008, **9**(9): 930-936
- [23] Kayagaki N, Phung Q, Chan S, *et al.* DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science*, 2007, **318**(5856): 1628-1632
- [24] Frieman M, Ratia K, Johnston R E, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF- κ B signaling. *J Virology*, 2009, **83**(13): 6689-6705

Deubiquitinase Activity and Regulation of Antiviral Innate Immune Responses by Papain-like Proteases of Human Coronavirus NL63*

SUN Li**, YANG Yu-Dong**, LIU Dian-Bo, XING Ya-Ling, CHEN Xiao-Juan, CHEN Zhong-Bin***

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract So far there are at least five coronaviruses that are responsible for human respiratory infections. The pathogenesis and immunity of coronavirus are the result of interaction between virus and host. The innate immune response will be started when coronaviruses infect cells. Coronaviruses usually encode multifunctional proteins that are critical for viral replication and blocking the innate immune response to viral infection. Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63), a new-emerging human coronavirus for human respiratory infections, has two papain-like protease (PLP) core domains, PLP1 and PLP2, in nonstructural protein nsp3. Besides the proteolytic processing activity towards pp1a(1ab), it was previously demonstrated that PLP2 of HCoV-NL63 has *in vitro* deubiquitinase (DUB) activity. However, the characteristics and functions of DUB activity of NL63 coronavirus PLPs are poorly understood. It was first demonstrated that the core domain of PLP2, but not PLP1, has *in vivo* DUB activity, and the DUB activity is not dependent on the catalytic residue of D1849. However, the PLP2 DUB activity is significantly reduced when the catalytic sites of C1678 and H1836 were mutated. PLP2 has both *in vivo* DUB and DeISGylation activity, and PLP2 exhibits DUB activity toward ubiquitinated branched peptides without any specificity for either Lys⁴⁸ linkages or Lys⁶³ linkages. Furthermore, PLP2, but not PLP1, is the only core domain responsible for the inhibition of both RIG-I and TLR3-dependent induction of IFN α/β expression. Mechanism study demonstrated that PLP2 interacts with the key regulation players of RIG-I and ERIS (also called STING/MITA) of IFN induction pathway, and induces the deubiquitination of RIG-I and ERIS. Overall, these results definitely demonstrated that for the two core domains of PLP responsible for proteolytically processing of N-terminal part of pp1a(1ab) of NL63 coronavirus, PLP2 is the only core domain of PLPs that responsible for DUB activity and IFN antagonists. The studies are currently underway to determine the biological significance of DUB of NL63 coronavirus PLP2 in virus replication and pathogenesis.

Key words coronavirus NL63, papain-like protease, deubiquitinase, IFN antagonist, ERIS/STING

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00111

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30870536, 30972761), National S&T Major Project (2008ZX10004-015), The Beijing Municipal Natural Science Foundation (7092075) and The Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry.

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-10-66930297, Fax: 86-10-88272105, E-mail: chenzhongbin@yahoo.com, chenzb@bmi.ac.cn

Received: March 13, 2010 Accepted: May 5, 2010