

ZAP融合蛋白抑制 HIV 病毒模型的构建及功能分析*

李志强 刘利新 吕凤祥 马 静 高光侠**

(中国科学院生物物理研究所感染与免疫中心, 北京 100101)

摘要 ZAP 是一种抗病毒因子, 能够特异性结合病毒 RNA 并招募细胞中的 RNA 酶降解所结合的靶 RNA, 从而抑制某些病毒的复制, 如鼠白血病毒 (MLV)、辛德比斯病毒 (SIN). ZAP 对 HIV 病毒抑制作用并不明显. Tat 和 Rev 是 HIV 编码的两种可以特异性结合 HIV RNA 的蛋白质, 将它们与 ZAP 构建成融合蛋白, 使得融合蛋白通过 Tat 或 Rev 结合 HIV RNA 并通过 ZAP 降解 HIV RNA, 从而抑制 HIV 假病毒载体携带基因的表达. 这一结果为抑制 HIV 病毒提供了一个新思路, 也支持了 ZAP 招募 mRNA 降解机器降解靶 RNA 的模型.

关键词 ZAP, HIV, Tat/Rev, 融合蛋白, mRNA 降解

学科分类号 Q71

HIV 病毒是一种逆转录病毒, 其基因组 RNA 是病毒遗传信息的携带者, 病毒 RNA 也是翻译病毒蛋白的模板. 在 HIV 复制过程中, 病毒自身编码的 Tat 蛋白发挥着重要作用. Tat 是一种 RNA 结合蛋白, 能够特异性结合到 HIV 病毒 RNA 上的 TAR (transactivation response element) 序列. 通过与 P-TEFb (positive elongation factor b) 中的 cyclin 亚基的相互作用, Tat 招募 CDK9 (cyclin-dependent kinase 9) 完成对 RNA 聚合酶 II C 端的磷酸化, 使之完成从起始转录到转录延伸功能的转变, 增强病毒各种基因的转录^[1]. Rev 是 HIV 病毒自身编码的另一种辅助蛋白, 可以特异性地结合到 HIV 病毒 RNA 上的 RRE (Rev response element) 序列, 在 GTP 酶 RAN、入核因子 Importin- β 和亮氨酸富集出核信号 (NES) 的受体 CRM1 等细胞因子的共同作用下, 使未剪接或未完全剪接的 RNA 出核进入细胞质^[2], 并可增强 HIV RNA 的稳定性, 促进 RNA 的翻译^[3~5].

ZAP (zinc-finger antiviral protein) 是通过高通量功能基因组筛选的方法从大鼠 cDNA 文库中筛选到的宿主抗病毒因子, 含有 4 个 CCCH 型的锌指结构, 能够特异性抑制某些病毒的复制^[6], 如鼠白血病毒 (murine leukemia virus, MLV)、辛德比斯病毒 (sindbis virus, SIN), 但对 HIV 病毒抑制作

用并不明显. ZAP 作用机理的研究结果表明, ZAP 本身不具有 RNA 酶的活性, 但是能特异性结合到病毒 RNA 的特定序列上^[7], 并招募细胞内具有降解 RNA 功能的蛋白质复合物而特异性地降解所结合的 RNA.

本研究中, 我们将 Tat 或 Rev 与 ZAP 融合, 期望融合蛋白能够通过 Tat 或 Rev 特异性结合 HIV RNA, 并通过 ZAP 招募核酸外切酶复合体实现对所结合 RNA 的降解. 通过对比不同融合蛋白的功能, 找到了 2 个对 HIV 假病毒载体携带基因 (*luc*, 荧光素酶基因) 的表达有抑制作用的融合蛋白 ZAP-Tat 和 ZAP-Rev. 免疫荧光染色实验证明, ZAP-Tat 和 ZAP-Rev 都分布在细胞质内. 这一结果为抑制 HIV 提供了一种新方法, 同时也为我们提出的 ZAP 作用机制提供进一步的支持证据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验所用试剂. 细胞培养所用 DMEM、胎牛

*国家自然科学基金资助项目(30470092).

** 通讯联系人. Tel: 010-64888545, Fax: 010-64877837

E-mail: gaogx@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2006-06-13, 接受日期: 2006-06-27

血清和双抗(青霉素和链霉素)购自 Hyclone 公司. 转染细胞所用 Fugene 6 购自 Roche 公司, Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司. 荧光素酶活性分析所用报告底物及海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK 购自 Promega 公司. 抗 myc 鼠单克隆抗体 9E10 购自 Santa Cruz 公司. 辣根过氧化物酶偶联的 Anti-Mouse IgG, FITC 偶联的 Anti-Mouse IgG 和 DAPI 购自 Promega 公司.

1.1.2 实验所用质粒. pcDNA4/TO/myc-His B 购自 Invitrogen 公司. pCMVTat、pCMVRev、pHR'-CMV-luc 和 pHR'-luc 的构建在前人的工作中已被描述过^[8-10], 以上 4 种质粒由中国科学院生物物理研究所唐宏研究员惠赠. pcDNA4-ZAP-myc、pcDNA4-NZAP-myc 和 pcDNA4-CZAP-myc 是本实验室构建的质粒^[9].

1.2 实验方法

1.2.1 质粒构建.

a. 融合蛋白表达载体的构建. pcDNA4-ZAP-myc、pcDNA4-NZAP-myc 和 pcDNA4-CZAP-myc 分别用于在哺乳类细胞中表达 ZAP、NZAP 和 CZAP. NZAP 代表 ZAP 的 N 端截短体, 含有全长 ZAP 的 1~254 位氨基酸; CZAP 代表 ZAP 的 C 端截短体, 含有全长 ZAP 的 236~776 位氨基酸. 为构建表达融合蛋白的载体, 首先在 pcDNA4-ZAP/NZAP-myc 中 ZAP/NZAP 的编码序列 C 端插入一段连接肽的编码序列, 生成 pcDNA4-ZAP/NZAPlinker-myc. 该连接肽含 23 个氨基酸, 核苷酸序列为 5' GGT GGA GGC TCT GGG GGA GGT ACA GGA GGT GGC TCA GGT GGG GGC ACT GGT GGA GGC AGT GGA GGT GGC 3', 编码的氨基酸序列为 GGGSGGGTGGGSGGG-TGGGSGGG. 然后以 pCMVTat 或 pCMVRev 为模板(pCMVTat、pCMVRev 的构建见文献[8, 10]) PCR 扩增出 Tat 或 Rev 编码序列并引入酶切位点, 将回收的 PCR 产物连至 pMD18-T 克隆载体, 测序正确后将目的片段亚克隆到 pcDNA4-ZAP/NZAPlinker-myc 中, 测序验证 ZAP/NZAP、linker 和 Tat 或 Rev 的编码序列是否位于同一读码框. 表达的蛋白质分别为 ZAP-Tat 和 NZAP-Tat, ZAP-Rev. 同样, 在 pcDNA4-ZAP/CZAP-myc 中 ZAP/CZAP 的编码序列 N 端插入一段连接肽的编码序列, 生成 pcDNA4-linkerZAP/CZAP-myc. 以 pCMVTat 和 pCMVRev 为模板, 分别 PCR 扩增出

Tat 和 Rev 的编码序列并引入酶切位点, 将回收的 PCR 产物连至 pMD18-T 克隆载体, 测序正确后将目的片段亚克隆到 pcDNA4-linkerZAP/CZAP-myc 中, 测序验证是否 ZAP/NZAP、linker 和 Tat/Rev 的编码序列位于同一读码框. 表达的蛋白质为 Tat-ZAP、Rev-ZAP、Tat-CZAP 和 Rev-CZAP.

b. HIV 假病毒报告载体的改造. 为检验融合蛋白对 HIV 的抑制作用, 我们将带有荧光素酶报告基因(luc)的 HIV 假病毒载体 pHR'-luc 进行了改造. 具体方法为: 以 pHR'-luc 质粒为模板(pHR'-CMV-luc 和 pHR'-luc 的构建见文献[9]), 扩增出含有 RRE 序列的片段并引入酶切位点 BamH I, 测序正确后将载体 pHR'-luc 和 PCR 产物用 BamH I 和 Not I 双酶切, 连接得到比 pHR'-luc 少了 SA 位点的报告载体 pHR'-luc(SA-). 同样以 pHR'-luc 为模板, 扩增出含有 SA 位点的一段序列并引入酶切位点 Not I, 载体 pHR'-luc(SA-)上的 Not I 酶切位点位于 RRE 序列上游, 将 pHR'-luc(SA-)和 PCR 产物用 Not I 酶切, 连接后测序验证插入片段方向正确与否, 得到报告载体 pHR'-RRE-luc.

1.2.2 荧光素酶活性分析. 为检测不同的融合蛋白对 HIV 假病毒载体的影响, 我们使用了双荧光素酶活性分析系统. 体系中 HIV 假病毒载体转录出的 mRNA 包含萤火虫荧光素酶基因编码序列, 经翻译后表达的萤火虫荧光素酶活性可视为 HIV 假病毒载体携带的基因表达量.

具体方法如下: 293 细胞于转染前 16~24 h 消化转入新培养皿, 磷酸钙转染时细胞密度应达到 30%~50%, Fugene6 转染时细胞密度应达到 60%~80%. 转染时更换新鲜培养基(不添加抗生素). 所用质粒比例为: 表达载体: 报告载体: 内参载体 pRL-TK=100:10:1(质量比). pRL-TK 含海肾荧光素酶基因. 转染后 8 h 换液, 用 PBS 缓冲液洗一次, 加入新鲜培养基(DMEM:FBS(胎牛血清):PS(青霉素和链霉素)=100:10:1(体积比)), 48 h 后收集细胞. 检测荧光素酶活性, 分别得到萤火虫荧光素酶和海肾(Renilla)荧光素酶的荧光值. 海肾荧光素酶的数值用来作为内参, 表明转染效率的高低; 萤火虫荧光素酶的数值作为报告参数, 表明在某一转染效率下报告基因表达量的高低. 萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的荧光值比值是将每组数值做归一化处理, 便于与某一标准值比较. 以空质粒 pcDNA4/TO/myc-His B 共转染组的萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶荧光值的比值作为对照, 其他组的

比值去除该值, 所得比值即为抑制倍数, 即: 抑制倍数 = 空质粒共转染组比值 / 功能蛋白共转染组比值. 每组实验均重复 3 次以上, 取平均值并求出标准偏差.

1.2.3 免疫荧光染色. 为观察融合蛋白定位, 我们将融合蛋白表达载体 pcDNA4-ZAP-Tat-myc 和 pcDNA4-ZAP-Rev-myc 分别转染 293 细胞. 8 h 后消化细胞转移到置入盖玻片的 24 孔培养皿中, 12 h 后吸走培养基, PBS 缓冲液洗 1 次. 用含有 4% 多聚甲醛的 PBS 溶液室温固定细胞 20~30 min, 再用含有 10% 甘氨酸的 PBS 溶液洗 3 次, 每次 10 min. 用 0.4% 的 Triton X-100 浸泡 10 min, 再用 PBS 溶液洗 3 次, 每次 10 min, 加入染色缓冲液 (含 10% FBS, 0.1% 吐温的 PBS 溶液) 封闭 5 min, PBS 洗 1 次. 加入含有适当浓度一抗(9E10)的染色缓冲液孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 10 min. 加入含有适当浓度 FITC 偶联的二抗(Anti-Mouse IgG)染色缓冲液孵育 45 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min.

加入 DAPI 染核, PBS 洗 3 次, 每次 10 min. 封片, 在激光共聚焦显微镜下观察结果.

2 实验结果

2.1 融合蛋白的表达

为了验证 ZAP 是否可以通过融合 HIV 的 RNA 结合蛋白的方式来降解 HIV RNA, 从而抑制 HIV, 我们以 ZAP 为基础, 在其 N 端或 C 端融合了 Tat 或 Rev, 构建了 Tat-ZAP、Tat-CZAP、Rev-ZAP、Rev-CZAP、ZAP-Tat、NZAP-Tat、ZAP-Rev 等一系列融合蛋白. 其中, Tat 或 Rev 位于融合蛋白 N 端的有 Tat-ZAP、Tat-CZAP、Rev-ZAP、Rev-CZAP, Tat 或 Rev 位于融合蛋白 C 端的有 ZAP-Tat、NZAP-Tat、ZAP-Rev (图 1a). 融合蛋白的表达载体经测序正确后, 用磷酸钙法转入 293T 细胞, 48 h 后收集细胞用于蛋白质印迹分析. 经检测, 融合蛋白在 293T 细胞中是表达的, 其蛋白质分子质量与预测的大小相符 (图 1b).

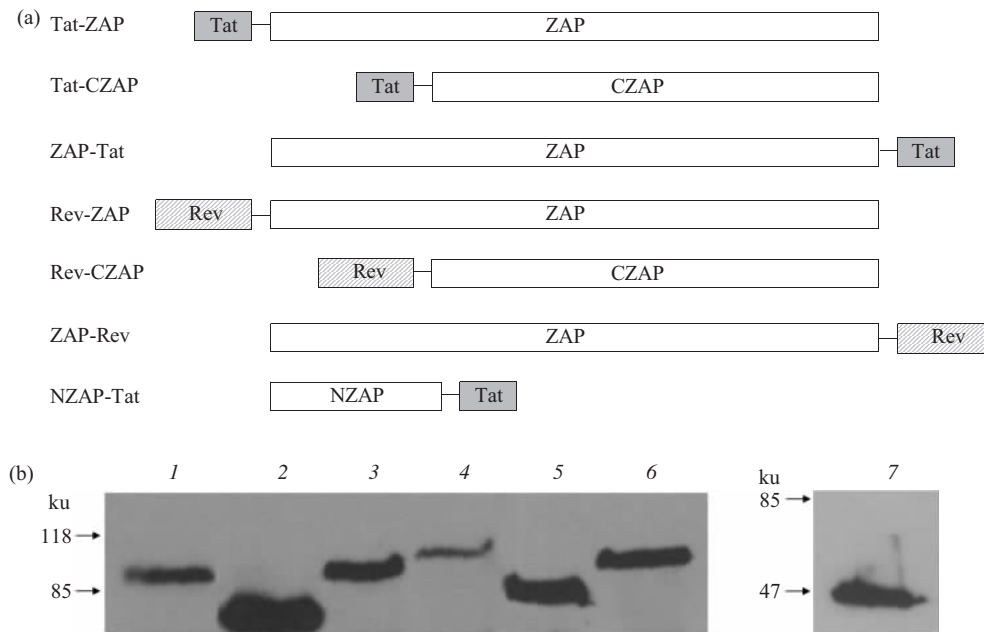


Fig. 1 Western blot analysis of fusion proteins

(a) Schematic representation of the fusion proteins used in this report. (b) Expression of the fusion proteins. 293T cells were transiently transfected with plasmids expressing the indicated proteins. 48 h later, cells were lysed and boiled in loading buffer for 5 min. The proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by Western blot using the 9E10 anti-myc antibody. 1: Tat-ZAP; 2: Tat-CZAP; 3: ZAP-Tat; 4: Rev-ZAP; 5: Rev-CZAP; 6: ZAP-Rev; 7: NZAP-Tat.

2.2 HIV 假病毒报告载体的改造

报告载体 pHR'-CMV-luc 和 pHR'-luc 是以 HIV 的基因组为骨架构建而成的, 含有 HIV 基因组的大部分序列 (图 2). 其中包括: 启动子 LTR, 为

HIV 的长末端重复序列; 剪接信号 SD 和 SA (SD: splicing donor; SA: splicing acceptor); Ga 序列, 为不完整的 Gag 编码区域, 产生了一个移码突变, 不能被翻译; RRE (Rev response element) 序列, 为

Rev蛋白的结合位点; 萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase)报告基因编码序列, 缩写为 *luc*; HIV RNA 的包装信号, 用符号 Ψ 表示. pHR'-CMV-*luc* 的萤火虫荧光素酶报告基因前还有一个 CMV 启动子. 因为 pHR'-CMV-*luc* 有 LTR 和 CMV 2 个启动子, 所以它可以转录生成 2 种 mRNA. CMV 启动子距离萤火虫荧光素酶基因较近, 且启动能力远大于 LTR, 所以绝大部分带有萤火虫荧光素酶的转录产物是 CMV 起始转录的, 这种转录产物的 mRNA 不含 5' 端的 LTR 和 RRE 序列, 只含 3' 端的 LTR 序列. 另一种以 LTR 作为启动子的 mRNA 只占一小部分, 这种 mRNA 含有 5' 端的 LTR, 但是没有 RRE 序列. pHR'-*luc* 报告载体的转录产物在核内未剪接时有 RRE 序列, 经剪接出核后不带 RRE 序列. 将 pHR'-*luc* 进行改造, 使之缺失 SA 位点或将 SA 位点移至 RRE 序列之前, 产生了 2 个新的报告载体 pHR'-*luc*(SA-)和 pHR'-RRE-*luc*. 新的报告载体转录产生的 mRNA 都含有 RRE 序列 (图 2).

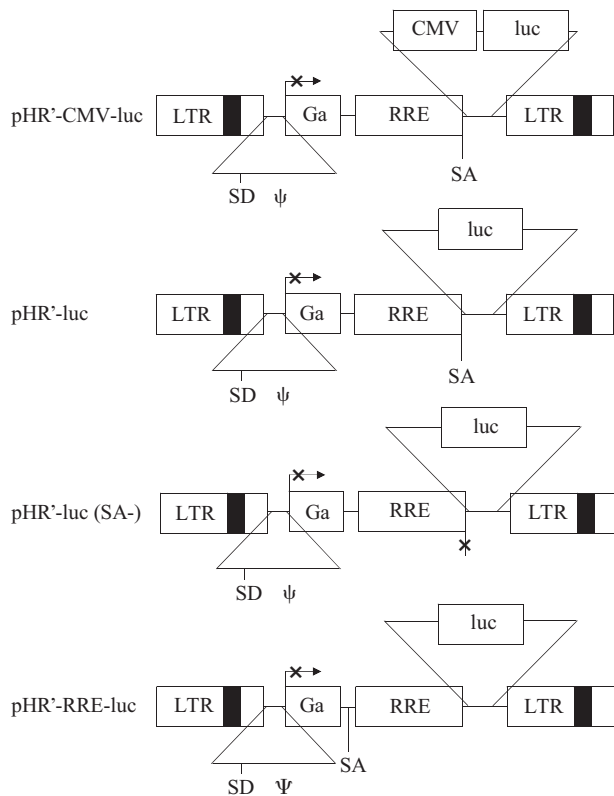


Fig. 2 Schematic structures of the reporter plasmids

Schematic representation of the reporters. LTR, the long terminal repeat of HIV; SD and SA, splicing donor and acceptor, respectively; Ga, the gag ORF disrupted by a frame shift; RRE, Rev response element; CMV, hCMV immediate early promoter; luc, firefly luciferase; Ψ , HIV-1 genomic RNA packaging signal.

2.3 融合蛋白 ZAP-Tat 对报告载体 pHR'-CMV-luc 表达的荧光素酶活性有明显抑制作用

为了检测带有 Tat 的融合蛋白对带有 TAR 序列的 mRNA 有何种影响, 将含有 Tat 序列的融合蛋白与报告载体 pHR'-CMV-*luc* 和内参质粒 pRL-TK 共转染 293 细胞, 48 h 后收集细胞检测荧光素酶活性. 以空质粒 pcDNA4/TO/myc-HisB 共转染组的萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的荧光值的比值作为对照, 其他组的比值去除该值, 所得比值即为抑制倍数, 即: 抑制倍数 = 空质粒共转染组比值 / 功能蛋白共转染组比值 (图 3).

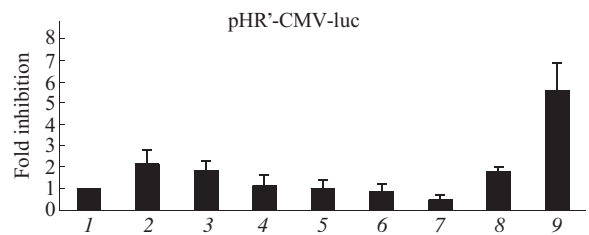


Fig. 3 Inhibitory activities of the Tat-fusion proteins on pHR'-CMV-luc

293 cells were transiently co-transfected with plasmids expressing the indicated proteins, and pHR'-CMV-*luc* and pRL-TK reporters. 48 h later, the cells were lysed and luciferase activities were measured. 1: pcDNA4; 2: ZAP; 3: NZAP; 4: CZAP; 5: TAT; 6: Tat-ZAP; 7: Tat-CZAP; 8: NZAP-TAT; 9: ZAP-TAT.

由图 3 可见, 在 pHR'-CMV-*luc* 作为报告载体的检测系统中, ZAP-Tat 对 pHR'-CMV-*luc* 载体表达的荧光素酶活性有 5 至 6 倍的抑制作用, 而其他融合蛋白对荧光素酶的活性没有明显抑制. ZAP、NZAP 和 CZAP 作为对照, 对荧光素酶的活性没有明显抑制.

同时, 我们还检测了带有 Tat 的融合蛋白对报告载体 pHR'-*luc* 的影响, 实验方法同上 (图 4).

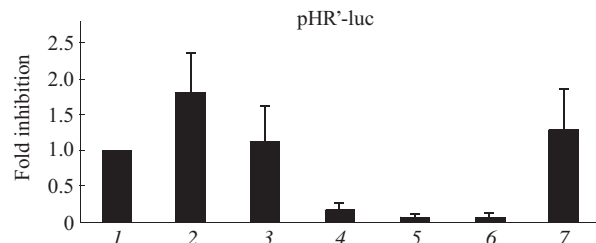


Fig. 4 Inhibitory activities of the Tat-fusion proteins on pHR'-luc

293 cells were transiently co-transfected with plasmids expressing the indicated proteins, and pHR'-*luc* and pRL-TK reporters. 48 h later, the cells were lysed and luciferase activities were measured. 1: pcDNA4; 2: ZAP; 3: CZAP; 4: Tat; 5: Tat-ZAP; 6: Tat-CZAP; 7: ZAP-Tat.

由图 4 可见，在 pHR'-luc 作为报告载体的检测系统中，Tat 对 pHR'-luc 载体表达的荧光素酶活性有明显的激活作用，而 N 端融合 Tat 的融合蛋白 Tat-ZAP 和 Tat-CZAP 甚至有比 Tat 更强的激活作用，ZAP-Tat 对荧光素酶活性没有明显的抑制。

2.4 融合蛋白 ZAP-Rev 对报告载体 pHR'-luc (SA-) 和 pHR'-RRE-luc 表达的荧光素酶活性有较强抑制作用

我们又尝试了 HIV RNA 的结合蛋白 Rev 用于融合蛋白。由于 Rev 的结合位点是 RRE 序列，故采用 mRNA 序列中带有 RRE 序列的报告载体 pHR'-luc(SA-)和 pHR'-RRE-luc。由于报告载体 pHR'-luc 转录出的 RNA 也是带有 RRE 序列的，只是发生剪接后 RRE 序列才丢失，而 ZAP 和 Rev 都是核质穿梭蛋白，那么融合后的蛋白质极有可能入核作用于

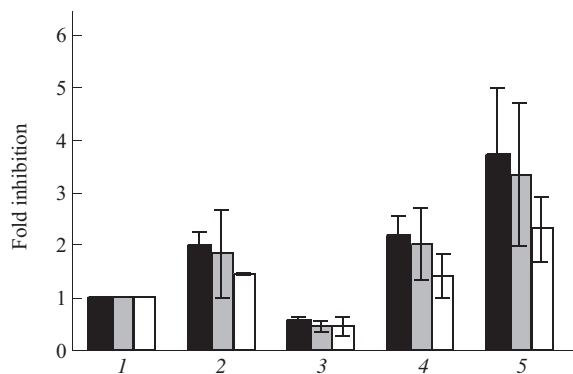


Fig. 5 Inhibitory activities of the Rev-fusion proteins on pHR'-luc (SA-), pHR'-RRE-luc and pHR'-luc

293 cells were transiently co-transfected with plasmids expressing the indicated proteins, pRL-TK and different reporter plasmids. 48 h after transfection, the cells were lysed and luciferase activities were measured. 1: pcDNA4; 2: ZAP; 3: Rev; 4: Rev-ZAP; 5: ZAP-Rev. ■: pHR'-luc (SA-); ▤: pHR'-RRE-luc; □: pHR'-luc.

未发生剪接的 RNA，所以我们同时应用了报告载体 pHR'-luc。将质粒共转入 293 细胞中，48 h 后收集细胞用于荧光素酶活性分析 (图 5)。

由图 5 可见，含有 Rev 的融合蛋白对 pHR'-luc (SA-)和 pHR'-RRE-luc 表达的荧光素酶活性的影响趋势几乎是一样的。C 端融合 Rev 的融合蛋白 ZAP-Rev 对 pHR'-luc(SA-)和 pHR'-RRE-luc 表达的荧光素酶活性均有 3 至 4 倍的抑制作用，而对 pHR'-luc 表达的荧光素酶活性有 2~3 倍的抑制作用。N 端融合 Rev 的融合蛋白 Rev-ZAP 与未融合 Rev 的蛋白 ZAP 相比，对荧光素酶活性影响没有明显变化。Rev 对荧光素酶活性有激活现象。

作为对照，我们还检测了 ZAP-Rev 对 pHR'-CMV-luc 表达的荧光素酶活性的影响 (图 6)。

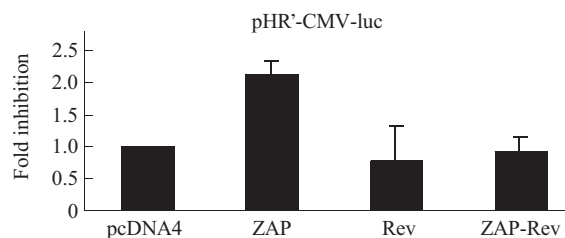


Fig. 6 Inhibitory activities of the Rev-fusion proteins on pHR'-CMV-luc

293 cells were transiently co-transfected with plasmids expressing the indicated proteins, pHR'-CMV-luc and pRL-TK. 48 h after transfection, the cells were lysed and luciferase activities were measured.

由图 6 可见，ZAP-Rev 对 pHR'-CMV-luc 表达的荧光素酶活性的影响与空白载体相差不多。

2.5 ZAP-Tat 和 ZAP-Rev 都定位于细胞质内

ZAP 是一种核质穿梭蛋白，在稳态下定位于细胞质中 [1]，从而可以招募细胞质中的核酸外切酶

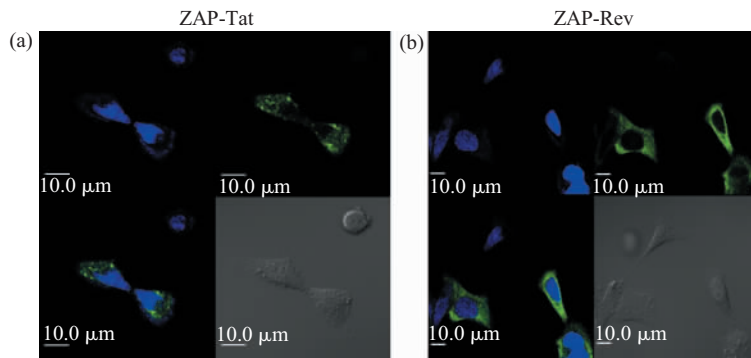


Fig. 7 The sub-cellular localization of ZAP-Tat and ZAP-Rev

293 cells were transfected with plasmids expressing the indicated proteins. Eight hours posttransfection, the cells were replated on 24-well chamber multiwell slides. The cells were grown for an additional 12 h and then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and probed with 9E10 anti-myc antibody and FITC-conjugated anti-mouse IgG, then stained with DAPI to mark the nuclei. The cells were visualized by confocal microscopy. (a) The sub-cellular localization of ZAP-Tat. (b) The sub-cellular localization of ZAP-Rev.

复合体介导 mRNA 的降解. 那么, 融合了 Tat 和 Rev 的 ZAP 蛋白是否会产生定位上的变化呢? 将 pcDNA4-ZAP-Tat-myc 和 pcDNA4-ZAP-Rev-myc 分别转染 293 细胞. 细胞转染后, 用抗 myc 的一抗 9E10 和带有荧光染料 FITC 的二抗依次杂交, 然后在荧光显微镜下观察. 图 7 为融合蛋白 ZAP-Tat-myc 和 ZAP-Rev-myc 在 293 细胞中表达后的免疫荧光分析图片. 图 7 中蓝色荧光显示为细胞核的位置, 绿色荧光显示为融合蛋白的定位. 由图 7 可见, 融合蛋白 ZAP-Tat 和 ZAP-Rev 都定位于细胞质, 其定位与 ZAP 蛋白的定位是相同的. 这说明 ZAP-Tat 和 ZAP-Rev 仍可能按照 ZAP 介导 RNA 降解的机制发挥作用.

3 讨 论

本文中, 我们将具有特异性降解 RNA 功能的 ZAP 蛋白与可结合 HIV RNA 的 Tat 和 Rev 蛋白进行了各种形式的融合, 通过荧光素酶活性检测, 寻找到了对 HIV 假病毒报告载体有抑制作用的两个蛋白质: ZAP-Tat 和 ZAP-Rev, 并发现 ZAP-Tat 和 ZAP-Rev 的定位与 ZAP 相同, 在稳态时都定位于细胞质内.

我们构建了 Tat-ZAP、Tat-CZAP、Rev-ZAP、Rev-CZAP、ZAP-Tat、NZAP-Tat、ZAP-Rev 等一系列融合蛋白, 比较不同的融合蛋白对不同报告载体的影响可以发现, 在不同的蛋白融合方式中, 只有全长的 ZAP 在 C 端融合 RNA 结合蛋白 (Tat 或 Rev) 这一方式可产生具有抑制报告基因功能的融合蛋白.

对比带有 Tat 的融合蛋白对 pHR[']-CMV-luc 和 pHR[']-luc 表达的荧光素酶活性的影响, 可以发现, Tat 和 N 端融合 Tat 的蛋白对 pHR[']-luc 的激活作用远大于它们对 pHR[']-CMV-luc 的激活作用. 我们认为, 这是因为 pHR[']-luc 转录的 RNA 带有 5' LTR, 单独的 Tat 或融合蛋白中的 Tat 可以结合在其中的 TAR 序列上, 激活 RNA 的转录. 而 pHR[']-CMV-luc 转录出的两种 RNA 中, 大部分不带有 5' LTR, Tat 只能结合它们的 3' LTR 中的 TAR 序列, 不能激活这种 RNA 的转录. ZAP-Tat 对 pHR[']-CMV-luc 表达的荧光素酶活性有明显的抑制作用, 而对 pHR[']-luc 表达的荧光素酶活性没有明显的影响, 这可能是因为 ZAP-Tat 可结合在 RNA 3' 端的 TAR 序列, 介导 mRNA 的降解, 但同时, 它也可以结合在 5' 端的 TAR 序列, 激活 RNA 的转录. 在 pHR[']-luc 体系中,

ZAP-Tat 既激活转录, 又介导降解, 二者的作用相互抵消, 表现为 ZAP-Tat 对 pHR[']-luc 表达的荧光素酶活性没有明显的影响. 在 pHR[']-CMV-luc 体系中, CMV 起始的 RNA 占大部分, ZAP-Tat 可以介导它的降解, 但不能激活它们的转录; LTR 起始的 RNA 只占一小部分, ZAP-Tat 对它的影响一方面激活转录, 一方面介导降解, 二者相互抵消, 故总体来看, ZAP-Tat 对 pHR[']-CMV-luc 载体表达的荧光素酶活性还是有较强的抑制作用.

将 ZAP-Rev 对 pHR[']-luc(SA-) 和 pHR[']-RRE-luc 表达的荧光素酶活性的影响与 ZAP-Rev 对 pHR[']-luc 的影响进行对比, 可以发现 ZAP-Rev 对 pHR[']-luc 的抑制作用稍低于它对 pHR[']-luc(SA-) 和 pHR[']-RRE-luc 的抑制作用. 我们认为这可能是由于 pHR[']-luc 转录出的 RNA 一部分被 ZAP-Rev 结合, 携带出核并由 ZAP-Rev 介导降解, 另一部分 RNA 进行正常的剪接, 生成不含 RRE 序列的 mRNA, 这部分 RNA 不受 ZAP-Rev 的影响, 所以表现出的抑制倍数略低于 pHR[']-luc(SA-) 和 pHR[']-RRE-luc. Rev 对 pHR[']-CMV-luc 的激活作用弱于对 pHR[']-luc(SA-)、pHR[']-RRE-luc 和 pHR[']-luc, 同样是因为 pHR[']-CMV-luc 中大量的 RNA 是由 CMV 起始转录的, 不带有 RRE 序列.

ZAP 对各种 HIV 的假病毒载体都有 1~2 倍的抑制作用, 全长 ZAP 在 N 端融合 Tat 或 Rev 后, 融合蛋白对报告载体的抑制作用与 ZAP 对相应报告载体的作用相比没有明显增强. 如 Rev-ZAP 和 ZAP 对 pHR[']-luc(SA-)、pHR[']-RRE-luc 和 pHR[']-luc 表达的荧光素酶活性都有约 2 倍的抑制倍数, 而 Tat-ZAP 由于 Tat 的激活转录功能, 对 pHR[']-CMV-luc 表达的荧光素酶活性甚至还有微弱的激活作用. 当 Tat 或 Rev 位于全长 ZAP 的 C 端时, 对相应报告载体表达的荧光素酶活性的抑制作用有明显的增加. 产生这一现象的原因我们还不清楚, 不过这应该与蛋白融合后产生的新的性状或发生的性状改变有关. 这一现象还需要我们进一步的研究.

本文的研究结果表明, ZAP 可以通过融合 HIV RNA 结合蛋白 Tat 或 Rev 的方式抑制 HIV 假病毒载体携带基因的表达. 虽然本报告中所观察到的抑制倍数只有 5~6 倍, 但至少证明了这种方法的可行性, 这一方法可能成为一种新的抑制特定基因表达的手段. 另外, 经过改造, ZAP-Tat 和 ZAP-Rev 对 HIV 假病毒载体的抑制能力有可能进

一步提高. 虽然限于条件, 本研究没有检测 ZAP-Tat 或 ZAP-Rev 对 HIV 活病毒的抑制活性, 但是由于本研究所用的报告载体与 HIV 活病毒 RNA 高度同源, 我们有理由相信, 这两种融合蛋白对 HIV 活病毒也会有一定程度的抑制作用.

参考文献

- 1 Taube R, Fujinaga K, Wimmer J, *et al.* Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation. *Virology*, 1999, **264** (2): 245~253
- 2 Feinberg M B, Jarrett R F, Aldovini A, *et al.* HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell*, 1986, **46** (6): 807~817
- 3 Arrigo S J, Chen I S. Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev*, 1991, **5** (5): 808~819
- 4 Zolotukhin A S, Michalowski D, Bear J, *et al.* PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol Cell Biol*, 2003, **23** (18): 6618~6630
- 5 Sanchez-Velar N, Udofia E B, Yu Z, *et al.* hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev*, 2004, **18** (1): 23~34
- 6 Gao G, Guo X, Goff S P. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science*, 2002, **297** (5587): 1703~1706
- 7 Guo X, Carroll J W, Macdonald M R, *et al.* The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *J Virol*, 2004, **78** (23): 12781~12787
- 8 Gatignol A, Buckler-White A, Berkhout B, *et al.* Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science*, 1991, **251** (5001): 1597~1600
- 9 Derse D, Hill S A, Lloyd P A, *et al.* Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J Virol*, 2001, **75** (18): 8461~8468
- 10 Ahmad N, Venkatesan S. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science*, 1988, **241** (4872): 1481~1485
- 11 Liu L, Chen G, Ji X, *et al.* ZAP is a CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321** (3): 517~523

Fusing ZAP to HIV RNA Binding Proteins to Inhibit HIV*

LI Zhi-Qiang, LIU Li-Xin, LÜ Feng-Xiang, MA Jing, GAO Guang-Xia**

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The zinc finger antiviral protein (ZAP) specifically inhibits the replication of Moloney murine leukemia virus (MLV) and Sindbis virus (SIN), but has very modest inhibitory effect on HIV. Previous studies suggest that ZAP directly binds to the viral RNA and recruit the RNA degradation machinery to degrade the target RNA. The HIV-1 Tat and Rev are regulatory proteins which bind to HIV RNA. Tat and Rev were fused with ZAP in various manners. Two fusion proteins, ZAP-Tat and ZAP-Rev were found to be able to inhibit the expression HIV-1 vector.

Key words ZAP, HIV, Tat/Rev, fusion protein, mRNA degradation

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30470092).

**Corresponding author. Tel: 86-10-64888545, Fax: 86-10-64877837, E-mail: gaogx@moon.ibp.ac.cn

Received: June 13, 2006 Accepted: June 27, 2006