

- 13 Liu K, Schoonmaker M M, Levine B L, *et al.* Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (9): 5147~ 5152
- 14 Kang S S, Kwon T, Kwon D Y, *et al.* Akt Protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem*, 1999, **274** (19): 13085~ 13090
- 15 Li H, Cao Y, Berndt M C, *et al.* Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein P53 *in vitro*. *Oncogene*, 1999, **18** (48): 6785~ 6794

### Progress on Mechanism of Telomerase Activation.

ZHANG Ru-Gang, WANG Xing-Wang, XIE Hong  
(Shanghai Institute of Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

**Abstract** Following the importances of telomere and telomerase in senescence and tumor were recognized,

the pathway of telomerase activation is becoming the focus of this area. By now, MYC was found to play key role in telomerase activation. It could activate telomerase directly by binding to E-box in promoter region of TERT gene. At the same time, MYC might mediate other molecules to activate telomerase, such as HPV-E6 and estrogen. Estrogen could activate telomerase directly by forming estrogen/estrogen receptor complex binding to imperfect palindromic degenerate estrogen responding element in promoter region of TERT gene. APC, p53 and protein phosphorylation might also involve in telomerase activation.

**Key words** Senescence, tumor, telomerase, MYC, HPV-E6, estrogen

## 丙型肝炎病毒依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 研究进展\*

陈忠斌 王升启

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要** 由于缺乏合适的 HCV 感染细胞模型, 严重制约了 HCV 复制, 特别是 HCV 复制的关键因子依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 的研究. 对 HCV 序列比较分析并通过异源表达证明 NS5B 是 HCV 复制的 RdRp. NS5B C 端疏水性氨基酸区域以及 NS5B 与细胞膜形成复合体等影响 NS5B 溶解性. 在合适的反应条件下 NS5B 可以多种 RNA 分子为模板催化 RNA 复制, 特别是能有效复制 HCV 全长 (+) RNA. 高浓度 GTP 激活 HCV RdRp 活性. NS5B N/C 端缺失突变和保守性 A、B、C 区中的点突变影响 RdRp 活性, 但 D 区 345 位精氨酸突变为赖氨酸时 RdRp 活性明显升高. HCV RdRp 的发现及其功能研究为 HCV 药物研究提供了新型靶标.

**关键词** 丙型肝炎病毒, 非结构蛋白 NS5B, 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶, RNA 复制

**学科分类号** Q939.47

1989 年首次证实丙型肝炎病毒 (HCV) 为输血传播的非甲非乙型肝炎的主要病原, 随后对 HCV 基因组和蛋白质结构和功能进行了深入研究. 现已阐明 HCV 为黄病毒科丙型肝炎病毒属成员, 基因组由长约 9.5 nt 的 (+) RNA 构成. HCV 基因组 5' 和 3' 端均有一段非翻译区 (NTR), 其间为一编码多聚蛋白的 ORF (约 3000 氨基酸). 在宿主细胞和病毒蛋白酶作用下, HCV 多聚蛋白裂解形成至少 10 种具有不同功能的病毒蛋白: C (核心蛋白); E1 和 E2 (糖基化囊膜蛋白); p7; NS2 (金属蛋白酶); NS3 (丝氨酸蛋白酶; NTPase 和

解旋酶); NS4A (NS3 蛋白酶辅因子); NS4B; NS5A (与 HCV 干扰素抗性有关) 和 NS5B. 由于缺乏合适的 HCV 感染细胞系统, 目前对 HCV 复制的关键酶——依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 以及 HCV 基因组 RNA 的复制及其调节机制等缺乏深入研究. 氨基酸序列分析发现, NS5B 含有与其他 (+) RNA 病毒 RdRp 相同的保守性氨基酸模体

\* 军事医学科学院科技创新基金资助项目 (9805107).

Tel: (010) 66932211, E-mail: chenzhongbin@USA.net

收稿日期: 1999-11-07, 修回日期: 2000-02-21

(motif), 提示非结构蛋白 NS5B 是 HCV RNA 复制的关键酶 RdRp. 最近, 利用异源表达系统成功获得了高纯度 HCV NS5B, 证实 NS5B 具有 RdRp 活性, 并对其特性以及与 HCV 基因组复制关系等进行了深入研究.

## 1 HCV NS5B 体外表达

利用杆状病毒/昆虫细胞和原核表达系统, 已成功实现了 HCV NS5B 的体外表达. 分离纯化表达产物时意外发现 NS5B 溶解性差<sup>[1]</sup>, 特别是当盐、去污剂和甘油浓度低时. 相反, 当盐、去污剂和甘油浓度较大时, NS5B 的溶解性好. 据此建立了 NS5B 逐级分离纯化方法<sup>[2,3]</sup>: 在低盐、去污剂和甘油浓度时, 溶解大部分细胞蛋白, 收集含 NS5B 沉淀物; 接着在高盐、去污剂和甘油浓度时溶解 NS5B, 进一步纯化可获得足够量高纯度的表达产物.

NS5B 溶解性差的原因, 可能与 NS5B 与细胞膜结合形成膜复合体有关<sup>[3]</sup>. 实验发现, NS5B C 端 21 个氨基酸区域疏水性较高, 其中含有在 HCV 各基因型中高度保守、由四个亮氨酸 LLLL 组成的模体. 突变分析发现, NS5B C 端缺失 21 个氨基酸的突变体溶解性好, 证明 NS5B C 端的区域特别是 LLLL 构成的模体决定 NS5B 溶解性<sup>[4,5]</sup>. 另一方面, 把绿色荧光蛋白 GFP 与 NS5B 及其 C 端缺失突变体 (NS5B<sup>ΔCT21</sup>) 融合并转染真核细胞, 发现 GFP-NS5B 主要分布在细胞质和核外周; 而 GFP-NS5B<sup>ΔCT21</sup> 主要集中在胞核区, 提示 NS5B C 端 21 个氨基酸残基构成蛋白质转运的锚定结构域, 对 NS5B 在宿主细胞质滞留和富集具有重要调节作用<sup>[4]</sup>.

## 2 HCV RdRp 生物学特征

HCV NS5B 具有 RdRp 活性<sup>[1~9]</sup>. NS5B 的催化模板有: HCV 3' RNA 和异源 RNA, 如 LacZ RNA、poly (N) 等. 体外反应中, NS5B 主要通过引物依赖的 RdRp 活性复制 RNA 模板. 当以 HCV 3' RNA 为模板时, RNA 3' 端倒转形成发卡样结构, NS5B 催化 3' 端延伸完成互补 (-) RNA 合成. 当以 3' 端封闭的 RNA 或 poly (N) 为模板时, 必须有引物时 NS5B 才具有复制 RNA 模板活性. NS5B 对 RNA 模板未表现病毒特异性, 提示 HCV 其他蛋白或宿主细胞蛋白质因子可能参与了 NS5B 对 RNA 模板特异性识别作用.

NS5B 催化活性需要一定反应条件<sup>[1~6]</sup>. 除 RNA 模板外, 还需要 4 种 NTP, 最适 pH 值 7.0~8.5; 温度为 22~32℃.  $Mg^{2+}$  是 NS5B 催化活性必需的, 但  $Mn^{2+}$  更有效激活 NS5B 酶活性;  $Zn^{2+}$  对 NS5B 表现抑制作用.

NS5B 的一个显著特征是, 高浓度 GTP (5~10 mmol/L) 能激活 NS5B RdRp, 使其活性提高 50~100 倍<sup>[7]</sup>; 更高浓度 (>10 mmol/L) 时, 因 GTP/ $Mg^{2+}$  比例改变, 使 NS5B 酶活性抑制. 其他 NTP (ATP、CTP、UTP) 却不具有上述刺激作用. 高浓度 GTP 促进 RNA 合成, 与 RNA 模板类型有关, 如对 HCV RNA 和 poly (C) 模板有激活作用, 但对 poly (A) 无作用, 说明 GTP 激活 NS5B 与其本身渗入 RNA 模板有关. 进一步研究表明, GTP 的激活作用不是增强了与 RNA 结合能力或提高 RNA 链延伸速度, 而是促进 RNA 合成的起始. 另外, GTP 对 RdRp 的激活作用在与 HCV 进化关系上较近的瘟病毒属 RdRp 也存在, 但对进化关系较远的微 RNA 病毒科成员如脊髓灰质炎病毒的 RdRp (3D<sup>pol</sup>) 不表现激活作用. 结合 HCV 基因组 3' 端核酸组成特点, 推测 GTP 对 NS5B 激活作用与 RNA 合成起始的第一个 GTP 掺入相关.

除了自身固有特点, NS5B 与其他 (+) RNA 病毒 RdRp 也具有一定相似性<sup>[2]</sup>. 第一, NS5B 等目前所研究的大部分 RdRp, 其催化反应要有引物参与. 引物可以由 RNA 3' 端倒转折叠形成, 也可以是外源性寡聚 RNA 分子. 第二, 大部分 RdRp 对 RNA 模板无特异性. 但 BMV RdRp 只作用于自身 RNA 模板, 不同的是 BMV RdRp 由 2 个病毒蛋白和至少 6 种宿主细胞蛋白质因子构成. HCV NS5B 缺乏 RNA 模板特异性, 可能需要其他病毒蛋白或细胞因子参与 RNA 的特异性识别, 或者模板 RNA 必须具备特征性高级空间结构才能被 NS5B 特异性识别. 第三, 目前研究的大部分 RdRp 催化效率较高, 能以几千核苷酸的 RNA 为模板催化其复制. 如 3D<sup>pol</sup> 催化速率为 300~1250 nt/min; 但 HCV NS5B 催化 RNA 链延伸的速率要低得多, 这是 HCV RdRp 固有的特性 (可能与 HCV 复制效率低下有关), 还是要求其他病毒蛋白或细胞因子参与, 目前尚难定论.

HCV RNA 3' 端与 NS5B 特异性结合在 HCV 基因组复制起始过程具有重要作用. 实验发现<sup>[8,10]</sup>, 当 HCV 3' RNA 含部分编码区、基因型特

异性高变区和 poly (U) 成分时对 NS5B 具有较高结合活性, 而且该区形成 4 个发卡样高级结构. HCV RNA 3' 端 98 nt 高度保守区与 NS5B 结合活性较差, 同时发现 98 nt RNA 不是 RdRp 最佳反应模板. 另一方面, NS5B 含有 RNA 结合结构域 (RBD): RBD1 (83~194) 和 RBD2 (196~298), 其中 RBD2 与 RdRp 的保守性模体 A 和 B 重叠.

利用建立的 HCV NS5B 体外活性检测系统, 发现了多种 HCV RdRp 抑制剂<sup>[3,5,8]</sup>.  $Zn^{2+}$  在高浓度时抑制 NS5B 活性.  $Zn^{2+}$  螯合剂土氮杂菲 (1, 10-phenanthroline) 对 NS5B 有抑制作用, 提示金属离子是 NS5B 活性必需的. 真菌代谢物胶霉毒素 (gliotoxin) 呈剂量相关性抑制 HCV RdRp 活性. 另外, 依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶抑制剂, 如焦磷酸 (PPi)、磷酰乙酸 (PPA) 和乙磷甲酸 (PFA) 等在 1  $\mu$ mol/L 时对 NS5B 活性无明显影响. 在高浓度时 GDP、GMP、dGTP 和 ddGTP 对 NS5B 活性也表现抑制作用, 而且 dGTP 抑制作用最强.

### 3 HCV NS5B 突变与 RdRp 活性

为了进一步研究 NS5B 结构与功能的关系, 对 NS5B 进行了多种点突变和缺失突变, 测定了突变体 RdRp 活性<sup>[2,4,5,8]</sup>. 序列分析发现, NS5B 具有其他 RdRp 特征性的保守性模体 A、B、C 和 D, 模体 A、B、C 点突变使 RdRp 活性丧失, 说明与其他逆转录病毒和 (+) RNA 病毒一样, 这些保守区域是 NS5B RdRp 活性必需的. A、B、C 区域点突变对 NS5B 的 RNA 结合活性无影响. 意外的是, D 区 345 位精氨酸突变成赖氨酸时, NS5B RdRp 活性非但没有消失, 反而增加了 50%. 进一步比较分析发现, 逆转录病毒和其他 (+) RNA 病毒 RdRp D 区域相应位置均为赖氨酸. 据此推测, HCV 在进化过程中, D 区 345 位赖氨酸突变为现在的精氨酸, 使 HCV RdRp 活性下降, 因此影响 HCV 体内复制. 上述特性与 HCV 体内复制效率低下是否有关, 有待于进一步证实.

缺失突变发现, NS5B N 端氨基酸残基是 RdRp 活性必需的, N 端 19~44 个氨基酸缺失即失去 RdRp 活性. C 端缺失对 RdRp 活性相对耐受, 如 C 端缺失 21 个氨基酸时对 RdRp 活性影响较小, 但 C 端缺失 24~56 个氨基酸时, RdRp 活性下降. 另外, N 和 C 端缺少突变体分离纯化较难, 可能与缺失突变体不能正确折叠形成特征性高

级空间结构有关.

### 4 HCV RdRp 与 HCV 基因组 RNA 复制

NS5B 具有复制 HCV 全长基因组 RNA 的特性. Lohmann 等<sup>[2]</sup>利用杆状病毒/昆虫细胞系统表达了 NS5B-G-His, 表达产物能有效催化以 HCV (+) RNA 为模板的 (-) RNA 复制, 但是 HCV RNA 以 3' 端倒转折叠形成发卡样结构作为引物起始 (-) RNA 合成, 并且 NS5B 不具有模板特异性. 这一结果也许只能部分反映 HCV RdRp 体内本质. 最近, Oh 等<sup>[9]</sup>在 *E. coli* 中表达了 NS5B N-His, 表达产物具有很高的 HCV RNA 模板特异性, 无引物时能起始 9.5 nt (-) RNA 从头 (de novo) 合成, 并具有催化以 HCV 复制中间体 (-) RNA 为模板的 (+) RNA 复制特性. 对 (+) RNA, (-) RNA 3' 端突变分析发现, 二者均有一段核酸序列是 NS5B 活性必需的. 如 (+) RNA 3' 端 98 nt 的保守序列是 NS5B 活性必需的, 而且含有高变区, poly (U) 区和 98 nt 保守序列的 3' 端能有效促进 (-) RNA 合成. (-) RNA 3' 端 239 nt 缺失时即失去模板活性. 以上结果提示 HCV (+) RNA 和 (-) RNA 3' 端具有起始 RNA 复制的顺式调控元件. 忠实反映 HCV RdRp 活性的 NS5B 蛋白成功表达, 为 HCV 基因组复制及其调节机制研究提供了良好试验模型, 为以 RdRp 为靶标的药物研究奠定了理论基础.

### 5 问题与展望

由于缺乏有效的 HCV 感染细胞模型, 严重阻碍了 HCV 体内复制及其调节机制和抗病毒药物研究. 1996 年 Behrens 等首次报道了 HCV NS5B 具有 RdRp 活性, 是 HCV 基因组 RNA 复制的关键酶, 随后对 HCV RdRp 及其在 HCV 基因组复制中的作用进行了一系列探索. HCV NS5B 具有 RdRp 特性, 但不完全具有 HCV RNA 特异性结合作用, 提示 HCV 在体内复制可能要有其他病毒蛋白或细胞蛋白质因子参与, 因此寻找并鉴定这些病毒或细胞来源的辅助因子是系统研究 HCV RdRp 特性以及 HCV RNA 复制过程要解决的首要问题, 这方面的研究进展将为 HCV 药物研究提供新的靶标. 另外, 以体外复制模型为基础, 进一步阐明 HCV 体内复制机制仍是未来一段时期 HCV 分子生物学研究面临的严峻挑战.

毫无疑问, HCV RdRp 的发现及其生物学活

性以及 HCV 复制中的作用等研究为抗 HCV 药物研究提供了一个新型、潜在的最有效靶标。RdRp 是所有 (+) RNA 病毒复制过程中的关键酶, 在病毒长期进化过程中相当保守, 而且宿主细胞中不存在 RdRp, 是 HCV 等病毒高度特异性的复制酶。特别是最近 HCV NS5B 三维高级空间结构的成功解析<sup>[11]</sup>, 为以 RdRp 为靶标的抗病毒药物研究提供了理论基础。在 HCV RdRp 发现之初, 我们即已意识到 HCV RdRp 作为 HCV 药物靶标的重要意义和应用前景, 在军事医学科学院科技创新基金资助下启动了靶向 HCV RdRp 药物高通量筛选分子体系研究。可以预料, HCV RdRp 的发现将开辟抗 HCV 药物研究的极具竞争性的新兴领域。我国是丙型肝炎高发区, 更应对以 RdRp 为靶的药物研究引起足够重视。

#### 参 考 文 献

- Behrens S E, Tomei L, Francesco R D. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*, 1996, **15** (1): 12~ 22
- Lohmann V, Korner F, Herian U, *et al.* Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol*, 1997, **71** (11): 8416~ 8428
- Lohmann V, Roos A, Korner F, *et al.* Biochemical and kinetic analysis of NS5B RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Virology*, 1998, **249** (1): 108~ 118
- Yamashita T, Kaneko S, Shiota Y, *et al.* RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J Biol Chem*, 1998, **273** (25): 15479~ 15486
- Ferrari E, Wright-Minogue J, Fang J W S, *et al.* Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1999, **73** (2): 1649~ 1654
- Al R H, Xie Y, Wang Y, *et al.* Expression of recombinant hepatitis C virus non-structural protein 5B in *Escherichia coli*. *Virus Res*, 1998, **53** (2): 141~ 149
- Lohmann V, Overton H, Bartenschlager R. Selective stimulation of hepatitis C virus and pestivirus NS5B RNA polymerase activity by GTP. *J Biol Chem*, 1999, **274** (16): 10807~ 10815
- Ishii K, Tanaka Y, Yap C C, *et al.* Expression of hepatitis C virus NS5B protein: characterization of its RNA polymerase activity and RNA binding. *Hepatology*, 1999, **299** (4): 1227~ 1235
- Cheng J C, Chang M, Chang S. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J Virol*, 1999, **73** (8): 7044~ 7049
- Oh J, Ito T, Lai M M C. A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *J Virol*, 1999, **73** (9): 7694~ 7702
- Lesburg C A, Cable M B, Ferrari E, *et al.* Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol*, 1999, **6** (10): 937 ~ 943

**The Advance on Research of RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp) of Hepatitis C Virus.** CHEN Zhong-Bin, WANG Sheng-Qi (The Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China).

**Abstract** Due to the lack of efficient cell culture systems, animal models, the low amounts of viral antigens and RNA in infected tissues, knowledge about the replication mechanisms, especially the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of hepatitis C virus (HCV) is poor. Based on analysis of amino acid sequence of HCV polyprotein and analogy to the closely related flaviviruses and pestiviruses, it is assumed that NS5B may be the RdRp of HCV. By Baculovirus and *E. coli* expression system and *in vitro* RNA replication system, it was demonstrated that the *de novo* synthesis of RNA could be catalyzed by NS5B, which resembles other viral RdRp. The biochemical properties and the mutation-function relationships of RdRp of HCV were comprehensively reviewed, and the potential of NS5B as an important new target for antiviral therapy was also discussed.

**Key words** hepatitis C virus (HCV), NS5B, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), RNA replication