

## • 综述 •

## 猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 与抗病毒天然免疫

张百灵<sup>1)</sup>\*\*, 陈建飞<sup>2)</sup>\*\*, 邢雅玲<sup>1)</sup>, 冯力<sup>2)</sup>\*, 陈忠斌<sup>1)</sup>\*<sup>1)</sup> 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850;<sup>2)</sup> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

**摘要** 猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 是引起猪流行性腹泻病等肠道疾病的一种动物冠状病毒。PEDV 与宿主系统相互作用, 特别是其对宿主抗病毒天然免疫调节作用和机制是目前动物冠状病毒研究的基础科学问题之一。基于作者近几年来对人类重要冠状病毒对宿主抗病毒天然免疫系统调节作用的研究, 本文对 PEDV 基因组与编码蛋白主要功能以及 PEDV 调节宿主抗病毒天然免疫反应及其可能机制的进展和现状进行了分析。与人类冠状病毒相似, PEDV 编码的木瓜样蛋白酶 (papain-like protease, PLP) 是一个多功能蛋白酶, 除了蛋白酶活性外, 还具有去泛素化酶 (DUB) 活性和宿主干扰素拮抗活性, 是 PEDV 编码的一种新型病毒来源 DUB 和宿主干扰素拮抗蛋白。这些研究为阐明 PEDV 对宿主抗病毒天然免疫反应调节作用和其致病机制提供了重要的理论依据, 为研制新型 PEDV 免疫防治措施提供了重要理论基础。

**关键词** 猪流行性腹泻病毒; 木瓜样蛋白酶; 去泛素化酶; 抗病毒天然免疫反应; 干扰素  
**中图分类号** Q5

### Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) and Host Antiviral Innate Immunity

ZHANG Bai-Ling<sup>1)</sup>\*\*, CHEN Jian-Fei<sup>2)</sup>\*\*, XING Ya-Ling<sup>1)</sup>, FENG Li<sup>2)</sup>\*, CHEN Zhong-Bin<sup>1)</sup>\*<sup>1)</sup> Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China; <sup>2)</sup> National Key Laboratory of Veterinary

Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

**Abstract** Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is an animal coronavirus that causes pig intestinal diseases—porcine epidemic diarrhea (PED). To date, it is not clear that how PEDV interacts with the host antiviral innate system and what is the molecular mechanisms that regulate the host innate antiviral immune responses. Based on the author's recent studies on human coronaviruses, this review will focus on recent advances in our understanding of the genome replication and viral protein functions of PEDV, especially the potential mechanisms of PEDV interaction with the host innate antiviral immune response. Similar to human coronaviruses, PEDV papain-like protease (PLP) is a multifunctional protein with protease activity, deubiquitinase (DUB) activity and interferon antagonism activity. PLP2 domain is a novel PEDV-encoded DUB and interferon antagonist from animal coronavirus. These studies will help to illustrate the mechanisms of PEDV regulation of the host innate antiviral immune responses and disease

收稿日期: 2011-01-11; 接受日期: 2011-03-28

国家自然科学基金项目 (No. 30901081, No. 30870536, No. 30972761), 兽医生物技术国家重点实验室开放基金项目 (No. SKLVBF201101) 和北京市自然科学基金项目 (No. 7092075)

\* 联系人 Tel: 010-66930297; Fax: 010-88272105; E-mail: chenzhongbin@yahoo.com, fengli\_h@163.com

\*\* 共同第一作者

Received: January 11, 2011; Accepted: March 28, 2011

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30901081, No. 30870536, No. 30972761), National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology (No. SKLVBF201101), and Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 7092075)

\* Corresponding author Tel: 86-10-66930297; Fax: 86-10-88272105; E-mail: chenzhongbin@yahoo.com, fengli\_h@163.com

\*\* Two authors contributed equally to this work

pathogenesis, and will also provide the fundamental theoretical clues for the development of novel immune control measures for animal coronavirus infection.

**Key words** porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); papain-like protease; deubiquitinase (DUB); innate antiviral immunity; interferon

冠状病毒(coronavirus, CoV)是感染人和动物的一大类病毒。目前已知的冠状病毒,根据基因组结构相似性和血清型不同,可以分为3个家族,即I类、II类和III类冠状病毒。其中,I类和II类冠状病毒为哺乳类病毒,III类冠状病毒为禽类病毒。第I类冠状病毒包括人冠状病毒229E(HCoV-229E)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)和人类新发冠状病毒NL63(HCoV-NL63)等;第II类冠状病毒包括鼠肝炎病毒(MHV)、严重急性呼吸道综合征病毒(SARS-CoV)和大鼠冠状病毒(RtCoV)等;第III类冠状病毒包括禽传染性支气管炎病毒(IVB)和火鸡蓝冠病毒(TCoV)等<sup>[1]</sup>。

冠状病毒基因组是线性正链RNA,具有RNA病毒中最大的病毒基因组(27~30 kb)。冠状病毒基因组RNA具有帽子结构、多聚腺苷酸尾和核衣壳蛋白的包裹。冠状病毒被大的纤突蛋白(Spike, S)包裹并借助它传播。冠状病毒具有相似的基因组结构,其中复制酶基因在5'端占基因组的2/3,由2个重叠的开放阅读框(ORF)ORF1a和ORF1b组成。结构基因区域占3'端的1/3基因组,编码一组常规的结构基因依次是:5'端-纤突蛋白、小包膜糖蛋白(Envelope, E)、膜糖蛋白(Membrane, M)和核衣壳蛋白(Nucleocapsid, N)-3'端。某些II类冠状病毒除了具有以上结构外,还包括一个额外的结构蛋白,即血凝素酯酶,这个基因定位在ORF1b和S基因之间。

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)属于I类冠状病毒<sup>[2]</sup>,引起猪流行性腹泻病,是一种肠道疾病,其致病特征是急性水样下痢、脱水和呕吐。PEDV是引起猪特别是仔猪腹泻疾病的主要病原体,仔猪感染此病毒后具有很高的死亡率。此病毒感染已经成为猪养殖产业发展中的一个严重问题,此病已经在全球许多国家爆发并造成了严重的经济损失。

## 1 PEDV 基因组结构及其复制周期

### 1.1 PEDV 基因组结构

引起猪流行性腹泻病的病原体PEDV是一个正向包膜病毒,其基因组是正义单链RNA,5'端有帽结

构(cap),3'端有Poly(A)尾,基因组全长为28 033 bp,基因组结构如图1所示。5'端的2/3部分编码2个大的复制酶多聚蛋白pp1a和pp1ab,其余1/3基因组序列包括5个ORF,编码4个结构蛋白:纤突蛋白(S)、小包膜糖蛋白(E)、膜糖蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)以及ORF3编码的1个非结构蛋白。复制酶多聚蛋白基因ORF1ab长20 346 bp,包括ORF1a(12 354 bp)和ORF1b(8 037 bp)两个开放阅读框,通过滑动序列和假结结构使核糖体进行移码阅读,从而保证它的正确翻译<sup>[1,2]</sup>。

### 1.2 PEDV 蛋白功能

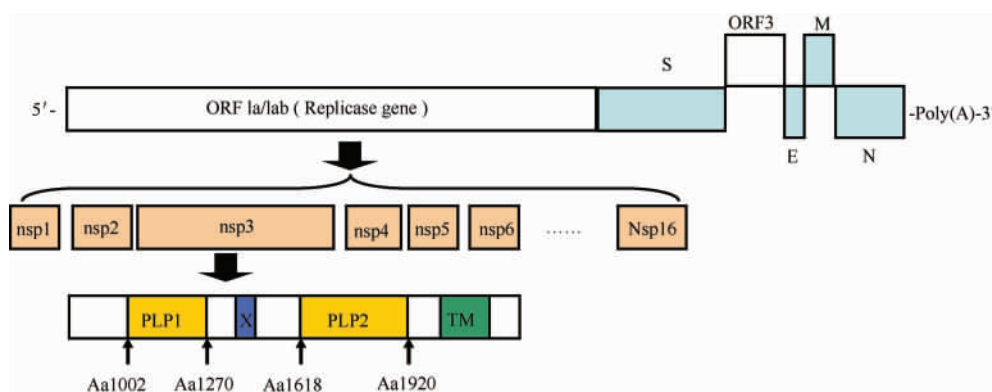
**1.2.1 S蛋白** 冠状病毒蛋白结构与功能具有一定的相似性。S蛋白是位于病毒粒子表面的纤突糖蛋白,作为一种表面抗原,在识别靶细胞以及病毒和细胞膜融合过程中发挥重要作用,在感染宿主体内介导中和抗体产生过程中也具有重要作用<sup>[3]</sup>。S蛋白对病毒的出芽和分泌也是必要的。体外研究发现,S蛋白影响多个细胞信号传导过程。S蛋白抑制宿主细胞翻译<sup>[4]</sup>。此外,在VeroE6细胞中S蛋白诱导凋亡<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 E蛋白** E蛋白是病毒囊膜上的小包膜蛋白,在病毒包膜和病毒粒子的形成等方面发挥至关重要的作用。MHV的E蛋白在细胞中过表达后诱导凋亡。感染SARS-CoV后,T细胞发生凋亡很可能是由于E蛋白与抗凋亡因子Bcl-xL直接相互作用引起的<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 M蛋白** M蛋白对病毒粒子的装配是必要的,其在出芽过程中也发挥重要作用。M蛋白可诱导宿主产生特异性抗体(但这类抗体一般没有中和活性)和IFN- $\alpha$ ,还能介导细胞融合。据报道,SARS病毒M蛋白具有干扰素拮抗性<sup>[7]</sup>。

**1.2.4 N蛋白** N蛋白与病毒基因组RNA相互缠绕形成病毒核衣壳。N蛋白除了在病毒装配中发挥重要作用外,在病毒转录和复制中也可能发挥重要作用。可能是由于N蛋白在冠状病毒复制和转录过程中的重要作用,从而影响了许多病毒和细胞的过程。SARS病毒N蛋白具有干扰素拮抗性<sup>[8]</sup>。

**1.2.5 ORF3** ORF3编码223或224个氨基酸的多肽。ORF3编码蛋白是PEDV基因组编码唯一的1



**Fig. 1 PEDV genome structure and papain-like protease (PLP) domains** The 5'-terminal two-thirds of the PEDV genome encodes the replicase polyproteins (ppla and pplab). The 3'-terminal one-third of the genome includes five ORFs, encoding four structural proteins: the spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N) proteins, and a nonstructural protein/accessory protein ORF3. PEDV genome encodes two papain-like protease domains (PLP1 and PLP2) in the nonstructural protein nsp3. The encoding amino acids (AA) sequence and the predicted catalytic residues for PLP1 and PLP2 core domain are presented

个辅助蛋白,与冠状病毒毒力有关。

**1.2.6 非结构蛋白** 非结构蛋白 (nsp)<sup>[9]</sup> 中, nsp7–nsp10 具有典型的结合 RNA 活性,在病毒 RNA 合成过程发挥作用。nsp12 具有 RNA 依赖的 RNA 聚合酶活性, nsp13 具有 RNA 解旋酶活性, nsp14 具有核糖核酸外切酶活性, nsp15 具有核糖核酸内切酶活性, nsp16 具有甲基转移酶活性。nsp3 和 nsp5 编码蛋白酶活性,它们将 ORF1a/b 编码的多聚蛋白加工成单一的复制酶元件。nsp3 编码 2 个木瓜样蛋白酶 PLP1 和 PLP2,它们主要加工 ppla/pplab 的 N 端, nsp3 还编码另外 1 个功能性结构域 ADRP (ADP-核糖-4 磷酸化酶),也被称为 nsp3 的 X 结构域。nsp5 在复制酶多聚蛋白加工释放过程发挥关键作用, nsp5 的半胱氨酸蛋白酶活性对病毒的复制起关键作用,因此被称为主要蛋白酶 (Mpro)。最近有研究表明, nsp1 能抑制宿主干扰素基因合成<sup>[10, 11]</sup>。

### 1.3 PEDV 复制周期

在冠状病毒生命周期中的几个阶段,病毒成分均能被宿主细胞蛋白识别。已经证明,多数 I 类冠状病毒成员都以氨基肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 作为其细胞感染受体。冠状病毒侵入宿主包括 3 个阶段:首先 S 糖蛋白与受体结合,然后 S 糖蛋白被组织蛋白酶 L 剪切后活化一种融合肽,通过融合肽与细胞内成分的融合作用介导病毒侵入宿主细胞。PEDV 基因组复制与其它冠状病毒相似,病毒粒子通过膜融合侵入宿主细胞内,然后释放其具有感染性的基因组 RNA。猪氨基肽酶 N (porcine aminopeptidase N, pAPN) 是 PEDV 细胞感染受体之

一<sup>[12]</sup>。融合后紧密结合的病毒 RNA 与核衣壳蛋白 N 被释放进细胞质中,随后在胞质中脱衣壳,与核衣壳蛋白 N 紧密结合的病毒 RNA 基因组被释放入胞质中。首先, ORF1ab 翻译成 1 个多聚前体蛋白,然后此前体蛋白被 2 种蛋白酶 (木瓜样蛋白酶 (PLP) 和主要蛋白酶 (Mpro)), 剪切成为病毒复制所必须的单一蛋白,经共转译处理后产生 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 和其它合成病毒 RNA 所必需的蛋白。RdRp 以进入胞质中的基因组 RNA 为模板,转录产生负链 RNA,然后以负链 RNA 为模板,合成不同长度的亚基因组 mRNA (sg mRNA) 和基因组 RNA。通常每个 sg mRNA 能够翻译成其 5' 端 ORF 所编码的一种蛋白质。因此,不同的 sg mRNA 在细胞质中合成了病毒所有结构蛋白。N 蛋白与新合成的病毒基因组 RNA 在细胞质中形成螺旋的核衣壳,核衣壳与固定在内质网和高尔基体之间空隙的 M 蛋白结合后再与 E 蛋白结合, E 蛋白和 M 蛋白相互作用促使病毒粒子出芽,形成包裹的核衣壳。最后,包裹的核衣壳与在高尔基体内经糖基化等修饰的三聚体 S 蛋白结合,形成成熟的病毒粒子,通过胞吐作用释放到细胞外<sup>[13]</sup>。

## 2 PEDV 与细胞抗病毒天然免疫

### 2.1 细胞抗病毒天然免疫及其信号通路调节

天然免疫是机体抵抗微生物感染的第一道抵抗防线。天然免疫应答协调一系列信号传导途径,用以阻止入侵病原体复制和其引发的疾病。病毒感染宿主后,宿主立即启动抗病毒天然免疫反应,诱导干扰

素产生.一旦病原体破坏了机体的物理屏障,它就会被不同的免疫细胞和非免疫细胞检测到.这种检测是通过宿主模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别病原体相关的分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)介导的PAMP激活PRR介导的天然免疫应答信号通路,从而诱导产生不同的抗病原体分子,例如细胞因子和趋化因子.这些功能不同的分子共同发挥作用,抵抗病毒等病原体入侵.例如,肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )引发有力的炎症应答,限制病原体生长并将免疫细胞募集到感染位点; I型干扰素(IFN- $\alpha$ 和IFN- $\beta$ )是其中非常重要的分子,可以诱导上百种干扰素激活基因(interferon stimulate gene, ISG)表达,使机体进入抗病毒状态,限制病毒的复制和传播<sup>[14]</sup>. I型IFN不仅活化抑制病毒复制和装配的信号传导级联反应,而且对于激活消除感染的适应性免疫反应系统也是必需的.

与T细胞和B细胞的抗原受体(由于体细胞基因重排和超突变而产生)不同,PRR是宿主进化过程中高度保守的受体.三类模式识别受体:Toll样受体(Toll-like receptor, TLR),维甲酸诱导基因I(retinoic acid inducible gene I, RIG-I)样受体(RIG-I-like receptor, RLR)和NOD样受体(NOD-like receptor, NLR),已经被广泛地研究.病毒入侵后,模式识别受体如胞质中的RLR识别细胞质中的RNA,经衔接蛋白MAVS(又称IPS-1、VISA或者CARDIF)传递信号,激活下游激酶复合体,通过不同机制活化转录因子NF- $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B)和IRF3/7等,导致I型IFN表达. IFN进一步激活IFN信号传导通路,刺激数百个ISG表达,并由ISG发动抗病毒效应.

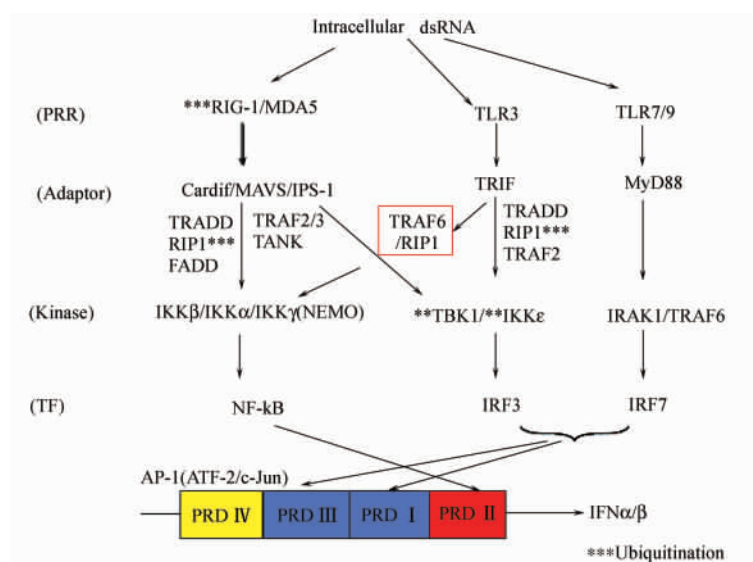
有3种RLR(RIG-I、MDA5和LGP2)都具有RNA解旋酶域,用以识别细胞质中病毒双链RNA<sup>[15]</sup>.此外,RIG-I和LGP2有1个C端调节域结合未加帽5'-三磷酸单链病毒RNA,此种RNA明显不同于其它细胞内被修饰或者5'末端加帽的RNA. RIG-I和MDA5的N端有2个串联CARD域与下游的信号传导衔接蛋白MAVS的CARD域相互作用<sup>[16]</sup>.尽管LGP2没有N端CARD域,但是,其能在RIG-I和MDA5信号传导过程中发挥重要调节作用.最近有研究表明,RIG-I是细胞质中检测正链和负链RNA病毒的关键PRR<sup>[17,18]</sup>.这说明,RIG-I是体内主要的病毒RNA识别受体.在受体水平上,依赖RLR的抗病毒天然免疫反应被下游的衔接蛋白

MAVS所调控<sup>[19]</sup>. MAVS的C端跨膜域将其锚定在线粒体外膜上,这种定位的作用是对活化RLR并诱发信号传导所必需的.最近有报道<sup>[20]</sup>指出,MAVS跨膜域也将其定位在过氧化物酶体上,同时还发现,过氧化物酶体和线粒体上的MAVS相继起作用,从而形成一种抗病毒状态.病毒感染后,过氧化物酶体MAVS诱导快速且不依赖于干扰素的抵抗因子表达,以便提供短期保护;线粒体MAVS激活延迟且依赖干扰素的信号传导途径,扩大和稳定抗病毒应答.线粒体是抗病毒信号传导的重要位点,线粒体外膜定位对于活化细胞质中IKK和TBK1/IKK- $\epsilon$ 具有重要作用,MAVS活化这些激酶并进一步激活转录因子NF- $\kappa$ B和IRF3,引发I型IFN和其它抗病毒分子的产生(如图2所示).

天然免疫信号通路中重要分子和蛋白的泛素化及去泛素化修饰在天然免疫反应调节中起着非常重要的作用.最近研究指出:63位赖氨酸位(K63)连接的多聚泛素化修饰对RIG-I信号传导途径起关键作用.病毒感染后,RIG-I第2个CARD域的赖氨酸残基被K63连接的多聚泛素链修饰,此修饰强化了RIG-I与MAVS结合<sup>[21]</sup>. RIG-I泛素化是被一种RING域泛素连接酶TRIM25催化的.缺失TRIM25的细胞在病毒感染时不能产生I型IFN.此外,RIG-I泛素化位点的1个点突变破坏了它诱导I型IFN产生的能力.泛素化对RIG-I活性有重要作用的另一个证据<sup>[22]</sup>:肿瘤抑制子CYLD(cylindromatosis)能通过去除RIG-I K63连接的多聚泛素化修饰从而抑制诱导I型IFN产生.

泛素化修饰也与RIG-I下游蛋白MAVS介导的信号传导有关. MAVS具有2个共有模序:TRAF6结合位点和另1个与TRAF2或者TRAF3结合的模序.募集TRAF2和TRAF6到MAVS对于NF- $\kappa$ B活化是重要的,然而,募集TRAF3是用于活化IRF3<sup>[23]</sup>.与TRAF2和TRAF6一样,TRAF3也有N端RING域使它能活化IRF3<sup>[23]</sup>.与TRAF3多聚泛素化在MAVS信号传导途径所具有的重要作用一致的另一个证据,DUBA,一个最新确定的去泛素化酶(DUB),通过特异地降解TRAF3 K63连接的多聚泛素化修饰,从而抑制TBK1和IRF3的活化<sup>[24]</sup>.

ZAP(zinc-finger CCCH-type antiviral protein 1, 锌指CCCH型抗病毒蛋白1)也称为聚ADP核糖聚合酶-13(Poly(ADP-ribose) polymerase-13, PARP-13). ZAP与病毒RNA相互作用后,募集RNA外核体和DEAD-box的RNA解旋酶p72高效地降解



**Fig. 2 PRRs-mediated signaling pathway of host innate antiviral immune responses** Viral dsRNA or ssRNA is recognized by PRRs (RIG-I or TLRs) and association with the downstream adaptor MAVS for RIG-I, TRIF for TLRs and MyD88 for TLR7/9. Activated signaling recruits the novel adaptor molecule STING which is interaction with TRAF3 and TBK1- $\text{IKK}\epsilon$ , finally leading to IFN induction

RNA<sup>[25]</sup>. ZAPS (较短构型的 ZAP) 被 5'三磷酸 RNA 特异性地诱导 (正调控作用), 其功能是作为 RIG-I 介导的信号传导途径的调节子. ZAPS 与 RIG-I 相互作用后启动 RIG-I 的寡聚化和 ATP 酶活化, 从而导致活化转录因子 IRF3 和 NF- $\kappa$ B<sup>[26]</sup>. ZAPS 是抗病毒天然免疫反应 RIG-I 信号传导途径的又一个关键调节因子.

## 2.2 PEDV 与细胞抗病毒天然免疫

宿主抗病毒天然免疫反应最快速有效的抗病毒应答是产生 I 型干扰素 (IFN $\alpha/\beta$ ). 尽管 SARS-CoV、MHV 和许多其它冠状病毒对 I 型 IFN 都非常敏感, 而且 SARS-CoV 和 MHV 在感染期间产生了大量可以诱导 IFN 产生的 dsRNA, 但它们仍然是高致病性的. 这说明, 冠状病毒在进化过程中形成了某些特定机制来逃避或者抑制宿主抗病毒天然免疫应答. 事实上, 我们的研究和国际上其他小组的研究已证明, 冠状病毒如 SARS-CoV、NL63-CoV 和 MHV 感染过程中都不能诱导 IFN- $\beta$  产生<sup>[27-30]</sup>.

我们课题组最近研究发现, PEDV 感染细胞后不诱导 IFN- $\beta$  产生, 并且负调节 Poly (I:C) 激活的 IFN- $\beta$  表达通路 (待发表). IFN 转录需要活化转录因子 NF- $\kappa$ B、IRF3 和 AP-1 等. 我们对 PEDV 如何负调节 IFN- $\beta$  表达通路做了进一步研究, 发现 PEDV 抑制 IRF3 活化. 因此, 我们推测 PEDV 可能是通过抑制 IRF3 的活化从而负调节 IFN- $\beta$  表达通路. 这与

之前的报道 (冠状病毒感染能够引起宿主低水平 I 型 IFN 的产生) 一致. 病毒通过编码某种多功能蛋白阻止或抵御宿主抗病毒天然反应. 有报道揭示<sup>[31]</sup>, SARS-CoV 除 N 蛋白、ORF3b、ORF6、Nsp1、Nsp3 外, Nsp7 和 Nsp15 也是干扰素拮抗剂. 我们课题组前期研究<sup>[32]</sup>发现, 冠状病毒 NL63 PLP2 蛋白酶除具有经典蛋白酶水解活性外, 还具有 DUB 活性. 我们课题组另一研究<sup>[29]</sup>发现, SARS PLpro 蛋白酶是一种 IFN 拮抗剂. 这些研究结果进一步揭示了冠状病毒编码的蛋白对于抵抗宿主抗病毒天然免疫反应的重要性以及冠状病毒调控天然免疫反应的多样性和复杂性. 这也许是导致冠状病毒致病性和免疫性差异的机制之一.

## 2.3 PEDV PLP 蛋白酶与宿主抗病毒天然反应

PEDV 侵入细胞后, 其正义单链基因组 RNA 立即被释放入细胞质, 翻译产生 2 个多聚蛋白: ppla 和 pplab. ppla 的非结构蛋白 nsp3 编码 2 个木瓜样蛋白酶 PLP1 和 PLP2 结构域. PLP 蛋白酶加工病毒复制酶多聚蛋白的氨基末端. 通过分析比对<sup>[33]</sup>, 我们预测 PEDV 的 2 个木瓜样蛋白酶 (PLP1 和 PLP2) 的核心结构域氨基酸序列分别位于 Aa1002-Aa1270 和 Aa1618-Aa1920 (参考 PEDV CV777 毒株, 氨基酸编号从 pplab 第 1 个氨基酸起始), 如图 1 所示.

蛋白酶是所有冠状病毒复制周期中的重要蛋白, 有利于复制酶复合体的加工、定位、功能发挥、病

毒 RNA 合成和病毒复制. 前期报道,许多冠状病毒(例如 MHV-A59、SARS-CoV 和 NL63-CoV 等) PLP 蛋白酶不但具有蛋白酶活性,还具有去泛素化酶(DUB)活性. 我们课题组最新研究<sup>[30]</sup>发现,冠状病毒 NL63 和 SARS 的木瓜样蛋白酶结构域具有多功能的特征(包括蛋白酶活性、DUB 活性和干扰素拮抗活性). 为了证实 DUB 活性是否是所有冠状病毒 PLP 蛋白酶都具有的生物学特性,本研究选用动物冠状病毒猪流行性腹泻病毒(PEDV)作为研究对象. 针对这一问题,我们将 PEDV 的 2 个 PLP 蛋白酶分别与泛素分子共转染细胞后,通过 Western 印迹检测,发现 PEDV PLP2 蛋白酶具有明显的 DUB 活性,但是 PLP1 不具有 DUB 活性. 那么,PLP2 DUB 活性对其它连接形式的泛素是否具有底物特异性? 通过同样的方法,我们证实 PEDV PLP2 对 48 位赖氨酸(K48)连接的多聚泛素化和 K63 连接的多聚泛素化修饰也具有 DUB 活性,说明 PLP2 DUB 活性对 K48 和 K63 连接的多聚泛素无底物特异性. 这些结果说明, PEDV PLP2 是 PEDV 编码的新型 DUB. 根据报道, K48 连接的多聚泛素可以介导目标蛋白通过泛素-蛋白酶体途径降解;而 K63 连接的多聚泛素可以调节蛋白相互作用和胞内定位从而影响信号传导通路活化. 分别将 PEDV PLP1 和 PLP2 与 IFN- $\beta$ -luc 和做内参的 PRL Renilla 荧光素酶报告基因共转染细胞 24 h,然后用仙台病毒刺激 16 h,通过双荧光素酶报告基因测定技术测定. 发现 PLP1 对干扰素无拮抗作用;PLP2 对仙台病毒激活的 IFN- $\beta$  表达具有明显抑制作用,并且此抑制作用呈现明显的剂量依赖性,说明 PLP2 是 PEDV 编码的一种干扰素拮抗剂.

深入研究 PEDV PLP2 这个 PEDV 编码的多功能蛋白,我们认为, PLP 精巧的结构是其发挥功能的基础. PLP 三联体蛋白酶催化位点(C-H-D)是行使其蛋白酶水解功能的基础. 我们通过点突变技术构建了 PLP2 蛋白酶催化活性位点突变体. 通过分析<sup>[31]</sup>,我们预测与 PLP2 蛋白酶催化活性相关的氨基酸位点为 C1729、H1888 和 D1901,形成特征性 C-H-D 三联氨基酸残基. 通过定点突变技术构建 PLP2 蛋白酶催化活性位点的 3 个突变体, PEDV PLP2 C1729A, PEDV PLP2 H1888A 和 PEDV PLP2 D1901A. 研究发现, PLP2 蛋白酶催化活性位点突变后 PLP2 DUB 活性明显被抑制,说明 PLP2 蛋白酶催化活性位点同时也是其 DUB 活性关键位点;同时这 3 个突变体的干扰素拮抗能力也明显被减弱,说明

其干扰素拮抗功能与其蛋白酶催化活性密切相关. DUB 活性对病毒在宿主细胞中的复制及其逃避宿主细胞的免疫机制中发挥着非常重要的作用.

近年来,越来越多的细菌和病毒病原体被发现具有泛素-去泛素的功能,而泛素-去泛素化修饰在抗病毒天然免疫信号传导中也发挥重要作用. 最新报道<sup>[34]</sup>发现, MHV-A59 PLP2 通过与 TBK1 相互作用并对其去泛素化从而负调节 IFN 信号传导通路. 进一步研究发现, PEDV PLP2 与抗病毒天然免疫通路中的重要模式识别受体——维甲酸诱导基因 1(RIG-I)和重要调节蛋白——干扰素基因刺激子(stimulator of interferon genes, STING)发生相互作用,并对 RIG-I 和 STING 具有明显的 DUB 活性. 泛素化修饰在天然免疫应答的信号传导中发挥重要作用,并且 RIG-I 和 STING 都是被泛素化修饰的. 根据上述结果,我们认为, PEDV PLP2 是通过与宿主抗病毒天然免疫系统中的重要模式识别受体 RIG-I 及其调节蛋白 STING 发生相互作用,并对 RIG-I 和 STING 发生去泛素化修饰从而发挥其抑制宿主抗病毒天然免疫反应的作用(如 Fig. 2 所示).

### 3 展望

冠状病毒是感染人类和动物的一类重要病原. 动物冠状病毒感染对畜牧业持续健康发展构成巨大隐患. 抗病毒天然免疫应答是机体抵抗病毒感染的第一道防线. 病毒在漫长的进化过程中形成了适应宿主以及与宿主长期共存亡的特殊分子机制. 目前,对动物冠状病毒及其与宿主抗病毒天然免疫反应的关系及其机制还不很清楚. 人类和动物冠状病毒种类多样性、病毒复制周期的复杂性以及病毒编码蛋白功能的多样性,可能决定了动物冠状病毒与宿主抗病毒天然免疫反应及其机制的复杂性. 目前普遍认为,冠状病毒通过编码特定蛋白来逃逸或抑制宿主抗病毒天然免疫反应. 动物冠状病毒 PEDV 的 PLP 蛋白酶是一种多功能蛋白酶,在病毒调节宿主天然免疫反应过程中具有重要功能,这一发现为阐明 PEDV 对宿主抗病毒天然免疫反应的调节作用和其致病机制提供了重要理论依据,为研制 PEDV 新的免疫防治措施提供了重要理论基础.

### 参考文献(References)

- [1] Dijkman R, van der Hoek L. Human coronaviruses 229E and NL63: close yet still so far [J]. J Formos Med Assoc, 2009, 108(4): 270-279



- [2] Chen J, Wang C, Shi H, *et al.* Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China [J]. Arch Virol, 2010, **155**(9):1471-1476
- [3] Kang T J, Seo J E, Kim D H, *et al.* Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants [J]. Protein Expr Purif, 2005, **41**(2):378-383
- [4] Xiao H, Xu L H, Yamada Y, *et al.* Coronavirus spike protein inhibits host cell translation by interaction with eIF3f [J]. PLoS One, 2008, **3**(1):e1494
- [5] Chow K Y, Yeung Y S, Hon C C, *et al.* Adenovirus-mediated expression of the C-terminal domain of SARS-CoV spike protein is sufficient to induce apoptosis in Vero E6 cells [J]. FEBS Lett, 2005, **579**(30):6699-6704
- [6] Yang Y, Xiong Z, Zhang S, *et al.* Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors [J]. Biochem J, 2005, **392**(Pt 1):135-143
- [7] Siu K L, Kok K H, Ng M H, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3, TANK, TBK1/IKKepsilon complex [J]. J Biol Chem, 2009, **284**(24):16202-16209
- [8] Lu X, Pan J, Tao J, *et al.* SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- $\beta$  response by targeting initial step of IFN- $\beta$  induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism [J]. Virus Genes, 2010, Oct 26 [Epub ahead of print]
- [9] Frieman M, Baric R. Mechanisms of severe acute respiratory syndrome pathogenesis and innate immunomodulation [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2008, **72**(4):672-685
- [10] Tohya Y, Narayanan K, Kamitani W, *et al.* Suppression of host gene expression by nsp1 proteins of group 2 bat coronaviruses [J]. J Virol, 2009, **83**(10):5282-5288
- [11] Kamitani W, Huang C, Narayanan K, *et al.* A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein [J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, **16**(11):1134-1140
- [12] 李宝贤, 马广鹏, 葛俊伟, 等. 猪流行性腹泻病毒功能性受体的鉴定 [J]. 病毒学报 (Li Bao-Xian, Ma Guang-Peng, Ge Jun-Wei, *et al.* Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus [J]. Chin J Virol, 2009, **25**(3):220-225
- [13] Brian D A, Baric R S. Coronavirus genome structure and replication [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, **287**:1-30
- [14] 杨宇东, 孙莉, 陈忠斌. SARS 冠状病毒 PLpro 蛋白酶的结构与功能 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Yang Yu-Dong, Sun Li, Chen Zhong-Bin. Structure and functions of papain-like protease of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2010, **26**(1):15-21
- [15] Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses [J]. Immunity, 2007, **27**(3):370-383
- [16] Kawai T, Takahashi K, Sato S, *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I and Mda5-mediated type I interferon induction [J]. Nat Immunol, 2005, **6**(10):981-988
- [17] Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection [J]. Immunol Rev, 2009, **227**(1):75-86
- [18] Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors [J]. Immunol Rev, 2009, **227**(1):54-65
- [19] Nakhaei P, Genin P, Civas A, *et al.* RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection [J]. Semin Immunol, 2009, **21**(4):215-222
- [20] Dixit E, Boulant S, Zhang Y, *et al.* Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity [J]. Cell, 2010, **141**(4):668-681
- [21] Gack M U, Shin Y C, Joo C H, *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity [J]. Nature, 2007, **446**(7138):916-920
- [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 [J]. EMBO Rep, 2008, **9**(9):930-936
- [23] Saha S K, Pietras E M, He J Q, *et al.* Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif [J]. EMBO J, 2006, **25**(14):3257-3263
- [24] Kayagaki N, Phung Q, Chan S, *et al.* DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production [J]. Science, 2007, **318**(5856):1628-1632
- [25] Chen G, Guo X, Lv F, *et al.* p72 DEAD box RNA helicase is required for optimal function of the zinc-finger antiviral protein [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, **105**(11):4352-4357
- [26] Hayakawa S, Shiratori S, Yamato H, *et al.* ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses [J]. Nat Immunol, 2011, **12**(1):37-44
- [27] Spiegel M, Pichlmair A, Martínez-Sobrido L, *et al.* Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3 [J]. J Virol, 2005, **79**(4):2079-2086
- [28] Zhou H, Perlman S. Mouse hepatitis virus does not induce Beta interferon synthesis and does not inhibit its induction by double-stranded RNA [J]. J Virol, 2007, **81**(2):568-574
- [29] Devaraj SG, Wang N, Chen Z, *et al.* Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. J Biol Chem, 2007, **282**(44):32208-32221
- [30] Clementz M A, Chen Z, Banach B S, *et al.* Deubiquitinating and interferon antagonism activities of coronavirus papain-like proteases [J]. J Virol, 2010, **84**(9):4619-4629
- [31] 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- $\kappa$ B signaling [J]. J Virol , 2009 , **83** ( 13 ) : 6689-6705
- [32] Chen Z , Wang Y , Ratia K , *et al.* Proteolytic processing and deubiquitinating activity of papain-like proteases of human coronavirus NL63 [J]. J Virol , 2007 , **81** ( 11 ) : 6007-6018
- [33] Barretto N , Jukneliene D , Ratia K , *et al.* The papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus has deubiquitinating activity [J]. J Virol , 2005 , **79** ( 24 ) : 15189-15198
- [34] Wang G , Chen Z , Zheng D , *et al.* PLP2 of mouse hepatitis virus A59 ( MHV-A59 ) targets TBK1 to negatively regulate cellular type I interferon signaling pathway [J]. PLoS One , 2011 , **6** ( 2 ) : e17192