

DOI: 10.13376/j.cbls/2016048

文章编号: 1004-0374(2016)03-0391-08

植物病毒蛋白核质转运的研究进展

瞿思宜, 户海燕, 沈洋洋, 施曼玲*

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要: 植物病毒编码一些含有核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 或者核输出信号 (nuclear export signal, NES) 的核质转运蛋白, 这些已被验证的转运蛋白有三种类型: 核输入蛋白、核输出蛋白和核质穿梭蛋白。它们通过识别寄主核质转运受体 Importin α 和 Importin β , 介导含有经典核定位信号的蛋白质入核过程, 以及寄主蛋白 Ran 参与, 由 XPO1 介导的富含亮氨酸核输出信号的蛋白质出核过程。植物病毒核质转运蛋白利用寄主的转运机制, 进出细胞核发挥相应功能, 如介导病毒基因组的核输入和核输出、介导病毒长距离运输及系统侵染、抵抗寄主细胞启动的 RNA 沉默、调节寄主细胞转录活性、调控病毒的复制及表达和参与病毒症状的形成等。对植物病毒蛋白核质转运的相关研究进展进行综述, 着重介绍植物病毒蛋白核质转运类型、核输入和输出信号、转运机制和生物学意义, 以及寄主蛋白介导的互作等研究的最新成果。

关键词: 植物病毒; 核质转运; 核定位信号; 核输出信号

中图分类号: Q939.46 **文献标志码:** A

Research advances in nucleocytoplasmic transport proteins of plant viruses

QU Si-Yi, HU Hai-Yan, SHEN Yang-Yang, SHI Man-Ling*

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: Some plant virus encoded proteins contain nuclear localization signals (NLS) or nuclear export signals (NES) that mediate nucleocytoplasmic transport by three types of transport proteins: nuclear import proteins, nuclear export proteins and nucleocytoplasmic shuttling proteins. Virus proteins containing classical NLS are imported into the nucleus by recognizing the host nuclear transport receptors Importin α and Importin β , whereas the XPO1 protein mediates leucine-rich NES-dependent protein to export from the nucleus by involvement of the host Ran protein. The plant virus nucleocytoplasmic transport proteins get in and out of the nucleus to regulate biological functions through the host transport mechanism. Such functions include meditating nuclear import and export of the viral genome, local and long-distance virus movement, resisting host-induced RNA silencing, controlling virus replication and expression, regulating transcriptional activity of host cells and development of the disease phenotype. This review presents an overview of research advances in nucleocytoplasmic transport of plant virus proteins. We have mainly focused on types of nucleocytoplasmic transport proteins and their NLS and NES motifs, mechanisms of action and biological significance, and the host protein-mediated interactions.

Key words: plant viruses; nucleocytoplasmic transport; nuclear localization signal; nuclear export signal

真核细胞内的大多数蛋白质通过核质转运进行跨核膜运输, 蛋白质的核质转运介导了细胞核与细胞质的物质交换及信号交流, 因此在真核生物的生命活动中就显得尤为重要。许多植物病毒会编码一些含有核输入或核输出信号的蛋白质, 这些蛋白质通过识别寄主植物核质转运受体, 利用寄主的核质

转运机制, 进出细胞核并发挥病毒蛋白的相应功能。本文将对植物病毒蛋白核质转运的相关研究进展作

收稿日期: 2015-08-03; 修回日期: 2015-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371916); 浙江省自然科学基金项目(LY12C14013)

*通信作者: E-mail: smiling1969@163.com

一介绍。

1 植物病毒蛋白核质转运的类型

已验证的植物病毒蛋白核质转运的类型可以分为三类：第一类是核输入蛋白(见表1)，通过核质转运途径，定位于细胞核的蛋白，如细胞核弹状病毒属中的苦苣菜黄网病毒(*Sonchus yellow net virus*, SYN_V)等的核衣壳蛋白N(nucleocapsid protein N)^[1-3]、双生病毒中的番茄黄化曲叶病毒-中国分离物Y10(*Tomato yellow leaf curl virus—China*, TYLCCNV-Y10)等的βC1蛋白^[4]、鸭茅斑驳病毒(*Cocksfoot mottle virus*, CfMV)等的外壳蛋白(coat protein, CP)^[5-7]。此外，还有芜菁皱缩病毒(*Turnip crinkle virus*, TCV)的P8蛋白^[8]、甜菜黑色焦枯病毒(*Beet black scorch virus*, BBSV)的运动蛋白P7a^[9]、马铃薯A病毒(*Potato virus A*, PVA)的核包涵体蛋白a(nuclear inclusion protein a, NIa)^[10]以及贝因迪黄脉花叶病毒(*Bhendi yellow vein mosaic virus*,

BYVMV)的转录后基因沉默抑制子C2蛋白^[11]。

第二类是核输出蛋白(见表2)，通过核质转运，定位于细胞质的蛋白，如番茄曲叶爪哇病毒(*Tomato leaf curl Java virus*, ToLCJAV)的V2蛋白^[12]，双生病毒中的BYVMV等的βC1蛋白^[4]、豇豆蚜传花叶病毒(*Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV)的HC-Pro(helper component-proteinase)蛋白^[13]，还有烟草坏死病毒A中国分离物(*Tobacco necrosis virus A Chinese isolate*, TNV-A^c)的P6蛋白^[14]。

第三类是核质穿梭蛋白(见表3)，即能够穿梭于细胞核和细胞质之间的蛋白，如苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*, AMV)的CP^[15]、花生丛簇病毒(*Groundnut rosette virus*, GRV)的ORF3蛋白^[16]、南瓜卷叶病毒(*Squash leaf curl virus*, SLCV)的核质穿梭蛋白(nuclear shuttle protein, NSP)^[17]。

此外，有些植物病毒蛋白的核质转运还会受到其他蛋白的影响，如SYNV的P蛋白单独表达时是核质共定位的，但当存在N蛋白时，P蛋白就只定

表1 一些植物病毒的核输入蛋白及核输入信号

植物病毒	核输入蛋白	核定位信号
甜菜黑色焦枯病毒(<i>Beet black scorch virus</i> , BBSV) ^[5,9]	P7A	¹² RRVRSR ¹⁷
	CP	⁴ KRNKGGKKSR ¹⁷
马铃薯卷叶病毒(<i>Potato leafroll virus</i> , PLRV) ^[6]	CP	¹⁷ PRRRRRQSLRRRANR ³¹
鸭茅斑驳病毒(<i>Cocks foot mottle virus</i> , CfMV) ^[7]	CP	NLS1(较强): ²² QPGGRR RRRGRS ³³ NLS2(较弱): ¹ MMVRKG AATKAPQQPKPKAQQQ ²²
水稻东格鲁杆状病毒(<i>Rice tungro bacilliform virus</i> , RTBV) ^[23]	CP	NLS1: ⁴⁷⁹ KRPK ⁴⁸²⁻⁴⁹⁷ KRK ⁴⁹⁹ NLS2: ⁷⁴⁴ KRK ⁷⁴⁶⁻⁷⁵⁸ RRK ⁷⁶⁰
绿豆黄花叶病毒(<i>Mungbean yellow mosaic virus</i> , MYMV) ^[23]	CP	NLS1: ³ KR ⁴ NLS2: ⁴¹ KRRR ⁴⁴
芜菁皱缩病毒(<i>Turnip crinkle virus</i> , TCV) ^[8]	P8	NLS1: ¹⁹ KRKK ²² NLS2: ²⁹ KKR ³¹⁻⁴⁴ KKR ⁴⁶
水稻黑条矮缩病毒(<i>Rice black-streaked dwarf virus</i> , RBSDV) ^[24]	P8	²² KRPNDPINHRKTKK ³⁶
烟草坏死病毒A中国分离物(<i>Tobacco necrosis virus A Chinese isolate</i> , TNV-A ^c) ^[14]	P8	¹⁵ RGRARSSEGKK ²⁵
菊花B病毒(<i>Chrysanthemum virus B</i> , CVB) ^[25]	p12	⁴⁶ RRRR ⁵⁰
兰花斑点病毒(<i>Orchid fleck virus</i> , OFV) ^[26]	P	¹²⁴ PPPKRKH ¹³⁰
黄瓜花叶病毒(<i>Cucumber mosaic virus</i> , CMV) ^[27]	2b	²² KRRRRR ²⁷
苦苣菜黄网病毒(<i>Sonchus yellow net virus</i> , SYN _V) ^[2,28]	N	⁴⁴⁵ PSRKRSDALTTEKPKK ⁴⁶¹
马铃薯黄矮病毒(<i>Potato yellow dwarf virus</i> , PYDV) ^[3]	N	⁴¹⁹ QKRANEEAPPAAQKR ⁴³³
番茄黄化曲叶病毒-中国分离物Y10(<i>Tomato yellow leaf curl virus—China</i> , TYLCCNV-Y10) ^[4]	βC1	⁴⁵ PALAKKK ⁵¹
马铃薯A病毒(<i>Potato virus A</i> , PVA) ^[10]	NIa	NLS1: ⁴ KRQRQK ⁹ NLS2: ⁴¹ KKGKTKGKTH ⁵⁰
贝因迪黄脉花叶病毒(<i>Bhendi yellow vein mosaic virus</i> , BYVMV) ^[11]	C2	¹⁷ KVQHKEAKRVHRRRR ³¹
甜菜西方黄化病毒(<i>Beet western yellows virus</i> , BWYV) ^[5]	P0	

表2 一些植物病毒的核输出蛋白及核输出信号

植物病毒	核输出蛋白	核输出信号
番茄曲叶爪哇病毒(Tomato leaf curl Java virus, ToLCJAV) ^[12]	V2	²⁰ LAVKYLQLV ²⁹
贝因迪黄脉花叶病毒(Bhendi yellow vein mosaic virus, BYVMV) ^[4]	βC1	¹⁰⁵ LEEDIHMVDI ¹¹⁵
秋葵曲叶病毒(Okra leaf curl virus, OLCuV) ^[4]	βC1	
棉花曲叶病毒(Cotton leaf curl virus, CLCuV) ^[4]	βC1	
赛葵黄脉病毒(Malvastrum yellow vein virus, MYVV) ^[4]	βC1	
胜红蓟黄脉病毒(Ageratum yellow vein virus, AYVV) ^[4]	βC1	
豇豆蚜传花叶病毒(Cowpea aphid-borne mosaic virus, CABMV) ^[13]	HC-Pro	
烟草坏死病毒A中国分离物(Tobacco necrosis virus A Chinese isolate, TNV-A ⁵) ^[14]	P6	¹³ TLFPYFAILILILAILVV ³¹

表3 一些植物病毒的核质穿梭蛋白及核输入和输出信号

病毒	核质穿梭蛋白	核定位信号	核输出信号
苜蓿花叶病毒(Alfalfa mosaic virus, AMV) ^[15]	CP	⁵ KKAGGKAGK ¹³	²⁰⁴ LRLSIVGLF ²¹²
番茄曲叶爪哇病毒(Tomato leaf curl Java virus, ToLCJAV) ^[22]	CP	NLS1: ⁶ KVRRR ²⁰ NLS2: ⁵² RKPR ⁵⁵	²⁴⁵ LKIRIY ²⁵⁰
烟草坏死病毒A中国分离物(Tobacco necrosis virus A Chinese isolate, TNV-A ⁵) ^[14]	CP	¹⁶ RTPEQQVEIDQ RDARRLARGR ³⁶	NES1: ⁷⁵ RPVVPK ⁸⁰ NES2: ¹²² LAGISDLYSK YRWLSCEL ¹³⁹
南瓜曲叶病毒(Squash leaf curl virus, SqLCV, SLCV) ^[17]	BR1(NSP)	NLS1: ²⁵ KRSYGA ARGDDRRRP ³⁹ NLS2: ⁸⁷ PNRTRTYIK ⁹⁵	¹⁷⁷ VTKRVVSLEKD TLLIDLHGTTQL ¹⁹⁹
花生丛病毒(Groundnut rosette virus, GRV) ^[16]	ORF3	¹⁰⁸ RPRRRAGRS GGMDPR ¹²²	¹⁴⁸ LLPSLLNTL ¹⁵⁶
烟草蚀刻病毒(Tobacco etch virus, TEV) ^[48]	P1	⁸⁹ LTHGKRRKVS NNKRNRRRK ¹⁰⁹	²⁵¹ LTFGSSGLVL ²⁶⁰
甜菜坏死黄脉病毒(Been necrotic yellow vein virus, BNYVV) ^[30]	p25	⁵⁷ KRIRFR ⁶²	¹⁶⁹ VYMVCLVNTV ¹⁷⁸
马铃薯帚顶病毒(Potato mop-top virus, PMTV) ^[31-32]	TGB1	¹¹ HRVKKD ¹⁶ 和 ³⁷ FRTN NNKKTQNWKPRS ⁵²	
小麦黄花叶病毒(Wheat yellow mosaic virus, WYMV) ^[18]	VPg	³² KEKRKK ³⁷	¹²³ IKDDKGTahrMDI ¹³⁵
苦苣菜黄网病毒(Sonchus yellow net virus, SYN ^V) ^[2]	P		
苘麻花叶病毒(Abutilon mosaic virus, AbMV) ^[19]	NSP		

位于细胞核^[2]; 小麦黄花叶病毒(Wheat yellow mosaic virus, WYMV)的VPg(virus protein, genome-linked)单独表达时只定位于细胞核,但在感染WYMV的细胞中则是核质共定位^[18]; 苘麻花叶病毒(Abutilon mosaic virus, AbMV)的NSP单独表达时只定位在细胞核,但当存在运动蛋白(movement protein, MP)时,NSP则定位在质膜^[19]。

2 植物病毒蛋白的核输入和核输出信号

2.1 核输入信号

在真核细胞中,小分子的蛋白能够通过自由扩散进入细胞核,而相对分子质量大于40~60 k的大分子蛋白则需要通过主动运输才能进入细胞核^[14]。通过主动运输进入细胞核的蛋白质通常含有特殊的

核定位信号(nuclear localization signal, NLS),通过NLS与转运受体的相互作用,经过核孔复合体(nuclear pore complex, NPC)进入细胞核。经典核定位信号(classical NLS, cNLS)是存在于核蛋白中最为广泛的一类NLS,又可以分为单一型(monopartite)和双分型(bipartite)两类。单一型NLS是最初在猿猴病毒40(Simian virus 40, SV40)大T抗原中发现,通常由一段连续的碱性氨基酸序列排列而成,其保守序列K(K/R)X(K/R),X可以是除D、E以外的任意氨基酸^[14,20]。双分型NLS由两段碱性氨基酸被中间几个到十几个非保守的氨基酸所隔开而形成,序列通式为R/K(X)₁₀₋₁₂RRKK^[14,20]。在植物病毒的蛋白中也有发现这两类NLS,如TCV的运动蛋白P8中存在两个NLS:一个属于单一型NLS,其

关键氨基酸序列为¹⁹KRKK²²；另一个属于双分型 NLS，关键氨基酸序列是²⁹KKR³¹和⁴⁴KKR⁴⁶[18]。

2.2 核输出信号

有些蛋白质可以通过其含有的核输出信号 (nuclear export signal, NES) 与转运受体互作，从 NPC 出核，定位于细胞质。NES 首次在 1995 年被发现，是分别存在于 HIV 的 Rev 蛋白、人类 cAMP- 依赖的蛋白激酶抑制蛋白 (protein kinase inhibitors, PKI) 和爪蟾的转录因子 IIIA (transcription factor IIIA, TFIIIA) 中的一个短小肽段，该肽段能帮助蛋白穿过核膜，定位于细胞质 [17]。因为这种肽段中往往富含亮氨酸或其他疏水性氨基酸，所以被命名为富含亮氨酸的核输出信号 (leucine-rich NESs) [17,21]。其通式为 LXXXLXXLXL，X 的数目可以变化，L 也可以换成其他疏水性氨基酸，如缬氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸 [14]。很大一部分植物病毒蛋白上的核输出信号属于这种 NES 类型，如 AMV 的 CP 上的 NES 为²⁰⁴LRSLITVGL²¹²[15]，TNV-A^c 的 CP 的两个 NES 其中之一为¹²²LAGISDLYSKYRWLSCEL¹³⁹[14]。此外，也存在其他类型的 NES，如 TNV-A^c 的 CP 的另一个 NES 结构为⁷⁵RPIVPK⁸⁰[14]。

一些植物病毒的蛋白常同时含有 NLS 和 NES，因此这类蛋白质能穿梭于细胞核和细胞质之间，既能定位于细胞质，也能定位于细胞核。例如，Sharma 等 [22] 发现 ToLCJAV 的 CP 的 N 端有两个 NLS，即¹⁶KVRRR²⁰和⁵²RKPR⁵⁵，C 端有一个 NES，即²⁴⁵LKIRIY²⁵⁰。

3 与病毒蛋白核质转运相关的寄主蛋白

3.1 核质转运受体

核转运受体在蛋白质的核质转运过程中发挥重要的作用，包括核输入蛋白 (Importin) 和核输出蛋白 (Exportin) [33]。核输入蛋白能结合底物蛋白上的核定位信号，从而将底物蛋白转运入核。核输出蛋白则结合底物蛋白上的核输出信号，把底物蛋白转运出核。另外，有些核转运受体能同时参与底物蛋白的核输入和核输出过程 [33-34]。按照作用方式的不同，核转运受体可分为 Importin α 家族和 Importin β 家族。

3.1.1 Importin α

Importin α 是一类能够介导具有核定位信号的蛋白质进入细胞核的蛋白质 [35]，具有三个结构单位：亲水性的 C 端，功能未知；中间是一个 NLS 结合域，含有 10 个串联重复的 Armadillo (ARM) 结

构域；含有 IBB 结构域 (Importin β -binding domain) 的 N- 端，既可以结合 Importin β ，也可以结合 Importin α 自身序列中的 ARM。Importin α 在核质转运过程中可以作为接头蛋白将底物蛋白与 Importin β 相连 [33-34]，即有些 Importin β 不能直接结合底物，需要底物与接头蛋白连接后，Importin β 结合接头蛋白，从而串联起来。Importin α 家族成员结构和功能比较保守，其 C- 端和 N- 端都能结合不同的底物蛋白并将其转入核内 [36]，此外，Importin α 的功能具有冗余性 [33]，在拟南芥中已经发现了至少 9 个 Importin α 的基因 [37]，水稻中发现了至少 4 个，本氏烟中发现了 2 个 (NbIMP α 1 和 NbIMP α 2)，小米椒中也至少发现了 2 个 [38]。

已有研究表明，某些植物病毒蛋白通过与植物的 Importin α 发生互作，从而进入细胞核。Herranz 等 [15] 通过酵母双杂交和双分子荧光互补实验证明了 AMV 的 CP 能与拟南芥的 Importin α 发生相互作用，间接证明 AMV 的 CP 能依赖 Importin α 进入细胞核；另外发现 PMTV 的 TGB1 蛋白能通过其 N 端结构域与本氏烟的 Importin α 蛋白互作，从而转运入核 [31]。如果沉默本氏烟的 Importin α 基因则会降低 TGB1 在细胞核的积累量，并减少病毒在新叶的积累，且减弱病毒的系统运动能力 [31]。

3.1.2 Importin β

根据转运方向的不同，可以将 Importin β 家族成员分为三类：第一类是能介导底物转运进入细胞核的核输入受体，如 Importin β 1；第二类是介导底物转运出核的核输出受体，如核转运蛋白受体 1 (Karyopherin receptor, CRM1, exportin 1, XPO1)，在人类、酵母、植物、爪蟾、果蝇等生物中都发现 XPO1 能特异性识别富含亮氨酸的 NESs，在这些物种中，XPO1 序列同源性达到 42%~50% [21,39]；第三类是既能介导底物转运入核，又能介导底物转运出核的双向转运受体 [40]。Importin β 也可以分为三个结构单位：C 端能结合底物蛋白或接头蛋白；中部 HEAT 重复结构域通过改变构象可以结合不同的底物；N 端是 Ran 结合结构域。有些 Importin β 可以直接识别并结合底物的 NLS 或者 NES，有些则需要接头蛋白的帮助。此外，Importin β 家族成员的结构和功能差异较大，进化起源不同，在拟南芥中至少发现了 18 个 Importin β 基因 [33]。某些植物病毒的蛋白质能通过植物的 Importin β 蛋白发生相互作用，而进入或转出细胞核。如 TNV-A^c 的 CP 的 NES2 受到 XPO1 调控使蛋白质转运出核 [14]。

3.2 Ran

Ran (Ras-related nuclear protein) 是一种小分子的 G 蛋白, 在 Importin β 家族介导的蛋白质的核质转运中起重要的调节作用, Ran 能与 GTP 或者 GDP 结合成稳定的 Ran-GTP 或者 Ran-GDP 形式^[21]。Ran 在 Ran-GTP 酶激活蛋白 (Ran-GTP-activating protein, RanGAP) 和辅助因子 (Ran-binding protein 1/2, RanBP1/2) 的帮助下能迅速将 Ran-GTP 水解为 Ran-GDP。Ran-GDP 与 Ran 鸟嘌呤交换因子 (Ran-guanine nucleotide exchange factor, RanGEF or RCC1) 相互作用后, 又能转变为 Ran-GTP^[40]。由于 RanGAP 主要定位在核膜外侧, 也就是细胞质中, 而 RanGEF 定位在细胞核内的染色体组蛋白 H2A 与 H2B 上, 这使得核内 Ran-GTP 的浓度约是胞质中的 500 倍, 而 Ran-GDP 则相反^[40], 即细胞核内主要以 Ran-GTP 的形式存在, 细胞质中主要以 Ran-GDP 的形式存在, 这样的浓度差为蛋白质的正常核输出转运提供了保证。核输入受体与 Ran-GTP 的亲和力很高, 两者结合后, 核输入受体就会释放其底物蛋白, 而没有结合货物的核输出受体与 Ran-GTP 的亲和力很低^[41]。如水稻东格鲁杆状病毒 RTBV 和绿豆黄花叶病毒 MYMV 的 CP^[23]、烟草坏死病毒 A 中国分离物 TNV-A^c 的 CP^[14]、甜菜黑色焦枯病毒 BBSV 的 P7a^[9] 等蛋白入核过程就有 Ran 的参与^[23]。

4 植物病毒蛋白核质转运的机制

4.1 含有经典核定位信号的蛋白质转运机制

Importin α 和 Importin β ^[20] 参与含有经典核定位信号的蛋白入核过程。首先, Importin α 作为接头蛋白能识别 cNLS 从而结合“货物”蛋白, 并通过其 IBB 结构域结合 Importin β , 形成“货物-Importin α -Importin β ”三元复合物。Importin β 能与 NPC 蛋白相互作用, 使三元复合物通过 NPC 进入细胞核, 在核内由于 Ran-GTP 能结合 Importin β 并改变其构象, 使其释放 Importin α 和货物蛋白^[40]。Importin β 与 Ran-GTP 形成的复合物可以回到细胞质^[21], Importin α 在一些蛋白如核孔蛋白 2 (nucleoporin 2, Nup2) 和羧酸酯酶 1 (carboxylesterase 1, Ces1) 的辅助下, 重新进入细胞质^[20]。BBSV 的 P7a^[9]、TNV-A^c 的 CP^[14] 等一些病毒蛋白都能与 Importin α 互作, 推测可能是依据该途径进入细胞核。

4.2 富含亮氨酸的核输出信号的蛋白质转运机制

由 XPO1 介导的富含亮氨酸核输出信号的蛋白

质的核输出过程需要 Ran 的参与。在细胞核内, 核输出受体需要与 Ran-GTP 结合后才能识别并结合具有 NES 的底物, 形成的“核输出受体-Ran-GTP-底物”三聚体穿过 NPC 进入细胞质后, 随着 Ran-GTP 水解生成 Ran-GDP, 三聚体解体, 底物释放入细胞质内。细胞质中的 Ran-GDP 在核转运因子 2 (nuclear transport factor 2, Ntf2) 的帮助下重新被送入核, 与核内的 RanGEF 相互作用, 转变为 Ran-GTP^[14, 40]。

XPO1 介导的蛋白质核输出过程可以被来普霉素 B (leptomycin B, LMB) 所抑制, LMB 能直接结合 XPO1, 从而抑制 XPO1 与 NES 的结合, 导致底物蛋白不能核输出^[42], 例如 BNYVV 的 P25 蛋白核输出功能就会被 LMB 抑制^[30]。

5 植物病毒蛋白核质转运的生物学意义

5.1 介导病毒基因组的核输入和核输出

对于双组份双生病毒来说, 如 SLCV 的 NSP 含有两个 NLS 和一个 NES, 分别是一个单一型 NLS、一个双分型 NLS, 以及一个富含亮氨酸的 NES; 对于单组分双生病毒来说, 如 ToLCJAV 的 CP 含有两个 NLS 和一个富含亮氨酸的 NES^[22], 因此 NSP 和 CP 都具有在细胞核和细胞质中穿梭的功能, 且它们都能结合单链 DNA, 所以能介导病毒基因组进入寄主细胞核中, 发生转录和复制, 并将新生的基因组转运出核, 用于之后的细胞间运动^[43]。

5.2 抵抗寄主细胞启动的 RNA 沉默

植物被病毒感染后可以启动转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS), 其主要机制为: 含有病毒来源的小 RNAs 与寄主细胞的一些酶结合后, 会形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 又能够识别并结合病毒 RNA 从而将其切割、降解, 来起到防御功能。而病毒也进化出各种蛋白来抑制 PTGS, 从而抵抗宿主的防御行为。

研究发现 CMV 的 2b 蛋白和 BWYV 的 P0 蛋白都是 PTGS 的抑制子。这两种蛋白都能够定位于细胞核, 它们的作用靶点都是 RISC 中的一种能够切割 RNA 的重要蛋白质——ARGONAUTE1 (AGO1)。2b 能够抑制 AGO1 的切割活性, 而 P0 则引发 AGO1 的降解, 最终都促使病毒抵抗寄主对病毒 RNA 的沉默。若 2b 的 NLS 突变, 则不能定位于细胞核, 且蛋白不再具有抑制 PTGS 的活性, 可见蛋白的核定位对于抵抗寄主细胞启动的基因沉默

具有重要意义^[5,27,44-45]。

5.3 介导病毒长距离运输及系统侵染

病毒核蛋白粒子 RNP (ribonucleoprotein, RNP) 是病毒长距离运动及系统侵染所必需的, 而 RNP 的形成需要纤维蛋白的帮助。纤维蛋白是一种重要的核仁蛋白, 也是一种 RNA 结合蛋白, 通过核质转运进入细胞质后可以结合病毒的 RNA, 识别并催化起装配作用的蛋白质。GRV 编码的 ORF3 蛋白含有一个富含精氨酸的 NLS 和一个富含亮氨酸的 NES^[16], 因此, ORF3 能入核识别并结合纤维蛋白, 并带其出核进入细胞质, 辅助 RNP 的形成。如果将核仁蛋白的基因沉默, 可以阻止 GRV 的长距离运输, 但是不会影响病毒的复制及细胞间运输^[46]。

5.4 调节寄主细胞转录活性

RBSDV 的小核心蛋白 P8 是一种细胞核定位的蛋白质, 在寄主细胞核中能形成同源二聚体, 抑制寄主细胞的转录活性。可能的机理是 P8 进入细胞核后能阻碍基因转录复合物的形成或降低其活性^[24]。

CVB 的 p12 蛋白是一个核定位蛋白, 含有一个能定位于细胞核的碱性结构域, 这个碱性结构域不仅可以在 p12 的锌指结构域存在时更好地结合 DNA, 还能在结合 RNA 时单独发挥作用, 从而使 p12 具有转录因子的功能^[25]。定位于细胞核的 p12 能通过其锌指结构域特异性结合一个碱性/螺旋-环-螺旋转录因子 (bHLH/TF) 家族的蛋白的启动子, 从而上调这个蛋白的表达, 因此, 将这个蛋白命名为由 p12 上调蛋白——upp-L。upp-L 能促进分裂促进子的表达, 并抑制分离抑制子的表达, 从而促进感染病毒的植物细胞的增殖, 调节组织生长^[29]。

5.5 调控病毒的复制及表达

AMV 的 CP 具有富含赖氨酸的 NLS 和富含亮氨酸的 NES, CP 的浓度可以调控病毒的复制, 低浓度可以促进病毒的复制, 高浓度则抑制^[47]。若将 AMP CP 蛋白的核定位信号进行突变, 则会抑制病毒复制^[15]。TEV 的 P1 蛋白是一个核质穿梭蛋白, 不仅含有一个 NES, 还含有能定位于核仁的序列。在感染早期, P1 会进入细胞核并定位于核仁中, 随后又会离开细胞核定位于细胞质并与核糖体结合。体外实验表明 P1 能促进蛋白质合成, 因而推测在 TEV 侵染寄主的过程中, P1 能促进病毒蛋白的合成^[48]。

5.6 参与病毒症状的形成

BNYVV RNA3 编码的 p25 蛋白具有一个富含

碱性氨基酸的 NLS 和一个 XPO1 介导的 NES, 如果改变 p25 的定位会影响病毒症状的显现。接种 BNYVV RNA1 和 RNA2 的苜蓿, 其叶片会产生轻微的褪绿斑 (chlorotic spot, CS), 但同时接种 RNA1、RNA2 和 RNA3 的叶片则会产生强烈的发黄褪绿斑 (yellow spot, YS)。对 RNA3 进行突变, 得到定位于细胞核或者细胞质的 p25 突变体。将突变的 RNA3 与 RNA1 和 RNA2 共接种于苜蓿, 如果 p25 是定位于细胞质的突变体, 会产生褪绿斑; 而定位于细胞核的突变体, 则会产生坏死斑。而定位于细胞核的三个突变体中, 其中一个会产生褪绿斑, 但另外两个则会产生坏死斑。这可能是由于这两个产生坏死斑的 p25 突变体有高等电点, 会非特异性结合核 DNA, 导致细胞死亡^[30]。

虽然植物病毒的一些蛋白质能利用寄主的核质转运机制进行入核或者出核^[43], 但是其机制却并不完全一致, 含有经典核定位信号的蛋白质通过 Importin α 、Importin β 和 Ran 等蛋白质的帮助进入细胞核, 而富含亮氨酸的核输出信号的蛋白质则在 XPO1 和 Ran 的介导下输出细胞核。植物病毒的蛋白质不仅核质转运机理具有多样性, 而且其发挥的生物学功能也很多样, 如可介导病毒基因组的核输入和核输出、抵抗寄主细胞启动的 RNA 沉默、介导病毒长距离运输及系统侵染、调节寄主细胞转录活性、调控病毒的复制及表达、参与病毒症状的形成等。今后, 在研究植物病毒核质转运蛋白的结构、定位及转运机制的同时, 还应该更加深入地探索其在病毒的复制装配、胞间运输、系统侵染、与寄主互作及宿主防御中的生物学作用, 这将为揭示植物病毒侵染机理及研制植物病毒的防治策略奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Ivanov KI, Mäkinen K. Coat proteins, host factors and plant viral replication. *Curr Opin Virol*, 2012, 2: 712-8
- [2] Deng M, Bragg JN, Ruzin S, et al. Role of the sonchus yellow net virus N protein in formation of nuclear viroplasms. *J Virol*, 2007, 81: 5362-74
- [3] Anderson G, Wang R, Bandyopadhyay A, et al. The nucleocapsid protein of potato yellow dwarf virus: protein interactions and nuclear import mediated by a non-canonical nuclear localization signal. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 1-9
- [4] Usha R, Zrachya A, Levy Y, et al. Protein-protein interactions and nuclear trafficking of coat protein and β C1 protein associated with bhendi yellow vein mosaic disease. *Virus Res*, 2006, 122: 127-36
- [5] Zhang Y, Zhang X, Niu S, et al. Nuclear localization of

- beet black scorch virus capsid protein and its interaction with importin α . *Virus Res*, 2011, 155: 307-15
- [6] Haupt S, Stroganova T, Ryabov E, et al. Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *J Gen Virol*, 2005, 86: 2891-6
- [7] Olsper A, Paves H, Toomela R, et al. Cocks foot mottle sobemovirus coat protein contains two nuclear localization signals. *Virus Genes*, 2010, 40: 423-31
- [8] Cohen Y, Qu F, Gisel A, et al. Nuclear localization of turnip crinkle virus movement protein p8. *Virology*, 2000, 273: 276-85
- [9] Wang X, Zhang Y, Xu J, et al. The R-rich motif of beet black scorch virus P7a movement protein is important for the nuclear localization, nucleolar targeting and viral infectivity. *Virus Res*, 2012, 167: 207-18
- [10] Rajamäki ML, Valkonen JPT. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell*, 2009, 21: 2485-502
- [11] Chandran SA, Levy Y, Mett A, et al. Mapping of functional region conferring nuclear localization and karyopherin α -binding activity of the C2 protein of bhendi yellow vein mosaic virus. *J Gen Virol*, 2012, 93: 1367-74
- [12] Sharma P, Gaur RK, Ikegami M. Subcellular localization of V2 protein of Tomato leaf curl Java virus by using green fluorescent protein and yeast hybrid system. *Protoplasma*, 2011, 248: 281-8
- [13] Mlotshwa S, Verver J, Sithole-Niang I, et al. Subcellular location of the helper component-proteinase of cowpea aphid-borne mosaic virus. *Virus Genes*, 2002, 25: 207-16
- [14] 牛少芳. 烟草坏死病毒 A 外壳蛋白的核质穿梭及其功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2013
- [15] Herranz MC, Pallas V, Aparicio F. Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of alfalfa mosaic virus coat protein: nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity, and virion formation. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012, 25: 1093-103
- [16] Ryabov EV, Kim SH, Taliensky M. Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. *J Gen Virol*, 2004, 85: 1329-33
- [17] Ward BM, Lazarowitz SG. Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *Plant Cell*, 1999, 11: 1267-76
- [18] Sun L, Jing B, Andika IB, et al. Nucleo-cytoplasmic shuttling of VPg encoded by wheat yellow mosaic virus requires association with the coat protein. *J Gen Virol*, 2013, 94: 2790-802
- [19] Frischmuth S, Wege C, Hülser D, et al. The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. *Protoplasma*, 2007, 230(1-2): 117-23
- [20] 赵元茵, 王元忠, 曹念, 等. 核定位信号及其分析策略. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25: 683-9
- [21] Merkle T. Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta*, 2001, 213: 499-517
- [22] Sharma P, Ikegami M. Characterization of signals that dictate nuclear/nucleolar and cytoplasmic shuttling of the capsid protein of tomato leaf curl Java virus associated with DNA β satellite. *Virus Res*, 2009, 144: 145-53
- [23] Guerra-Peraza O, Kirk D, Seltzer V, et al. Coat proteins of rice tungro bacilliform virus and mungbean yellow mosaic virus contain multiple nuclear-localization signals and interact with importin α . *J Gen Virol*, 2005, 86: 1815-26
- [24] Liu H, Wei C, Zhong Y, et al. Rice black-streaked dwarf virus minor core protein P8 is a nuclear dimeric protein and represses transcription in tobacco protoplasts. *FEBS Lett*, 2007, 581: 2534-40
- [25] Lukhovitskaya NI, Ignatovich IV, Savenkov EI, et al. Role of the zinc-finger and basic motifs of chrysanthemum virus B p12 protein in nucleic acid binding, protein localization and induction of a hypersensitive response upon expression from a viral vector. *J Gen Virol*, 2009, 90: 723-33
- [26] Kondo H, Chiba S, Andika IB, et al. Orchid fleck virus structural proteins N and P form intranuclear viroplasm-like structures in the absence of viral infection. *J Virol*, 2013, 87: 7423-34
- [27] Lucy AP, Guo HS, Li WX, et al. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J*, 2000, 19: 1672-80
- [28] Goodin MM, Austin J, Tobias R, et al. Interactions and nuclear import of the N and P proteins of sonchus yellow net virus, a plant nucleorhabdovirus. *J Virol*, 2001, 75: 9393-406
- [29] Lukhovitskaya NI, Solovieva AD, Boddeti SK, et al. An RNA virus-encoded zinc-finger protein acts as a plant transcription factor and induces a regulator of cell size and proliferation in two tobacco species. *Plant Cell*, 2013, 25: 960-73
- [30] Vetter G, Hily JM, Klein E, et al. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol*, 2004, 85: 2459-69
- [31] Lukhovitskaya NI, Cowan GH, Vetukuri RR, et al. Importin- α -mediated nucleolar localization of potato mop-top virus TRIPLE GENE BLOCK1 (TGB1) protein facilitates virus systemic movement, whereas TGB1 self-interaction is required for cell-to-cell movement in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol*, 2015, 167: 738-52
- [32] Wright KM, Cowan GH, Lukhovitskaya NI, et al. The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and long-distance movement. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23: 1486-97
- [33] 杨玫. 拟南芥核转运受体家族分析及 *AtIMP α 1* 和 *AtIMP α 2* 的功能研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2010
- [34] Mosammaparast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol*, 2004, 14: 547-56
- [35] 成钢, 胡维新. 细胞核质转运受体—— α 输入蛋白与核质转运. *生命的化学*, 2010, 30: 504-8

- [36] Melén K, Fagerlund R, Franke J, et al. Importin α nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2 and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem*, 2003, 278: 28193-200
- [37] Chang CW, Couñago RM, Williams SJ, et al. The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the utilization of the minor NLS-binding site in plant nuclear import factor importin- α . *Plant Signal Behav*, 2013, 8: 5074-88
- [38] Kanneganti TD, Bai X, Tsai CW, et al. A functional genetic assay for nuclear trafficking in plants. *Plant J*, 2007, 50: 149-58
- [39] La Cour T, Kierner L, Mølgaard A, et al. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*, 2004, 17: 527-36
- [40] 王潇, 王玉鹏, 全宇, 等. 细胞核质转运受体 Importin β 家族与转运调控. *细胞生物学杂志*, 2006, 28: 637-45
- [41] Pemberton LF, Paschal BM. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 2005, 6: 187-98
- [42] Kudo N, Matsumori N, Taoka H, et al. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9112-7
- [43] Krichevsky A, Kozlovsky SV, Gafni Y, et al. Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes. *Mol Plant Pathol*, 2006, 7: 131-46
- [44] Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, et al. The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current Biol*, 2007, 17: 1615-21
- [45] Zhang X, Yuan YR, Pei Y, et al. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev*, 2006, 20: 3255-68
- [46] Kim SH, MacFarlane S, Kalinina NO, et al. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 11115-20
- [47] Guogas LM, Laforest SM, Gehrke L. Coat protein activation of alfalfa mosaic virus replication is concentration dependent. *J Virol*, 2005, 79: 5752-61
- [48] Martínez F, Daròs JA. Tobacco etch virus protein P1 traffics to the nucleolus and associates with the host 60S ribosomal subunits during infection. *J Virol*, 2014, 88: 10725-37