



缺失宿主 Vta1 蛋白的 MIT 结构域对杆状病毒 AcMNPV 复制的影响

孙雨, 李玉英, 王司军, 于乾龙, 岳琦, 李朝飞*

西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100

摘要:【目的】克隆草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) Vta1 基因, 检测 Vta1 在苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)复制中的作用。【方法】利用反转录-PCR 与 PCR 方法筛选草地贪夜蛾 Vta1 基因及缺失 Vta1 N-端 MIT 结构域的突变体并构建其瞬时表达质粒, 通过转染 Sf9 细胞检测表达; 构建 Vta1 及其突变体的双分子荧光互补表达质粒, 并通过瞬时转染检测其与 Vps4 及 ESCRT-III 亚基 Vps46 与 Vps60 的相互作用; 共转染 gp64 与 Vta1 及其突变体瞬时表达质粒, 检测瞬时表达 Vta1 突变体对 AcMNPV 出芽型病毒产量及病毒基因启动子指导报告基因表达的影响。【结果】获得了草地贪夜蛾 Vta1 基因。氨基酸序列相似性分析表明, 昆虫、酵母与人类 Vta1 同源蛋白的相似性分别约为 20%与 50%。Western blotting 分析表明 GFP 标签的 Vta1 及其突变体均能在瞬时转染的 Sf9 细胞中表达。双分子荧光互补分析发现, 缺失第 1 个或第 2 个 MIT 结构域显著降低 Vta1 突变体与 Vps4、Vps46 或 Vps60 的相互作用。此外, 瞬时表达 Vta1 突变体显著降低了 AcMNPV 感染性出芽型病毒的产量, 但并未影响 AcMNPV *ie1* 基因早期启动子和 *p6.9* 基因晚期启动子指导的 *LacZ* 和 *GUS* 报告基因的表达。【结论】Vta1 可能参与杆状病毒 AcMNPV 子代病毒粒子的组装和/或出芽释放过程。

关键词: 草地贪夜蛾, 内吞分选转运复合体, Vta1, 苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒

在真核细胞中, 内吞分选转运复合体(the endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)由 ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III 及 Vps4 (vacuolar protein sorting protein 4)5 个复合体与一些辅助蛋白组成。ESCRT 复合体参与多泡

体(multivesicular bodies, MVB)的形成、胞质分裂、质膜修复及核膜重构等生理过程, 对维持细胞稳态具有重要作用^[1-2]。此外, ESCRT 复合体也参与包括人类免疫缺陷型病毒(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)与昆虫杆状病毒等多种囊膜病

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31672082)

*通信作者。E-mail: zhaofeili@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2018-03-15; 修回日期: 2018-04-11; 网络出版日期: 2018-04-20

毒的入侵或出芽释放过程^[3-5]。研究表明,在酵母细胞中 ESCRT-III 复合体由 Vps2、Vps20、Vps24、Vps32、Vps46、Vps60 等多个亚基组成,具有脂质双层膜解离功能^[6]。在 ESCRT 系统中,Vps4 是 ATP 酶,具有水解 ESCRT-III 复合体促进其组分循环利用的功能^[6]。近年的研究发现,Vps4 的激活依赖 Vta1(Vps twenty associated 1)^[7-10]。

研究表明,酵母 Vta1 包含 N-端的 2 个 MIT (microtubule-interacting and transport domain)结构域与 C-端的 VSL (Vta1/SBP-1/LIP5)结构域。其中,VSL 结构域与 Vps4 C-端的 β 折叠结合;而 Vta1 N-端的 MIT 结构域与 ESCRT-III 组分 Vps46 和 Vps60 结合^[7,10]。研究发现,在 Vps46 与 Vps60 不存在时,Vta1 对 Vps4 的激活能力较弱;当 Vps46 或 Vps60 与 Vta1 的 MIT 结构域结合后,Vta1 对 Vps4 的激活能力则显著增强^[7]。

昆虫杆状病毒是一类 DNA 囊膜病毒,其双链环状分子大小约为 80–180 kb。在杆状病毒复制过程中,通常产生两种形态和功能各异的病毒:包埋型病毒(occlusion-derived virus, ODV)和出芽型病毒(budded virus, BV)。昆虫口服被病毒污染的食物后,在昆虫中肠碱性环境条件下,多角体裂解并释放出 ODV;ODV 病毒粒子穿过中肠围食膜起始感染中肠上皮细胞。BV 在不同组织或离体培养的细胞之间进行感染^[11]。目前,较广泛深入研究的杆状病毒为苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcMNPV)^[11]。研究发现,干扰宿主细胞 ESCRT-I、ESCRT-III 或 Vps4 的表达显著影响 AcMNPV 出芽型病毒的入侵和子代病毒的出芽释放^[4-5]。

本文通过克隆草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) Vta1 基因,缺失了该基因 N-端编码的 2 个 MIT 结构域,构建了 Vta1 及其突变体的表达质粒。初步检测了 Vta1 及其突变体与 Vps4 及 ESCRT-III

亚基 Vps46 与 Vps60 的相互作用,以及瞬时表达 Vta1 及其突变体对 AcMNPV 出芽型病毒复制的影响,为揭示宿主 ESCRT 复合体调控杆状病毒侵染机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒:草地贪夜蛾细胞 Sf9 购自美国模式培养物集存库(ATCC);Sf9^{OP1D} 细胞系(持续表达 *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus* GP64 蛋白)^[12]与缺失 *gp64* 基因的 AcMNPV 病毒 LacZGUS-*gp64*^{ko} (报告基因 *LacZ* 与 *GUS* 的表达分别由 AcMNPV 早期基因 *ie1* 和晚期基因 *p6.9* 的启动子控制)^[5]由美国康奈尔大学 Gary Blissard 教授惠赠。两株细胞均在 28 °C 培养,培养基为含有 10% FBS (Gibco)的 TNMFH (Sigma-Aldrich)。

1.1.2 菌株与质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 购自 TaKaRa 公司,pIEnGFP 与基于 mCherry 的双分子荧光互补表达质粒本实验室构建^[13]。AcMNPV *gp64* 表达质粒 pBieGP64^[4]由 Gary Blissard 教授惠赠。

1.1.3 酶、抗体与试剂盒:T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI 购自 Promega 公司,ExTaq polymerase 购自 TaKaRa 公司。GFP、c-Myc-tag、HA-tag、GP64 单克隆抗体分别购自 GenScript、Abbkine 与 Santa Cruz 公司,碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 与 NBT/BCIP 显色试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 PCR 引物设计

根据草地贪夜蛾 EST 数据库^[14](<http://bioweb.ensam.inra.fr/spodobase>)中的部分 Vta1 序列设计 PCR 引物(表 1),引物由 Invitrogen 公司合成。

表 1. 草地贪夜蛾 *Vta1* 及缺失 MIT 结构域的 PCR 引物序列Table 1. Primer sequences for PCR amplification of *S. frugiperda Vta1* and the MIT domain-deleted constructs

Primer	Sequence (5'→3')	Construct
Vta1BF	AATGGATCCATGTCTGTGAATATACTGAGT	Vta1
Vta1ER	AATGAATTCTCAAGCAGGATCACGGCCTGTT	
dMIT1F	AATGGATCCAATGAAGCAATTACTAATGAAGT	dMIT1
dMIT2F	TATCGAGAACCAGGACCAATGCAGTCAGAA	dMIT2
dMIT2R	TGGTCCTGGTTCTCGATACGTTTTCTTAGCT	

1.3 *Vta1* 基因克隆及突变体构建

收集适量的 Sf9 细胞采用 RNAiso plus Trizol (TaKaRa) 进行总 RNA 提取并按照 RNA LA PCRTM (AMV) 反转录试剂方法 (TaKaRa) 进行 cDNA 合成。采用 PCR 及重叠 PCR 方法分别克隆 *Vta1* 基因及构建缺失 *Vta1* N-端 MIT1 或 MIT2 的截短突变体。PCR 反应体系 (50 μL) 包括 cDNA 5 μL、Ex Taq polymerase 0.25 μL、10× Ex Taq buffer 5 μL、dNTP (1×10⁻² mol/L) 4 μL、上、下游引物 (5×10⁻⁶ mol/L) 各 4 μL、ddH₂O 27.75 μL。反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化后, 用 *Bam*H I 与 *Eco*R I 酶切并连接到 pIEnGFP 载体, 重组质粒命名为 GFP-*Vta1*pBlue、GFP-dMIT1pBlue、GFP-dMIT2pBlue 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 *Vta1* 及其突变体的表达

采用 CaPO₄ 沉淀法^[4], 将 GFPpBlue^[5]、GFP-*Vta1*pBlue、GFP-dMIT1pBlue、GFP-dMIT2pBlue 质粒 (各 2 μg) 分别转染 Sf9 细胞。在转染后 36 h, 收集细胞并用 0.1% Triton X-100 裂解液 (0.1% Triton X-100、0.05 mol/L Tris·Cl、0.15 mol/L 的 NaCl、protease inhibitor cocktail (Roche), pH 8.0) 裂解, 进行 SDS-PAGE。随后, 将蛋白样品转印

至 PVDF 膜 (Millipore), 用 GFP 抗体和碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 检测。

1.5 双分子荧光互补分析

采用 *Bam*H I 与 *Eco*R I 酶切 GFP-*Vta1*pBlue、GFP-dMIT1pBlue、GFP-dMIT2pBlue 质粒并回收 *Vta1*、dMIT1 及 dMIT2 片段, 将其分别与基于 mCherry 的双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 表达载体 Nm-HApBlue 或 Cm-MycpBlue 连接^[13]。随后, 将 Nm-*Vta1*pBlue、Nm-dMIT1pBlue、Nm-dMIT2pBlue、Cm-*Vta1*pBlue、Cm-dMIT1pBlue、Cm-dMIT2pBlue 分别与 c-Myc-tag 与 HA-tag 标签的 Vps4-NmpBlue、Vps46-NmpBlue、Vps60-NmpBlue、Vps4-CmpBlue、Vps46-CmpBlue、Vps60-CmpBlue^[5] 组合转染 Sf9 细胞 (12 孔培养板, 2×10⁵ 细胞/孔, 每个质粒 2 μg, 每个质粒组合转染 4 个培养孔)。在转染后 36 h 收集其中一组细胞, 用 c-Myc-tag 与 HA-tag 抗体进行 Western blotting 检测各融合蛋白的表达。同时, 在倒置荧光显微镜下观察其他转染细胞并拍照。

1.6 表达 *Vta1* 突变体对 AcMNPV 复制的影响

在 12 孔细胞培养板中 (2×10⁵ 细胞/孔), 采用磷酸钙沉淀法将 GP64 表达质粒 pBieGP64 与 GFPpBlue、GFP-*Vta1*pBlue、GFP-dMIT1pBlue 或 GFP-dMIT2pBlue (各 2 μg) 共转染 Sf9 细胞。阳性

对照组合为共转染 pBieGP64 与 E231Q-GFPpBlue 质粒^[4] (每一个质粒组合重复转染 3 个细胞培养孔)。在转染后 12 h, 接种 LacZGUS-*gp64*^{ko} 病毒感染细胞(MOI=5 TCID₅₀)1 h。随后, 用 TNMFH 培养基漂洗细胞一次并换入新鲜的 TNMFH 培养基。在病毒感染后 24 h, 收取培养上清液, 3000 g、5 min 离心去除细胞。采用 TCID₅₀ 方法, 用 Sf9^{OP1D} 细胞测定 AcMNPV 出芽型病毒的滴度。同时, Western blotting 检测细胞中 GP64 与 Vta1 蛋白的表达。重复上述转染、病毒感染实验并在病毒感染后 6 h 和 24 h, 分别收集细胞并用含有 2 mg/mL LacZ 底物 Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG, Roche Diagnostics GmbH)或 GUS 底物 4-Nitrophenyl β-D-glucuronide (PNPG, Sigma-Aldrich)的 0.5% NP-40 (PBS, pH 7.4)裂解细胞并在 37 °C 反应 30 min。随后, 在酶标仪中读取 570 nm (CPRG)或 405 nm (PNPG)的吸光值。

2 结果和分析

2.1 *Vta1* 基因的序列分析

通过提取草地贪夜蛾 Sf9 细胞的总 RNA, 结合反转录与 PCR 方法获得了 *Vta1* 基因(GenBank 登录号: MH054904)。序列分析表明, 该基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)为 969 个核苷酸, 预测编码 322 个氨基酸。氨基酸序列相似性分析表明, 昆虫与酵母的 *Vta1* 蛋白序列相似性约为 20%, 而昆虫与人类的 *Vta1* 同源蛋白序列相似性约为 50%; 在不同昆虫中, *Vta1* 同源蛋白的序列相似性差异较大, 约为 40%–78%。结构域分析发现, 在酵母、昆虫与人类 *Vta1* 同源蛋白的氨基酸序列中均保守存在 MIT1、MIT2 与 VSL 结构域(图 1)。

2.2 *Vta1* 与缺失 MIT 结构域突变体的表达

采用普通 PCR 和重叠 PCR 方法分别缺失了草地贪夜蛾 *Vta1* 基因 N-端编码的 MIT1 和 MIT2 结构域, 突变体命名为 dMIT1、dMIT2 (图 2-A)。将 N-端融合 GFP 的 *Vta1* 及其突变体瞬时表达质粒 GFP-*Vta1*pBlue、GFP-dMIT1pBlue、GFP-dMIT2pBlue 及对照质粒 GFPpBlue 转染 Sf9 细胞。Western blotting 分析表明, 各融合蛋白在 Sf9 细胞中均有表达(图 2-B)。有趣的是, 过表达 GFP 标签的 dMIT2 突变体诱导约 30% Sf9 细胞的形状由通常的圆形改变为梭形(图 2-C), 推测该突变体的表达可能影响了细胞分裂过程而引发部分 Sf9 细胞形态改变。

2.3 *Vta1* 及缺失 MIT 结构域突变体与 Vps4、Vps46 及 Vps60 的相互作用

根据双分子荧光互补技术(BiFC)原理, 将 *Vta1* 及缺失 MIT 结构域的突变体分别与红色荧光蛋白 mCherry 的 N-端(Nm)或 C-端(Cm)融合并将其分别与 Vps4、Vps46 或 Vps60 的 BiFC 表达质粒组合共转染 Sf9 细胞。如图 3 所示, 在转染后 36 h, 采用 HA-tag 与 c-Myc-tag 抗体检测发现各融合蛋白在 Sf9 细胞中均有表达(图 3-A, 其中 mCherry N-端融合 *Vta1* 及缺失 MIT 结构域的突变体与 mCherry C-端融合 Vps4、Vps46、或 Vps60 的表达结果未显示)。在共转染 Cm-*Vta1*pBlue 与 Vps4-NmpBlue、VPS46-NmpBlue 或 Vps60-NmpBlue 组合的 Sf9 细胞中观察到约 12%–20% 的红色荧光细胞(图 3-B, C)。相比较, 在共转染 Cm-dMIT1pBlue 与 Vps4-NmpBlue 的 Sf9 细胞中仅存在约 3% 的红色荧光细胞, 而在共转染 Cm-dMIT1pBlue 与 Vps46-NmpBlue 或 Vps60-NmpBlue 以及共转染 Cm-dMIT2pBlue 与 Vps4-NmpBlue、

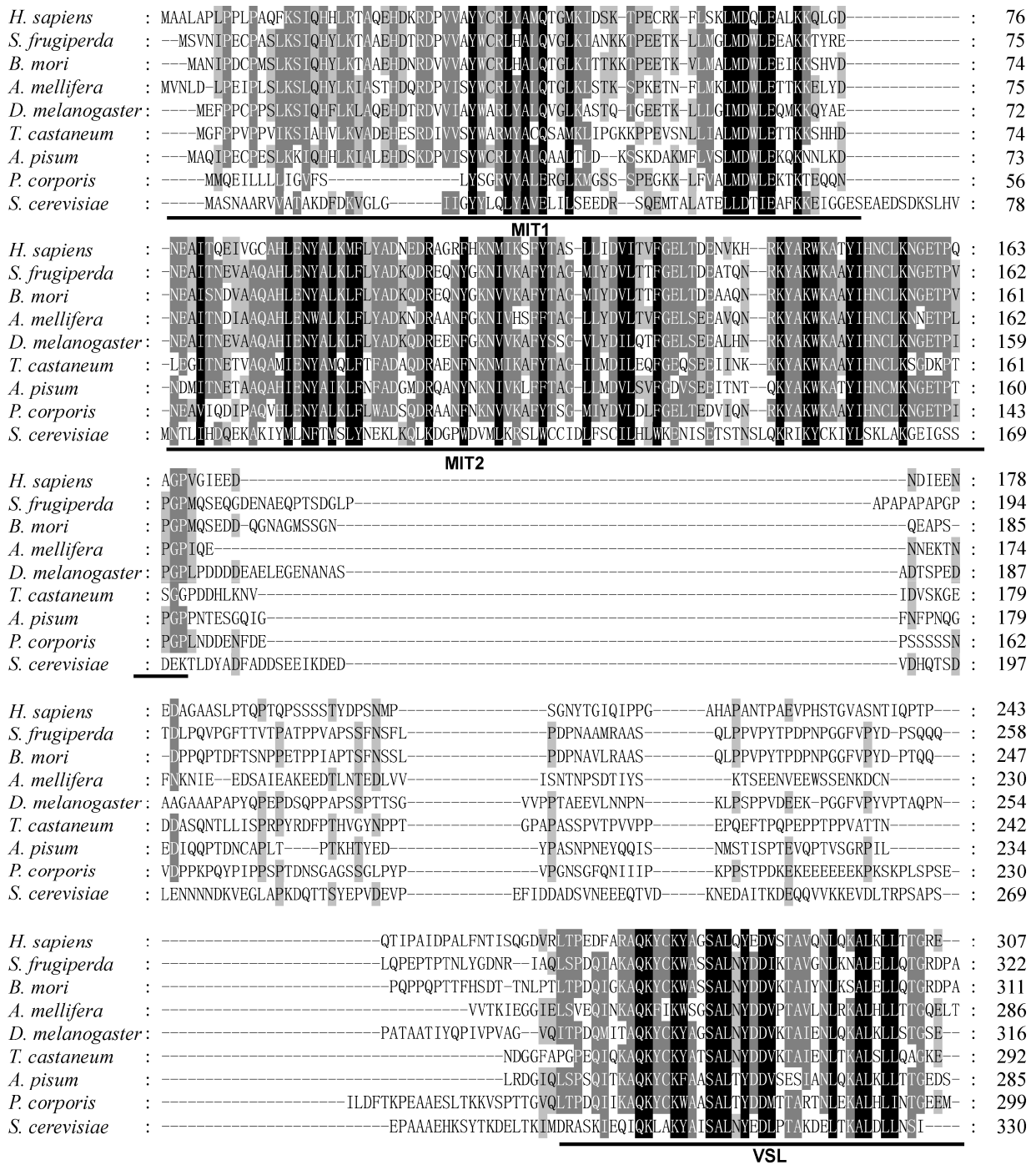


图 1. 昆虫、酵母与人类 Vta1 同源蛋白的氨基酸序列比对分析

Figure 1. Amino acid sequence alignment of Vta1 homologs from insects, yeast and humans. The predicted MIT1, MIT2 and VSL domains are underlined. MIT, microtubule-interacting and transport domain; VSL, Vta1/SBP-1/LIP5. The amino acid sequences used were from *Homo sapiens* (GenBank accession No. NP057569), *Spodoptera frugiperda* (MH054904), *Bombyx mori* (NP001040410), *Apis mellifera* (XP001123063), *Drosophila melanogaster* (NP647640), *Tribolium castaneum* (XP970311), *Acyrtosiphon pisum* (NP001191949), *Pediculus humanus corporis* (XP002423438) and *Saccharomyces cerevisiae* (NP013282).

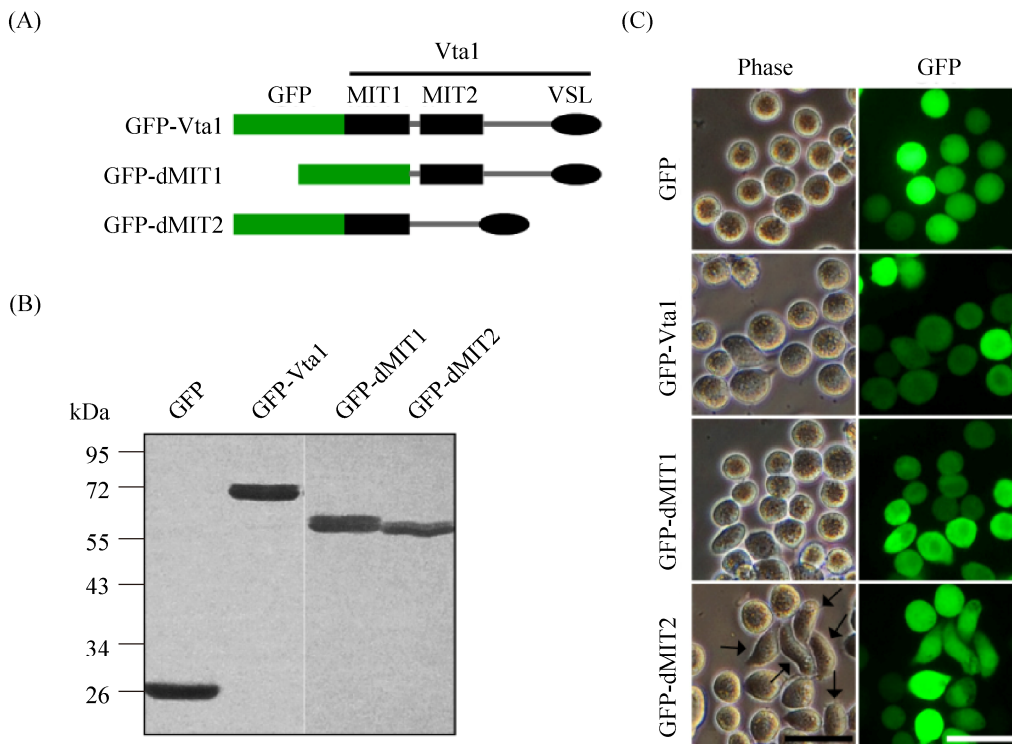


图 2. GFP 标签的草地贪夜蛾 *Vta1* 及缺失其 MIT 结构域的突变体在 Sf9 细胞中的瞬时表达

Figure 2. Transient expression of GFP-tagged *Vta1* and its MIT domains-deleted constructs in Sf9 cells. A: diagram representation of domain structure and GFP fusions of *Vta1* and its N-terminal MIT domains-deleted constructs. MIT, microtubule-interacting and transport domain; VSL, *Vta1*/SBP-1/LIP5. B: Western blotting analysis of transiently expressed GFP-*Vta1* fusion proteins in Sf9 cells by using an anti-GFP monoclonal antibody. C: morphology of Sf9 cells transfected with the plasmids expressing GFP-tagged *Vta1* and its mutation constructs. The spindle cells in which expressing GFP-dMIT2 were indicated with black arrows. Bar, 50 μm.

Vps46-NmpBlue 或 Vps60-NmpBlue 组合的 Sf9 细胞中未观察到 mCherry 红色荧光(图 3-B, C)。在共转染 Nm-*Vta1*pBlue、Nm-dMIT1pBlue 或 Nm-dMIT2pBlue 与 Vps4-CmpBlue、Vps46-CmpBlue 或 Vps60-CmpBlue 组合的 Sf9 细胞中, 我们观察到类似的相互作用现象(结果未显示)。据此, 我们推测缺失 MIT1 或 MIT2 结构域显著抑制了 *Vta1* 突变体与 Vps4、Vps46 及 Vps60 的相互作用。

2.4 瞬时表达缺失 MIT 结构域的 *Vta1* 突变体对 AcMNPV 复制的影响

为了初步探究 *Vta1* 是否与杆状病毒 AcMNPV

侵染有关, 我们采用病毒缺失补偿策略^[4-5]分析瞬时表达 *Vta1* 突变体对 AcMNPV 复制的影响。考虑到 Sf9 细胞的转染效率约为 70%, 共转染 *Vta1* 或其突变体瞬时表达质粒与 GP64 表达质粒 (GP64 为病毒出芽释放所必需^[15], 瞬时表达 GP64 可以补偿病毒出芽释放所需要的 GP64) 尽可能确保出芽释放的病毒来自共转染表达 *Vta1* 或其突变体与 GP64 的 Sf9 细胞。在共转染 12 h 后, 用缺失 *gp64* 基因的 AcMNPV 病毒 LacZGUS-*gp64*^{ko} 感染 Sf9 细胞。如图 4 所示, 在病毒感染后 24 h, Western blotting 分析表明感染细胞中 GP64

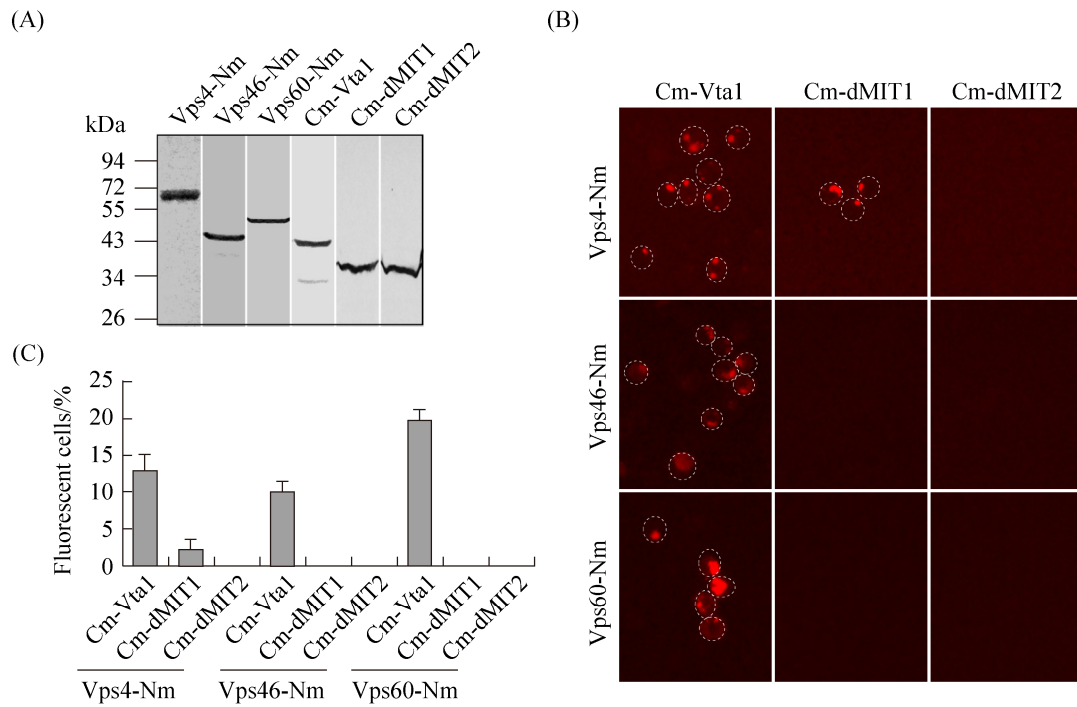


图 3. 双分子荧光互补分析 Vta1 及其突变体与 Vps4、Vps46 及 Vps60 的相互作用

Figure 3. BiFC analysis of the interactions of Vta1 and its mutation constructs with Vps4, Vps46 and Vps60. A pair of BiFC plasmids: one expressing Cm-Myc fused Vta1 or its mutation constructs, and the other expressing HA-Nm-tagged Vps4, Vps46 or Vps60, were used to co-transfect Sf9 cells. At 36 h post-transfection, the expression of each construct in co-transfected Sf9 cells was analyzed by Western blotting with anti-HA (for Nm-tagged Vps4, Vps46 and Vps60) or anti-Myc (for Cm-tagged Vta1 and its mutation constructs) antibodies (A) and the cells were examined for red fluorescence complementation by epifluorescence microscopy (B). C: the percentage of mCherry red fluorescence-positive cells in five fields was estimated. Error bars represent the standard deviations from the mean of three replicates.

与 Vta1 或其突变体的表达水平类似(图 4-A)。瞬时表达 GFP 标签的 Vps4 突变体 E231Q (E231Q-GFP) 导致细胞培养上清中感染性病毒粒子的产量急剧下降。相比较, 瞬时表达 Vta1 对感染性 AcMNPV 的产生没有显著影响, 然而, 瞬时表达缺失 MIT 结构域的 Vta1 突变体 dMIT1 或 dMIT2 均导致感染性 AcMNPV 出芽型病毒产量显著下降(图 4-B)。为了进一步分析 Vta1 突变体对 AcMNPV 复制的影响, 我们重复上述共转染与感染实验并在 LacZGUS-*gp64*^{ko} 感染后 6 h 与 24 h 分别检测 Sf9 细胞中的 LacZ 和 GUS 活性。如图 5 所示, 与我

们之前的研究结果类似^[5], 瞬时表达 Vps4 突变体 E231Q (E231Q-GFP) 造成病毒感染早、晚期阶段报告基因 *LacZ* 和 *GUS* 的表达显著下降。比较而言, *LacZ* 或 *GUS* 的活性在瞬时表达 GFP 标签的 Vta1 或缺失 MIT 结构域突变体的 Sf9 细胞中与对照(表达 GFP)一致, 揭示病毒复制进入晚期阶段。这一结果初步表明瞬时表达缺失 MIT 结构域的 Vta1 突变体可能对病毒入侵及复制过程没有显著影响, 而瞬时表达这些突变体对感染性病毒产量的影响可能暗示 Vta1 突变体影响了病毒粒子的组装和/或出芽释放。

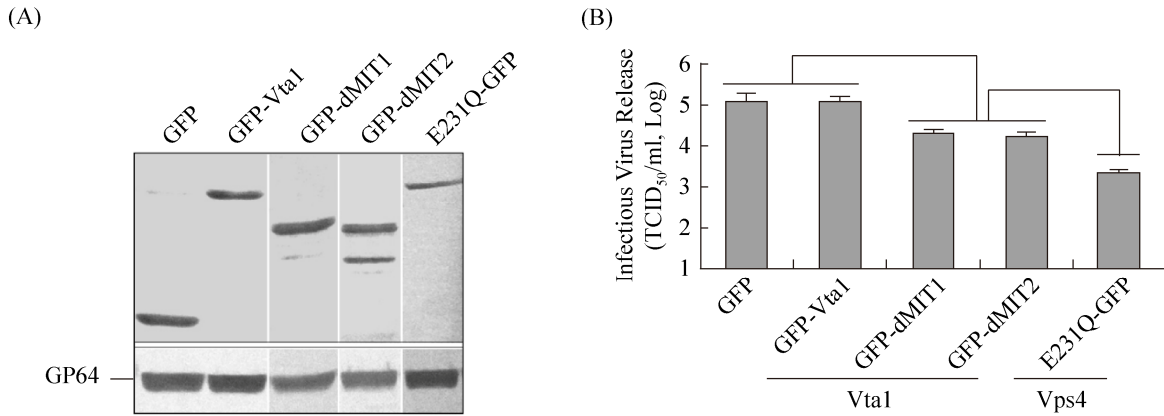


图 4. 瞬时表达 *Vta1* 及缺失 MIT 结构域的突变体对 AcMNPV 出芽型病毒产生的影响

Figure 4. Effects of transient expression of *Vta1* and its MIT domain-deleted constructs on the production of infectious budded virions of AcMNPV. Sf9 cells were co-transfected with two plasmids expressing GP64 and either GFP-tagged *Vta1*, dMIT1, dMIT2, or GFP. At 12 h post-transfection, Sf9 cells were infected with the *gp64*-knockout virus (LacZGUS-*gp64*^{ko}, MOI=5). At 24 h post-infection, the expression of GP64 and GFP-tagged *Vta1* and its mutation constructs was examined by Western blotting analysis using anti-GFP and anti-GP64 (AcV5) monoclonal antibodies (A). B: the effect of mutated *Vta1* proteins on replication of AcMNPV was analyzed by determining the titers of infectious budded virions in the cultured supernatants. Error bars represent standard deviations from the mean of three replicates. *, $P < 0.05$ (by unpaired t test).

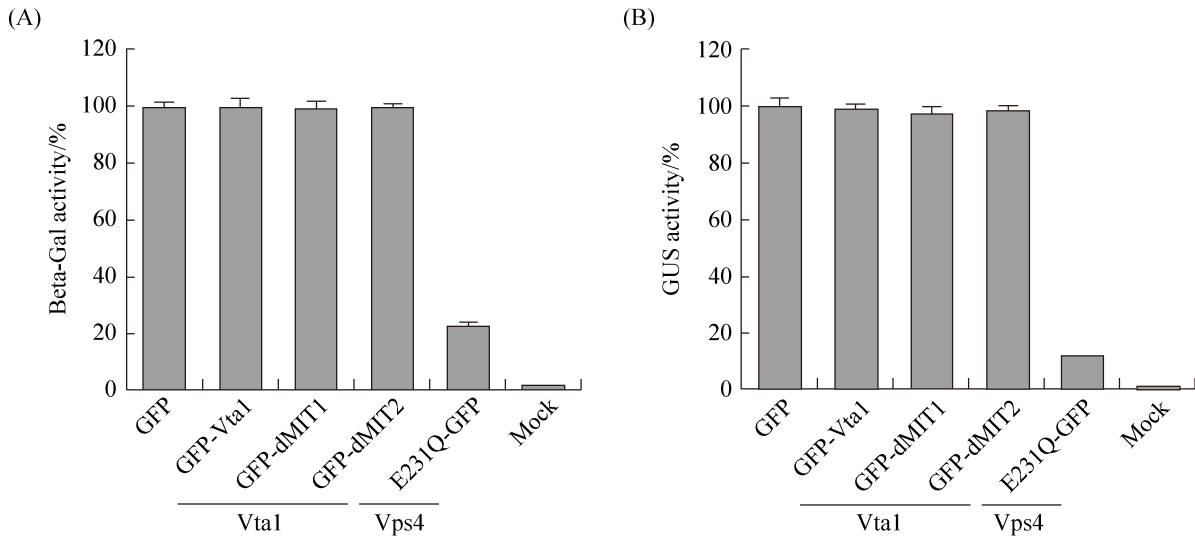


图 5. 瞬时表达 *Vta1* 及缺失 MIT 结构域的突变体对 AcMNPV 启动子指导的 *LacZ* 与 *GUS* 报告基因表达的影响

Figure 5. Effects of transient expression of *Vta1* and its MIT domain-deleted constructs on the expression of the reporter genes *LacZ* and *GUS* that directed by AcMNPV promoters. Sf9 cells were co-transfected with two plasmids expressing GP64 and either GFP-tagged *Vta1*, dMIT1, dMIT2, Vps4 mutation construct E231Q, or GFP. At 12 h post-transfection, Sf9 cells were infected with LacZGUS-*gp64*^{ko} virus (MOI=5). A: at 6 h post-infection, the expression of *LacZ* that controlled by AcMNPV *ie1* early promoter was determined using CPRG as the substrate. B: at 24 h post-infection, the expression of *GUS* that controlled by AcMNPV *p6.9* late promoter was determined using PNPG as the substrate. Error bars represent standard deviations from the mean of three replicates.

3 讨论

自从 2001 年发现 ESCRT 复合体以来, 大量的研究表明 ESCRT 复合体参与真核细胞内几乎所有的脂质双层膜解离过程。其中, ESCRT-0、ESCRT-I 与 ESCRT-II 参与底物募集以及脂质双层膜结合, 而 ESCRT-III 则直接介导膜结构的缢缩和解离。在膜结构剪切的最后阶段, Vta1 与 ESCRT-III 亚基 Vps46 与 Vps60 协助激活 Vps4 并利用 Vps4 水解 ATP 产生的能量解聚 ESCRT-III 复合体^[1-2]。研究表明, 在酵母细胞中 Vps46 与 Vps60 均能与 Vta1 N-端的 MIT 结构域结合并调控 Vps4 功能^[8-10]。

近年来, 较多的研究发现宿主 ESCRT 复合体调控多种 RNA 病毒、逆转录病毒以及一些大分子 DNA 囊膜病毒的侵染过程。RNA 干扰或表达相应 ESCRT 组分的显性-负性(dominant-negative, DN) 突变体普遍影响上述病毒的入侵和/或出芽释放^[3,16]。近期的研究发现, RNA 干扰抑制宿主细胞 *Vta1* 同源基因的表达, 显著降低人类免疫缺陷性病毒(HIV-1)感染性病毒的出芽释放^[17]。最近的研究表明, 在杆状病毒 AcMNPV 侵染昆虫细胞 Sf9 与 Tn5B1-4 的过程中, 病毒的入侵及子代病毒核衣壳经核膜的释放过程依赖于宿主 ESCRT-I、ESCRT-III 及 Vps4 的功能^[4-5]。然而, 关于宿主 ESCRT 复合体中其他组分, 特别是一些调控 ESCRT 复合体功能的辅助蛋白是否参与 AcMNPV 的侵染尚不清楚。

本文中, 我们克隆了草地贪夜蛾 *Vta1* 基因并构建了缺失其 N-端编码 2 个 MIT 结构域的区域。值得一提的是, 在 Sf9 细胞中瞬时表达 GFP 标签的 dMIT2 突变体诱导部分 Sf9 细胞的形态由通常的圆形转变为梭形(图 2-C)。考虑到在酵母细胞中 RNA 干扰 *Vta1* 同源基因的表达显著抑制胞质分

裂^[8-9], 我们推测 dMIT2 突变体的瞬时表达可能影响了部分 Sf9 细胞的正常分裂过程。类似于在酵母细胞中的发现^[8,10], 缺失草地贪夜蛾 Vta1 N-端的 MIT1 或 MIT2 结构域完全抑制了 Vta1 突变体 dMIT1 或 dMIT2 与 Vps46 或 Vps60 的互作(图 3)。同时, 与酵母细胞中不同^[7-10], 我们发现缺失 MIT 结构域也显著影响或完全抑制 Vta1 与 Vps4 的互作, 推测草地贪夜蛾 Vta1 的 MIT 结构域直接参与二者的互作或 MIT 结构域的缺失引发 Vta1 突变体构象的改变进而影响 Vta1 与 Vps4 的互作。关于上述蛋白之间互作的分子机制仍需要采用其他方法, 如酵母双杂交、免疫共沉淀等进一步验证。

研究发现, 在 ESCRT-III 亚基的 N-端或 C-端融合一些大分子蛋白如 GFP 将形成相应 ESCRT 蛋白的显性-负性(DN)突变体进而造成过表达细胞中产生可见的囊泡现象并影响一些囊膜病毒的入侵和/或出芽释放^[3,5]。我们发现, 在 Sf9 细胞中瞬时表达 GFP 融合的 Vta1 并没有诱导产生可见的异常表型(图 2-C)也不影响感染性 AcMNPV 出芽型病毒的产生(图 4)或病毒早、晚期基因启动子指导下的报告基因表达(图 5)。相比较而言, 瞬时表达 GFP 标签的缺失 MIT 结构域的 Vta1 突变体却显著降低了感染性 AcMNPV 出芽型病毒的产量(图 4)。进一步分析发现, 瞬时表达 dMIT1 或 dMIT2 突变体不影响 AcMNPV 早、晚期基因启动子指导下的报告基因 *LacZ* 和 *GUS* 的表达(图 5), 推测 Vta1 突变体不影响出芽型病毒的入侵和病毒复制过程, 但对病毒粒子的组装和/或出芽释放过程产生了影响。在酵母细胞中, Vta1 通过其 N-端的 MIT 结构域与 Vps46 或 Vps60 互作^[8-10]。我们之前的研究发现, 瞬时表达 Vps4、Vps46 或 Vps60 的 DN 突变体显著降低子代病毒粒子的出芽释放^[5]。因

此, Vta1 突变体对 AcMNPV 侵染的影响也可能是由于该类突变体间接影响了 Vps46 与 Vps60 对 Vps4 功能调节的结果。关于 Vta1 在 AcMNPV 侵染中的作用仍需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Christ L, Raiborg C, Wenzel EM, Campsteijn C, Stenmark H. Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane-scission machinery. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(1): 42–56.
- [2] Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *The EMBO Journal*, 2015, 34(19): 2398–2407.
- [3] Scourfield EJ, Martin-Serrano J. Growing functions of the ESCRT machinery in cell biology and viral replication. *Biochemical Society Transactions*, 2017, 45(3): 613–634.
- [4] Li Z, Blissard GW. Cellular Vps4 is required for efficient entry and egress of budded virions of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 2012, 86(1): 459–472.
- [5] Yue Q, Yu Q, Yang Q, Xu Y, Guo Y, Blissard GW, Li Z. Distinct roles of cellular ESCRT-I and ESCRT-III proteins in efficient entry and egress of budded virions of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 2018, 92(1): e01636-17, doi: 10.1128/JVI.01636-17.
- [6] Chiaruttini N, Roux A. Dynamic and elastic shape transitions in curved ESCRT-III filaments. *Current Opinion in Cell Biology*, 2017, 47: 126–135.
- [7] Davies BA, Norgan AP, Payne JA, Schulz ME, Nichols MD, Tan JA, Xu ZH, Katzmann DJ. Vps4 stimulatory element of the cofactor Vta1 contacts the ATPase Vps4 $\alpha 7$ and $\alpha 9$ to stimulate ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(41): 28707–28718.
- [8] Lottridge JM, Flannery AR, Vincelli JL, Stevens TH. Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(16): 6202–6207.
- [9] Shiflett SL, Ward DM, Huynh D, Vaughn MB, Simmons JC, Kaplan J. Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(12): 10982–10990.
- [10] Yang D, Hurley JH. Structural role of the Vps4-Vta1 interface in ESCRT-III recycling. *Structure*, 2010, 18(8): 976–984.
- [11] Rohrmann GF. Baculovirus molecular biology. 3rd ed. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information (US), 2013.
- [12] Plonsky I, Cho MS, Oomens AGP, Blissard G, Zimmerberg J. An analysis of the role of the target membrane on the GP64-induced fusion pore. *Virology*, 1999, 253(1): 65–76.
- [13] Guo Y, Yue Q, Gao JL, Wang Z, Chen YR, Blissard GW, Liu TX, Li Z. Roles of cellular NSF protein in entry and nuclear egress of budded virions of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 2017, 91(20): e01111-17, doi: 10.1128/JVI.01111-17.
- [14] Nègre V, Hôtelier T, Volkoff AN, Gimenez S, Cousserans F, Mita K, Sabau X, Rocher J, López-Ferber M, d'Alençon E, Audant P, Sabourault C, Bidegainberry V, Hilliou F, Fournier P. SPODOBASE: an EST database for the lepidopteran crop pest *Spodoptera*. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 322.
- [15] Oomens AGP, Blissard GW. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 1999, 254(2): 297–314.
- [16] Votteler J, Sundquist WI. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host & Microbe*, 2013, 14(3): 232–241.
- [17] Ward DM, Vaughn MB, Shiflett SL, White PL, Pollock AL, Hill J, Schnegelberger R, Sundquist WI, Kaplan J. The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(11): 10548–10555.

Effects of deletion of MIT domains of host *Vta1* on replication of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*

Yu Sun, Yuying Li, Sijun Wang, Qianlong Yu, Qi Yue, Zhaofei Li*

College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] To isolate *Vta1* of *Spodoptera frugiperda* and to detect the requirement of *Vta1* in replication of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). [Methods] *Vta1* was isolated from Sf9 cells using reverse-transcription PCR. Two mutations of *Vta1*, which removed the first or second microtubule-interacting and transport domain (MIT) were transiently expressed. The interaction of *Vta1* and its mutants with Vps4, Vps46 and Vps60 was detected with bimolecular fluorescence complementation (BiFC). Using a viral complementation assay, the effect of *Vta1* mutants on replication of AcMNPV was determined. [Results] We obtained *Vta1* of *S. frugiperda*. The amino acid identities between *Vta1* of insect and yeast or between *Vta1* of insect and human are about 20% or 50%. Western blotting analysis showed GFP-tagged *Vta1* and its mutants were expressed in Sf9 cells. BiFC analysis revealed that deletion of MIT1 or MIT2 significantly reduced the interaction of *Vta1* mutants with Vps4, Vps46 or Vps60. Overexpression of *Vta1* mutants significantly decreased the infectious AcMNPV budded virions production but had no effect on the expression of the reporter genes *LacZ* and *GUS*, which separately controlled by AcMNPV *ie1* and *p6.9* early or late promoter. [Conclusion] *Vta1* might be involved in assembly and/or budding of progeny virions of AcMNPV.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, ESCRT, *Vta1*, AcMNPV

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31672082)

*Corresponding author. E-mail: zhaofeili@nwsuaf.edu.cn

Received: 15 March 2018; Revised: 11 April 2018; Published online: 20 April 2018