

野田村病毒 RNA 的复制机制

刘传凤^{1*} 张珈敏² 胡远扬²

(1. 武汉纺织大学 环境工程学院 湖北 武汉 430073)

(2. 武汉大学 生命科学院病毒学国家重点实验室 环球生物农药武汉大学联合研发中心 湖北 武汉 430072)

摘要: 野田村病毒科 *Nodaviridae* 分为 2 个属, 分别为主要感染昆虫的 α 野田村病毒属 (*Alphanodavirus*) 和主要感染鱼类的 β 野田村病毒属 (*Betanodavirus*)。野田村病毒的基因组由 2 条单链正义 RNA 分子 (RNA1 和 RNA2) 所组成, RNA1 编码蛋白 A, 即病毒负责复制病毒两条基因组的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶催化亚基。RNA2 编码衣壳前体蛋白 α , 此前体蛋白 α 先组装成原病毒粒子, 再经历一次自我催化的成熟切割成 2 个病毒的衣壳蛋白 β 和 γ , 就成了成熟的有感染性的病毒粒子。在 RNA 复制过程中, 从 RNA1 的 3' 末端会合成一个不被包装进病毒粒子的亚基因组 RNA3。RNA1 能在无 RNA2 的情况下自我复制, 并持续地产生亚基因组 RNA3, RNA3 的合成采取的是提前终止机制。本文还介绍了野田村病毒复制的调节、非结构蛋白的功能和病毒复制在细胞内的定位。

关键词: 野田村病毒, 基因组结构, 复制机制, 复制调节, 复制的定位

RNA replication mechanism of nodaviruses

LIU Chuan-Feng^{1*} ZHANG Jia-Min² HU Yuan-Yang²

(1. School of Environmental Engineering, Wuhan Textile University, Wuhan, Hubei 430073, China)

(2. Global Bio Pesticide Limited & Wuhan University Joint R&D Centre, State Key Laboratory of Virology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: The family *Nodaviridae* contains two genera, *Alphanodaviruses* and *Betanodaviruses*, which predominantly infect insects and fish, respectively. The genome of nodaviruse consists of two single-strand positive-sense RNAs (RNA1 and RNA2). RNA1 encodes protein A, catalytic subunit of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and RNA2 encodes coat precursor protein which undergoes an autocatalytic mature cleavage into two viral capsid proteins β and γ . During the course of RNA replication, a sub-genome RNA3 is synthesized which is not packaged into the virion from the 3' termini of RNA1. RNA1 can self-replicate automatically absence of RNA2 and produce the sub-genome RNA3 persistently. The mechanism of RNA3 synthesis is the mechanism of premature termination. The paper also reviewed the regulation of RNA replication, the functions of non-structural proteins and the local-

* 通讯作者: lcfzyl@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-01-22; 接受日期: 2011-05-05

ization of RNA replication of the nodaviruses.

Keywords: Nodaviruses, Genomic organization, Mechanism of replication, Regulation of replication, Localization of replication

野田村病毒科 *Nodaviridae* 分为 2 个属, 分别为主要感染昆虫的 α 野田村病毒属 (*Alphanodavirus*) 和主要感染鱼类的 β 野田村病毒属 (*Betanodavirus*)。野田村病毒是非包涵体的球状病毒, 病毒粒子直径为 29 nm–32 nm, 呈 T=3 正二十面体对称^[1]。

α 野田村病毒属成员的原始寄主都来自昆虫^[2], 但各病毒却都没有明显的宿主特异性。其 RNA 能在昆虫^[3–4]、脊椎动物^[5]、植物^[6]和酵母^[7]细胞内复制。因野田村病毒这种基因组的简单性使其在培养细胞中能大量的复制, 其特殊的遗传策略又使其成为一个很好的实验模型用于研究病毒的结构与组装^[8]、病毒的复制^[9–11]、病毒诱导细胞凋亡的机制^[12]以及研究其作为表达载体的潜能性^[3,13]等。

目前, 国外对野田村病毒 RNA 复制的研究已经有了大量深入的报道, 大多数是对感染昆虫的野田村病毒的研究, 然而, 国内除了武汉大学昆虫病毒实验室于 1998 年以来对 1 株感染昆虫的野田村病毒——武汉野田村病毒 (Wuhan nodavirus, WhNV) 进行研究以外^[14–17], 其它都是对鱼类野田村病毒的研究, 并且未有对于 RNA 复制研究的相关报道。本文拟对野田村病毒的复制作一综述。

1 野田村病毒的基因组结构

野田村病毒的基因组由两条单链正义 RNA 分子 (RNA1 和 RNA2) 所组成, 这两条 RNAs 分子都包装在同一个病毒粒子中^[18–19], 并且这两条 RNAs 分子对病毒的感染活性都是必需的。其中, RNA1 编码蛋白 A, 即依赖 RNA 的 RNA 聚合酶催化亚基; RNA2 编码衣壳前体蛋白 α , 此前体蛋白 α 先组装成原病毒粒子, 再经历一次自我催化的成熟切割成 2 个病毒的衣壳蛋白 β 和 γ , 就成了成熟的有感染性的病毒粒子。这种成熟切割对病毒的感染活性是必需的, 且能增强病毒的稳定性。这两条 RNAs 分子的 5' 末端都有帽子结构, 3' 末端无 Poly(A) 尾^[20], 并且 3' 末端被某种不平常的二级结构或未知的共价

修饰所封闭^[21]。除了 RNA1 和 RNA2 以外, 在 RNA 复制过程中, 从 RNA1 的 3' 末端会合成一个不被包装进病毒粒子的亚基因组 RNA3, 此 RNA3 编码 2 个开放阅读框 (ORF) 相互重叠的非结构蛋白 B1 和 B2^[21]。其基因组结构见图 1。

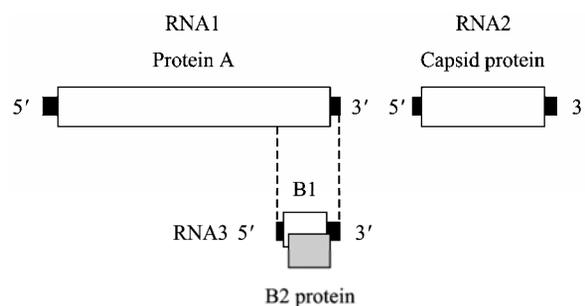


图 1 野田村病毒的基因组结构^[22]

Fig. 1 Genomic organization of nodavirus^[22]

注: 白色和灰色的方框表示开放阅读框。

Note: ORFs are shown in white and grey boxes.

2 野田村病毒 RNA 的复制

关于昆虫野田村病毒的复制已经有了较为深入的研究, 下面将从复制机制、复制的调节、非结构蛋白的功能以及复制的定位等方面逐一概述。

2.1 野田村病毒 RNA 的复制机制

2.1.1 RNA1 的复制和 RNA3 的合成: RNA1 能在无 RNA2 的情况下自我复制, 并持续地产生亚基因组 RNA3^[5]。和 RNA1 复制有关的顺式作用信号还未被系统地研究, 并且在 RNA1 复制过程中一些部位的自动缺失也和复制无关^[23]。目前对 RNA3 的合成机制提出了 2 个模型: 内部起始模型和提前终止模型。根据内部起始模型, 病毒的 RdRp 从负义 RNA1 模板的内部位点起始转录合成正义链的 RNA3; 而提前终止模型中是假设 RdRp 首先由正义链 RNA1 模板合成负义链的 RNA1, 但这种合成被提前终止以至于产生了负义链 RNA3, 负义 RNA3 然后被作为模板合成正义 RNA3。现已有证据显示其合成采取的是提前终止机制^[24]。

在 RNA1 上有 2 个控制 RNA3 合成的顺式作用元件: 一个是邻近的亚基因组控制元件(Proximal subgenomic control element), 正好位于 RNA3 起始位点的上游, 另一个是远端亚基因组控制元件(Distal subgenomic control element), 在离上游的 1.5 kb 处。在这 2 个控制元件之间有碱基互补配对区域, 该区域对 RNA3 的合成和 RNA2 的复制都是必要的, 在距 RNA1 3'端 1/4 处有 2 个对 RNA1 的复制很重要的顺式作用区域^[10]。

2.1.2 RNA2 的复制: 和其他病毒的 RdRp 一样, 野田村病毒的 RdRp 是高模板特异性的, 仅在感染细胞里选择性地复制病毒自身的 RNAs。由此可见, 在病毒 RNA 上必定存在 RdRp 能特异识别的位点。通过突变分析证明, 在正义 RNA2 3'末端有一个长约 60 nt 的区域, 包含一些在所有 α 野田村病毒的 RNA2s 上都保守的一级和二级结构。这个区域对 RNA2 的复制是必需的, 可能包含一个重要的 RdRp 识别决定簇^[25]。因为正义 RNA 是复制的主要产物, 负义 RNA 应是 RdRp 偏好的模板, 在负义 RNA 的 3'末端应有更强的复制起点, 但是, 对正义 RNA2 5'末端的内部进行的缺失突变(与负义 RNA2 预测的复制起点相互补的区域)没有对复制产生影响, 甚至直到 5'末端只剩下 3 nt 时也是如此。也就是说, RNA2 负义链复制的主要决定簇在其 5'端, 即与其正义链复制的 3'端顺式作用元件相互补的位置。

对 FHV 的研究表明, 其 RNA2 复制时除需要上面所提到的 3'末端序列以外, 还需要在 520-720 nt 间的一段内部序列。在 FHV 一系列复制传代过程中, 在 RNA2 的自动重组中产生的 36 个独立缺失突变体中, 尽管在其两边都有大段的缺失, 这个区域都是保守的^[23]。这个内部区域相对于 RNA2 末端的位置对其发挥功能是不重要的, 但对除了最小的约 150 nt 的 RNA2 复制子以外的所有 RNA2 的有效复制都是必需的。

2.1.3 复制中间体: 在野田村病毒复制过程中, 除了产生负义链的 RNAs 这样的复制中间体外, 还会产生 RNAs 1、2 和 3 的二聚体, 其中包括 RNAs 1、2 和 3 的同源二聚体(Homodimer)和 RNA2-RNA3 的

异质二聚体(Heterodimer)^[19,26]。这样的二聚体并不是只有野田村病毒才产生, 在其它的一些 RNA 病毒中也产生, 只是被认为是 RNA 复制异常时产生的副产物^[27-28]。但是对野田村病毒的研究发现, 这些二聚体并不是 RNA 复制时的异常副产物, 而是可能在 RNA 复制中起着非常重要的作用。比如, 在二聚体中, 其侧翼序列能保护末端的顺式作用信号免受外切核酸酶的攻击, 能调节一级结构中前后序列的位置, 并直接或间接的增强 RdRp 和其模板之间的相互作用^[26]。最近的研究表明, 在细胞内小干扰 RNA 介导的 RNA 沉默中, 这种双链的复制中间体可能是 Dicer 酶作用的底物^[29]。

2.2 RNA 复制的调节

2.2.1 RNA1 复制的调节: 在感染早期 RNA1 复制的速率是呈指数增长的, 但不久后就会达到一个稳定的水平, 并且在整个感染周期一直保持这个水平。当不存在 RNA2 时, RNA1 的复制也表现出相似的动力学特征, 这表明稳定期的形成不是由于复制产物的被包装, 而是因为 RNA1 有一种内在的调节自身复制的能力: 即 RNA 和蛋白质产物之间的反应产生了早期的指数增长和晚期的减少。

2.2.2 RNA2 复制的调节: 在病毒复制周期的大多数时间, RNA1 和 RNA2 的克分子数都是相等的。但因为 RNA2 对 RNA 的复制是非必需的, 所以这种状态很不稳定。在病毒一系列转染传代中, 全长的 RNA2 迅速被大量的不能编码蛋白质 α 的自动缺失突变体所替代^[23]。但是, 这些 RNA2 的自动缺失突变体的复制和 RNA1 是等分子数的, 甚至通过基因工程产生的 RNA2 的突变体也是如此, 表明有某些机制在调节这两种 RNAs 的复制。Ball 等^[2]对其调节机制进行了研究, 发现在 RdRp 能接受 RNA2 作为一个模板之前 RNA1 的先复制是必要的。他们通过基因工程的方法得到了一个 RNA1 的突变体, 这个突变体自身不能作为复制模板, 但能表达功能性的 RdRp。由这个模板翻译产生的复制酶能复制 RNA1 和来自 RNA1 的复制子, 但它不能复制 RNA2 或 RNA2 的衍生物。但是, 当加入能作为复制模板的 RNA1 的复制子时却恢复了 RNA2 的复制, 这种

影响不依赖于 B1、B2 蛋白或 RNA3 的合成, 但负义 RNA1 有可能参与。这些结果表明 RNA2 的合成与 RNA1 的合成是偶联的, 因而获得了克分子数相等的结果。

另外, RNA2 的复制也受到 RNA3 的反式调节。不能合成 RNA3 的 RNA1 突变体不能支持 RNA2 的复制, 但当重新加入外源的 RNA3 后又恢复了 RNA2 的复制, 这表明 RNA3 能反式激活 RNA2 的复制, 这种反式激活仅依赖于 RNA3 本身, 不依赖于 RNA3 编码的蛋白产物。有研究已经证明, 在 RNA2 3'末端的 50 nt 包含一个依赖 RNA3 的顺式作用复制信号。不能完成复制的 RNA3 突变体也不能反式激活 RNA2 的复制, 这表明 RNA3 的合成对 RNA2 复制的反式激活是必需的^[30]。

2.2.3 RNA3 复制的调节: RNA3 仅仅在病毒复制的起始阶段产生, 然后就完全被 RNA2 的复制所抑制, 但当 RNA2 不存在时, 其合成又将继续。这种抑制依赖于 RNA2 的复制, 但不是 RNA2 的翻译。这暗示这种抑制作用可能是由 RNA-RNA 间的相互作用所介导产生的直接影响。在东方蜚蠊病毒(Black beetle virus, BBV)的 RNA1 和 RNA2 序列上发现了 3 个潜在的正义 RNA2 和负义 RNA1 的碱基配对区域, 这 3 个区域正是 RNA3 起始合成的上游位置^[21]。这表明正链 RNA2 直接结合到负义 RNA1 的内部启动子上, 这种稳定的 RNA-RNA 相互作用抑制了 RNA3 的合成。然而, 另一种昆虫野田村病毒——羊舍病毒(Flock house virus, FHV)的 RNAs 之间碱基配对水平很低, 以至于这种解释无更多的事实依据。另外, 这种抑制主要是影响正义 RNA3 的合成, 对其负义链没有影响。

RNA3 能独立进行复制, 不依赖于 RNA1 的存在, RNA3 所编码的两个非结构蛋白 B1、B2 对其复制是非必要的, 但在 RNA3 3'末端的 58 nt 对复制是必需的^[30]。据推测, RNA3 可能对 RNA1、RNA2 的复制起协调作用。

2.2.4 翻译水平的调节: 在整个感染循环中, RNA1 和 RNA2 虽说是克分子数相等的, 但它们各自的翻译产物蛋白 A 和 α 的比例却有很大的差异。蛋白 A

的峰值出现在感染大约 5 h, 然后急剧减少, 而此时蛋白 B 和 α 的量却是持续增加。蛋白 B 的峰值出现在约感染后 8 h, 在感染后期, 大约 14 h 左右, 感染细胞中主要合成蛋白 α , 衣壳蛋白 α 持续增加直到 48 h 时达到整个细胞蛋白的 20%左右^[2]。蛋白 A 合成的这种选择性地早期关闭是由于当病毒 RNAs 在感染细胞中积累到一定量时, RNA1 可以作为 mRNA 是因宿主翻译系统中某种未知的速度限制因子的作用受到限制, 而不是病毒蛋白的作用, 也不是由于 RNA1 整合到核糖蛋白颗粒或亚细胞的小泡上。

2.3 非结构蛋白的功能

2.3.1 Protein A: 蛋白 A 是一个多功能的蛋白质, 它有几个功能域(Domain): 指导病毒 RNA 复制和转录的 RdRp 结构域; 指导蛋白 A 自身相互作用的结构域; 一个给病毒自身 RNA 加帽的鸟苷酸转移酶结构域, 以及指导蛋白 A 插入线粒体外膜的 N 末端靶定信号和跨膜结构域。蛋白 A 自身之间能发生相互作用, 并且这种自身之间的相互结合对其功能是非常重要的。也就是说, 在 RNA 复制的若干步骤中, 蛋白 A 都是以多聚体的形式来行使功能的。蛋白 A 除了发挥以上的功能外, 还指导复制复合体的形成, 在复制早期在体内增加 RNA1 的稳定性和指导 RNA1 富集到线粒体外膜上形成复制复合体中发挥着关键的作用^[31-32]。而蛋白 A 的合成受到宿主细胞因子的影响, 最近对研究得最为深入的一种野田村病毒——羊舍病毒 FHV 的研究发现, 感染果蝇细胞时, 宿主细胞的分子伴侣蛋白热激蛋白 90 (Hsp90)对病毒的复制和蛋白 A 的合成都是必需的^[33], 若抑制 Hsp90 的活性就会大大降低病毒的复制和蛋白 A 的合成; 但是当感染酵母细胞时, 降低 Hsp90 的活性却对病毒的复制和蛋白 A 的合成没有造成影响^[34]。

2.3.2 B1 和 B2 蛋白: 对纯化的 B1 和 B2 蛋白 N 末端序列分析表明这两个蛋白是分别从 RNA3 两个相互重叠的 ORFs 翻译的, 这个结果也通过对相应的起始密码的突变得到了证实^[22]。B1 蛋白和蛋白 A 在同一个 ORF 里, 它代表了蛋白 A C 末端 102 个残

基。但是,它对 RNA 的复制或是在果蝇细胞系中产生感染性病毒粒子都是不必要的。在 α 野田村病毒中,产生 B1 蛋白的能力也不是保守的,比如国内分离的 1 株昆虫野田村病毒——武汉野田村病毒的复制过程中 B1 蛋白就没有表达^[17]。但 B2 蛋白的产生是保守的,其情况更复杂。

当表达不能产生 B2 蛋白的 RNA1 的转录本时, RNA 复制的起始活性和野生型是一样的,表明 B2 蛋白对 RdRp 的活性没有影响。然而和野生型相比,突变体在下面的传代中不能保持自我复制的能力,表明 B2 蛋白对 RNA 复制起着某种微妙的支持作用。如果在 RNA1 的亚基因组 RNA3 启动子的起始位点产生一个 G 到 U 的突变, RNA1 就不能产生 RNA3,突变的 RNA 和野生型 RNA 的复制活性在转录诱导后的 24 h 是一样的,但随之突变体的活性会下降并且复制被提前终止。B2 蛋白可能在 RNA 复制的保真中起作用或是调节 RNA1 翻译和复制的平衡^[2]。

FHV 的 B2 蛋白不管是在动物细胞和植物细胞中都是一个 RNA 沉默的抑制剂^[35]。FHV 的感染需要抑制 RNA 沉默,这种结果表明 RNA 沉默在动物细胞中是一个适应性的抗病毒防御行为^[36]。在果蝇细胞中,野田村病毒(Nodamura virus, NoV)的 B2 蛋白也具有抑制 RNAi 的功能^[37-38]。进一步的研究表明,在哺乳动物细胞中, NoV 的 B2 蛋白是通过结合到 pre-Dicer 底物 RNA 和 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-inducing silencing complex, RISC)即加工 RNA 上抑制 Dicer 的切割反应,从而抑制一个或更多的 Post-Dicer 活性来抑制 RNAi 的^[39]。另外, NoV 的 B2 蛋白还能增强病毒 RNAs 在哺乳动物细胞中的积累^[40]。对鱼类野田村病毒 SJNNV 的 B2 蛋白的研究也显示其能在转基因植物中抑制 RNA silencing,并且是通过和昆虫野田村病毒相同的机制来完成的^[41]。

2.4 病毒复制的定位

正义 RNA 病毒复制的一个共同特征是必需有宿主细胞内膜的参与^[42]。对许多植物的和动物的正义 RNA 病毒研究表明,其复制酶蛋白和 RNA 合成

的位点定位在广泛的宿主细胞内膜结构上,比如脊髓灰质病毒定位到溶酶体(Lysosome)、内质网(Endoplasmic reticulum, ER)和高尔基体的膜上^[43];麻疹病毒(Rubella virus)定位到溶酶体和核内体(Endosome)^[44];雀麦草花叶病毒(Brome mosaic virus)和烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus)定位到 ER^[45-46]等。

对野田村病毒的研究发现,其 RdRp 能结合到病毒感染的果蝇细胞裂解物的膜碎片上;体外 RNA 合成时对膜和甘油磷脂的依赖性也暗含膜结合对病毒 RNA 复制的某些步骤是关键^[47];对两个相关的 α 野田村病毒的形态学研究也暗示在 RNA 复制中存在潜在的细胞内定位^[48-49];对 Nodamura virus (NoV) 感染的大蜡螟幼虫和乳鼠的超微病理学研究表明,在感染的细胞质中出现了泡状体,该泡状体包含 RNA,在感染的早期线粒体发生了形态变化,因此推测线粒体可能是病毒复制的支持结构或能量来源^[49]。

通过用荧光聚焦显微镜观察发现蛋白 A、线粒体和新合成的病毒 RNA 之间的共定位。电镜观察也表明在野田村病毒感染的细胞内线粒体成束状,并且在线粒体内膜空间形成 40 nm–60 nm 的与膜结合的球体结构。免疫金电膜分析显示蛋白 A 定位到线粒体的外膜上,由此表明,野田村病毒 RNA 的复制是发生在线粒体外膜上^[9,50]。研究表明,蛋白 A 是一个跨膜蛋白,该蛋白通过一个 N 末端的线粒体定位信号和跨膜结构域将 RNA 复制复合体靶定和锚定到线粒体外膜^[9]。但是,当将这个定位信号用酵母 NaDP 细胞色素 P450 氧化还原酶的 ER 靶定序列或丙型肝炎病毒(HCV) NS5B 聚合酶或酵母 T-SNARZ Uflp 的 C-末端 ER 靶定序列替代时,这种蛋白 A 的嵌合体靶定到 ER 上,因此证实, FHV RNA 复制复合体的形成和发挥功能并不需要特定的细胞内膜^[11]。除了需要蛋白 A N 末端的靶定信号外,复制复合体要特异性定位到线粒体外膜上还必须要有宿主细胞的一种分子伴侣蛋白热激蛋白 70 (Hsp70)的参与^[34]。

目前对于昆虫野田村病毒 RNA 复制研究的数

据主要来自于研究最深入的羊舍病毒, 对同属其他病毒的研究相对较少, 特别是对 RNA1 复制有关的顺式作用元件还没有定论, 对鱼类野田村病毒 RNA 复制的研究也处于起步阶段, 本人认为进一步的研究应重点集中在其他几种野田村病毒的复制以及鱼类野田村病毒的复制上, 找出野田村病毒复制的共同的基本策略及差异性, 以及昆虫野田村病毒和鱼类野田村病毒的进化关系等。

参 考 文 献

- [1] Hosur MV, Schmid T, Tucker RC, et al. Structure of an insect virus at 3.0 Å resolution[J]. *Proteins Struct Funct Genet*, 1987, 2(3): 167–176.
- [2] Ball LA, Johnson KL. Nodaviruses of insects//Miller LK, Ball LA. *The Insect Viruses*[M]. New York: Plenum Publishing Corporation, 1998: 225–267.
- [3] Dasgupta R, Cheng LL, Bartholomay LC, et al. Flock house virus replicates and expresses green fluorescent protein in mosquitoes[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(7): 1789–1797.
- [4] Li TC, Scotti PD, Miyamura T, et al. Latent Infection of a new alphanodavirus in an insect cell line[J]. *J Virol*, 2007, 81(20): 10890–10896.
- [5] Ball LA, Amann JM, Garrett BK. Replication of nodamura virus after transfection of viral RNA into mammalian cells in culture[J]. *J Virol*, 1992, 66(4): 2326–2334.
- [6] Selling BH, Allison RF, Kaesberg P. Genomic RNA of an insect virus directs synthesis of infectious virions in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(1): 434–438.
- [7] Price BD, Echerle LD, Ball LA, et al. Nodamura virus RNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*: heterologous gene expression allows replication-dependent colony formation[J]. *J Virol*, 2005, 79(1): 495–502.
- [8] Tihova M, Dryden KA, Le TVL, et al. Nodavirus coat protein imposes dodecahedral RNA structure independent of nucleotide sequence and length[J]. *J Virol*, 2004, 78(6): 2897–2905.
- [9] Miller DJ, Schwartz MD, Ahlquist P. Flock house virus RNA replicates on outer mitochondrial membranes in *Drosophila* cells[J]. *J Virol*, 2001, 75(23): 11664–11676.
- [10] Lindenbach BD, Sgro JY, Ahlquist P. Long-distance base pairing in flock house virus RNA1 regulates subgenomic RNA3 synthesis and RNA2 replication[J]. *J Virol*, 2002, 76(8): 3905–3919.
- [11] Miller DJ, Schwartz MD, Dye BT, et al. Engineered re-targeting of viral RNA replication complexes to an alternative intracellular membrane[J]. *J Virol*, 2003, 77(22): 12193–12202.
- [12] Settles EW, Friesen PD. Flock house virus induces apoptosis by depletion of *Drosophila* inhibitor-of-apoptosis protein DIAP1[J]. *J Virol*, 2008, 82(3): 1378–1388.
- [13] Venter PA, Schneemann A. Recent insights into the biology and biomedical applications of Flock House virus[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(17): 2675–2687.
- [14] 邱乐泉, 张珈敏, 刘传凤, 等. 菜粉蝶野田村病毒感染宿主的病理学变化及病毒的装配[J]. *中国病毒学*, 2005, 20(6): 664–667.
- [15] Liu CF, Zhang JM, Yi FM, et al. Isolation and RNA1 nucleotide sequence determination of a new insect nodavirus from *Pieris rapae* larvae in Wuhan city, China[J]. *Virus Res*, 2006, 120(1/2): 28–35.
- [16] Liu CF, Zhang JM, Wang JP, et al. Sequence analysis of coat protein gene of Wuhan nodavirus isolated from insect[J]. *Virus Res*, 2006, 121(1): 17–22.
- [17] Cai DW, Qiu Y, Qi N, et al. Characterization of Wuhan nodavirus subgenomic RNA3 and the RNAi inhibition property of its encoded protein B2[J]. *Virus Res*, 2010, 151(2): 153–161.
- [18] Newman JFE, Brown F. Further physicochemical characterization of Nodamura virus. Evidence that the divided genome occurs in a single component[J]. *J Gen Virol*, 1977, 38(1): 83–95.
- [19] Krishna NK, Schneemann A. Formation of an RNA heterodimer upon heating of nodavirus particles[J]. *J Virol*, 1999, 73(2): 1699–1703.
- [20] Schneemann A, Reddy V, Johnson JE. The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology[J]. *Adv Virus Res*, 1998, 50: 381–446.
- [21] Li Y, Ball LA. Nonhomologous RNA recombination during negative-strand synthesis of flock house virus RNA[J]. *J Virol*, 1993, 67(7): 3854–3860.
- [22] Johnson KN, Johnson KL, Dasgupta R, et al. Comparisons among the larger genome segments of six nodaviruses and their encoded RNA replicases[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(8): 1855–1866.
- [23] Ball LA. Requirements for the self-directed replication of flock house virus RNA 1[J]. *J Virol*, 1995, 69(2): 720–727.
- [24] White KA. The premature termination model: a possible third mechanism for subgenomic mRNA transcription in (+)-strand RNA viruses[J]. *Virology*, 2002, 304(2): 147–154.
- [25] Roskopf JJ, Upton JH III, Rodarte L, et al. A 3' terminal stem-loop structure in Nodamura virus RNA2 forms an

- essential cis-acting signal for RNA replication[J]. *Virus Res*, 2010, 150(1/2): 12–21.
- [26] Albarino CG, Price BD, Eckerle LD, et al. Characterization and template properties of RNA dimers generated during flock house virus RNA replication[J]. *Virology*, 2001, 289(2): 269–282.
- [27] Dalmay T, Szittyá G, Burgyán J. Generation of defective interfering RNA dimers of cymbidium ringspot tomosvirus[J]. *Virology*, 1995, 207(2): 510–517.
- [28] Finnen RL, Rochon DM. Characterization and biological activity of DI RNA dimers formed during cucumber necrosis virus coinfections[J]. *Virology*, 1995, 207(1): 282–286.
- [29] Van Rij RP, Berezhikov E. Small RNAs and the control of transposons and viruses in *Drosophila*[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(4): 163–171.
- [30] Eckerle LD, Albarino CG, Ball LA. *Flock house virus* subgenomic RNA3 is replicated and its replication correlates with transactivation of RNA2[J]. *Virology*, 2003, 317(1): 95–108.
- [31] Van Wynsberghe PM, Chen HR, Ahlquist P. Nodavirus RNA replication protein A induces membrane association of genomic RNA[J]. *J Virol*, 2007, 81(9): 4633–4644.
- [32] Van Wynsberghe PM, Ahlquist P. 5' cis elements direct nodavirus RNA1 recruitment to mitochondrial sites of replication complex formation[J]. *J Virol*, 2009, 83(7): 2976–2988.
- [33] Castorena KM, Weeks SA, Stapleford KA, et al. A functional heat shock protein 90 chaperone is essential for efficient flock house virus RNA polymerase synthesis in *Drosophila* cells[J]. *J Virol*, 2007, 81(16): 8412–8420.
- [34] Weeks SA, Miller DJ. The heat shock protein 70 cochaperone YDJ1 is required for efficient membrane-specific flock house virus RNA replication Complex assembly and function in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Virol*, 2008, 82(4): 2004–2012.
- [35] Venter PA, Schneemann A. Nodaviruses[M]//Mahy BWJ, van Regenmortel MHV. *Encyclopedia of Virology*. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2008: 430–438.
- [36] Aliyari R, Wu QF, Li HW, et al. Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in *Drosophila*[J]. *Cell Host & Microbe*, 2008, 4(4): 387–397.
- [37] Galiana-Arnoux D, Dostert C, Schneemann A, et al. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(6): 590–597.
- [38] Wang XH, Aliyari R, Li WX, et al. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*[J]. *Science*, 2006, 312(5772): 452–454.
- [39] Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells[J]. *J Virol*, 2005, 79(12): 7371–7379.
- [40] Johnson KL, Price BD, Echerle LD, et al. *Nodamura virus* nonstructural protein B2 can enhance viral RNA accumulation in both mammalian and insect cells[J]. *J Virol*, 2004, 78(12): 6698–6704.
- [41] Fenner BJ, Goh W, Kwang J. Sequestration and protection of double-stranded RNA by the betanodavirus B2 protein[J]. *J Virol*, 2006, 80(14): 6822–6833.
- [42] Buck KW. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals[J]. *Adv Virus Res*, 1996, 47: 159–251.
- [43] Schlegel A, Giddings TH Jr, Ladinsky MS, et al. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection[J]. *J Virol*, 1996, 70(10): 6576–6588.
- [44] Magliano D, Marshall JA, Bowden DS, et al. Rubella virus replication complexes are virus-modified lysosomes[J]. *Virology*, 1998, 240(1): 57–63.
- [45] Restrepo-Hartwig MA, Ahlquist P. Brome mosaic virus helicase- and polymerase-like proteins colocalize on the endoplasmic reticulum at sites of viral RNA synthesis[J]. *J Virol*, 1996, 70(12): 8908–8916.
- [46] Más P, Beachy RN. Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA[J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(5): 945–958.
- [47] Wu SX, Ahlquist P, Kaesberg P. Active complete *in vitro* replication of nodavirus RNA requires glycerophospholipid[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(23): 11136–11140.
- [48] Bashiruddin JB, Cross GF. Boolarra virus: ultrastructure of intracytoplasmic virus formation in cultured *Drosophila* cells[J]. *J Invertebr Pathol*, 1987, 49(3): 303–315.
- [49] Garzon S, Strykowski H, Charpentier G. Implication of mitochondria in the replication of nodamura virus in larvae of the Lepidoptera, *Galleria mellonella* (L.) and in suckling mice[J]. *Arch Virol*, 1990, 113(3/4): 165–176.
- [50] Miller DJ, Ahlquist P. Flock house virus RNA polymerase is a transmembrane protein with amino-terminal sequences sufficient for mitochondrial localization and membrane insertion[J]. *J Virol*, 2002, 76(19): 9856–9867.