

植物病毒编码 RNA 沉默抑制子的研究进展

王献兵 张凌娣 李大伟 韩成贵 于嘉林

(中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 RNA 沉默是真核生物用来抵抗病毒入侵的一种普遍而又古老的防御机制,而病毒在进化过程中也相应地产生了一些与之抗衡的功能,其中编码沉默抑制子就是对抗 RNA 沉默的有效策略。它们分别能够在不同阶段,以不同的方式干扰来自于寄主的 RNA 沉默,从而有效地建立侵染。本文主要针对目前已经发现的由植物病毒编码 RNA 沉默抑制子的作用特征、鉴定方法以及作用副效应进行综述,并讨论了 RNA 沉默抑制子的研究及应用前景。

关键词 RNA 沉默; 抗病毒; 抑制子; 进化

中图分类号 Q 754

文章编号 1007-4333(2005)04-0031-08

文献标识码 A

Approaches of research on RNA silencing suppressors encoded by plant viruses

Wang Xianbing, Zhang Lingdi, Li Dawei, Han Chenggui, Yu Jialin

(State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract In recent years, RNA silencing is identified as a general and ancient defense mechanism of plants against to virus infections. Accordingly, during the long-term evolution, mechanisms against the RNA silencing of their hosts have been developed in viruses to evade or neutralize the defense system, in which expression of suppressors is a very effective strategy. During establishment of a successful infection, virus encoded suppressors interfere with the elements related to RNA silencing at different points of the regulation pathway. This reviewing paper is mainly focusing on the functional characteristics, identification of the suppressor proteins and the side effect during the processes, while the application and the prospect of suppressors studies are briefly discussed.

Key words RNA silencing; virus resistance; suppressor; evolution

1 RNA 沉默研究概况

在 20 世纪末发现的小片段 RNA 在近几年中引起科学界的广泛关注,人们纷纷转向研究这种一直被忽略的小的非编码的 RNA。在 2002 年《科学》杂志的 10 大科学进展中,小片段 RNA 的研究被列入其首位。这些小片段非编码 RNA 在生物体的抵御病毒和核酸的入侵以及在植物生长发育的过程中发挥非常重要的调控作用。

早在 1990 年,就有一些研究者发现在转基因植物中存在着基因表达的共抑制的现象^[1],即在转入的外源基因与内源基因具有同源序列时,会导致内源基因和外源基因同时出现表达减弱的现象,而最

终达到沉默的效果,人们称之为 RNA 沉默^[2-3]。随后发现,这些共抑制现象并不局限在植物中,而在实验动物中也有类似现象^[4-6]。直到 1998 年,Fire 等人^[7]发现双链 RNA 比单链反义 RNA 更有效的抑制基因的表达,此结果证明了共抑制现象是由正反双链共同作用的结果。随后,众科学家纷纷开始研究这种现象中的真正作用因子。1 年后,英国 Baulcombe 研究小组^[8]找到了 RNA 沉默中关键作用因子:他们在研究转基因及病毒诱导的 RNA 沉默的过程中,发现 1 种长约 21~25 nt 之间的小片段 RNA 仅存在于沉默的植株中,并且与沉默的内源基因具有同源性。此发现无疑给敏锐的科学家提供了一个很重要的信息,即这种被忽略的小片段可能在

收稿日期: 2004-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30325001)

作者简介: 王献兵,博士研究生;李大伟,教授,博士生导师,主要从事分子植物病毒学的研究。

生物体中发挥其他大片段无法替代的作用。Zamore 小组^[9]发现在果蝇胚胎的体液中,双链 RNA(dsRNA)能够被切割成上述的小片段 RNA,并且证明与 RNA 干扰有关,他们将之称为小干扰性 RNA(small interfering RNA,简称 siRNAs)。随后,这种小片段 RNA 被发现存在于各种发生 RNA 沉默的生物体内,植物的 RNA 沉默现象与动物的 RNA 干扰现象也由此相互联系起来^[10]。

根据发生的阶段 RNA 沉默可分为:转录 RNA 沉默和转录后 RNA 沉默,两者都与核 DNA 的序列特异性甲基化有关^[11],其中前者是基因的启动子被甲基化而不能启动转录,而后者往往在同源基因的编码区甲基化造成转录出来的异常的 mRNA 在细胞质中被降解,这两种情况都能导致基因的不表达。转录后 RNA 沉默主要分为下面几个主要阶段^[12]:

RNA 沉默的起始:RNA 沉默的起始阶段主要是 dsRNA 的产生和 dsRNA 切割成 siRNA 的过程。RNA 沉默的引发体主要是双链 RNA(dsRNA)的出现,然后导致后面一系列反应的出现。效应阶段:效应阶段就是指 siRNA 结合寄主的一些蛋白,形成 RNA 诱导的沉默复合体(RISC),然后由 siRNA 指导同源 mRNA 的特异降解。这个阶段是 RNA 沉默最重要的阶段,是中间的枢纽过程。保持阶段:RNA 沉默的现象不是瞬时的,而是能保持和延伸到生物体的各个部位。在实验过程中常常微量的双链 RNA 就能导致整个生物体产生沉默现象;保持阶段主要是系统沉默信号的产生、放大、运输进而产生沉默的循环过程,保持阶段还有 DNA 甲基化的参与。

总之, RNA 沉默现象是真核生物中普遍存在的抵抗外来核酸入侵的一种防御机制,并且在外界的选择压下不断的进化成一种很完善的防御体系,最大程度的保护真核基因组免受侵害。

2 病毒和寄主植物的共进化

在植物和病毒相互作用的过程中,它们之间存在着斗争、妥协的共进化的复杂关系^[13]。在长期的进化的过程中,植物不断完善 RNA 沉默机制,构建一个完善的防御体系来抵抗病毒以及外来核酸的侵入到自己的基因组中,换句话说, RNA 沉默就是真核基因组的免疫系统^[14]。

变异较快的病毒为了生存繁殖,也相应地采取了一些手段来增加自己的复制和传播能力。现在研

究发现,病毒在进化过程中产生的抵抗 RNA 沉默的方法有 2 种:一种是大多数病毒采用的编码沉默抑制子来干扰 RNA 沉默的各个过程,另外一种是一些缺陷干扰 RNA 或卫星 RNA 通过复杂的二级结构逃避 RNA 沉默的降解^[15-16]。例如:CMV 的 2b 基因的出现大大晚于该基因组的其他 4 个基因,这也说明此基因可能是病毒为了抵抗寄主的 RNA 沉默而经过变异产生的一个经典的抑制子^[2]。

随后,寄主植物为了抵抗这种强大的抑制子又进一步进化产生了新的抗病毒机制。Ding 研究小组^[17]把番茄不孕病毒(TAV)的 2b 基因利用烟草花叶病毒(TMV)载体进行表达实验,结果表明:这个蛋白在本生烟(*Nicotiana benthamiana*)中表现为功能很强的抑制子并能加重 TMV 的病毒症状,而在相近的寄主植物普通烟(*N. tabacum*)中并没有产生类似的现象,却诱导产生另外一种强烈的“基因对基因(gene-for-gene)”的寄主超敏反应,从而大大降低了 TMV 的病毒症状。这个实验首次说明了寄主植物为了抵抗病毒编码的 RNA 沉默的抑制子又进化产生另外一套独立的抗病毒体系。

因此,可以看到:在长期的进化过程中,病毒和寄主植物为了在相互斗争中取得相对优势,从 RNA 沉默到沉默抑制子再到“基因对基因(gene-for-gene)”的寄主超敏反应,这些分子机制都是在病毒和寄主植物之间的防御、反防御的斗争中逐渐进化形成的。

虽然植物和病毒之间存在相互斗争不断进化的对抗关系,但是这对矛盾并不是完全不可调和的。以下两方面的证据充分说明了这一点:

1) 病毒并不是快速致寄主于死地,否则也不利于它们的生存繁殖。它们通过调节这些抑制子的强度,使植物和病毒之间的斗争达到一个相对缓和的平衡状态。甜菜西部黄化病毒(BWYV)的 P0 在瞬时表达系统中也表现出很强的抑制 RNA 沉默的效果,但是在基因组中因为有一个弱的翻译起始环境不能大量表达,因此表现不出强烈的抑制效果^[18]。Feng 等^[19]发现:芜菁皱缩病毒(TCV)的外壳蛋白在瞬时表达载体系统中发挥很强的抑制沉默的能力,但在原来病毒基因组中表达的外壳蛋白则没有抑制沉默功能。以上结果表明病毒并不是完全利用抑制子来无限增加侵染能力而最终导致寄主的快速死亡;这些抑制子可能只在某些恶劣的环境中为求得生存才表现出抑制沉默的能力。甚至一些种传和

花粉传的病毒都不产生抑制子,因为它们与植物之间是相对温和的对抗关系^[20]。

2) 寄主植物也相应地采取一些分子机制来缓和自身与病毒之间的对抗关系。Anandalakshmi 等^[21]发现在植物内存在与 TEV 的沉默抑制子 HC-Pro 蛋白互作的几种蛋白,其中最典型的是钙信号相关的调节蛋白 rgsCaM。瞬时表达和稳定转化产生的 rgsCaM 也能产生与 HC-Pro 蛋白类似的抑制沉默的效果。这个实验表明 rgsCaM 是植物内源的沉默抑制子。植物编码内源蛋白来抑制自己沉默反应,是为缓和与植物病毒之间的矛盾。

这些现象表明:病毒和植物之间采取谦和的态度对待对方也是自然界长期进化选择的结果。

3 病毒编码的 RNA 沉默抑制子

病毒编码的抑制子的发现是源于对病毒侵染植物的协同效应的研究^[22]。病毒的协同效应是指当 2 种不相关的病毒共同侵染同一株植物时,其中一种可以强化另外一种病毒的症状和病毒积累量。1998 年多个实验室几乎同时发现这种现象是由于病毒编码的 RNA 沉默抑制子所引起的^[23-26]。

随后,开始在各种病毒编码的蛋白中寻找抑制子,Brigneti 等^[24]最早发现一些病毒的致病因子在本生烟(*N. benthamiana*)中都具有抑制 RNA 沉默的能力,随后许多病毒的致病因子也陆续被鉴定为 RNA 沉默的抑制子。随后,发现具有抑制子功能的各种病毒蛋白并没有共同的保守序列和功能结构域,在细胞中定位也各不相同。这些抑制子具有的序列结构多样性可能是因病毒在寄主体内进行复制的时候,不同的植物有着机制来抵抗病毒,相应地,病毒也会有策略来破坏植物的防御,这是一个非常复杂的相互作用的过程,各种沉默抑制子在不同的环节起了作用^[27]。

迄今为止,已经在不同的病毒中发现病毒编码的各种功能的蛋白都有沉默抑制子的活性(表 1),比如运动蛋白、外壳蛋白、聚合酶、介体传播辅助蛋白等。

根据一些典型抑制子的具体作用特点,从功能上它们可以被分为以下 6 类^[19-20,45]:

1) 影响 RNA 沉默的保持阶段,能逆转 RNA 沉默现象,这类抑制子是在 siRNA 出现之前发挥作用

的:主要包括:马铃薯 Y 病毒(PVY)和烟草蚀纹病毒(TEV)的 HC-Pro 蛋白^[23-24],水稻黄斑驳病毒(RYMV)的 P1 蛋白^[33]。HC-Pro 蛋白主要是通过降低 21-25nt 的小 RNA 的积累量而达到抑制 RNA 沉默的目的^[46-47],但是它不能阻止系统沉默信号的产生和扩散^[47]。

2) 能抑制沉默信号的转移或湮灭信号的活性,可以阻止沉默信号进入新生叶中引起 RNA 沉默,但是这种抑制子不能在已经建立的沉默状态区域重新启动目标基因表达:本类的典型抑制子是黄瓜花叶病毒(CMV)的 2b 蛋白,它主要是通过阻止沉默信号的转移而达到抑制 RNA 沉默的效果^[24,48],并且它的核定位信号是发挥作用所必需的^[49]。

3) 能抑制沉默信号的形成但不逆转沉默:目前,这类蛋白有 PVX 的 P25 蛋白^[32]。

它能阻止病毒和转基因诱导的系统沉默发生,且仅能抑制转基因诱导的局部沉默,而不能抑制病毒诱导的局部沉默。

4) 这类抑制子发挥功能的时期更早,在 RNA 沉默的起始阶段:至今这类的抑制只有芜菁皱缩病毒(TCV)的 CP 蛋白,其功能可能是干扰植物体内源产生的切割酶(DICER)的活性^[19]。

5) 通过竞争结合 siRNAs 抑制 RNA 沉默:这类的抑制子典型代表是番茄丛矮病毒属病毒(*Tombusviruses*)编码的 P19 蛋白^[35]。P19 通过非特异的结合 PTGS 产生的 21-25nt 的 siRNAs 而达到抑制沉默的效果^[35,50]。它抑制沉默的类型和上述的 P25 相似^[35],并且这类蛋白抑制沉默效果具有 siRNAs 剂量依赖性,即当大量的 siRNAs 出现时就不能阻止 RNA 沉默的发生^[51-52]。

6) 改变寄主基因的表达:有些病毒可以通过改变寄主参与 RNA 沉默的基因表达而达到抑制 RNA 沉默的效果。这类病毒一般是 DNA 病毒,它们编码的抑制子是转录激活因子(TrAP)。这类主要包括非洲木薯花叶病毒(ACMV)的 AC2^[33]和番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)的 C2^[53]。利用农杆菌注射的方法,这类抑制子能抑制局部和系统沉默,并且它们的核定位信号、锌指结构以及 DNA 结合活性都是沉默所必需的^[53]。根据推测这些转录激活因子可能是通过开启和关闭 RNA 沉默相关的基因而达到抑制 RNA 沉默的目的。

表1 植物病毒 RNA 沉默抑制子
Table 1 Plant viral suppressors of RNA silencing

抑制子	所在病毒	病毒属	作用方式	其他功能	参考文献
HcPro	马铃薯 Y 病毒 (PVY) 烟草蚀纹病毒 (TEV) 李痘病毒 (PPV)	<i>Potyvirus</i>	能逆转沉默状态、阻止 SiRNAs 积累	基因组扩增因子、长距离运输、辅助介体传播、多聚蛋白的切割	[23~24, 28~29]
2b	黄瓜花叶病毒 (CMV) 番茄不孕病毒 (TAV)	<i>Cucumovirus</i>	PVX-2b 能干扰系统信号上传、抑制系统沉默	致病因子、寄主特异性远距离传播	[24~25]
b	大麦条纹花叶病毒 (BSMV) 早熟禾半潜隐病毒 (PSLV)	<i>Hordeivirus</i>	PVX 载体系统表达可以抑制 RNA 介导的交叉保护现象	基因组扩增因子、远距离运输、种子传毒	[30~31]
P25	马铃薯 X 病毒 (PVX)	<i>Potexvirus</i>	能抑制沉默信号的形成但不逆转沉默	胞间运动	[32]
AC2 C2	非洲木薯花叶病毒 (ACMV) 番茄黄化曲叶病毒 (TYLCV)	<i>Begomovirus</i>	DNA 结合活性可能具有转录激活子功能、利用 PVX 载体能逆转沉默状态	致病因子	[24]
P1	水稻黄斑驳病毒 (RYMV)	<i>Sobemovirus</i>	用 PVX 载体表达可以抑制系统沉默	病毒积累、远距离运输、致病因子	[33]
P0	甜菜西方黄化病毒 (BWYV) 南瓜蚜转黄化病毒 (CABYV)	<i>Polerovirus</i>	抑制局部沉默	病毒的积累、致病因子	[18, 34]
P19	番茄从矮病毒 (TBSV) 蕙兰环斑病毒 (CymRSV) 菊芋斑驳皱缩病毒 (AMCV)	<i>Tombusvirus</i>	与 SiRNAs 结合有限抑制系统沉默	病毒运动、致病因子	[33, 35]
CP	芜菁皱缩病毒 (TCV)	<i>Carmovirus</i>	利用双元载体表达可以抑制局部和系统沉默	基因组包装和运动	[36]
NSs	番茄斑萎病毒 (TSMV)	<i>Tospovirus</i>	抑制系统沉默	致病因子、运动蛋白	[37~38]
P15	花生丛矮病毒 (PCV)	<i>Peeluvirus</i>	抑制系统沉默	基因组扩增因子	[39]
P21 P22	甜菜黄化病毒 (BYV) 甜菜西部黄化病毒 (BYSV)	<i>Classteovirus</i>	抑制局部沉默	病毒积累、病毒的长距离运输	[40]
P130	番茄花叶病毒 (ToMV)	<i>Potexvirus</i>	抑制系统沉默	病毒复制酶	[41]
NS3	水稻条纹病毒 (RHBV)	<i>Tenuivirus</i>	抑制局部沉默	尚不清楚	[38]
P126	烟草花叶病毒 (TMV)	<i>Tobamovirus</i>	抑制局部沉默、延迟 GFP 的沉默状态的出现	病毒复制酶	[42]
CP P20	柑桔衰退病毒 (CTV)	<i>Classterovirus</i>	抑制系统沉默	病毒包装	[43]
P23			抑制局部沉默 抑制系统和局部沉默	致病因子 病毒积累	
S6	水稻黑条矮缩病毒 (RBSDV)	<i>Fijivirus</i>	降低基因组甲基化、抑制系统沉默	尚不清楚	[44]
14K	甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV)	<i>Benevirus</i>	干扰甲基化、抑制系统沉默	保护以及促进病毒在体内传播	[44]

4 研究沉默抑制子的主要方法

通过近几年的系统研究,已经建立了以下几种

方法来鉴定新的病毒编码的抑制子:

1) 利用病毒载体异源表达并观察重组病毒的致病能力的变化:这种方法通常采用改造过的马铃薯

X 病毒(PVX)载体来表达可能的抑制子。如果重组病毒使 PVX 的症状加重,就可以初步鉴定为抑制子。但是这种方法并不能完全来证明抑制子的功能,因为后来发现 PVX 上也编码一个抑制子 P25,因此这种方法曾引起科学界的争议。

2) 农杆菌介导的瞬时表达系统:这种方法提供了快速而简单的鉴定抑制子的方法,现在已被普遍应用^[32,46]。该方法需要 2 种农杆菌质粒:一种是含有报告基因(多为 GFP)来作为 RNA 沉默的激发子,另外一种是用来表达抑制子候选基因。然后再将分别含有这 2 种质粒的农杆菌(*Agrobacterium*)混合注射植物叶片上,再跟踪观察注射区域的报告基因的表达情况。如果候选基因具有抑制子活性,报告基因的表达会持续很长时间,反之报告基因会很快被沉默掉。因为该方法简单,因此可以用来快速的大量的筛选抑制子,以及一些抑制子的关键氨基酸和功能结构域^[28,36]。

3) 稳定表达检测系统:这种方法耗时比较长,因此一般在其他快速的方法鉴定为抑制子的前提下,再稳定转化这种抑制子。稳定转化植株可以用来作用于转基因诱导的 RNA 沉默,可以进一步研究抑制功能的发生机制。除此之外,这种转化植株通过嫁接还可以用来检测沉默抑制子对系统沉默是否有作用^[47-48]。

4) RNA 沉默的逆转系统:这种方法可以用表达候选抑制子基因的转基因植株和发生沉默的转基因植株进行杂交,看后代是否重新表达报告基因。在发生沉默的植株上,用病毒去侵染,如果这种病毒能使沉默植株重新表达报告基因,则这个病毒肯定编码一个功能很强的抑制子^[33]。

5) 功能互补法:即用已知有抑制功能的抑制子来替代候选抑制子的一种很巧妙的方法^[31]。Yelina 等发现将大麦条纹花叶病毒(BSMV)的 b 蛋白基因去除后导致在寄主植物体内的病毒含量降低、致病力下降,进一步检测表明这些现象都是 RNA 沉默所引起的。但这个缺失 b 蛋白基因的突变株在转马铃薯 A 病毒(PVA)的 HC-Pro 基因的植株内却表现很强的致病力,并且用 HC-Pro 替换 b 基因的重组病毒照样能引起很强的致病力,同时 RNA 沉默的标志物 siRNAs 也消失了。因此他们推测 b 可能与 HC-Pro 一样具有抑制 RNA 沉默的功能^[31]。

虽然上述几种方法都可以用来筛选新的抑制

子,但由于激发子的形式、抑制子的表达剂量以及抑制能力的强弱都存在差别,因而不同实验室的结果不尽相同。此外,鉴定抑制子的实验大多都是在烟草上进行的,还需要尝试更多的模式植物以用来观察抑制子在不同植物内是否有功能上的变化。

5 沉默抑制子与 RNA 沉默互作的副效应

除了 RNA 沉默过程中产生的 siRNAs 之外,在真核生物体内还存在大量的非编码小片段 RNA,统称为 miRNAs。这些非编码的小 RNA 在真核生物体的基因表达中具有重要的调节功能^[54-55],主要是与目的 mRNA 的 3 端结合来抑制真核基因的翻译,但是它们不会切割靶 mRNA。由于 miRNAs 和 siRNAs 的调节过程有很多相似的地方,因此很多病毒编码的沉默抑制子可能会对 miRNAs 调节过程产生影响。用番茄从矮病毒(TBSV) P19 基因转化拟南芥后,植株生长异常可能是因为 P19 改变了内源产生的 miRNAs 的调节途径。并且这些实验表明稳定表达的 P19 通过结合病毒的 siRNA 而使植株更加的感病,并且通过结合内源的小片段核酸而改变植物基因的表达,最终导致异常的病毒症状^[56-57]。在含有芜菁花叶病毒(TuMV)编码的 HC-Pro 蛋白的拟南芥植株内尽管 miRNAs 的积累量大大增加^[58],但是这些 miRNAs 的目标 mRNAs 也能够积累到很高的水平^[59],说明这个抑制子能在产生 miRNAs 的下游来抑制 miRNAs 的调节通路。

稳定转化各类抑制子的植株表现出各种不同缺陷等现象证明抑制子在植物体内的表达会干扰 miRNAs 调节植物发育的过程。但是这些转基因植物也会产生相应的调节机制,它们通过各种方法降低甚至关闭该基因的表达以求生存。Eugene 等人在转入 HC-Pro 的烟草上接种含有这个基因的病毒马铃薯 A 病毒(PVA),结果导致这种抑制子转录产生的 mRNA 被 PVA 诱导的 RNA 沉默降解。但是他们还没发现转此基因的植株自发沉默^[60]。

6 RNA 沉默抑制子研究的展望和应用前景

通过众多科学家短短几年的努力,病毒编码的抑制子的研究已经取得了长足的进展,尤其是一些抑制子的晶体结构的准确解析更加促进了这些抑制子的功能研究^[61]。但是现在这方面的研究还有许多问题需要解决。比如,病毒编码的抑制子是和寄主产生的基因沉默现象紧密相关的,不同的病毒编

码不同的抑制子,并作用在基因沉默的不同阶段,同时这种相互作用在不同的寄主植物内具有不同的反应程度。此外,现在的研究主要集中在模式植物烟草上,但尚不清楚这些抑制子是否只在烟草中发挥抑制子的功能;在病毒自然寄主中会不会发挥这种功能;不同的病毒抑制子在不同的沉默位置发挥作用,两个不同类型的抑制子会不会对基因沉默的抑制有协同作用。一个基因组复杂的病毒可能会编码多个不同类型的抑制子,Lu等^[43]曾在基因组长度为20 kb的柑橘速衰病毒上发现3个类型的抑制子,但这些蛋白在功能上是否存在协同作用尚不清楚。

病毒编码的沉默抑制子的应用领域很广泛,主要在植物反应器、RNA沉默作用过程以及抗病毒植物的研究方向上给科学家提供更多的研究空间:

1) 植物生物反应器技术新突破。转基因植物技术的成功应用已使全世界的农业发生了革命性的进步。近年来,植物基因工程有发展到一个全新的阶段。科学家已不满足于植物仅仅作为食品、饲料等的常规用途,而是提出了“将植物变成工厂(Use Plant As Plant)”的口号,就是利用植物来生产药物、工业原料等全新的产品^[62]。虽然植物生物反应器的研究取得了丰硕的成果,但是要将其发展为一个廉价、高效、大规模的成熟的生物反应系统,还要攻克许多技术难题。无论是组成型的稳定表达还是瞬时表达,基因沉默都会阻止外源蛋白在植物内的大量表达,因而会成为植物生物反应器的一个重要技术障碍^[63]。Mallory等^[64]在植物体内共表达外源蛋白和抑制子会在一定程度上抑制外源蛋白的沉默,增加外源蛋白的表达量。

2) RNA沉默过程解析新方法。病毒编码的抑制子的出现是和RNA沉默相互作用的结果,因此抑制子的研究可以用来更加清楚地理解RNA沉默的作用过程。Hamilton等^[65]就是利用各种抑制子的作用特点在沉默植株内发现2种不同大小的siRNAs,它们可能参与不同的RNA沉默过程。很多抑制子在植物体内都存在互作蛋白,抑制子的研究对进一步了解植物和病毒的互作有很大的帮助。

3) 抗病毒植物策略新思考。抑制子的研究为我们培育抗病毒植物提供更多的思路。我们当今大多是采用转基因技术来达到抗病毒的目的,一部分是蛋白介导的抗性,另外一部分是核酸介导的抗性。实际上后一种抗性是通过RNA沉默产生作用的,

而这种转基因的植株会更加促进病毒进化产生更强的抑制子,使我们培育出的农作物在与病毒斗争中又处于下风。因此,我们可以从病毒编码的抑制子入手,采用一些手段来降低抑制子的功能会产生更有意义的抗病毒农作物。

此外,现在很多病毒缺少合适的系统寄主,有的只是产生局部枯斑,而很少产生系统的侵染症状。设想如果我们将一些功能很强的抑制子转化到一些典型的模式植物例如烟草、拟南芥上,利用病毒抑制子降低转基因植株会的抵抗力,有可能产生系统症状以利于科学研究。

参 考 文 献

- [1] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans [J]. *Plant Cell*, 1990(2):279-289
- [2] Ding S W. RNA silencing [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11:152-156
- [3] Baulcombe D C. Molecular biology: unwinding rna silencing [J]. *Science*, 2000, 290:1108-1109
- [4] Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences [J]. *Mol Microbiol*, 1992(6):3343-3353
- [5] Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler J A. Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent [J]. *Cell*, 1997, 90:479-490
- [6] Dernburg A F, Zalevsky J, Colaiacovo M P, et al. Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line [J]. *Genes & Dev*, 2000, 14:1578-1583
- [7] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391:806-811
- [8] Hamilton A J, Baulcombe D C. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants [J]. *Science*, 1999, 286:950-952
- [9] Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, 101:25-33
- [10] Ding S W, Li H, Lu R, et al. RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals [J]. *Virus Res*, 2004, 102:109-115
- [11] Kooter J M, Matzke M A, Meyer P. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and

- pathogen control [J]. *Trends Plant Sci*, 1999(4):340-347
- [12] Hannon G J. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418:244-251
- [13] Olivier Voinnet. RNA silencing as a plant immune system against viruses [J]. *TRENDS in Genetics*, 2001, 17(8):449-459
- [14] Plasterk RHA. RNA Silencing: The genome's immune system [J]. *Science*, 2002, 296:1263-1265
- [15] Szittya G, Molnar A, Silhavy D, et al. Short defective interfering RNAs of Tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus [J]. *Plant Cell*, 2002, 14:359-372
- [16] Wang M B, Bian X Y, Wu L M, et al. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 2004, 101:3275-3280.
- [17] Li H W, Lucy A P, Guo H S, et al. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism [J]. *EMBO J*, 1999, 18:2683-2691
- [18] Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, et al. P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing [J]. *The Journal of Virology*, 2002, 76:6815-6824
- [19] Qu F, Ren T, Morris T J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step [J]. *J Virol*, 2003, 77:511-522
- [20] Susi P, Hohkuri M, Wahlroos T, et al. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54:157-174
- [21] Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, et al. A Calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants [J]. *Science*, 2000, 290:142-144
- [22] Vance V B. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y [J]. *Virology*, 1991, 182:486-494
- [23] Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X, et al. A viral suppressor of gene silencing in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95:13079-13084
- [24] Brigneti G, Voinnet O, Li W X, et al. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana* [J]. *EMBO J*, 1998, 17:6739-6746
- [25] Beclin C, Berthome R, Palauqui J C, et al. Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans) genes [J]. *Virology*, 1998, 252:313-317
- [26] Kasschau K D, Carrington J C. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing [J]. *Cell*, 1998, 95:461-470
- [27] Couzin J. Breakthrough of the year: small RNAs make big splash [J]. *Science*, 2002, 298:2296-2297
- [28] Kasschau K D, Carrington J C. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro [J]. *Virology*, 2001, 285:71-81
- [29] Simon-Mateo C, Lopez-Moya J J, Guo H S, et al. Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84:2877-2883
- [30] Ratcliff F G, MacFarlane S A, Baulcombe D C. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses [J]. *Plant Cell*, 1999, 11:1207-1216
- [31] Yelina N E, Savenkov E I, Solovyev A G, et al. Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in Hordei- and Potyvirus: complementary functions between virus families [J]. *J Virol*, 2002, 76:12981-12991
- [32] Voinnet O, Lederer C, Baulcombe D C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Cell*, 2000, 103:157-167
- [33] Voinnet O, Pinto Y M, Baulcombe D C. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96:14147-14152
- [34] Sadowy E, Maasen A, Juszczak M, et al. The ORF0 product of Potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82:1529-1532
- [35] Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, et al. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded RNAs [J]. *EMBO J*, 2002, 21:3070-3080
- [36] Thomas C L, Leh V, Lederer C, et al. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Virology*, 2003, 306:33-41
- [37] Takeda A, Sugiyama K, Nagano H, et al. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus [J]. *FEBS Lett*, 2002, 532:75-79
- [38] Bucher E, Sijen T, de Haan P, et al. Negative-Strand Tospoviruses and Tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions [J]. *J Virol*, 2003, 77:1329-1336

- [39] Dunoyer P, Pfeffer S, Fritsch C, et al. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus [J]. *Plant J*, 2002, 29:555-567
- [40] Reed J C, Kasschau K D, Prokhnovsky A I, et al. Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus [J]. *Virology*, 2003, 306:203-209
- [41] Kubota K, Tsuda S, Tamai A, et al. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted post-transcriptional gene silencing [J]. *J Virol*, 2003, 77:11016-11026
- [42] Ding X S, Liu J, Cheng N H, et al. The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17:583-592
- [43] Lu R, Folimonov A, Shintaku M, et al. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(44):15742-15747
- [44] 张凌娣, 王朝辉, 王献兵, 等. 两种植物病毒编码蛋白的基因沉默抑制子功能鉴定[J]. *科学通报*, 2005, (Submitted)
- [45] Li W X, Ding S W. Viral suppressors of rna silencing [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12:150-154
- [46] Llave C, Kasschau K D, Carrington J C. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97:13401-13406
- [47] Mallory A C, Ely L, Smith T H, et al. HC-Pro Suppression of Transgene Silencing Eliminates the Small RNAs but Not Transgene Methylation or the Mobile Signal [J]. *Plant Cell*, 2001, 13:571-583
- [48] Guo H S, Ding S W. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal [J]. *EMBO J*, 2002, 21:398-407
- [49] Lucy A P, Guo H S, Li W X, et al. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus [J]. *EMBO J*, 2000, 19:1672-1680
- [50] Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D, et al. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses [J]. *EMBO J*, 2004, 23:876-884
- [51] Qiu W, Park J W, Scholthof H B. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2002, 15:269-280
- [52] Gyögy Szittyá, Daaniel Silhavy, Attila Molnár, et al. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation [J]. *EMBO J*, 2003, 22(3):633-640
- [53] Dong X, van Wezel R, Stanley J, et al. Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing [J]. *J Virol*, 2003, 77:7026-7033
- [54] Hutvagner G, Zamore P D. RNAi:nature abhors a double-strand [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12:225-232
- [55] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants [J]. *Genes & Dev*, 2002, 16:1616-1626
- [56] Papp I, Mette M F, Aufsatz W, et al. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering rna precursors [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132:1382-1390
- [57] Bartel B, Bartel D P. MicroRNAs:At the root of plant development?[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132:709-717
- [58] Kristin D, Kasschau, Zhixin Xie, et al. P1/ HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing,interferes with Arabidopsis development and miRNA function [J]. *Developmental Cell*, 2003(4):205-217
- [59] Mallory A C, Reinhart B J, Bartel D, et al. From the Cover: A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99:15228-15233
- [60] Savenkov E I, Valkonen J P T. Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83:2325-2335
- [61] Baulcombe D C, Molnar A. Crystal structure of p19-a universal suppressor of RNA silencing [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29:279-281
- [62] Mason H S, Arntzen C J. Transgenic plants as vaccine production systems [J]. *Trends Biotechnol*, 1995, 13:388-392
- [63] Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, et al. Transgene-induced gene silencing in plants [J]. *Plant J*, 1998, 16:651-659
- [64] Mallory A C, Parks G, Endres M W, et al. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20:622-625
- [65] Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, et al. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing [J]. *EMBO J*, 2002, 21:4671-4679