焦点论坛 TOPIC HIGHLIGHT

猪流行性腹泻病毒蛋白结构与功能的初探

茅翔, 任晓峰

■背景资料
猪流行性腹泻病毒是导致猪流行性腹泻的主要病原体, 猪流行性腹泻在我国依然较为常见, 对养猪业的健康发展造成很大的威胁. 因此有必要继续大力加强对该病毒的研究. 进一步了解猪流行性腹泻病毒各个蛋白的生物学功能, 对寻找有效的药物或生物干预制剂, 有着重要意义.

茅翔, 南京农业大学动物医学院 江苏省南京市 210095
任晓峰, 东北农业大学动物医学学院预防兽医系 黑龙江省哈尔滨市 150030
茅翔, 教授, 博士生导师, 主要从事流行性乙型脑炎, 猪繁殖与呼吸综合征病毒及猪流行性腹泻病毒与宿主细胞相互作用的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 31270188
作者贡献分布: 本综述由茅翔完成; 任晓峰负责审校.
通讯作者: 茅翔, 教授, 210095, 江苏省南京市卫岗1号, 南京农业大学动物医学院. xmao@njau.edu.cn
收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-30
接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

Functions of proteins of porcine epidemic diarrhea virus

Xiang Mao, Xiao-Feng Ren

Xiang Mao, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China
Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 31270188
Correspondence to: Xiang Mao, Professor, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, 1 Weigang, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China. xmao@njau.edu.cn
Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-30
Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

Abstract
Porcine epidemic diarrhea (PED) is caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), which belongs to the order Nidovirales of the family Coronaviridae. Since PED was first discovered in Europe in 1987, it has become a severe infectious disease in Asian countries (including China, Korea, Japan, Philippines and Thailand) and has caused great economic losses in swine industry. Although bivalent vaccine for PEDV and transmissible gastroenteritis virus (TGEV, another porcine coronavirus) can decrease the incidence of both diseases, the incidence of PED is still increasing annually in China. Unfortunately, there have been few studies on viral proteins and pathogenesis of PEDV. This review aims to provide some functional insights on PEDV viral proteins based on the available information from coronaviruse studies.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Porcine epidemic diarrhea virus; Nonstructural protein; Structural protein

Mao X, Ren XF. Functions of proteins of porcine epidemic diarrhea virus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(1): 44-53

摘要
猪流行性腹泻是猪流行性腹泻病毒引起的猪肠道传染性疾病. 该病毒属于尼多病毒目, 冠状病毒属. 虽然猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)首次在欧洲发生, 但是目前已经成为包括中国、韩国、日本、菲律宾以及泰国等亚洲国家猪产业中严重的传染性疾病, 造成了严重的经济损失. 目前猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)和猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)二联灭活苗及弱毒苗的应用大大降低了两种病毒病的发生率, 但是我国目前PED的流行仍呈逐年上升趋势. 目前对PEDV的致病机制了解较少, 本综述目的旨在借助其他冠状病毒病毒蛋白结构和功能的研究成果, 对PEDV编码的病毒蛋白进行初步分析, 以期为深入研究PEDV提供一些新的思路.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 非结构蛋白; 结构蛋白

茅翔, 任晓峰. 猪流行性腹泻病毒蛋白结构与功能的初探. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 44-53
http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/44.asp

■同行评议者
陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物学教研室

0 引言
猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪肠道传染性疾病. 目前其在临床上与猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)和猪轮状病毒(porcine rotavirus, PRV)腹泻共存混合感染, 给该病的防控

■相关报道
目前对于PEDV发病机制和病毒编码蛋白的功能的研究仍然欠缺.

和研究带来极大的不利. 猪流行性腹泻仅发生在猪上, 各种年龄的猪都能感染. 本病多发于寒冷季节. 春秋季节也有小规模流行发生. 哺乳仔猪、架子猪和育肥猪的发病率高达100%, 尤以对哺乳仔猪的危害最为严重. 成年母猪发病率为70%-90%. 虽然PED首次在欧洲发生, 但是目前已经成为包括中国、韩国、日本、菲律宾以及泰国等亚洲国家猪产业中严重的传染性疾病, 造成了巨大的经济损失. TGEV和PEDV二联灭活苗及弱毒苗的应用虽然大大降低了两种病毒病的发生率, 但是我国目前猪流行性腹泻的发病率仍呈逐年上升趋势. 爆发该病时无特效抗病毒药物可以使用.

PEDV基因组为单股正链RNA, 具有感染性. 全长为27 000-33 000个核苷酸. 属于Ⅰ类冠状病毒. 目前已经测定了PEDV-CV777、PEDV-CH/S、PEDV-CH/FJND-3/2011和PEDV-DR13及其弱毒株的全基因组序列[1-4]. PEDV基因组包括5'和3'非翻译区, 3'有多聚腺嘌呤核苷酸序列. 基因组编码4个结构蛋白(S蛋白、囊膜蛋白E、膜蛋白M和核衣壳蛋白N)以及15个非结构蛋白1-15(nonstructural protein, nsp)和ORF3. 排列顺序为5'-nsp1-15-S-ORF3-E-M-N-3'. 在15个非结构蛋白中nsp11-nsp15分别编码5个与病毒基因组复制有关的酶. 这些酶与一些病毒非结构蛋白和宿主蛋白相互作用形成复制复合体负责病毒基因组复制.

目前对于PEDV的研究多数还是集中在流行性病学调查、不同毒株M蛋白、S蛋白以及N蛋白序列变化以及进化分析、PEDV的检测方法和PEDV入胞机制等的研究. 而对于PEDV的致病机制, 病毒编码的结构和非结构蛋白的结构功能的研究目前报道很少. 这对于研究防控PEDV的方法极其不利. PEDV与同类的TGEV、人冠状病毒NL63(human coronavirus NL63, HCoV-NL63)和人冠状病毒299E(human coronavirus 299E, HCoV-299E)等病毒的序列同源性较高, 与其他类冠状病毒在部分病毒蛋白序列上也有一定同源性. 对于这些病毒的致病机制和病毒蛋白的结构功能已有一些研究报道. 本综述旨在综合分析已有的一些冠状病毒研究进展, 为进一步研究PEDV的致病机制等提供一些思路.

1 非结构蛋白

1.1 nsp1 目前没有关于PEDV编码的非结构蛋白1(non-structural protein 1, nsp1)的生物学功能研究的报道. PEDV编码的nsp1长度为110个氨基酸, 与同类的Ⅰ型冠状病毒的nsp1的长度大致相同, 在氨基酸序列上与蝙蝠冠状病毒(bat coronavirus, BtCoV)、HCoV-NL63和HCoV-229E的同源性较高. 严重急性呼吸道综合征病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)的nsp1的NMR结构已有报道. 在其13-128位区域内与Ⅰ类冠状病毒nsp1在用于维持蛋白结构的重要疏水氨基酸上保守性较强. 因此推测这两类病毒nsp1在结构上可能较接近[5].

SARS-CoV的nsp1可以抑制宿主基因表达, 主要是通过结合在宿主40S核糖体上来阻止宿主蛋白的翻译, 并诱导宿主mRNA的降解. 病毒基因组的5'-末端引导序列可以保护病毒mRNA免受nsp1介导的RNA降解[6].

TGEV的nsp1在功能上与SARS-CoV的nsp1类似, 可以有效地抑制宿主蛋白的合成. 与SARS-CoV的nsp1的作用机制不同的是TGEV的nsp1并不结合到40S核糖体或促进宿主蛋白mRNA降解. 他可以抑制HeLa细胞提取物中的蛋白翻译, 但是并不能抑制兔网状细胞裂解物中的蛋白翻译. 因此推测某些宿主蛋白可能参与TGEV的nsp1对宿主蛋白翻译的抑制过程[7].

研究还表明属于Ⅰ类冠状病毒的HCoV-NL63和HCoV-229E的nsp1可以结合到宿主细胞核糖体40S亚基上, 且不抑制IRF-3的激活. 宿主蛋白的转录和翻译都受nsp1的抑制, 而对翻译的抑制更强烈. HCoV-NL63和HCoV-229E均属于低致病性冠状病毒. 但是他们的nsp1抑制宿主蛋白翻译的效果要比SARS-CoV的nsp1的作用更强烈, 推测这些nsp1更可能作为病毒的毒力因子促进病毒的增殖, 而不是主要的致病因子[5]. TGEV的感染可以激活宿主的先天免疫并诱导Ⅰ型干扰素的产生[8,9], 而SARS-CoV和小鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)只能诱导微弱和迟缓的先天免疫反应[10-12]. HCoV-229E的nsp1可以稳定地刺激干扰素转录因子的激活, 被感染细胞可以产生大量的IFN-β[5]. 由于PEDV、TGEV、HCoV-NL63和HCoV-229E同属Ⅰ类冠状病毒, 因此PEDV的nsp1对于宿主细胞先天免疫反应和宿主蛋白翻译等的影响是否与这些病毒类似还有待进一步研究.

1.2 nsp2 PEDV的nsp2编码785个氨基酸. 氨基酸序列与同类冠状病毒的同源性较高, 包括BtCoV和猫冠状病毒(feline coronavirus, FCoV)等. 而与其他类冠状病毒同源性较差, 大小和序列变化

■创新盘点
本文通过对近年来冠状病毒的一些研究结果进行综述, 全面地归纳了猪流行性腹泻病毒的各个蛋白可能的结构特点和功能, 对PEDV的研究具有很好的参考价值.

较大. 与PEDV同类的冠状病毒的nsp2的功能目前没有报道. SARS-CoV的nsp2与包括nsp8在内的7个病毒蛋白有相互作用, 其自身也会形成二聚或多聚物[13]. MHV和SARS-CoV的nsp2并不是病毒在细胞上生长所必需, 缺失nsp2会造成病毒生长和RNA合成减弱, 但病毒蛋白的翻译不受影响, 因此nsp2可能在病毒总体RNA合成上具有重要作用, 同时还可能在病毒和宿主细胞相互作用或病毒致病机制中起作用[14]. 外源表达的nsp2并不像在感染病毒时那样定位于特定的膜结构上, 但是感染缺失nsp2的MHV后反式表达nsp2, nsp2仍会募集至复制复合体上. 虽然nsp2并不是形成复制复合体所必需的蛋白, 但是在复制过程中, nsp2仍会与复制复合体中的nsp4、nsp8和dsRNA共定位[15].

SARS-CoV病毒的nsp2和宿主细胞的PHB1和PHB2相互作用. 这两个蛋白是进化上较为保守的蛋白. 他们与细胞周期进程、细胞迁移、分化和凋亡等有关. 因此nsp2可能在病毒感染过程中起到调节宿主细胞生理环境的作用[16].

由于PEDV的nsp2与SARS-CoV和MHV的nsp2序列差别较大, 其nsp2的功能是否与这两个病毒的nsp2有相似之处还有待进一步研究. 通过酵母双杂交以及其他研究蛋白质间相互作用的方法寻找与nsp2相互作用的宿主蛋白对进一步研究nsp2生物学功能具有重要意义.

1.3 nsp3 nsp3是PEDV编码的最长的病毒蛋白(1 621个氨基酸). SARS-CoV的nsp3预测有3个疏水结构域, 实验证明有一个疏水结构域不在脂双层中[17]. nsp3上还有一些在其他冠状病毒中都存在的结构域. 其中一个是ADP-核糖-1'-单磷酸酶(ADP-ribose-1'-monophosphatase, ADRP)结构域, 负责催化ADP-核糖-1'-单磷酸为ADP-核糖. 目前只在少数病毒中发现该结构域的存在, 包括风疹病毒、甲病毒、戊肝病毒等. 目前SARS-CoV、HCoV-N163、HCoV-229E和FCoV的ADRP结构域的结构已有报道[18-21]. TGEV的ADRP的活性也有报道[22]. SARS病毒的反向遗传的研究表明ADRP酶活中心的突变对于病毒复制没有很明显的影响. 缺失该结构域的SARS-CoV和HCoV-299E与野生型病毒相比对IFN-α的敏感性增加, 因此ADRP可能与病毒的免疫逃逸机制有关[23].

PEDV的nsp3上还包含两个木瓜酶样蛋白酶结构域(papain-like protease, PLP). 可能主要负责nsp1/nsp2和nsp2/nsp3之间的裂解. 该结构域与TGEV和SARS-CoV病毒的nsp3上木瓜酶样蛋白酶的同源性为30%左右. TGEV的PLP1结构已经得到解析[24]. 结构整体上与SARS-CoV的PLP2类似, 结构上有一个锌结合区. 对HCoV-299E的PLP1的研究表明锌结合区域是水解nsp1/nsp2所必需[25,26]. 另外TGEV的PLP1还具有去泛素酶的特性[24]. 这对于病毒拮抗宿主细胞的先天和后天免疫反应和促进病毒入胞和释放具有重要意义. MHV的PLP2也具有去泛素的作用, 可以抑制Ⅰ型干扰素的产生[27].

1.4 nsp4 nsp4是一个跨膜蛋白. 猫冠状病毒和小鼠肝炎病毒的nsp4的C-末端部分的晶体结构已有报道[28,29]. PEDV与猫冠状病毒的nsp4在该区域的同源性有85%. 与MHV的有59%同源性. 推测这段区域可能会与某些宿主蛋白相互作用. 另外nsp4包括4个疏水的结构域, 实验证明均处于脂双层中[17]. MHV的nsp4会影响病毒复制所需的双膜囊泡(double-membrane vesicles, DMVs)的正常形成, 在DMV的组装和稳定性上起重要作用[30]. 单独表达的MHV的nsp4定位于ER. 而感染病毒时, nsp4位于复制复合体上. MHV的nsp4可以与nsp3和nsp6相互作用, 共表达nsp4和nsp3会分别影响这两个蛋白的分布[31].

1.5 nsp5 nsp5编码3C样蛋白酶(3C-like proteinase, 3CLpro), 是病毒成熟所必需的蛋白酶. 目前有HCoV-229E、HCoV-HKU1、TGEV、SARS-CoV等相关蛋白酶结构和酶/抑制剂复合物结构的相关报道[32-35]. PEDV的nsp5与HCoV-299E的nsp5的同源性高达83%, 与TGEV和SARS-CoV的nsp5同源性分别为78%和63%. nsp5是抗病毒抑制剂研究的主要热点. 对nsp5和他与肽抑制剂复合物的晶体结构的研究可以为进一步设计和优化抑制剂奠定基础. 对所有类型的冠状病毒3CLpro的水解肽段的氨基酸偏好性研究可以为设计针对3CLpro的广谱的抑制剂提供理论基础[36].

1.6 nsp6 nsp6为膜蛋白, 理论预测含有7个疏水结构域. 但是SARS-CoV编码的nsp6的第6个疏水结构域并不在脂双层中[17]. 鸡传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)的nsp6可以诱导宿主细胞自噬体的形成, 促进病毒复制[37]. PEDV的nsp6的功能仍有待进一步研究.

1.7 nsp7和nsp8 对冠状病毒nsp7和nsp8的研究多数集中在一起. 目前已经有SARS-CoV和猫冠状病毒的nsp7/nsp8复合物晶体结构的报道. SARS-CoV的nsp7/nsp8复合物晶体结构显示他们形成8∶8的结构[38]. 带有天然N末端氨基酸的SARS-

CoV病毒的nsp8与nsp7相互作用可以增强病毒编码的RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)的活力, 并且具有引物延伸能力, 但是总活性仍然低于病毒的RdRp的活性. 经典RdRp的基序A和C在nsp8上不存在. nsp8存在两个DNA依赖的RNA引物合成酶(primase)的保守基序D/ExD/E. 实验表明仅前一个保守基序是酶活所必需的[39].

猫冠状病毒nsp7/nsp8复合物结构与SARS-CoV的不同, 呈现2∶1的异源3聚体形式. 两个nsp7之间的结构也有所差异. nsp8可以合成6个核苷酸长度的寡聚核苷酸. N端带有GPLG的nsp8 RNA聚合酶活性明显增加. 与nsp7相互作用后, RNA聚合酶的活性进一步增加, 能够合成67个核苷酸. 未经切割的nsp7-10病毒多聚蛋白仍然具有合成6个核苷酸长度的寡聚核苷酸. 因此nsp7和nsp8形成的复合物并不是nsp8的聚合酶活性所必需. 聚合酶反应需要Mg^{2+}的参与[40].

PEDV的nsp7和nsp8与猫冠状病毒这两个蛋白间的同源性均为81%, 推测PEDV的nsp7/nsp8的结构可能与猫冠状病毒的更接近.

1.8 nsp9 PEDV的nsp9与HCoV-229E的nsp9的同源性为83%. nsp9在复制复合体中结合单链RNA. HCov-229E的nsp9形成通过二硫键相连的二聚体[41], 这与SARS-CoV的nsp9的结构不同[42]. 突变能够形成二硫键的Cys69为Ala得到的结构与SARS的nsp9的类似, 在结构上呈棒状. 野生型的HCoV-229E的nsp9对寡聚核酸有较强亲和力, 而Cys69Ala或Cys69Ser的突变体只能微弱的结合较长的多聚核苷酸. SARS的nsp9相应位置的突变并不影响核酸的结合[41].

SARS-CoV的nsp9是通过两个平行的α-螺旋之间的100GXXXG104基序发生相互作用. G100E、G104E和G104V的突变会破坏nsp9的二聚作用, 但是突变体仍然能够结合单链RNA, 只是结合能力有所下降. 因此nsp9的二聚作用并不是结合核酸所必需. 将G100E和G104E通过反向遗传的方式引入病毒, 突变病毒不能存活. 而G104V的突变病毒可以通过回复突变恢复感染能力. nsp9的二聚体形成虽然不是RNA结合所必需的, 但是对于病毒复制至关重要[43].

PEDV的nsp9上仅含有一个半胱氨酸, 这与SARS-CoV和HCoV-299E有所不同.

1.9 nsp10 nsp10是病毒编码的S-腺苷甲硫氨酸依赖型核苷-2-O'-甲基转移酶的辅助蛋白. 只有这两个蛋白形成复合物时核苷-2-O'-甲基转移酶才有活力. 单独存在的nsp10形成12聚体结构. nsp10是锌结合蛋白, 每个单体蛋白中存在两个锌指结构. 和锌螯合的氨基酸在Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ型的冠状病毒中均保守[44]. SARS-CoV的nsp10可以与单链RNA、双链RNA或DNA结合, 所结合的核苷酸序列没有特异性[45]. SARS-CoV的nsp10可以和复制复合体中的很多蛋白相互作用, 参与复制复合体的形成[46].

MHV的nsp10体外可以和tRNA、单链RNA、双链和单链 DNA结合[47]. 研究发现nsp10对MHV的基因组和亚基因组RNA合成至关重要, 同时nsp10也在病毒多聚蛋白的加工过程中起作用[48].

2 与病毒基因组复制相关的非结构蛋白

2.1 RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp, nsp11) 非结构蛋白nsp11编码病毒的RNA依赖的RNA聚合酶. RdRp负责病毒基因组的合成. 目前还没有关于PEDV的RdRp的研究报道. TGEV的RdRp可以和nsp2、nsp3和nsp8一起掺入病毒粒子[49]. 对SARS-CoV的RdRp的研究表明该酶活性依赖引物, 其功能的行使需要nsp8引物合成酶的参与. SARS-CoV的RdRp结合dsRNA和ssRNA的能力接近[50]. 该酶缺乏合成起始能力,可能与其较为开放的结构和缺少能自发启动合成的保守的启动环区(priming loop)有关[51]. 理论预测在SARS-CoV编码的RdRp的400-900位氨基酸区域中含有一个G基序, 这是所有引物依赖的RdRp的标志[50]. 研究发现Zn^{2+}能够抑制SARS-CoV的RdRp体外活性, RdRp的延伸能力受到抑制, 同时模板结合能力也减弱[52]. PEDV的RdRp的功能有待进一步研究.

2.2 解旋酶(helicase, nsp12) 非结构蛋白nsp12为核酸解旋酶/核苷酸三磷酸酶, 属于解旋酶超级家族Ⅰ. 可以有效地解开RNA和DNA双螺旋. 该酶有多聚的特性[53]. 其N端具有锌结合能力, C端为解旋酶区域. 马动脉炎病毒的解旋酶上锌结合区域的突变会导致病毒RNA不能合成, 因此该区域对于解旋酶酶活调节具有重要作用[54].

SARS-CoV的解旋酶解旋的方向是5'-3', 并具有持续解旋能力促进双链RNA和双链DNA的有效分离. 所有天然的核苷酸和脱氧核苷酸都可以作为核苷酸三磷酸酶(NTPase)的底物. 其水解ATP、dATP和GTP的能力较其他核苷酸更有效[55]. HCoV-N229E的nsp13除了具有SARS-CoV解旋酶的类似特性外, 还具有RNA 5'-三磷酸酶

■应用要点
通过对PEDV各个蛋白的结构和功能进行归纳, 为进一步研究病毒的发病机制以及寻找有效的药物或疫苗的研制提供了一定参考.

■同行评价
本综述选题新颖，对猪流行性腹泻病毒的研究有重要意义，故有一定的学术价值.

活力，可能与病毒RNA加帽有关[56].

2.3 核糖核酸外切酶(exoribonuclease, nsp13) PEDV的核糖核酸外切酶含有595个氨基酸. 序列上包括核糖核酸外切酶基序Ⅰ(DE)、基序Ⅱ(D)和基序Ⅲ(D)，这个基序最早发现在宿主细胞的DEDD核酸外切酶超级家族中存在，这些家族的一些酶具有纠错能力. 冠状病毒编码的核糖核酸外切酶在病毒复制过程中可能起着纠错的功能，以应付庞大的病毒基因组复制过程中可能出现的突变. SARS-CoV的核糖核酸外切酶具有3'-5'外切酶特性. 酶的C端结构域具有鸟嘌呤-N7-甲基转移酶的功能[57,58]. 突变HCoV-229E的核糖核酸外切酶保守基序上的氨基酸会影响病毒基因组和亚基因组RNA合成[58]. 将MHV或SARS-CoV的核糖核酸外切酶上的基序Ⅰ或Ⅲ的保守氨基酸突变为丙氨酸后得到的病毒具有中等程度的复制缺陷，表明酶活性不是病毒复制所必需. 对病毒序列分析后却发现病毒基因组的突变率均有所上升[59,60]. 这些都表明该酶在维持冠状病毒基因组复制的保真性上具有重要作用. 暗示着他可以作为新型的弱毒疫苗开发和抗病毒治疗方法的研究方向[61].

2.4 尿苷酸特异性核糖核酸内切酶(Uridylate-specific endoribonuclease, nsp14) 该酶为尼多病毒目病毒所特有[62]. PEDV的尿苷酸特异性核糖核酸内切酶与SARS的nsp15有60%同源性. SARS-CoV的nsp15的晶体结构已经解析. nsp15只有形成6聚体才具有相应的酶活[63]. 他主要切割3'尿苷酸，并形成2'-3'环状磷酸酯末端. 其活性依赖Mn^{2+}的存在[64,65]. 酶活力的丧失会导致HCoV-229E不能增殖[62].

SARS-CoV的nsp15可以抑制宿主细胞MAVS诱导的细胞凋亡，从而在病毒的免疫逃逸上起作用[66]. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的nsp11具有尿苷酸特异性核糖核酸内切酶活性，该蛋白可以在细胞上抑制IFN-β的产生[67]. PEDV的核糖核酸内切酶是否与病毒的免疫逃逸有关有待验证.

2.5 S-腺苷甲硫氨酸依赖型核苷-2-O'-甲基转移酶[S-adenosylmethionine-dependent-(nucleoside-2'-O)-methyltransferase, nsp15] PEDV的S-腺苷甲硫氨酸依赖型核苷-2-O'-甲基转移酶与SARS-CoV编码的nsp16的同源性为75%. SARS-CoV的nsp10/nsp16的晶体结构已经报道. 冠状病毒的核苷-2'-O-甲基转移酶只有在和nsp10结合的条件下才具有活性. SARS-CoV的nsp16只能甲基化m7GpppA-RNA，而不能甲基化m7GpppG-RNA. nsp10是甲基转移酶结合m7GpppA-RNA和S-腺苷甲硫氨酸(SAM)所必需的蛋白. nsp10可以稳定SAM结合部位并扩大甲基转移酶上RNA结合区域[68,69]. 推测PEDV的核苷-2'-O-甲基转移酶也只在和nsp10相互作用时才具有活力.

3 结构蛋白和ORF3

3.1 S蛋白(spike protein) PEDV的S蛋白由1 383个氨基酸组成，是识别宿主细胞上的入胞受体、促进病毒与细胞膜融合的蛋白. S蛋白基因在三类冠状病毒中高度保守. S蛋白表面有PEDV重要的抗原决定簇，有良好的免疫原性，在机体抗原免疫反应中起重要作用. 该蛋白可以作为疫苗和抗病毒药物开发的靶点. 冠状病毒S蛋白为Ⅰ型膜蛋白. N端S1区域形成3聚体的结构，S2区域结构为螺旋状，形成柄状结构嵌入病毒囊膜中[70]. S1区域可识别宿主细胞上的受体，而S2区域与病毒和细胞融合有关，包括七肽重复序列结构域HR1和HR2. S1结合受体后引发S2构象变化，导致融合肽插入细胞膜中. HR1和HR2相互作用形成6螺旋束的融合核心，促使病毒的囊膜靠近细胞膜从而引起融合[71]. 目前有不少抗病毒肽的研究是利用S2上的HR1和HR2相互作用的肽段来抑制病毒入胞[72]. 另外能够阻止S蛋白和受体结合的肽也可以作为有效的抗病毒药物[73].

TGEV的S1的N端包括4个抗原位点(C、B、D和A)，与宿主受体识别有关. 包含C和B位点的S1的N端大部分与肠道细胞嗜性有关. 位于S1的C端的A位点与呼吸和肠道细胞嗜性有关，且可以识别入胞受体氨肽酶N(aminopeptidase N, APN)[74]. PEDV的受体也是APN. 对PEDV受体结合位点的研究发现，PEDV与APN结合的部位可能在25-88位氨基酸上[75]. 有研究发现PEDV的S蛋白C末端的GPRLQPY序列可以诱导中和抗体产生[76]. 针对S蛋白上抗原表位的研究对于开发新型疫苗至关重要.

3.2 ORF3蛋白 ORF3是病毒编码的一个辅助蛋白. 预测其含有4个跨膜区并形成同源四聚体. 在非洲爪蟾卵母细胞模型上证实PEDV的ORF3具有离子通道特性，第4个跨膜区上的酪氨酸对钾离子通道活性起关键作用. ORF3的基因沉默可以降低病毒在Vero细胞上的滴度[77]. 有些PEDV毒株的ORF3上存在碱基缺失，因此可以用来作为区分PEDV的一些毒株的标志[78].

3.3 M蛋白 PEDV的M蛋白无信号肽, 预测含有3个跨膜区. M蛋白在TGEV病毒粒子的囊膜中存在两种拓扑模式[79]. PEDV和TGEV的M蛋白在跨膜区上保守性相对较高. M蛋白的拓扑结构在两个病毒间是否有类似需要进一步研究.

M蛋白可以和自身、S蛋白和N蛋白相互作用. M蛋白的C端第三跨膜区后有个保守结构域. MHV上的这个结构域可以调节M蛋白自身的相互作用, 在病毒囊膜形成中具有重要作用, 而N蛋白的存在也可以稳定病毒组装过程中M蛋白之间形成复合物[80].

3.4 E蛋白 E蛋白为膜蛋白, 和TGEV的E蛋白的同源性为31%. SARS-CoV的E蛋白体外具有离子通道性质[81]. SARS-CoV的E蛋白在单独表达或病毒感染时主要位于内质网-高尔基体中间层(ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC). 没有证据表明E蛋白存在于细胞膜上[82]. 鸡传染性支气管炎病毒的E蛋白可以影响蛋白的分泌途径, 对病毒释放具有重要作用[83]. TGEV的E蛋白对病毒粒子的分泌也有重要作用[84].

3.5 N蛋白 N蛋白与病毒复制有关, 并且与病毒的复制-转录复合体在一起. N蛋白包含两个RNA结合结构域, 分别为N端结构域和C端结构域. 两个结构域之间有一段富含丝氨酸和精氨酸的柔性区域. 目前SARS-CoV、IBV和MHV的两个RNA结合区域的晶体结构已经得到解析. 虽然结构总体上类似, 但是表面静电势有所差别, 这与他们各自结合RNA的特性相关. C端结构域有多聚的趋势[85-87].

MHV的N端结构域可以结合病毒基因组上的转录调节序列, 这是一段保守的6个碱基的序列, 对病毒亚基因组的合成起着重要作用. N端结构域具有RNA解链能力, 为不连续的转录提供条件[88]. 最近的研究表明MHV的N蛋白可以与病毒的nsp3的N端相互作用, 作用位点多集中于N蛋白的丝氨酸-精氨酸富集区域. 这种相互作用可能与基因组RNA在病毒感染早期定位于复制复合体有关[89]. MHV的N蛋白动态地与复制-转录复合体作用. N蛋白通过C端结构域与复制-转录复合体作用, 并进而与其他N蛋白相互作用. N蛋白间相互作用是其募集至复制-转录复合体所必需. N蛋白包裹病毒基因组RNA形成螺旋状核衣壳掺入出芽的病毒粒子[90]. TGEV的N蛋白作为RNA伴侣可以有效地促进模板切换来协助病毒RNA有效转录[91,92].

研究发现1,8-桉树脑(1,8-cineole)可以通过干扰IBV的N蛋白与RNA的结合来抑制病毒, 提示我们通过干扰N蛋白与RNA结合来控制病毒感染的可能性[93].

4 结论

目前对PEDV编码的蛋白研究较少, 还有很多可以拓展的研究空间. 鉴于其与其他冠状病毒的一些相似之处, 可以借鉴其他病毒的研究方法. 通过蛋白质相互作用筛选的方法发现各病毒蛋白间的相互作用以及病毒蛋白与宿主细胞蛋白间的相互作用、病毒复制复合体蛋白组成分析及病毒蛋白对免疫系统的影响等都是PEDV研究的重要环节. 对病毒成熟相关的蛋白酶3CL-pro和复制相关酶的结构和功能研究可以为设计小分子病毒抑制剂提供靶点. 这些研究的结果都将大大促进对PEDV致病机制的研究, 并为研发新型的防控PED的手段提供思路.

5 参考文献

1 Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 2001; 23: 137-144 [PMID: 11724265 DOI: 10.1023/A:1011831902219]

2 Chen J, Wang C, Shi H, Qiu HJ, Liu S, Shi D, Zhang X, Feng L. Complete genome sequence of a Chinese virulent porcine epidemic diarrhea virus strain. *J Virol* 2011; 85: 11538-11539 [PMID: 21980030 DOI: 10.1128/JVI.06024-11]

3 Chen J, Liu X, Shi D, Shi H, Zhang X, Feng L. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus variant. *J Virol* 2012; 86: 3408 [PMID: 22354946 DOI: 10.1128/JVI.07150-11]

4 Park SJ, Kim HK, Song DS, An DJ, Park BK. Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart. *J Virol* 2012; 86: 5964 [PMID: 22532530 DOI: 10.1128/JVI.00557-12]

5 Wang Y, Shi H, Rigolet P, Wu N, Zhu L, Xi XG, Vabret A, Wang X, Wang T. Nsp1 proteins of group I and SARS coronaviruses share structural and functional similarities. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 919-924 [PMID: 20609418 DOI: 10.1016/j.meegid.2010.05.014]

6 Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002433 [PMID: 22174690 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002433]

7 Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. Alphacoronavirus transmissible gastroenteritis virus nsp1 protein suppresses protein translation in mammalian cells and in cell-free HeLa cell extracts but not in rabbit reticulocyte lysate. *J Virol* 2011; 85: 638-643 [PMID: 21047955 DOI: 10.1128/JVI.01806-10]

8 Charley B, Laude H. Induction of alpha interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: role

of transmembrane glycoprotein E1. *J Virol* 1988; 62: 8-11 [PMID: 2824858]
9 Charley B, Lavenant L. Characterization of blood mononuclear cells producing IFN alpha following induction by coronavirus-infected cells (porcine transmissible gastroenteritis virus). *Res Immunol* 1990; 141: 141-151 [PMID: 2167506 DOI: 10.1016/0923-2494(90)90133-J]
10 Spiegel M, Pichlmair A, Martínez-Sobrido L, Cros J, García-Sastre A, Haller O, Weber F. Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 2005; 79: 2079-2086 [PMID: 15681410 DOI: 10.1128/JVI.79.4.2079-2086.2005]
11 Spiegel M, Weber F. Inhibition of cytokine gene expression and induction of chemokine genes in non-lymphatic cells infected with SARS coronavirus. *Virol J* 2006; 3: 17 [PMID: 16571117 DOI: 10.1186/1743-422X-3-17]
12 Roth-Cross JK, Martínez-Sobrido L, Scott EP, García-Sastre A, Weiss SR. Inhibition of the alpha/beta interferon response by mouse hepatitis virus at multiple levels. *J Virol* 2007; 81: 7189-7199 [PMID: 17459917 DOI: 10.1128/JVI.00013-07]
13 von Brunn A, Teepe C, Simpson JC, Pepperkok R, Friedel CC, Zimmer R, Roberts R, Baric R, Haas J. Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFeome. *PLoS One* 2007; 2: e459 [PMID: 17520018 DOI: 10.1371/journal.pone.0000459]
14 Graham RL, Sims AC, Brockway SM, Baric RS, Denison MR. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J Virol* 2005; 79: 13399-13411 [PMID: 16227261 DOI: 10.1128/JVI.79.21.13399-13411.2005]
15 Hagemeijer MC, Verheije MH, Ulasli M, Shaltiël IA, de Vries LA, Reggiori F, Rottier PJ, de Haan CA. Dynamics of coronavirus replication-transcription complexes. *J Virol* 2010; 84: 2134-2149 [PMID: 20007278 DOI: 10.1128/JVI.01716-09]
16 Cornillez-Ty CT, Liao L, Yates JR, Kuhn P, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J Virol* 2009; 83: 10314-10318 [PMID: 19640993 DOI: 10.1128/JVI.00842-09]
17 Oostra M, Hagemeijer MC, van Gent M, Bekker CP, te Lintelo EG, Rottier PJ, de Haan CA. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J Virol* 2008; 82: 12392-12405 [PMID: 18842706 DOI: 10.1128/JVI.01219-08]
18 Egloff MP, Malet H, Putics A, Heinonen M, Dutartre H, Frangeul A, Gruez A, Campanacci V, Cambillau C, Ziebuhr J, Ahola T, Canard B. Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J Virol* 2006; 80: 8493-8502 [PMID: 16912299 DOI: 10.1128/JVI.00713-06]
19 Xu Y, Cong L, Chen C, Wei L, Zhao Q, Xu X, Ma Y, Bartlam M, Rao Z. Crystal structures of two coronavirus ADP-ribose-1''-monophosphatases and their complexes with ADP-Ribose: a systematic structural analysis of the viral ADRP domain. *J Virol* 2009; 83: 1083-1092 [PMID: 18987156 DOI: 10.1128/JVI.01862-08]
20 Piotrowski Y, Hansen G, Boomaars-van der Zanden AL, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Hilgenfeld R. Crystal structures of the X-domains of a Group-1 and a Group-3 coronavirus reveal that ADP-ribose-binding may not be a conserved property. *Protein Sci* 2009; 18: 6-16 [PMID: 19177346]
21 Wojdyla JA, Manolaridis I, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Coutard B, Piotrowski Y, Hilgenfeld R, Tucker PA. Structure of the X (ADRP) domain of nsp3 from feline coronavirus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2009; 65: 1292-1300 [PMID: 19966415 DOI: 10.1107/S0907444909040074]
22 Putics A, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. Identification of protease and ADP-ribose 1''-monophosphatase activities associated with transmissible gastroenteritis virus non-structural protein 3. *J Gen Virol* 2006; 87: 651-656 [PMID: 16476987]
23 Kuri T, Eriksson KK, Putics A, Züst R, Snijder EJ, Davidson AD, Siddell SG, Thiel V, Ziebuhr J, Weber F. The ADP-ribose-1''-monophosphatase domains of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E mediate resistance to antiviral interferon responses. *J Gen Virol* 2011; 92: 1899-1905 [PMID: 21525212]
24 Wojdyla JA, Manolaridis I, van Kasteren PB, Kikkert M, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Tucker PA. Papain-like protease 1 from transmissible gastroenteritis virus: crystal structure and enzymatic activity toward viral and cellular substrates. *J Virol* 2010; 84: 10063-10073 [PMID: 20668092 DOI: 10.1128/JVI.00898-10]
25 Herold J, Gorbalenya AE, Thiel V, Schelle B, Siddell SG. Proteolytic processing at the amino terminus of human coronavirus 229E gene 1-encoded polyproteins: identification of a papain-like proteinase and its substrate. *J Virol* 1998; 72: 910-918 [PMID: 9444982]
26 Herold J, Siddell SG, Gorbalenya AE. A human RNA viral cysteine proteinase that depends upon a unique Zn2+-binding finger connecting the two domains of a papain-like fold . *J Biol Chem* 1999; 274: 14918-14925 [PMID: 10329692 DOI: 10.1074/jbc.274.21.14918]
27 Zheng D, Chen G, Guo B, Cheng G, Tang H. PLP2, a potent deubiquitinase from murine hepatitis virus, strongly inhibits cellular type I interferon production. *Cell Res* 2008; 18: 1105-1113 [PMID: 18957937]
28 Manolaridis I, Wojdyla JA, Panjikar S, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Berglind H, Nordlund P, Coutard B, Tucker PA. Structure of the C-terminal domain of nsp4 from feline coronavirus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2009; 65: 839-846 [PMID: 19622868 DOI: 10.1107/S0907444909018253]
29 Xu X, Lou Z, Ma Y, Chen X, Yang Z, Tong X, Zhao Q, Xu Y, Deng H, Bartlam M, Rao Z. Crystal structure of the C-terminal cytoplasmic domain of non-structural protein 4 from mouse hepatitis virus A59. *PLoS One* 2009; 4: e6217 [PMID: 19593433 DOI: 10.1371/journal.pone.0006217]
30 Gadlage MJ, Sparks JS, Beachboard DC, Cox RG, Doyle JD, Stobart CC, Denison MR. Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. *J Virol* 2010; 84: 280-290 [PMID: 19846526 DOI: 10.1128/JVI.01772-09]
31 Hagemeijer MC, Ulasli M, Vonk AM, Reggiori F,

Rottier PJ, de Haan CA. Mobility and interactions of coronavirus nonstructural protein 4. *J Virol* 2011; 85: 4572-4577 [PMID: 21345958 DOI: 10.1128/JVI.00042-11]
32 Lee CC, Kuo CJ, Ko TP, Hsu MF, Tsui YC, Chang SC, Yang S, Chen SJ, Chen HC, Hsu MC, Shih SR, Liang PH, Wang AH. Structural basis of inhibition specificities of 3C and 3C-like proteases by zinc-coordinating and peptidomimetic compounds. *J Biol Chem* 2009; 284: 7646-7655 [PMID: 19144641 DOI: 10.1074/jbc.M807947200]
33 Zhao Q, Li S, Xue F, Zou Y, Chen C, Bartlam M, Rao Z. Structure of the main protease from a global infectious human coronavirus, HCoV-HKU1. *J Virol* 2008; 82: 8647-8655 [PMID: 18562531 DOI: 10.1128/JVI.00298-08]
34 Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 2003; 300: 1763-1767 [PMID: 12746549 DOI: 10.1126/science.1085658]
35 Yang H, Xie W, Xue X, Yang K, Ma J, Liang W, Zhao Q, Zhou Z, Pei D, Ziebuhr J, Hilgenfeld R, Yuen KY, Wong L, Gao G, Chen S, Chen Z, Ma D, Bartlam M, Rao Z. Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *PLoS Biol* 2005; 3: e324 [PMID: 16128623 DOI: 10.1371/journal.pbio.0030324]
36 Chuck CP, Chow HF, Wan DC, Wong KB. Profiling of substrate specificities of 3C-like proteases from group 1, 2a, 2b, and 3 coronaviruses. *PLoS One* 2011; 6: e27228 [PMID: 22073294 DOI: 10.1371/journal.pone.0027228]
37 Cottam EM, Maier HJ, Manifava M, Vaux LC, Chandra-Schoenfelder P, Gerner W, Britton P, Ktistakis NT, Wileman T. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy* 2011; 7: 1335-1347 [PMID: 21799305 DOI: 10.4161/auto.7.11.16642]
38 Zhai Y, Sun F, Li X, Pang H, Xu X, Bartlam M, Rao Z. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 980-986 [PMID: 16228002]
39 te Velthuis AJ, van den Worm SH, Snijder EJ. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 1737-1747 [PMID: 22039154 DOI: 10.1093/nar/gkr893]
40 Xiao Y, Ma Q, Restle T, Shang W, Svergun DI, Ponnusamy R, Sczakiel G, Hilgenfeld R. Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer-independent RNA polymerase activity. *J Virol* 2012; 86: 4444-4454 [PMID: 22318142 DOI: 10.1128/JVI.06635-11]
41 Ponnusamy R, Moll R, Weimar T, Mesters JR, Hilgenfeld R. Variable oligomerization modes in coronavirus non-structural protein 9. *J Mol Biol* 2008; 383: 1081-1096 [PMID: 18694760 DOI: 10.1016/j.jmb.2008.07.071]
42 Sutton G, Fry E, Carter L, Sainsbury S, Walter T, Nettleship J, Berrow N, Owens R, Gilbert R, Davidson A, Siddell S, Poon LL, Diprose J, Alderton D, Walsh M, Grimes JM, Stuart DI. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure* 2004; 12: 341-353 [PMID: 14962394]
43 Miknis ZJ, Donaldson EF, Umland TC, Rimmer RA, Baric RS, Schultz LW. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp9 dimerization is essential for efficient viral growth. *J Virol* 2009; 83: 3007-3018 [PMID: 19153232 DOI: 10.1128/JVI.01505-08]
44 Su D, Lou Z, Sun F, Zhai Y, Yang H, Zhang R, Joachimiak A, Zhang XC, Bartlam M, Rao Z. Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10. *J Virol* 2006; 80: 7902-7908 [PMID: 16873247 DOI: 10.1128/JVI.00483-06]
45 Joseph JS, Saikatendu KS, Subramanian V, Neuman BW, Brooun A, Griffith M, Moy K, Yadav MK, Velasquez J, Buchmeier MJ, Stevens RC, Kuhn P. Crystal structure of nonstructural protein 10 from the severe acute respiratory syndrome coronavirus reveals a novel fold with two zinc-binding motifs. *J Virol* 2006; 80: 7894-7901 [PMID: 16873246 DOI: 10.1128/JVI.00467-06]
46 Pan J, Peng X, Gao Y, Li Z, Lu X, Chen Y, Ishaq M, Liu D, Dediego ML, Enjuanes L, Guo D. Genome-wide analysis of protein-protein interactions and involvement of viral proteins in SARS-CoV replication. *PLoS One* 2008; 3: e3299 [PMID: 18827877 DOI: 10.1371/journal.pone.0003299]
47 Matthes N, Mesters JR, Coutard B, Canard B, Snijder EJ, Moll R, Hilgenfeld R. The non-structural protein Nsp10 of mouse hepatitis virus binds zinc ions and nucleic acids. *FEBS Lett* 2006; 580: 4143-4149 [PMID: 16828088 DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.061]
48 Donaldson EF, Sims AC, Graham RL, Denison MR, Baric RS. Murine hepatitis virus replicase protein nsp10 is a critical regulator of viral RNA synthesis. *J Virol* 2007; 81: 6356-6368 [PMID: 17392363 DOI: 10.1128/JVI.02805-06]
49 Nogales A, Márquez-Jurado S, Galán C, Enjuanes L, Almazán F. Transmissible gastroenteritis coronavirus RNA-dependent RNA polymerase and nonstructural proteins 2, 3, and 8 are incorporated into viral particles. *J Virol* 2012; 86: 1261-1266 [PMID: 22090122 DOI: 10.1128/JVI.06428-11]
50 te Velthuis AJ, Arnold JJ, Cameron CE, van den Worm SH, Snijder EJ. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 203-214 [PMID: 19875418 DOI: 10.1093/nar/gkp904]
51 Hong Z, Cameron CE, Walker MP, Castro C, Yao N, Lau JY, Zhong W. A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* 2001; 285: 6-11 [PMID: 11414800 DOI: 10.1006/viro.2001.0948]
52 te Velthuis AJ, van den Worm SH, Sims AC, Baric RS, Snijder EJ, van Hemert MJ. Zn(2+) inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001176 [PMID: 21079686 DOI: 10.1371/journal.ppat.1001176]
53 Lee NR, Kwon HM, Park K, Oh S, Jeong YJ, Kim DE. Cooperative translocation enhances the unwinding of duplex DNA by SARS coronavirus helicase nsP13. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 7626-7636 [PMID: 20671029 DOI: 10.1093/nar/gkq647]
54 Seybert A, Posthuma CC, van Dinten LC, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. J Virol 2005; 79: 696-704 [PMID: 15613297

DOI: 10.1128/JVI.79.2.696-704.2005]
55 Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol* 2004; 78: 5619-5632 [PMID: 15140959 DOI: 10.1128/JVI.78.11.5619-5632.2004]
56 Ivanov KA, Ziebuhr J. Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J Virol* 2004; 78: 7833-7838 [PMID: 15220459 DOI: 10.1128/JVI.78.14.7833-7838.2004]
57 Minskaia E, Hertzig T, Gorbalenya AE, Campanacci V, Cambillau C, Canard B, Ziebuhr J. Discovery of an RNA virus 3'-& gt; 5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5108-5113 [PMID: 16549795 DOI: 10.1073/pnas.0508200103]
58 Chen Y, Cai H, Pan J, Xiang N, Tien P, Ahola T, Guo D. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3484-3489 [PMID: 19208801 DOI: 10.1073/pnas.0808790106]
59 Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, Scherbakova S, Graham RL, Baric RS, Stockwell TB, Spiro DJ, Denison MR. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000896 [PMID: 20463816 DOI: 10.1371/journal.ppat.1000896]
60 Eckerle LD, Lu X, Sperry SM, Choi L, Denison MR. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. *J Virol* 2007; 81: 12135-12144 [PMID: 17804504 DOI: 10.1128/JVI.01296-07]
61 Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* 2011; 8: 270-279 [PMID: 21593585 DOI: 10.4161/rna.8.2.15013]
62 Ivanov KA, Hertzig T, Rozanov M, Bayer S, Thiel V, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 12694-12699 [PMID: 15304651 DOI: 10.1073/pnas.0403127101]
63 Joseph JS, Saikatendu KS, Subramanian V, Neuman BW, Buchmeier MJ, Stevens RC, Kuhn P. Crystal structure of a monomeric form of severe acute respiratory syndrome coronavirus endonuclease nsp15 suggests a role for hexamerization as an allosteric switch. *J Virol* 2007; 81: 6700-6708 [PMID: 17409150 DOI: 10.1128/JVI.02817-06]
64 Bhardwaj K, Sun J, Holzenburg A, Guarino LA, Kao CC. RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J Mol Biol* 2006; 361: 243-256 [PMID: 16828802 DOI: 10.1016/j.jmb.2006.06.021]
65 Bhardwaj K, Guarino L, Kao CC. The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *J Virol* 2004; 78: 12218-12224 [PMID: 15507608 DOI: 10.1128/JVI.78.22.12218-12224.2004]
66 Lei Y, Moore CB, Liesman RM, O'Connor BP, Bergstralh DT, Chen ZJ, Pickles RJ, Ting JP. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One* 2009; 4: e5466 [PMID: 19404494 DOI: 10.1371/journal.pone.0005466]
67 Shi X, Wang L, Li X, Zhang G, Guo J, Zhao D, Chai S, Deng R. Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN-β induction. *Mol Immunol* 2011; 48: 1568-1572 [PMID: 21481939 DOI: 10.1016/j.molimm.2011.03.004]
68 Decroly E, Debarnot C, Ferron F, Bouvet M, Coutard B, Imbert I, Gluais L, Papageorgiou N, Sharff A, Bricogne G, Ortiz-Lombardia M, Lescar J, Canard B. Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002059 [PMID: 21637813 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002059]
69 Chen Y, Su C, Ke M, Jin X, Xu L, Zhang Z, Wu A, Sun Y, Yang Z, Tien P, Ahola T, Liang Y, Liu X, Guo D. Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002294 [PMID: 22022266 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002294]
70 Beniac DR, Andonov A, Grudeski E, Booth TF. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 751-752 [PMID: 16845391 DOI: 10.1038/nsmb1123]
71 Supekar VM, Bruckmann C, Ingallinella P, Bianchi E, Pessi A, Carfí A. Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17958-17963 [PMID: 15604146 DOI: 10.1073/pnas.0406128102]
72 Liu S, Xiao G, Chen Y, He Y, Niu J, Escalante CR, Xiong H, Farmar J, Debnath AK, Tien P, Jiang S. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet* 2004; 363: 938-947 [PMID: 15043961 DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15788-7]
73 Struck AW, Axmann M, Pfefferle S, Drosten C, Meyer B. A hexapeptide of the receptor-binding domain of SARS corona virus spike protein blocks viral entry into host cells via the human receptor ACE2. *Antiviral Res* 2012; 94: 288-296 [PMID: 22265858 DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.12.012]
74 Reguera J, Ordoño D, Santiago C, Enjuanes L, Casasnovas JM. Antigenic modules in the N-terminal S1 region of the transmissible gastroenteritis virus spike protein. *J Gen Virol* 2011; 92: 1117-1126 [PMID: 21228126 DOI: 10.1099/vir.0.027607-0]
75 Lee DK, Cha SY, Lee C. The N-terminal Region of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein is Important for the Receptor Binding. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2011; 39: 140-145
76 Cruz DJ, Kim CJ, Shin HJ. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize Porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* 2008; 132: 192-196 [PMID: 18067984 DOI: 10.1016/j.virusres.2007.10.015]
77 Wang K, Lu W, Chen J, Xie S, Shi H, Hsu H, Yu W, Xu K, Bian C, Fischer WB, Schwarz W, Feng L, Sun B. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett* 2012; 586: 384-391 [PMID: 22245155 DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.005]
78 Chen J, Wang C, Shi H, Qiu H, Liu S, Chen X, Zhang Z, Feng L. Molecular epidemiology of

porcine epidemic diarrhea virus in China. *Arch Virol* 2010; 155: 1471-1476 [PMID: 20544234 DOI: 10.1007/s00705-010-0720-2]
79 Escors D, Camafeita E, Ortego J, Laude H, Enjuanes L. Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J Virol* 2001; 75: 12228-12240 [PMID: 11711614 DOI: 10.1128/JVI.75.24.12228-12240.2001]
80 Arndt AL, Larson BJ, Hogue BG. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *J Virol* 2010; 84: 11418-11428 [PMID: 20719948 DOI: 10.1128/JVI.01131-10]
81 Pervushin K, Tan E, Parthasarathy K, Lin X, Jiang FL, Yu D, Vararattanavech A, Soong TW, Liu DX, Torres J. Structure and inhibition of the SARS coronavirus envelope protein ion channel. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000511 [PMID: 19593379 DOI: 10.1371/journal.ppat.1000511]
82 Nieto-Torres JL, Dediego ML, Alvarez E, Jiménez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Llorente M, Kremer L, Shuo S, Enjuanes L. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* 2011; 415: 69-82 [PMID: 21524776 DOI: 10.1016/j.virol.2011.03.029]
83 Ruch TR, Machamer CE. The hydrophobic domain of infectious bronchitis virus E protein alters the host secretory pathway and is important for release of infectious virus. *J Virol* 2011; 85: 675-685 [PMID: 21047962 DOI: 10.1128/JVI.01570-10]
84 Ortego J, Ceriani JE, Patiño C, Plana J, Enjuanes L. Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* 2007; 368: 296-308 [PMID: 17692883 DOI: 10.1016/j.virol.2007.05.032]
85 Huang Q, Yu L, Petros AM, Gunasekera A, Liu Z, Xu N, Hajduk P, Mack J, Fesik SW, Olejniczak ET. Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry* 2004; 43: 6059-6063 [PMID: 15147189 DOI: 10.1021/bi036155b]
86 Fan H, Ooi A, Tan YW, Wang S, Fang S, Liu DX, Lescar J. The nucleocapsid protein of coronavirus infectious bronchitis virus: crystal structure of its N-terminal domain and multimerization properties. *Structure* 2005; 13: 1859-1868 [PMID: 16338414 DOI: 10.1016/j.str.2005.08.021]
87 Ma Y, Tong X, Xu X, Li X, Lou Z, Rao Z. Structures of the N- and C-terminal domains of MHV-A59 nucleocapsid protein corroborate a conserved RNA-protein binding mechanism in coronavirus. *Protein Cell* 2010; 1: 688-697 [PMID: 21203940 DOI: 10.1007/s13238-010-0079-x]
88 Grossoehme NE, Li L, Keane SC, Liu P, Dann CE, Leibowitz JL, Giedroc DP. Coronavirus N protein N-terminal domain (NTD) specifically binds the transcriptional regulatory sequence (TRS) and melts TRS-cTRS RNA duplexes. *J Mol Biol* 2009; 394: 544-557 [PMID: 19782089 DOI: 10.1016/j.jmb.2009.09.040]
89 Hurst KR, Ye R, Goebel SJ, Jayaraman P, Masters PS. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *J Virol* 2010; 84: 10276-10288 [PMID: 20660183 DOI: 10.1128/JVI.01287-10]
90 Verheije MH, Hagemeijer MC, Ulasli M, Reggiori F, Rottier PJ, Masters PS, de Haan CA. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. *J Virol* 2010; 84: 11575-11579 [PMID: 20739524 DOI: 10.1128/JVI.00569-10]
91 Zúñiga S, Cruz JL, Sola I, Mateos-Gómez PA, Palacio L, Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J Virol* 2010; 84: 2169-2175 [PMID: 19955314 DOI: 10.1128/JVI.02011-09]
92 Zúñiga S, Sola I, Moreno JL, Sabella P, Plana-Durán J, Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* 2007; 357: 215-227 [PMID: 16979208 DOI: 10.1016/j.virol.2006.07.046]
93 Yang Z, Wu N, Fu Y, Yang G, Wang W, Zu Y, Efferth T. Anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of 1,8-cineole: effect on nucleocapsid (N) protein. *J Biomol Struct Dyn* 2010; 28: 323-330 [PMID: 20919748 DOI: 10.1080/07391102.2010.10507362]

编辑 李军亮 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)