



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 豬泡疹病毒一型基因體重組機制之研究(1/2)

### Study of Molecular Mechanism of Suid Herpesvirus 1 Recombination (1/2)

計畫編號：NSC90-2320-B-039-024

執行期限：90年08月01日至91年07月31日

主持人：項千芸 中國醫藥學院微生物學科

計畫參與人員：侯庭鏞 中國醫藥學院中醫所

吳世祿 中國醫藥學院生化學科

#### 一、中文摘要

在筆者以往的研究中，證實豬 $\nu_1$ 疹病毒一型 (suid herpesvirus 1, SHV-1) 去氧核糖核酸分解酶 (deoxyribonuclease; DNase) 具有類似 RecBCD 的切割活性，同時定義出 SHV-1 DNase 負責酵素活性及 DNA 結合能力的功能區和關鍵胺基酸，其次也發現 SHV-1 DNA 結合蛋白質 (DNA-binding protein, DBP) 具有類似 RecA 促進同源 DNA 配對及兩股交換的能力，這些結果顯示 $\nu_1$ 疹病毒基因體的重組機制可能是以類似於大腸桿菌 RecBCD pathway 的重組機制進行。因此，本計畫擬藉由試管內及細胞內重組模式的建立，探究 DBP 及 DNase 在 $\nu_1$ 疹病毒基因體重組及複製現象上所扮演的角色。本年度已完成下列三部分實驗：(一) 利用試管內重組模式的重建，分析 SHV-1 DBP 與 DNase 參與的角色：已建立 homologous pairing 及 helix unwinding 模式，並證實 DBP 具有這兩項功能，進一步擬探討 DNase 在這些過程中所扮演的角色；(二) SHV-1 基因體細胞內重組模式的建立及分析：已構築細胞內重組質體，利用  $\beta$ -galactosidase 為報導基因，發現單純 $\nu_1$ 疹病毒一型及 SHV-1 可以成功的啟動重組的發生，進一步擬探討 DBP 及 DNase 是否可以促進重組的機率；(三) SHV-1 基因體重組複合物的分析：已利用 yeast two-hybrid system，證實 DBP 確實會與 DNase 產生 physical interaction，進一步擬構築系統缺損株，探討 DBP 與 DNase 結合

的區域，並藉由建立病毒感染後的 cDNA 基因庫，探討是否有其他蛋白質可以與 DBP 或 DNase 作用。在未來，由對 SHV-1 DNase 及 DBP 在病毒重組的角色及功能上的了解，可使研究者對 $\nu_1$ 疹病毒的重組現象有更合理的推論及解釋，進而提供研究者從中尋求控制的方法。

**關鍵詞：**豬 $\nu_1$ 疹病毒一型、重組、去氧核糖核酸分解酶、DNA 結合蛋白質

#### Abstract

In previous study, we demonstrated that suid herpesvirus 1 (SHV-1) deoxyribonuclease (DNase) exhibits a RecBCD-like catalytic function and SHV-1 DNA-binding protein (DBP) possesses a RecA-like function. These results suggest that the mechanism of herpesviral recombination is similar to RecBCD pathway in *Escherichia coli*, where the herpesviral DNase and DBP correspond to the RecBCD and RecA proteins, respectively. In order to fully understand the recombination mechanism and demonstrate our speculation, we set up the *in vitro* and *in vivo* recombination models in this year. SHV-1 DBP exhibited the helix unwinding and homologous pairing abilities. The herpes simplex virus type 1 and SHV-1 enhanced the recombination efficiency in *in vivo* model system by using the  $\beta$ -galactosidase as

marker. In addition, SHV-1 DBP physically interacted with DNase by yeast two-hybrid system. Further studies will be performed to analyze the roles of DNase in helix unwinding and homologous pairing. The interaction domains of DBP and DNase will also be analyzed by yeast two-hybrid system. The better understanding of the mechanism of herpesviral recombination could provide another consideration for developing the attenuated herpesviruses for vaccines and gene delivery vectors and thus help the scientists to find a good way to improve the herpesviral vectors.

**Keywords:** Suid Herpesvirus 1, Recombination, DNase, DNA-binding Protein

## 二、緣由與目的

豬  $\nu_1$  疹病毒一型 (suid herpesvirus 1, SHV-1)，隸屬於  $\nu_1$  疹病毒科 (Herpesviridae)、阿爾伐  $\nu_1$  疹病毒亞科 (Alphaherpesvirinae)、水痘病毒屬 (Varicellavirus)，為假性狂犬病 (pseudorabies) 的致病原 [1]。與 SHV-1 同亞科的病毒，包括單純  $\nu_1$  疹病毒一型、二型 (herpes simplex virus 1、2)、帶狀  $\nu_1$  疹病毒 (varicella-zoster virus)、馬  $\nu_1$  疹病毒一型 (equine herpesvirus 1)、牛  $\nu_1$  疹病毒一型 (bovine herpesvirus 1) 等 [1]。這些阿爾伐  $\nu_1$  疹病毒之間，在基因的種類、基因在基因體上的排列位置、基因的轉錄調節，以及病毒 DNA 的複製機制都極為相似 [2]，因此筆者以 SHV-1 為模式，研究阿爾伐  $\nu_1$  疹病毒核酸重組與複製現象的機轉及參與的蛋白質。在筆者以往的研究中，證實 SHV-1 去氧核糖核酸分解鈣 (deoxyribonuclease, DNase) 具有類似 RecBCD 的切割活性 [3]，隨後也定義出 SHV-1 DNase 負責酵素活性及 DNA 結合能力的功能區和關鍵胺基酸 [4]，同時也證實 SHV-1 DNA 結合蛋白質 (DNA-binding protein, DBP) 具有類似 RecA 促進同源 DNA 配對及兩股交換的能力 [5]。這些初步的結果顯示發生在  $\nu_1$  疹病毒基因體的重組機制，可能是以類似於大腸桿菌 RecBCD

pathway 的重組機制進行。因此，本計畫擬藉由試管內及細胞內重組模式的建立，探究 DBP 及 DNase 在  $\nu_1$  疹病毒基因體重組及複製現象上所扮演的角色。

## 三、結果與討論

### (一) 利用試管內重組模式的重建，分析 SHV-1 DBP 與 DNase 參與的角色

在 *E. coli* 重組過程中，RecA 會造成雙股 DNA 的不穩定，使局部雙股分開 (helix unwinding)，而使其他同源單股 DNA 插入進行同源配對 (homologous pairing)，因此我們建立這兩項重組過程的試管內模式，探討 DBP 是否具有這兩項功能。結果顯示 DBP 確實具有 helix unwinding 及 homologous pairing 這兩項功能，此外，這兩項能力會隨濃度增加而上升。在最佳條件的測試下，發現 SHV-1 DBP 進行 homologous pairing 的最佳反應條件為 80 mM NaCl、20 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 7.0~7.8，且過程中不需 ATP 的存在。至於 helix unwinding 方面，SHV-1 DBP 進行 helix unwinding 時需要鎂離子的存在，但不需 NaCl 與 ATP。由今年度已建立的試管內模式，擬進一步探討 DNase 在這兩個過程中所扮演的角色，並進一步建立 strand invasion 的試管內模式，研究 DBP 及 DNase 的互動關係。

### (二) SHV-1 基因體細胞內重組模式的建立及分析

細胞內重組模式參考自 Dutch 等 [6] 的方法。將 pRD105 送入 Vero 細胞中，以 10 m.o.i. 的病毒量感染細胞，於 8 小時後抽取細胞內的質體 DNA，再送入 *E. coli* 中，最後將 *E. coli* 塗抹於 X-gal agar 上，藉由計算藍白菌落的數量，以評估重組的效率。pRD105 上含有兩個同方向的 a 序列，兩個 a 序列中含有一個完整的 lacZ 基因作為 reporter，當重組發生時，會產生兩個新的質體形式，其中一個具有 lacZ 基因但無複製起點 ori，另一個不具 lacZ 基因但具有複製起點 ori，因此在送入 *E. coli* 中，只有後者可以成功的複製，且在 X-gal agar 上出現白色菌落。所以，當重組發生時，白色菌落數會顯著的增加，而我們可藉由計算藍

白菌落的數量，以評估重組的效率。由表一發現，單純 vi 疹病毒一型如同 Dutch 等 [6] 的結果一般，可以顯著地驅動重組的發生，而 SHV-1 也可以成功的增加重組的機率，顯示 SHV-1 可辨認來自於單純 vi 疹病毒一型的 a 序列，誘發重組的發生。由本年度已建立的細胞內重組模式，擬進一步分析重組與病毒感染時序性的關連，並進一步藉由加入 DBP 及 DNase 真核表現質體，分析 DBP 與 DNase 在細胞內驅動重組發生的角色。

### (三) SHV-1 基因體重組複合物的分析

在本項實驗中，已利用 yeast two-hybrid system，證實 DBP 確實會與 DNase 產生 physical interaction。Yeast two-hybrid system 是利用酵母菌為表現宿主，使用兩種融合蛋白質，分別是與 GAL4 DNA-binding domain 融合的 X 蛋白質及與 GAL4 activation domain 融合的 Y 蛋白質，以報導基因的活化與否，判定 X 及 Y 蛋白質是否具有關連性。若是 X 及 Y 蛋白質發生相互作用，酵母菌就可活化報導基因 His 的表現，而使酵母菌生長在不含有 histidine 的培養基中。反之，則在培養基中無法看到酵母菌的生長。除了報導基因的篩選外，為了去除偽陽性的誤判，我們再將酵母菌點在濾紙上，經判斷另一個報導基因 lacZ 的表現與否，進行第二次的確認。在這個實驗中，我們以 DBP 基因為 X 基因，以 DNase 基因為 Y 基因，經過 His、lacZ 的確認，證實 DBP 及 DNase 如我們預期一般，可以產生 physical interaction。因此由已建立的 yeast two-hybrid system，擬進一步分析 DBP 與 DNase 相互作用的 domain，並由病毒感染細胞所建立的 cDNA 基因庫，搜尋是否有其他蛋白質可以與 DBP 或 DNase 發生相互作用。

## 四、計畫成果自評

### (一) 研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況

本年度計畫進度符合預期，並已完成以下三部份實驗：

#### (1) 利用試管內重組模式的重建，分析 SHV-1 DBP 與 DNase 參與的角色

我們已建立 helix unwinding 及 homologous pairing 的試管內模式，並發現 DBP 確實具有 helix unwinding 及 homologous pairing 這兩項功能，此外，這兩項能力會隨濃度增加而上升。在最佳反應條件的測試下，發現 SHV-1 DBP 進行 homologous pairing 的最佳反應條件為 80 mM NaCl、20 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 7.0~7.8，且過程中不需 ATP 的存在。至於 helix unwinding 方面，SHV-1 DBP 進行 helix unwinding 時需要鎂離子的存在，但不需 NaCl 與 ATP。進一步擬探討 DNase 在這兩個過程中所扮演的角色，並建立 strand invasion 的試管內模式，研究 DBP 及 DNase 的互動關係。

### (2) SHV-1 基因體細胞內重組模式的建立及分析

我們已建立細胞內重組模式，並證實單在單純 vi 疹病毒一型及 SHV-1 感染後，可以成功地啟動重組的進行。進一步擬分析重組與病毒感染時序性的關連，並藉由加入 DBP 及 DNase 真核表現質體，分析 DBP 與 DNase 在細胞內驅動重組發生的角色。

### (3) SHV-1 基因體重組複合物的分析

在本項實驗中，我們已利用 yeast two-hybrid system，經過 His、lacZ 的確認，證實 DBP 確實會與 DNase 產生 physical interaction。進一步擬分析 DBP 與 DNase 相互作用的 domain，並由病毒感染細胞所建立的 cDNA 基因庫，搜尋是否有其他蛋白質可以與 DBP 或 DNase 發生相互作用。

### (二) 研究成果的學術或應用價值

本計畫的研究成果，在學術上，可使研究者對於 vi 疹病毒 DBP 及 DNase 在 vi 疹病毒基因體重組的角色上，有較深刻的認識及了解，進一步推論 vi 疹病毒重組的機制。在醫學應用上，因為 vi 疹病毒基因體發生高頻率重組現象的特性，對於基因工程減毒疫苗及基因療法病毒載體的使用上，會造成相當大的困擾及困難，因此由對 vi 疹病毒重組機制的了解，可提供研究者在開發 vi 疹病毒載體及疫苗上的另一考量方向。對於參與本計畫的人員，將可獲得良好的分子病毒學及分子生物學方面的知識，並且獲得實務的遺傳工程技術方面

的操作經驗，為國家未來生物科技的發展  
培育不可多得的人才。

(三) 是否適合在學術期刊發表或申請專  
利

本研究相關成果已發表於  
Biochemical and Biophysical Research  
Communications [7]。

## 五、參考文獻

- [1] Roizman, B. 1996. Herpesviridae, p. 2221-2230. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley (eds.), Virology, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- [2] Ben-Porat, T., Veach, R.A., and Ihara, S. 1983. Localization of the regions of homology between the genomes of herpes simplex virus type 1, and pseudorabies virus. Virology 127: 194-204.
- [3] Hsiang, C.-Y., Ho, T.-Y., Hsiang, C.-H., and Chang, T.-J., 1998. Recombinant pseudorabies virus DNase exhibits a RecBCD-like catalytic function. Biochem. J. 330: 55-59.
- [4] Ho, T.Y., Wu, S.L., Hsiang, C.H., Chang, T.J., and Hsiang, C.Y. 2000 Identification of a DNA-binding domain and an active-site residue of pseudorabies virus DNase. Biochem J. 346: 441-445.
- [5] Wu, S.-L., Hsiang, C.-Y., Ho, T.-Y., and Chang, T.-J. 1998. Identification, functional expression, and characterization of the pseudorabies virus DNA-binding protein gene and gene product. Virus Res. 56: 1-9.
- [6] Dutch R.E., Bianchi V., and Lehman R. 1995. Herpes simplex virus type 1 DNA replication is specifically required for high-frequency homologous recombination between repeated sequences. J. Virol. 69: 3084-3089.
- [7] Hsiang, C.Y. 2002. Pseudorabies virus DNA-binding protein stimulates the exonuclease activity and regulates the processivity of pseudorabies virus DNase. Biochem. Bioph. Res. Co., 293: 1301-1308.

