

Virus Evolution

Current Research and Future Directions

病毒进化

研究现状和未来方向

著者

Scott C. Weaver Mark Denison

Marilyn Roossinck Marco Vignuzzi

主译

顾大勇



暨南大学出版社
JINAN UNIVERSITY PRESS



Virus Evolution

Current Research and Future Directions

病毒进化

研究现状和未来方向

著者

Scott C. Weaver Mark Denison

Marilyn Roossinck Marco Vignuzzi

主译

顾大勇



暨南大学出版社
JINAN UNIVERSITY PRESS

中国·广州

本书简体中文版根据英国凯斯特学术出版社 2016 年版译出,并由原书作者和原书出版社授权暨南大学出版社,在中华人民共和国(包括香港、澳门和台湾地区)发行。本书受国际版权公约保护。

VIRUS EVOLUTION: CURRENT RESEARCH AND FUTURE DIRECTIONS © Caister Academic Press, Norwich, UK

This translation is published by arrangement with Caister Academic Press.

广东省版权局著作权合同登记号:图字 19-2018-077 号

图书在版编目(CIP)数据

病毒进化:研究现状和未来方向/(美)斯科特·C. 韦弗(Scott C. Weaver), (美)马克·丹尼逊(Mark Denison), (美)玛丽莲·罗欣斯科(Marilyn Roossinck), (法)马可·维努齐(Marco Vignuzzi)著;顾大勇主译.—广州:暨南大学出版社,2018.9

书名原文:Virus Evolution: Current Research and Future Directions

ISBN 978-7-5668-2430-1

I. ①病… II. ①斯…②马…③玛…④马…⑤顾… III. ①病毒—研究 IV. ①Q939.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 157778 号

病毒进化——研究现状和未来方向

BINGDU JINHUA——YANJIU XIANZHUANG HE WEILAI FANGXIANG

著者:(美)斯科特·C. 韦弗 (美)马克·丹尼逊

(美)玛丽莲·罗欣斯科 (法)马可·维努齐

主译:顾大勇

出版人:徐义雄

策划编辑:曾鑫华

责任编辑:颜彦

责任校对:苏洁 叶佩欣

责任印制:汤慧君 周一丹

出版发行:暨南大学出版社(510630)

电话:总编室(8620)85221601

营销部(8620)85225284 85228291 85228292(邮购)

传真:(8620)85221583(办公室) 85223774(营销部)

网址:<http://www.jnupress.com>

排版:广州市天河星辰文化发展部照排中心

印刷:广州市穗彩印务有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:19.25

字数:465千

版次:2018年9月第1版

印次:2018年9月第1次

定价:68.00元

(暨大版图书如有印装质量问题,请与出版社总编室联系调换)

中译本序

“病毒进化”是一门年轻的科学，经过了近三十年的发展，目前已成为对人类和动植物传染病进行研究的主要驱动力之一。在过去三十年中，艾滋病、汉坦病毒病、非典型肺炎、中东呼吸综合征和埃博拉病毒病等新发病毒性疾病的出现，以及 RNA 病毒天然快速进化特性的发现，都推动了病毒进化研究的发展。时光荏苒，目前研究的焦点已扩展到更多领域：从高度理论、机械的基础进化机制研究，到引起新发病毒性疾病的宿主范围和毒力进化的分子生物学细节研究。

Virus Evolution: Current Research and Future Directions (《病毒进化——研究现状和未来方向》) 由美国德克萨斯大学医学院人类感染与免疫研究所 Scott C. Weaver 所长、美国范德堡大学 Mark Denison 教授、美国宾夕法尼亚州立大学 Marilyn Roossinck 教授和法国巴斯德研究所 Marco Vignuzzi 博士合作编著，全书共十二章，系统地介绍了病毒进化领域的科学问题和研究方法，并重点介绍了目前已知的病毒进化的历史和机制。同时作者还归纳了新发传染病、动植物病毒和噬菌体的研究资料，以便统一研究结果，强调病毒系统间进化方式的多样性，从而进行比较分析。本书是病毒进化和新发病毒性疾病领域工作者的必备资料，也将使病毒致病机制领域的研究者受益匪浅。本书充分体现了学科研究热点和前沿，提供了研究的典型案例，还提出了一些悬而未决的科学问题，有助于读者系统学习和深入思考。

本书译者均长期从事国境口岸卫生检疫相关检测和研究工作。他们在繁忙的日常工作中，怀着对专业的热忱，翻译了本书。海关总署张际文副署长非常关心本书的翻译工作，并希望以此为契机，推动国境口岸新发传染病的研究和防控工作。本译著忠实地反映了原著内容，图文并茂，可读性强，指导性强，适用于相关领域的检测人员和研究人员使用。此外，对于学习病毒学相关领域的人员，本书有助于他们建立立体多维的病毒学理论，从而更加全面地了解病毒学。

目 录

中译本序	1
第一章 病毒突变率	Rafael Sanjuán 1
第二章 病毒信息学：理解生物多样性基因组进化的重要工具	Siobain Duffy 19
第三章 虫媒病毒的进化和传播	Naomi L. Forrester Serafín Gutiérrez Lark L. Coffey 47
第四章 选择你的武器：宿主固有防御和病毒对抗策略的起源和进化	Welkin E. Johnson 81
第五章 病毒与其植物宿主相互作用的进化	Israel Pagán Aurora Fraile Fernando García-Arenal 102
第六章 病毒毒力的进化：实验研究	Gael Kurath Andrew R. Wargo 125
第七章 关于 RNA 病毒遗传多样性的两种观点：分类学进展和基因组大小变化	Chris Lauber Alexander E. Gorbalenya 178
第八章 通过病毒进化实验理解适应：从简单到复杂的环境	Valerie J. Morley Paul E. Turner 192
第九章 植物持久性病毒的进化	Marilyn J. Roossinck 216
第十章 古病毒学：内源性病毒元件研究	Amr Aswad Aris Katzourakis 226
第十一章 病毒种群遗传学建模	Jayna Raghvani Oliver G. Pybus Christopher J. R. Illingworth 241
第十二章 新发传染病	Michelle M. Becker Everett Clinton Smith Mark R. Denison 269

第一章 病毒突变率

Rafael Sanjuán

卡瓦尼列斯生物多样性和进化生物学研究所，帕特尔纳市 46980，瓦伦西亚省，西班牙

通讯作者：rafael.sanjuán@uv.es

摘要

自发突变是遗传多样性的主要来源，对进化过程极其重要。自发突变由未校正的复制错误、遗传物质编辑或自发的核酸损伤引起。病毒在自发突变率上表现出极大的差异。RNA 病毒显示出极高的突变率，而 DNA 病毒变异速度较慢，但仍比其宿主主要快得多。本章讨论了病毒产生自发突变的分子机制，如聚合酶的低保真、缺乏校正、逃避复制后修复或宿主介导的核苷脱氨基作用。同时，还讨论了病毒突变率的演变，着重于突变率与其他基本基因组特性之间的关系，包括病毒如何响应选择而修改复制保真度，以及病毒为最大限度适应环境而优化突变率的能力。最后，对某些病毒变异与发病机制、耐药性的产生和疫苗接种的相关问题进行了讨论。

概述

突变率被定义为基因信息变化遗传给下一代的概率。因此，突变率涉及未能通过复制后修复机制校正的分子过程，包括复制错误、碱基编辑或核酸损伤等。根据惯例，病毒周期的定义是细胞水平完成一个感染周期，因此突变率通常以每个细胞为单位表达。虽然关于突变率的这个定义没有考虑到一些突变出现在复制之外的事实，但每一轮基因组拷贝都可以算出突变率，重要的是，突变率不同于等位基因在病毒种群水平上的固定过程。后者不仅由突变率，也由病毒学、人口学、生态学及种族遗传因素，包括感染持续时间、潜伏期、传播途径、组织取向、选择压力等决定，称之为分子进化速率应该会更好（Duffy 等，2008）。

病毒是突变率差异最大的生物系统。单细胞内单个核苷酸突变率（mutations per nucleotide per cell, m/n/c）在 10^{-8} 到 10^{-4} 之间（Sanjuán 等，2010；图 1-1）。相比之下，细菌突变率相差约为 50 倍，真核生物（从酵母到人类）突变率相差约为 100 倍（Lynch，2010）。不同类型病毒的进化特性因它们的突变率不同而各不相同。通常，RNA 病毒变异进化速度比 DNA 病毒快，尽管这一规则可能有一些例外（Duffy、Holmes，2008）。在一些

生物体内，RNA 病毒和类病毒的突变率极高，如噬菌体 Q β 为 1.4×10^{-4} m/n/c (Bradwell 等, 2013)，菊花绿斑病类病毒每 400 个碱基就有一个突变 (Gago 等, 2009)。因此，在 RNA 病毒中，单个细胞释放出几十个新的基因变异，从而产生极其易变和快速演化的群体，通常这些群体被称为分子的准种 (Domingo 等, 1978; Holland 等, 1982)。

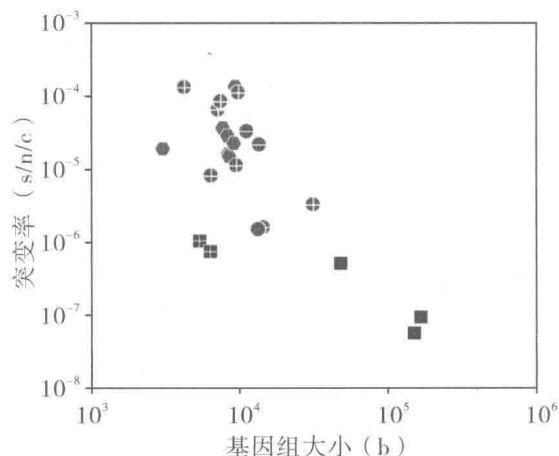


图 1-1 病毒突变率的差异

突变率为单个细胞中单个核苷酸的替换率 (substitution per nucleotide per cell, s/n/c)，是单个基因组大小 (碱基数, b) 的一个功能。RNA 病毒以圆表示 (正、负链病毒分别为 + 和 - 符号，双链 RNA 病毒为点)，逆转录病毒为六边形，DNA 病毒为正方形 (十字代表单链，点代表双链)。数据取自 Sanjuán 等 (2010) 和 Bradwell 等 (2013)。

病毒突变率具有重要的生物医学意义。例如，对于 HIV-1 感染者，其体内每天都在发生的单碱基替代都有可能导致耐药性，从而需要多重药物治疗以控制感染 (Perelson, 2002)。病毒突变率也是评价疫苗接种策略的一个重要参数 (Davenport 等, 2008)，并可通过它判定减毒活疫苗恢复毒力的可能性 (Vignuzzi 等, 2008)。快速突变也会降低宿主免疫系统清除感染的能力，因此，突变率可被视为一种毒力因子 (Pfeiffer、Kirkegaard, 2005; Vignuzzi 等, 2006)。病毒突变率同时影响在流行病学水平上疾病发生的风险 (Holmes, 2009; Pepin 等, 2010)。最后，RNA 病毒高突变率让其进化分子钟“嘀嗒”得比任何其他自然进化系统更快，使得找出最近的爆发来源成为可能 (Bhattacharya, 2014)。

病毒突变率的定量

RNA 病毒聚合酶，如 HIV-1 的逆转录酶 (Menéndez-Arias, 2009)、脊髓灰质炎病毒的 3D 蛋白 (Liu 等, 2013)，或丙型肝炎病毒 (HCV) NS5B 蛋白 (Powdrill 等, 2011) 的保真度，已经被用于体外分析碱基错误插入导致不同碱基组合的前稳态动力学。同时，模板携带报告表型作为复制试验被用于随后的突变评分中 (Menéndez-Arias, 2009)。尽管这些体外研究可以提供无可估量的信息，但其实验所得的突变率与细胞培养或体内检测推断

的突变率大为不同。在生化分析中,必需的化合物,如核苷酸或二价阳离子,常常在饱和状态下使用,可能会改变聚合酶的保真度和产生不同的突变类型。更重要的是,病毒突变率也由宿主因素决定,这些因素通常在这些研究中没有被考虑。

在高度控制细胞培养的条件下,已经开发出各种方法来测量病毒的突变率。一种简单的方法如下:细胞接种具有准遗传同质性的病毒(例如一个单独的噬菌体,或一个传染性克隆体),定量检测这些病毒短期内产生的基因多态性(一代或几代转录),通常是通过测序进行检验。突变率可以通过将观察到的突变数除以感染周期数来估计。然而,这种方法不能采集到存在样品中的许多有害突变信息,因为它们的频度因生存选择迅速降低,尽管在已知突变适应度分布的情况下,选择偏倚可以被校正(Sanjuán等,2010)。对于逆转录病毒,已开发出不经选择繁殖病毒的培养系统,从而避免了这个问题。在这些研究中另一种常见偏倚的来源是在RT-PCR检测和测序时人为引进的突变。当采用新一代测序(NGS)时,这个问题尤其严重,因为单个测序片段的错误率比实际检测到的自发突变的频率要高得多。更加先进的技术,如CircSeq测序(Acevedo、Andino,2014)和双重测序(Kennedy等,2014)的方法,以数量级方式增加了NGS的准确性,并可以对罕见突变做前所未有的深度分析。最后,测量病毒突变率较经典的方法是Luria和Delbrück的波动试验(Luria、Delbrück,1943;Zheng,2005)。这需要进行大量的每个初始病毒数量很小的平行培养。在统一标准、介质自由和选择性物质存在的条件下接种病毒后,当病毒能够继续生长时,自发突变体的数量就能够很容易地被计算出来。选择性物质可以是单克隆抗体、抗病毒药物,或不易感的细胞类型。然后可以利用每一种培养方法的突变体数量分布来估计突变率。

对比细胞培养进行病毒突变率检测的各种方案,进行活体内测量是一项更复杂的任务,因为观察到的突变率会受到许多不可控因素的影响,包括对有害突变的淘汰、复制循环数的未知、种群瓶颈等。现已开发出转基因植物组装病毒的基因获得丰富表达的方法,并通过反式互补选择释放这些基因(Malpica等,2002;Tomas、Elena,2010)。另一个策略是专注于完全抑制病毒感染性的突变(致死突变)。因为,根据定义,这些突变体不会进行病毒传代,它们的种群频率应该保持不变,等于突变率。这种方法已被用来对一个类病毒体(Gago等,2009)和丙型肝炎病毒(Cuevas等,2009b;Ribeiro等,2012)进行体内突变率的估计。然而,致死突变是非常罕见的,观察它们的频率会因RT-PCR和测序错误而受到极大的影响。最后,对丙型肝炎病毒等已被研究得较为清楚的病毒在急性感染期间复制的次数进行估计是有可能的,这类似于细胞培养研究,使得从序列数据中计算突变率的方法成为可能(Ribeiro等,2012)。

病毒突变率的分子决定因素

病毒聚合酶内在保真度

病毒突变率主要由其聚合酶内在的保真度决定。在小核糖核酸病毒、甲病毒和逆转录病毒中已分离出保真度不同程度的变种,虽然保真度不会严重影响病毒适应性及变种趋向,但是会对突变率产生轻微影响(Arias等,2008;Coffey等,2011;Graci等,2012;Menéndez-Arias,2009;Pfeiffer、Kirkegaard,2003)。内在的保真度可以被位于催化结构域之外的残留物测定(Gong、Peersen,2010;Korneeva、Cameron,2007)。例如,引入核苷酸的三磷酸部分被重新定位为脊髓灰质炎病毒3D蛋白的关键保真度检查点(Arnold等,2005)。此外,内在聚合酶保真度也取决于模板的属性。在聚合运行时,通过模板引物错位机制,可引起移码突变或导致碱基替换(Kunkel,1985),而复制暂停位点似乎特别容易发生变异(Ji等,1994)。另外,RNA二级结构已被证明能促进模板切换,是重组变异的一个主要来源(Pathak、Temin,1992;Galletto等,2004;Simon-Lorier等,2009)。然而,病毒聚合酶的3'核酸外切酶校对活性存在与否,可能是RNA病毒突变率的主要决定因素。迄今为止,除了冠状病毒外(Denison等,2011;Ulferts、Ziebuhr,2011),所有关于RNA病毒聚合酶的研究,均证明了此类病毒缺乏3'核酸外切酶校对活性(Roberts等,1988;Steinhauer等,1992),从而解释了为什么RNA病毒的突变率比DNA病毒的高。虽然DNA病毒编码聚合酶通常被认为具有较高的保真度,但似乎有一些例外。例如,由非洲猪瘟病毒(ASFV)编码的聚合酶X表现出非常高的错误率,这可能使这种病毒产生遗传多样性(de Villiers等,2010;Lamarche等,2006)。

复制模式

病毒从根本上不同于细胞,因为它们可以采用不同的复制模式,从中可以区分两种概念上不同的模式(图1-2)。首先,在冲压机复制模式中,一个模板用于产生给定细胞内的所有子代链,这意味着每个细胞只有一轮复制。然而,这种理论方案不能实现,因为需要合成一个反向互补中间体。在实践中,如果亲代的基因组只复制一次反向互补基因组,那么该病毒可以说是通过冲压机模式复制,而后被用作合成所有后代基因组的模板。其次,在半保留的类似细胞的复制模式下,子代链立即成为下一轮的复制模板,每个周期链数增加两倍。这意味着每个细胞必须进行多次复制以产生足够数量的病毒后代,所以突变可以在细胞内呈几何量级放大。因此,即使聚合酶的固有保真度保持不变,每个受感染细胞产生的突变数目的平均值和方差也会因复制模式的不同而产生变化。事实上,半保留和冲压机复制模式只是复制模式流水线的两个极端。例如,可以从最初的亲代基因组中合成多个子代链,但这些子代链可随后在同一细胞中进行多次复制循环。

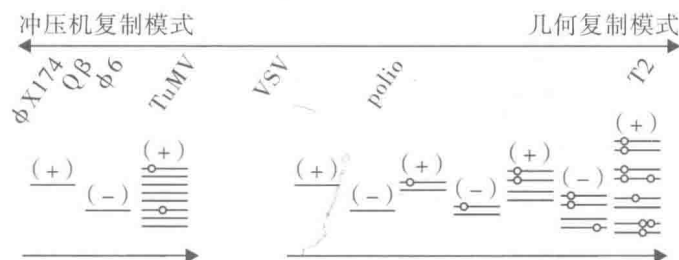


图 1-2 复制模式对单细胞突变率的影响

左：冲压复制模式，细胞内一个单一的反基因组（-）被用来合成所有后代的基因组（+）。

右：半保留（二进制），几何复制模式，在每个复制周期后代基因组的数量增加了两倍。

箭头表示细胞内病毒复制的进程。

上：由 Chao 等（2002）、Sanjuán 等（2010）、Martínez 等（2011）、Garcia-Villada 和 Drake（2012）与 Schulte 等（2015）共同断定的冲压机和几何复制模式下的几种病毒的大致位置。

大的双链 DNA 病毒利用半保留复制模式，而 RNA 病毒已被证明一直倾向于采用冲压复制模式，因为它降低了种群中的有害突变的积累（Sardanyés 等，2009；Sardanyés、Elena，2011；Thébaud 等，2010）。然而，我们还没有对 RNA 病毒复制模式进行系统的经验评估。在某些情况下，复制模式在很大程度上受制于复制的分子细节。例如，微小病毒如噬菌体 ϕ X174 使用滚动循环机制，从而形成冲压复制模式（Gillam 等，1984；Hutchinson、Sinsheimer，1966）。一个可提供复制模式信息的简单量化参数为正向和反向互补链的相对浓度信息（正/负）。在完全半保留性复制模式下，这两种浓度应该相等，而明显的不对称表明复制更接近冲压复制模式。Luria-Delbrück 波动试验提供了每轮复制的突变率，而其他的方法是以每个单细胞为单位提供突变率。因此，这些不同的单位为估计突变率的比率提供了一种思路，病毒在每个细胞内进行多轮复制（Sanjuán 等，2010）。到目前为止，这些不同的方法倾向于确认冲压复制模式在一些 RNA 病毒中比较盛行，包括噬菌体 ϕ 6（Chao 等，2002）和 Q β （Garcia-Villada、Drake，2012），以及芜菁花叶病毒（TuMV，Martínez 等，2011）。然而，一些几何量级的复制发生在 TuMV 和水泡性口炎病毒（VSV，Sanjuán 等，2010）中，最近的一项研究表明，脊髓灰质炎病毒在每个细胞内会经过多轮复制（Schulte 等，2015）。

宿主因素调节 RNA 病毒的突变率

细胞培养和细胞体内研究证实，病毒突变率受宿主的影响。HIV-1 突变的一个主要来源由载脂蛋白 B mRNA 编辑催化多肽形酶构成（APOBEC3 酶蛋白），特别是 APOBEC 3G、3F 和 3H（Harris 等，2003；Lecossier 等，2003；Mangeat 等，2003）。这些胞嘧啶脱氨酶的活性有一个非常明确的序列文本依赖性，使得逆转录病毒 cDNA 编辑一些 CC 和 TC 二核苷酸的第二碱基（Armitage 等，2008）。这导致大量 G 到 A 碱基在 RNA 基因组中转换。患者 APOBEC 3G 表达水平可能决定超突变 HIV-1 基因组积累的速率，并可能影响疾病进展（Land 等，2008）。另一个重要的宿主——编码蛋白可以编辑病毒的基因组是双链

的 RNA 依赖的腺苷脱氨酶 (ADAR)，它可以将腺苷改变成肌苷。这种酶首次在麻疹病毒中被发现，它可产生 A 碱基转换成 G 碱基的超突变 (Cattaneo 等, 1988)，随后的研究表明，它也可以使其他副粘病毒 (van den Hoogen 等, 2014)、流感病毒 (Suspène 等, 2011) 和弹状病毒 (Carpenter 等, 2009) 发生超突变。

除了这些编辑酶，还有其他宿主因素可能调节病毒的突变率，如细胞内稳态、dNTPs 浓度等 (Bebenek 等, 1992; Diamond 等, 2004; Julias、Pathak, 1998)。一些细胞代谢产物可引起核酸损伤，如研究发现乙醇衍生的活性氧 (ROS) 对丙型肝炎病毒有致突变作用 (Seronello 等, 2011)。另外，研究者在黄瓜花叶病毒 (CMV) 中观察到突变的类型取决于植物物种 (Schneider、Roossinck, 2001; Pita 等, 2007)。这些病毒突变率上的差异可能是由宿主的不同导致的，或在其他进化过程中由选择压力或与细胞间运动相关的瓶颈等引起的。前一种可能性的支持证据，特别是病毒复制保真度的作用，在 CMV 体现为遗传多样性的能力差异与不同宿主中两种病毒编码聚合酶活性不同相关 (Pita、Roossinck, 2013)。

尽管宿主编码因素本身是极其重要的，但最近的一项研究发现，虽然 T 淋巴母细胞、胶质母细胞瘤细胞和人胚肾细胞的基因突变谱存在差异，但它们的 HIV-1 突变率没有差异，这可能与 APOBEC 活性水平相关 (Holtz、Mansky, 2013)。同样，VSV 的突变率被发现在不同类型的细胞中是恒定的，包括初级和永生的细胞，以及来源于不同组织的细胞 (Combe、Sanjuán, 2014)。某项研究揭示了哺乳动物细胞和昆虫细胞之间的差异，并在基孔肯雅病毒 (CHIKV) 上得到相似的结果 (Rozen-Gagnon 等, 2014)。这是节肢动物传播的病毒，由于宿主哺乳动物和媒介昆虫的选择压力有极大差别，普遍认为这种类型的传输对病毒有进化限制作用 (Jenkins 等, 2002; Woelk、Holmes, 2002)。然而，最近的上述研究结果表明，自发突变率的差异也可能是由节肢动物传播的病毒进化相对缓慢所导致的。

DNA 病毒与复制后修复

传统观点认为 DNA 病毒进化缓慢，而过去十年中发现了一些快速进化的 DNA 病毒使得这一观点受到了挑战。例如，犬细小病毒 (Shackelton 等, 2005)、人类 B19 红病毒 (Shackelton、Holmes, 2006) 和多瘤病毒 (Shackelton 等, 2006) 的分子进化速率均进入 RNA 病毒的范围 (Duffy 等, 2008)。事实上，DNA 病毒在单个碱基上的突变率显示出丰富的变化 (Duffy 等, 2010)。可能 DNA 病毒突变率的主要决定因素是进入复制后的修复，因为该系统可以过滤掉 99% 以上的自发突变 (Fijalkowska 等, 2012)。一个很好的研究案例是单链 DNA 噬菌体 ϕ X174，它利用宿主的 DNA 全酶 III 进行复制。对于噬菌体和细菌 DNA，聚合酶具有相似的内在保真度 (Fersht, 1979; Fersht、Knill-Jones, 1981)，但噬菌体的突变率是宿主的三个数量级 (Cuevas 等, 2009a; Raney 等, 2004)。在大肠杆菌试验中，单链特异性双向甲基错配修复 (MMR) 由 Dam/MutHLS 系统完成 (Jiricny, 2013)，通过位于错配两边的 GATC 序列腺苷的甲基基团区分了亲代和子代的链。然后 MutH 切割非甲基化的子链，这是降解和重新合成 (Fukui, 2010; Li, 2008; Marti 等, 2002; Modr-

ich、Lahue, 1996; Schofield、Hsieh, 2003)。然而, ϕ X174 噬菌体的基因组中不包含 GATC 位点, 这阻碍了甲基化, 从而避免了 MMR (Cuevas 等, 2011)。

研究者对真核生物中 DNA 病毒和修复途径两者之间的相互作用仍知之甚少。几种脊椎动物 DNA 病毒可以改变 DNA 损伤反应 (DDR), 该反应可检测 DNA 损伤并启动细胞周期阻滞和修复。腺病毒、疱疹病毒、多瘤病毒和乳头瘤病毒可以在宿主体内减少 DDR 元件和导致 DNA 损伤, 另外, 为病毒复制中心补充 DDR 元件也是很常见的过程 (Luftig, 2014)。然而, 该过程如何影响病毒的突变率仍然是未知的。事实上, 很少有关于真核生物 DNA 病毒突变率的信息, 只有一个公开的对单纯疱疹病毒 (HSV-1) 的估计研究 (Drake、Hwang, 2005)。如此缺乏数据, 部分是因为经典 Sanger 测序法不能支持足够的高通量数据以推断 DNA 病毒自发突变率, 而 NGS 技术也因单个测序序列错误率高而受到了限制。

病毒突变率的进化

病毒突变率的基因组相关

20 多年前人们就已经注意到, 在基于 DNA 的微生物, 包括病毒、细菌和单细胞真核生物中, 突变率和基因组大小是协同进化的 (Drake, 1991; Drake 等, 1998)。所以, 单基因组的突变率在这些不同的类群中保持不变, 平均每轮复制变异 0.003 个。然而, 这种现象的基本进化力和机制仍不清楚。最近的研究讨论了 RNA 病毒是否有类似的规则。这是比较难评估的, 因为 RNA 病毒基因组的大小变化只有 10 倍, 而不像 DNA 病毒和微生物那样有 1 000 倍的差异 (图 1-1)。然而, 有几条证据表明, 在 RNA 病毒中突变率和基因组的大小也存在协同进化的情况。第一, 冠状病毒是 RNA 病毒中基因组最大的 (30 kb 的数量级), 并且是唯一的一种编码 3' 核酸外切酶校对活性的 RNA 病毒 (Denison 等, 2011; Ulferts、Ziebuhr, 2011)。这一活性的消除使得突变频率显著增加, 从而证明了对复制保真度有重大贡献 (Eckerle 等, 2010)。第二, 基因组大小与 RNA 病毒的分子进化率之间, 具有微弱但显著的负相关性 (Sanjuán, 2012)。第三, 在 RNA 病毒中拥有最小的基因组之一的噬菌体 Q β , 已被证明显示出特别高的自发突变率 (Bradwell 等, 2013)。几个假设可以解释为什么突变率和基因组大小呈负相关。作为最初假设的准种理论说, 基因有一个可以容忍的突变数量上限, 称为误差阈值 (Eigen 等, 1988; Eigen, 2002; Manrubia 等, 2010)。如果 RNA 病毒复制接近这个极限, 那么基因组规模的任何增加都会伴随着自发突变率的降低。虽然误差阈值的理论不适用于突变较缓慢的 DNA 病毒, 但一个群体的遗传负荷仍直接取决于基因组的突变率。此外, RNA 病毒的突变率维持在最佳值时, 可能是为了最大程度适应环境, 如同种族遗传学理论预测, 这个最佳值与基因组的大小成反比 (Orr, 2000; Sanjuán, 2012)。

单链和双链基因组病毒之间的突变率也有差异 (图 1-1)。基因组极性影响 RNA 病

毒生物学的许多方面。在正链病毒中,基因组 RNA 直接作为 mRNA;而在双链 RNA 病毒(同样在负链病毒)中,预转录的步骤是必需的。在后者中,基因组 RNA 被核蛋白高度保护以避免双链 RNA 敏感蛋白触发抗病毒天然免疫反应。目前未发现正、负链 RNA 病毒之间显示系统性的突变率差异,而对于双链 RNA 病毒目前只研究了噬菌体 $\phi 6$ (Chao 等, 2002),与单链 RNA 病毒相比,其突变率较低。这一观点间接得到种族研究支持,它表明,双链 RNA 病毒往往演变得比单链 RNA 病毒更慢 (Sanjuán, 2012)。DNA 病毒中单、双链病毒之间的区别更为明显,前者的突变率是后者的 10 倍以上 (Sanjuán 等, 2010)。

进化过程形成的病毒突变率

由于自发突变是遗传变异的最终来源,因此它们需要适应生存。然而,突变往往是有害而非有益的,因此这往往会增加种群的遗传负荷。基于自然选择在短期内作用的原理,理论预测突变率应该倾向于尽可能地降低以减少这种负荷 (Kimura, 1967; Lynch, 2010)。然而,大多数病毒,尤其是 RNA 病毒,显然不是这样的。研究者已经提出了几种可能的解释。第一, RNA 复制保真的能力可以被简单地生化约束。然而,冠状病毒 3' 核酸外切酶校对活性的存在反驳了这一假说。第二,对于大多数病毒来说,虽然机制上是可能的,但是复制保真度机制或许消耗巨大。支持了上述观点的现象是,在 VSV 和 HIV-1 病毒中,复制的速度和保真度是呈负相关的 (Furió 等, 2005; Furió 等, 2007)。然而,从理论上讲,保真度的代价也应该适用于那些快速复制对它们来说很重要的生物体,因此不能解释为什么 RNA 病毒的突变率比 DNA 病毒的高出几个数量级。第三,遗传负荷直接依赖于有害的自发突变部分。人们可以假设这一比例在病毒中比在细菌或真核生物中低,从而减少了选择压力,使前者的突变率降至最低。然而,选择系数的直接测量显示完全相反的模式,在许多的 RNA 和单链 DNA 病毒单点突变中有 20% ~ 40% 的致死突变 (Sanjuán, 2010)。第四,如果选择压力对突变率修饰基因的影响小于随机遗传漂变,一个被称为漂移障碍的限制 (Lynch, 2011; Sung 等, 2012),在突变率降低过程中则没有选择压力带来的变化。然而,只有当突变率达到足够低的值且种群规模较小时,才会遇到这种障碍,这种情况似乎不适合于大多数病毒。第五,细菌模型和实验数据证明,突变的等位基因可以在种群受到强正向或多样化选择时达到高频率 (Leclerc 等, 1996; PAL 等, 2007; Sniegowski 等, 1997; Taddei 等, 1997)。然而,这些突变基因通常是短暂存活的,特别是在重组存在时,因而未能解释许多病毒具有稳定的高突变率。第六,还有其他可能的因素决定突变率,如适应性优化结构的演变 (Clune 等, 2008) 和种群结构 (Jiang 等, 2010)。目前的进化理论为许多病毒的高突变率提供了多种解释,但没有一个是完全令人满意的。

对进化选择的反应

进化调节突变率的直接证据来自大量的研究,这些研究采用致突变核苷类似物治疗病毒。针对这些治疗措施, RNA 病毒可以使病毒聚合酶关键的残基发生演化改变,控制复

制保真性或药物的亲和性,从而抵抗诱导的突变 (Agudo 等, 2010; Arias 等, 2008; Coffey 等, 2011; Graci 等, 2012; Pfeiffer、Kirkegaard, 2003; Sierra 等, 2007)。早期的研究表明,在大的 DNA 噬菌体 T4 中,一系列的聚合酶变异可以有效地抑制化学诱变剂发挥作用 (Drake 等, 1969; Drake、Greening, 1970)。这些治疗所产生的选择压力,以及对选择的反应,取决于不同的病毒和药物。例如,噬菌体 Q β 中 5-氮胞苷 (AZC) 会增加 U $\rightarrow$ C、A $\rightarrow$ G 和 C $\rightarrow$ G 替换的频率 (Cabanillas 等, 2014);而对于淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) (Grande-Pérez 等, 2002) 和 HIV-1 (Dapp 等, 2009), AZC 只诱导替换第三个突变类型。此外,核苷类似物是否选择在聚合酶活性位点,或是在蛋白质的其他领域,甚至是其他蛋白质中替换氨基酸,取决于每种病毒的突变率及其相关的适应成本。

与此相关,不编码自身聚合酶的病毒对于研究化学突变剂带来的变化类型是特别有趣的。在碱基类似物 5-氟尿嘧啶 (FU) 存在的条件下, ϕ X174 噬菌体连续传代,裂解蛋白 E 的胞周质 N 末端域发生氨基酸置换,从而降低裂解的效率,使病毒感染细胞周期延长,从而增加每个细胞的病毒释放量 (Domingo-Calap 等, 2012; Pereira-Gómez、Sanjuán, 2014)。这种变化导致了对 FU 的抵抗,一个可能的解释是,这与病毒的复制模式有关。如上面所述,在冲压机复制模式下,单个细胞复制的循环数是固定的。反过来,感染一定数量宿主细胞所需的这种循环 (复制循环) 的数量取决于病毒释放量的大小。例如,如果每个细胞释放 100 个感染性病毒颗粒,从释放一个病毒颗粒到感染 1 万个细胞需要两个感染周期,但如果释放量只有 10 个,则需要四个周期。在后一种情况下,这种病毒需要复制两倍来感染所有的细胞,这意味着自发的突变将有更多的机会积累数量。因此,通过改变其溶解蛋白质的性质, ϕ X174 噬菌体可以减少感染给定数量细胞所需的复制次数,从而减轻药物的致突变作用。

病毒突变率的最优化

上述实验已经强有力地证实,突变率的轻微升高会对病毒的适应性和适应度产生负面影响,这表明 RNA 病毒的自发突变率接近于最高耐受水平。另外,在动物模型中,携带增加聚合酶保真度的 RNA 病毒变异往往是降低适应性和毒力的 (Gnadig 等, 2012; Pfeiffer、Kirkegaard, 2005; Vignuzzi 等, 2006)。这些观察表明 RNA 病毒突变率接近于进化上的最佳状态。一个额外的使用过时野毒株的系统动力学研究证据也支持这一观点 (Sanjuán, 2012)。在一个纯粹的中性进化的情况下,分子进化率应随突变率的增长而呈线性增长 (Kimura, 1983)。DNA 病毒的缓慢变异证实了这个预测。然而,分子进化的速率比线性增长的低,并且随着突变率的增长而停滞 (图 1-3)。这种模式被解释为一个模型,其中与短暂有害突变相关的遗传负荷阻碍中性或有利等位基因的固定。据此,突变率的进一步增长,会对病毒的进化产生负面影响。

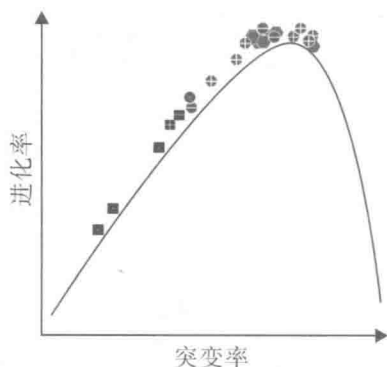


图 1-3 突变率与进化率的关系

分子进化的中性理论假定这两速率之间存在线性关系；然而，Sanjuán (2012) 的研究显示，进化率的增加随着突变率的增加趋向停滞，这表明拮抗有害突变的选择背景阻碍中性或有利突变的固定。这就产生了一种进化上的最佳突变率，RNA 病毒似乎已经达到这种突变率。超过这个最佳值，进化率会因遗传负荷过大而急剧降低，一些病毒实验也证实了此种观点（见正文）。不同类型的病毒采用与图 1-1 相同的符号表示。

由于 DNA 病毒的突变率大大低于 RNA 病毒的突变率，但它们的生活方式是相似的，人们可以得出 DNA 病毒突变率在适应性方面是次优的结论。事实上，化学诱变对于 DNA 病毒来说，并没有对 RNA 病毒那样的不利影响。例如，在用 T7 噬菌体进行的一项研究中，NGS 检测到，在诱变条件下，病毒连续传代产生大量的突变，但这种增加并没有对病毒适应性产生负面影响（Springman 等，2009）。另一项研究用进化实验对几个 DNA 和 RNA 噬菌体的适应性和分子进化速率进行了比较（Domingo-Calap、Sanjuán，2011）。在最初的适应阶段，RNA 噬菌体较高的突变率使得它们比 DNA 噬菌体适应快五倍，而且比前者在种群中的固定突变要快三倍。然而，一旦病毒达到适应度高的水平，这种差异即消失。因此，DNA 病毒的进化和适应要比 RNA 病毒的慢得多，但差异并不像它们的平均突变率差异那么大。一种可能的解释是 DNA 病毒不会在基因组中显示恒定的突变率。有实验支持了这一观点，该实验在波氏杆菌噬菌体 BPP-1 的一种用于宿主配体识别的尾纤基因中，通过选择性地运用一种具有位点特异性作用的反转录系统，引导出了大量突变（Liu 等，2002）。痘苗病毒控制所谓的遗传折叠，瞬时增加阻断细胞抗病毒反应位点基因的拷贝数（Elde 等，2012）。

病毒突变率对于疾病的重要性

毒力

单氨基酸替换修改 RNA 病毒聚合酶内在保真度的特征，可用于直接评价病毒突变率对致病力的影响。在核苷类似物利巴韦林的作用下，脊髓灰质炎病毒连续传代，使病毒聚

合酶替代选择 G64S。后续测序的遗传多样性分析表明, G64S 替代增加聚合酶保真度约三倍, 而复制动力依然保留 (Pfeiffer、Kirkegaard, 2003)。研究发现, 遗传多样性的缺失与 G64S 更换相关, 在细胞培养中, 病毒耐药性的进化能力或逃避抗体中和反应能力短期内受损。此外, 在小鼠感染模型中该 G64S 替代产生从中度 (Pfeiffer、Kirkegaard, 2005) 到高度 (Vignuzzi 等, 2006) 的病毒衰减。这些结果显示: 病毒需要维持高的突变率, 从而逃避先天免疫反应, 或者适应不同的体内微环境。脊髓灰质炎病毒的毒性主要取决于到达并感染神经系统的能力, G64S 突变体失去了这种能力 (Vignuzzi 等, 2006)。基孔肯雅病毒的变种增加的保真度随后获得类似的结果 (Coffey 等, 2011)。对于脊髓灰质炎病毒, 这种甲病毒属突变体表现出在自然宿主蚊子中遗传多样性减少, 感染和传播能力减弱。后来, 另一个版本的可以降低复制保真度的脊髓灰质炎病毒聚合酶 (H273R) 被确定 (Kor-boukh 等, 2014)。有趣的是, 根据小鼠瘫痪的能力, 这种变体也被发现在体内出现了衰减。另外, 降低的毒力与 H273R 病毒感染特定器官能力受损有关。总的来说, 这些研究建立了病毒突变率和毒力之间的联系。

如上所述, DNA 病毒突变率大大低于 RNA 病毒, 但 DNA 病毒也可以达到较高的毒力水平, 如天花病毒或非洲猪瘟病毒。DNA 病毒达到高碱基突变率的能力受到遗传负荷的阻碍。然而, DNA 病毒也需要响应免疫压力并适应宿主组织, 就像 RNA 病毒一样。毫无疑问, 一些 DNA 病毒的大基因组使它们能够编码一系列基因来对抗先天免疫反应 (Bahar 等, 2011), 这与 RNA 病毒不同。然而, 系统发育分析表明在宿主病原体竞争中的 DNA 病毒基因进化速率较快 (McLysaght 等, 2003)。突变率在这些位点所使用的机制, 如遗传折叠, 可能有助于这种快速的进化 (Elde 等, 2012)。因此, 尽管复制保真度很高, DNA 病毒也能创造出战胜宿主防御所需的遗传多样性。

接种疫苗

许多 RNA 病毒的蛋白质有屏蔽天然免疫的能力 (Versteeg、Garcia-Sastre, 2010)。如上所述, RNA 病毒的小基因组限制了它们部署复杂的免疫逃避蛋白的能力, 而大 DNA 病毒具有类似的能力。然而, 病毒已演变出了替代策略。例如, 通过致密聚糖链的掩护, HIV-1 隐藏着位于包膜蛋白 GP120 的表面抗原表位, 可逃避中和抗体 (Reitter 等, 1998; Wei 等, 2003)。另外, 诸如丙型肝炎病毒等其他人类病毒似乎并没有采用同样的策略, 或者至少不是广泛如此。RNA 病毒保持宿主免疫适应性的最常见机制可能是在关键抗原位点快速产生氨基酸变化, 这就产生了一种快速抗原性漂移, 正如季节性流感广泛证明的那样 (Smith 等, 2004)。由于抗原位点进化的速度在迅速消除交叉保护, 流感疫苗需要每年更新。已证明 HIV-1 (Kawashima 等, 2009) 和丙型肝炎病毒 (Gaudieri 等, 2006) 通过对 CTL 表位逃逸突变的快速固定来适应宿主细胞免疫。在这两种病毒中, 抗原位点有相当大的宿主内变异和一个巨大的全球多样性, 从而对疫苗开发造成了严重障碍 (Korber 等, 2009)。与 RNA 病毒极高突变率有关的另一个问题是减毒活疫苗毒力的恢复。对于脊髓灰质炎病毒, 个体接种标准 Sabin 株后偶尔会排泄疫苗产生的病毒, 因此这些个体具有潜在风险, 可导致其他非接种人群的个体受到致病性感染 (Georgescu 等, 1997)。聚合酶

保真变异的研究表明，RNA 病毒突变率可以被设计用于生产新的更安全的活疫苗。例如，脊髓灰质炎病毒的 G64S 和 H273R 保真突变体已被证明会引起保护性免疫反应（Vignuzzi 等，2008；Korboukh 等，2014）。高保真度突变体似乎比低保真度突变体更适合做疫苗，因为它们不太可能产生新的毒力突变或发生毒力恢复。降低重组率，可以减少因疫苗株与流行的野生型病毒重组而产生的风险。

耐药性与抗病毒策略

抗病毒药物抑制病毒感染周期的关键步骤在短期内是非常有效的。然而，耐药病毒会迅速进化，导致治疗失败。由于 RNA 病毒的高突变率，在每一个被感染病人体内每天都会产生所有可能的单核苷酸替换和许多双突变体。因此，在治疗开始之前，耐药突变通常在病毒种群中作为少数群体存在。目前 NGS 可以进行这些低频多态性的检测，因而成为辅助临床决策的有用工具（Nelson、Hughes，2015）。耐药性的一个著名的例子与 FDA 批准的第一个治疗艾滋病药物 AZT 有关。虽然短期有效，但位于 HIV-1 逆转录酶的耐药突变不可避免地出现在最高耐受剂量下。然而，若 AZT 与其他抗逆转录病毒药物进行组合使用，则有助于有效阻止病毒复制和降低耐药的风险。这些经验也应适用于其他快速变异的 RNA 病毒，如丙型肝炎病毒。病毒突变率的频率和突变谱特征还可以帮助预测耐药性。例如，HCV 聚合酶 NS5B 具有高度偏斜的突变谱，生产替代类型比其他的酶快数千倍（Powdrill 等，2011）。耐药性通常由一个或几个氨基酸替换决定，因此只涉及几个核苷酸变化。如果这些替换是突变谱中最罕见的，那么耐药变异体的出现将被推迟。这连同与耐药突变相关的适应成本，被称为所谓的耐药基因屏障（Svarovskaia 等，2014）。

除了进化的最佳突变率外，病毒的适应性和适应度也会因有害突变的积累而急剧衰减，这直接降低了适应度，干扰了有益突变的固定。病毒种群最终可能越过错误阈值，导致遗传信息不可逆转地丢失。基于此，有学者提出 RNA 病毒可被特定诱变剂打败（Anderson 等，2004；Bull 等，2007；Domingo，2006）。早期的实验表明，突变频率的轻微增长导致脊髓灰质炎病毒和 VSV 的适应度戏剧性下降，从而可能使 RNA 病毒对致死性突变特别敏感（Holland 等，1990）。后来在细胞培养和动物模型条件下，致死突变被证明对多种 RNA 病毒是有效的，包括肠道病毒（Crotty 等，2001；Graci 等，2007）、口蹄疫病毒（Sierra 等，2000）、汉坦病毒（Chung 等，2007）、沙粒病毒（Grande-Pérez 等，2005）和慢病毒（Dapp 等，2009；Loeb 等，1999）。事实上，一些经典的抗病毒药物如利巴韦林或阿米洛利后来被证明是 RNA 病毒的突变剂（Crotty 等，2001；Levi 等，2010）。来自于干扰素/利巴韦林治疗患者的 HCV 序列分析也表明，HCV 在体内发生突变（Cuevas 等，2009b）。一项临床试验对 HIV-1 致死突变的可行性进行检测，但是没有成功（试行 NCT00129194）（Mullins 等，2011）。另一个问题是，与最初的预期相反，致命性突变也会产生耐药性，包括产生高保真突变体。

（主译：王渊、刘春晓 校译：董瑞玲）