



鳊弹状病毒 N 蛋白与鳊 c-Myc 互作调控谷氨酰胺代谢机制

张秋爽^{1,2}, 叶彩媚^{1,2}, 牛银杰¹, 林强¹, 梁红茹¹,
罗霞¹, 李宁求^{1*}, 付小哲^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔用药物创制重点实验室,
广东省水产动物免疫与绿色养殖重点实验室, 广东 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了研究鳊弹状病毒 (SCRV) 如何调控鳊 c-Myc (Sc-c-Myc) 进而调控谷氨酰胺代谢的分子机制, 本研究通过免疫共沉淀联合蛋白质组寻找可能与 Sc-c-Myc 互作的病毒蛋白, 初步分析确定为核衣壳蛋白 (N 蛋白); Co-IP 结果显示, SCRV 的 N 蛋白与 Sc-c-Myc 存在相互作用。通过 PCR 扩增获得了带有 Flag 标签序列的 SCRV-N 基因的 ORF 片段, 并构建了 SCRV-N 蛋白过表达载体 pcDNA-N-Flag; 将 pcDNA-N-Flag 质粒转染鳊脑组织细胞系 (CPB 细胞系), 荧光共定位结果显示, Sc-c-Myc 与 SCRV-N 在细胞质内存在共定位现象; 通过逆转录实时定量 PCR (RT-qPCR) 和免疫印记 (Western blot) 检测转染 pcDNA-N-Flag 的 CPB 细胞系中 Sc-c-Myc 及谷氨酰胺代谢通路关键酶 (GLS1、GDH 和 IDH2) 的表达变化, 发现 Sc-c-Myc、GLS1 的转录水平和蛋白水平均显著上调。综上所述, SCRV 的 N 蛋白与 Sc-c-Myc 互作促进 Sc-c-Myc 的表达, 进而调控宿主细胞谷氨酰胺代谢途径, 为 SCRV 防控提供了新的靶点。

关键词: 鳊; 鳊弹状病毒 (SCRV); 鳊 c-Myc; 蛋白互作; 谷氨酰胺代谢

中图分类号: S 942

文献标志码: A

随着鳊 (*Siniperca chuatsi*) 养殖技术的不断发展, 我国鳊养殖业规模不断扩大。但是近年来, 鳊病毒病的暴发越来越频繁, 给养殖户造成了严重的经济损失。其中, 鳊弹状病毒 (*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCRV) 病是目前最常见的鳊暴发性病害之一^[1-2]。感染 SCRV 后的发病鳊表现出内脏、体表出血等症状, 死亡率可高达 80%~100%^[2]。SCRV 是属于弹状病毒科 (*Rhabdoviridae*) α -弹状病毒亚科 (*Alpharhabdovirinae*) 鳊弹状病毒属 (*Siniperhavivirus*) 的一种负链 RNA 病毒^[3]。其病

毒基因组全长为 11 545 bp, 仅仅编码 5 个病毒蛋白, 包括 RNA 依赖的 RNA 聚合酶蛋白 (RNA-dependent RNA polymerase protein, L)、糖蛋白 (glycoprotein, G)、核蛋白 (nucleoprotein, N)、磷酸化蛋白 (phosphoprotein, P) 以及基质蛋白 (matrix protein, M)^[4]。

病毒是一种非细胞形态生命体, 需要依靠宿主细胞的新陈代谢才能完成其自身的复制和增殖^[5]。因此, 病毒会诱导宿主细胞代谢重编程以快速获得病毒复制增殖所需的生物大分子和能量,

收稿日期: 2023-06-19 修回日期: 2023-08-30

资助项目: 国家重点研发计划 (2023YFD2400701); 广州市重点研发计划 (2024B03J1263); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2023TD48)

第一作者: 张秋爽 (照片), 从事水生动物医学研究, E-mail: 1306033559@qq.com

通信作者: 李宁求, 从事水生动物医学研究, E-mail: liningq@126.com;

付小哲, 从事水生动物医学研究, E-mail: fuxiaozhe-1998@163.com



包括糖酵解、谷氨酰胺代谢、脂代谢、核苷酸生物合成等^[6-9]。在细胞内谷氨酰胺主要有3条代谢途径, 即(1)谷氨酰胺酵解途径(glutaminolysis): 在谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)的作用下, 谷氨酰胺被氧化为谷氨酸, 随后在谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)催化下转化为 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG), 然后进入三羧酸(TCA)循环^[10]; (2)谷氨酰胺还原性代谢途径(reductive glutamine metabolism, RGM): 谷氨酰胺在经GLS和GDH代谢为 α -酮戊二酸后, α -酮戊二酸经过异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)羧化还原为异柠檬酸并异构化为柠檬酸, 然后进入脂肪酸从头合成途径^[11-12]; (3)谷胱甘肽合成途径: 谷氨酰胺转化成谷氨酸后经过催化生成谷胱甘肽, 维持细胞氧化还原水平^[13]。近年来已发现多种病毒的复制增殖依赖于谷氨酰胺并导致其代谢重编程, 如人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)^[14]、牛痘病毒(vaccinia virus, VAV)^[15]、传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)^[16]、乌鳢弹状病毒(snakehead fish vesiculovirus, SHVV)^[17]、对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)^[18]、神经坏死病毒(red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)^[19]以及SCRV^[20]等。

c-Myc是调控细胞代谢的关键转录因子, 能够调控谷氨酰胺酵解途径的限速酶谷氨酰胺酶1(glutaminase1, GLS1)的表达, 从而调控谷氨酰胺代谢。最近研究发现, 病毒可通过编码病毒蛋白与c-Myc直接或间接作用, 改变c-Myc蛋白稳定性或活性, 进而调控细胞代谢^[21-22]。如腺病毒(Adenovirus, ADV)的E4ORF1基因产物可以与c-Myc结合, 上调GLS1的表达进而实现宿主细胞谷氨酰胺代谢重编程^[23]; 而卡波西肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)的LANA蛋白与HIF-1 α 相互作用, 显著增强HIF-1 α 的转录, 激活c-Myc促进谷氨酰胺的代谢, 从而满足自身的复制增殖^[24-25]。

前期研究发现, 在鳃脑组织细胞系(Chinese perch brain cells, CPB cells)中, p53负调控Sc-c-Myc、GLS1的表达, 但是SCRV感染后, p53、Sc-c-Myc、GLS1表达均显著上调^[26]。因此, 我们推测SCRV病毒蛋白可能与Sc-c-Myc相互作用, 从而调控宿主谷氨酰胺代谢以期满足其自身复制增殖的需求。本研究通过免疫共沉淀、细胞共定

位等确定SCRV与Sc-c-Myc互作的病毒蛋白, 并检测互作后宿主细胞谷氨酰胺代谢途径关键酶的表达变化, 以期解析SCRV调控Sc-c-Myc进而调控宿主细胞谷氨酰胺代谢重构的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株和载体

CPB细胞系由本课题组建立并保存^[27]。SCRV-QY株由本实验室分离并保存^[28]。pcDNA3.1(+)由本实验室保存。

1.2 试剂和抗体

TRIzol Reagent购自Invitrogen公司(美国); Evo-M-MLV RT反试剂盒、SYBR Green Pro Taq HS购自湖南艾科瑞生物工程有限公司(中国); Endo-free Plasmid Midi Kit购自OMEGA公司(中国); Protein A/G、Flag标签鼠抗购自Proteintech公司(美国); Wes12-230 kDa分离试剂盒购自Protein simple公司(美国); 抗荧光淬灭剂购自上海碧云天生物技术有限公司(中国); 鳃c-Myc(Sc-c-Myc)抗体由本实验室制备保存^[29]; 带FITC标记的荧光兔二抗和带Cy3标记的荧光鼠二抗购自北京康为世纪生物技术有限公司; Transfect EZ 3000转染试剂购自ELGBIO公司(广州); 常用快切酶购自TaKaRa(日本)。

1.3 细胞培养和病毒接种

用L-15培养基(含10% Fetal Bovine Serum, FBS)对CPB细胞系按体积比1:3进行传代, 然后置于无CO₂、28℃培养箱中进行培养。根据细胞的生长情况, 每2~3天传代1次。待细胞长满至90%进行病毒接种, 先将旧培养基倒掉, 并用磷酸盐缓冲溶液(PBS)润洗2次后加入用L-15稀释的SCRV病毒液(MOI=0.01), 置于无CO₂培养箱中28℃孵育1h, 补加L-15(含2% FBS)培养基后, 置于培养箱中继续培养。

1.4 RNA提取、反转录和实时荧光定量PCR(qPCR)

采用TRIzol法对培养好的细胞或者病毒液提取总RNA, 然后使用Evo-M-MLV RT反转录试剂盒将总RNA反转录为cDNA, 具体方法按照使用说明书进行。根据已知鳃转录组信息, 针对Sc-c-Myc、GLS1、GDH和IDH2设计特异性引物(表1),

表 1 本研究使用的引物序列
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer name	序列 sequence (5'-3')	用途 application
SCRV-N-F	(<i>Kpn</i> I)CG <u>GGGTACT</u> C AAGAATGGAACACCAAATC	载体构建 vector construction
SCRV-N-R	(<i>Apa</i> I)TCC <u>GGGCCCTTACTTATCGTCGCATCCTTGTAATC</u> GATTGCTCACAAA	
GLSQ-F	TCCTGCGGCATGTACGACTTCT	qPCR
GLSQ-R	CCAGCTTGTCAGTGGAGGTGA	
GDHQ-F	AGGTCCGTCACTATGCCGATGC	
GDHQ-R	AGATCCTCCACCAGCTTGTCTC	
IDH2Q-F	GTCATCAGTGTGGTCACGGTACG	
IDH2Q-R	TGGAGATGGACGGAGACGAGATG	
Sc-c-Myc-F	ATGTTGCAAAGCTTCGCTC	
Sc-c-Myc-R	TTAGCTGCGAAGCTGCT	
18SQ-F	CATTCTGATTGTGCCGCTAGA	
18SQ-R	CAAATGCTTTCGCTTTGGTC	

注: 粗斜体黑框为酶切位点, 酶切位点前的碱基为保护碱基; 粗下划线为Flag标签序列。

Notes: Bold italicized black box represents the enzyme cleavage site; the base in front of the enzyme cleavage site is protected base; bold underline represents the sequence of Flag tag.

采用 SYBR Green Pro *Taq* HS 使用说明书进行 qPCR 实验。每个样品进行 3 次平行重复, 18S *rRNA* 作为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算出相对表达量。

1.5 免疫沉淀 (IP) 与质谱分析

把被 SCR V 感染的 CPB 细胞裂解上清液与 1 μ g Sc-c-Myc 抗体在 4 °C 下预孵育过夜。将用 1 mL RIPA (不含 PMSF) 洗好的 30 μ L protein A/G 加入到和抗体孵育过夜的细胞-抗体混合物中, 在 3D 摇床上 4 °C 孵育过夜, 使抗体和珠子充分偶联。用适量的 RIPA (不含 PMSF) 清洗偶联沉淀物, 加入适量的 SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 在 12% 的 SDS-PAGE 凝胶上 (140 V, 40 min) 分离。用考马斯亮蓝染色显色蛋白条带, 将目标蛋白条带切胶回收, 样品送至上海中科新生命生物科技有限公司进行蛋白质谱分析。

1.6 免疫共沉淀 (Co-IP) 及免疫印迹 (Western blot)

将转染了 pcDNA-N 的 CPB 细胞按“免疫沉淀 (IP) 与质谱分析”所述方法分别用 Sc-c-Myc 抗体、SCR V-N 蛋白抗体制备 IP 样品, 经 12% 的变性凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 将 PVDF 膜用甲醇先预处理 15 s, 再用去离子水浸泡 2 min, 然后将切好的胶、膜和滤纸按照膜在上胶在下的原则一起放在转膜缓冲液中平衡处理 1 min, 同时滤除气泡, 然后放入电泳槽中将蛋白质转移到 PVDF 膜 (140 V, 30~40 min), 然后用 5% 的脱脂牛

奶进行封闭 3 h。封闭后与特异性一抗 c-Myc (1 : 100)、SCR V-N (1 : 1 000)、 β -Actin (1 : 3 000) 在室温下孵育 3 h。用 PBST 洗涤 15 min 后, 与兔二抗 (1 : 5 000) 在室温下孵育 1 h, 使用 HRP ECL (Millipore, 美国) 显色。

1.7 过表达载体的构建

根据 SCR V-QY 株 N 蛋白基因序列设计带有酶切位点和 Flag 标签的引物, 以 SCR V 的 cDNA 为模板进行扩增, 引物如表 1 表示。随后用快切酶将 PCR 产物与载体 pcDNA3.1(+) 进行双酶切, 测量载体、片段浓度后用 T4 DNA 连接酶进行连接, 并转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 中。经平板抗性筛选、菌液 PCR 鉴定后, 将阳性克隆 pcDNA-N 送至广州艾基生物技术有限公司测序。

1.8 细胞转染和荧光共定位

将 CPB 细胞传至 12 孔板, 待细胞长至单层细胞后, 采用 Endo-free Plasmid Midi Kit 分别提取 pcDNA3.1(+), pcDNA-N-Flag 过表达质粒, 然后根据使用说明书, 使用 Transfect EZ 3000 转染试剂将 pcDNA3.1(+), pcDNA-N 质粒 (质粒/ μ g : 转染试剂/ μ L=1 : 3) 转入 CPB 细胞。采用 Endo-free Plasmid Midi Kit 分别提取 pcDNA3.1(+), pcDNA-N-Flag 过表达质粒, 然后根据使用说明书, 使用 Transfect EZ 3000 转染试剂将 pcDNA3.1(+), pcDNA-N 质粒转入 CPB 细胞。细胞转染 24 h 后, 加入 4% 的多聚甲醛固定, 并加入 0.5% 的 Triton-

100 透膜, 1%BSA 封闭后, 加入稀释好的 Flag 抗体和 Sc-c-Myc 抗体孵育, 再加入带有绿光的兔二抗和红光的鼠二抗, 用 DAPI 染核, 然后使用激光共聚焦显微镜进行观察。

1.9 转染 pcDNA-N-Flag 对 Sc-c-Myc 及谷氨酰胺代谢相关酶的影响

将 pcDNA3.1(+), pcDNA-N 过表达质粒转染 CPB 细胞, 48 h 后, 提取细胞总 RNA 和细胞蛋白, 通过逆转录实时定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blot, 分析 SCR-V-N 蛋白对 Sc-c-Myc 和谷氨酰胺代谢相关酶 (GLS1、GDH 和 IDH2) 的影响。

1.10 统计分析

所有数据来自 3 次平行实验, 以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。采用 GraphPad Prime 5.0 绘制图形, 且各组之间的误差表示为平均值标准差, 用 SPSS 21.0 比较和分析组间差异的显著性程度, * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 SCR-V-N 蛋白与 Sc-c-Myc 互作

IP 样品的 SDS-PAGE 结果显示, 在 SCR-V 感染细胞中在 45~65、65~75、100~130 ku 有特异性

蛋白条带存在 (箭头所示)。蛋白质谱分析结果显示, Sc-c-Myc IP 样品中鉴定出 1 个病毒蛋白, 为弹状病毒的核衣壳蛋白, 且肽段强度值较高 (表 2), 表明 SCR-V-N 蛋白可能与 Sc-c-Myc 互作。于是使用 SCR-V-N 蛋白抗体和 Sc-c-Myc 抗体分别进行 IP, WB 检测结果显示, 在加入 SCR-V-N 蛋白抗体的 IP 样品中检测到了 Sc-c-Myc, 在用 Sc-c-Myc 抗体 IP 的样品中检测到 N 蛋白, 表明 SCR-V-N 蛋白与 Sc-c-Myc 之间存在互作关系 (图 1-b)。

2.2 SCR-V-N 过表达载体的构建

通过 PCR 扩增获得了带有 Flag 标签序列的 SCR-V-N 基因的 ORF 片段, 长约 1 200 bp (图 2-a), 符合预期片段大小。将 PCR 产物回收并克隆至 pcDNA3.1(+) 载体中, 转化培养筛选后进行菌液鉴定, 结果显示, pcDNA-N-Flag 菌液扩增出长约 1 200 bp 的片段 (图 2-b), 经测序验证表明载体构建成功。

2.3 SCR-V-N 和 Sc-c-Myc 细胞内共定位

将 pcDNA-N-Flag 质粒转染 CPB 细胞, 转染后进行间接免疫荧光观察, 结果显示, Sc-c-Myc 可以与 SCR-V-N 在细胞质内存在共定位现象 (图版), 进一步说明了 Sc-c-Myc 可以与 SCR-V-N 相互作用。

表 2 Sc-c-Myc 免疫沉淀中鉴定出的 SCR-V 蛋白

Tab. 2 SCR-V proteins identified from the immunoprecipitation complex of Sc-c-Myc

蛋白质ID protein ID	蛋白名称 protein name	肽段强度值 intensity	覆盖率/% sequence coverage	蛋白分子量/ku MW
Q06Z40	nucleoprotein	68 329	4.5	47.44

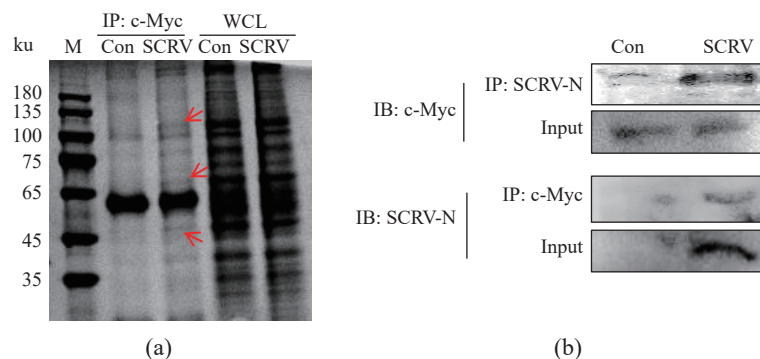


图 1 图 1 Co-IP 实验分析 SCR-V 病毒蛋白与 Sc-c-Myc 互作

(a) SDS-PAGE 分析 IP 结果; (b) N 蛋白与 Sc-c-Myc 蛋白互作分析; M. protein marker; IP. 免疫沉淀; WCL. 细胞裂解液; IB. 免疫印迹; Input. 阳性对照; 箭头. 与模拟感染对照组相比, SCR-V 感染组发现的蛋白质条带。

Fig. 1 The analysis of the interaction between SCR-V virus N protein and Sc-c-Myc by Co-IP

(a) result of IP; (b) detection of the interaction between N protein and Sc-c-Myc by Co-IP; M. protein marker; WCL. cell lysates; Input. positive control; arrows. protein bands identified in the SCR-V infection group compared to mock-infected controls.

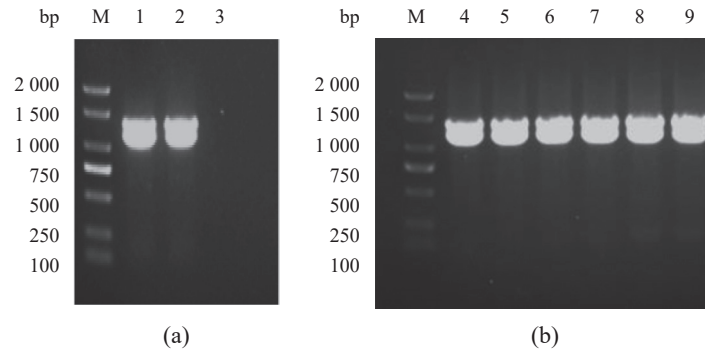
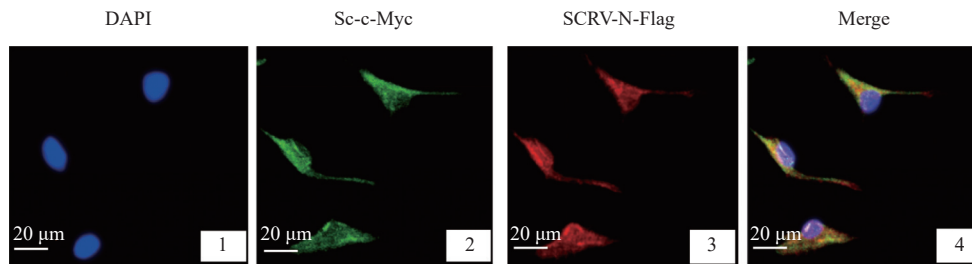


图 2 病毒 N 蛋白过表达载体的构建

(a) PCR 扩增 SCR-V-N ORF; (b) PCR 鉴定克隆菌; M. DNA Marker; 1~2. SCR-V-N ORF 样品; 3. 阴性对照; 4~9. pcDNA-N 阳性菌株。

Fig. 2 Construction of overexpressed plasmid of viral N proteins

(a) PCR amplification of SCR-V-N ORF; (b) positive strains was identified by PCR; M. DNA Marker; 1-2. SCR-V-N ORF samples; 3. negative control; 4-9. pcDNA-N positive strains.



图版 SCR-V-N 蛋白与 Sc-c-Myc 细胞荧光共定位

1. DAPI 染色细胞核; 2. 一抗孵育 Sc-c-Myc 蛋白抗体; 3. 一抗孵育 flag 蛋白抗体; 4. 细胞核、Sc-c-Myc 蛋白和 SCR-V-N-flag 蛋白共定位。比例尺: 20 μm 。

Plate SCR-V-N protein fluorescently co-located with Sc-c-Myc in CPB cells

1. Nucleus by DAPI staining; 2. incubated with the primary anti-Sc-c-Myc sera protein; 3. incubated with the primary anti- flag sera; 4. Co-localization of Sc-c-Myc, SCR-V-N-flag, and nucleus. bar: 20 μm .

2.4 转染 SCR-V-N 对 Sc-c-Myc 及谷氨酰胺代谢相关酶的影响

Co-IP 结果显示, SCR-V-N 蛋白与 Sc-c-Myc 存在互作, 但是与 Sc-c-Myc 互作后是否对 Sc-c-Myc 及谷氨酰胺代谢相关酶 (GLS1、GDH 和 IDH2) 表达有影响需进一步确定。RT-qPCR 结果显示, 与对照相比, 转染 SCR-V-N 后 Sc-c-Myc 和 GLS1 mRNA 的表达均显著上调, 与对照组相比分别上调了 2.1 倍和 3.1 倍, 但是 GDH 和 IDH2 mRNA 的表达变化不显著 (图 3-a)。WB 结果显示, 转染 SCR-V-N 后 Sc-c-Myc 和 GLS1 蛋白表达均显著升高, GDH 和 IDH2 的表达变化不显著 (图 3-b)。上述结果表明, SCR-V 可以通过其 N 蛋白与 Sc-c-Myc 互作, 促进 Sc-c-Myc 和 GLS1 的表达, 进而调控宿主细胞谷氨酰胺代谢使其发生代谢重构以供病毒复制增殖。

3 讨论

已有很多研究表明, 病毒是依靠宿主细胞的生物大分子来复制和组装新病毒粒子^[30-32]。例如脊髓灰质炎病毒 (poliomyelitis virus, PIV) 和 HCMV 依赖于葡萄糖和谷氨酰胺代谢进行有效的病毒复制^[14, 33]。之前的研究发现, SCR-V 的复制增殖依赖于谷氨酰胺和谷氨酰胺酵解途径^[20]。c-Myc 是一种转录因子, 在癌细胞和病毒感染的宿主细胞中高表达, 且能调控谷氨酰胺酵解途径限速酶 GLS1 和谷氨酰胺转运体的表达^[34-35], 从而调控谷氨酰胺代谢。目前已确定多种病毒能够调控 cMyc 促进谷氨酰胺代谢, 但是病毒如何调控 c-Myc 进而调控谷氨酰胺代谢的研究则少有报道。

SCR-V 的 N 蛋白具有调控病毒复制与转录的作用, 且较为保守^[36], 但是对于 SCR-V 的 N 蛋白调控代谢功能的研究未有报道。实验通过免疫共

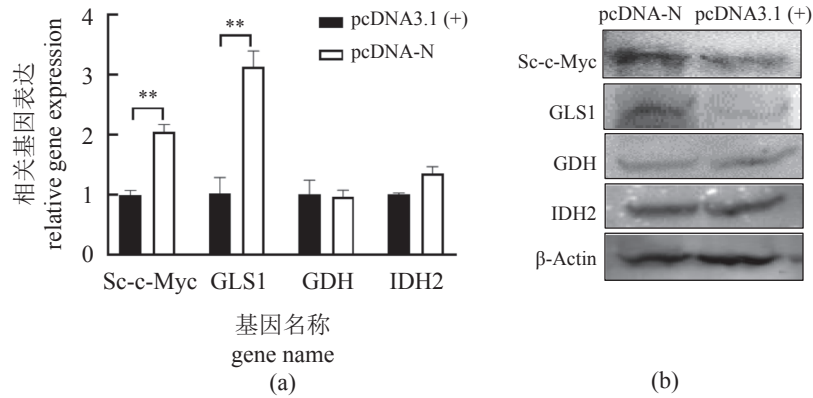


图3 转染 SCR-V-N 对 Sc-c-Myc、GLS1、GDH 和 IDH2 的影响

(a) mRNA 表达情况; (b) 蛋白表达情况; “**”代表显著差异, $P < 0.05$, “***”代表极显著差异, $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Effects of SCR-V-N transfection on Sc-c-Myc, GLS1, GDH and IDH2

(a) mRNA expression; (b) proteins expression; “**”represents significant difference, $P < 0.05$, “***”represents very significant difference, $P < 0.01$.

沉淀、细胞共定位等确定 SCR-V 的 N 蛋白与 Sc-c-Myc 存在互作关系。有报道表明, 病毒蛋白可以通过修饰 c-Myc 蛋白稳定性或调节 c-Myc 蛋白的活性来促进 c-Myc 的表达, 进而调控谷氨酰胺代谢^[37-38]。如 ADV 的 *E4ORF1* 基因产物可以与 c-Myc 结合, 通过 cMyc 抑制 miR-23a 上调参与重编程宿主细胞谷氨酰胺代谢^[23]; EBV 的 LMP1 蛋白可以通过增强 c-Myc 与 IDH2 启动子的结合, 使 IDH2 高表达, 从而重构宿主细胞的谷氨酰胺还原性代谢途径来满足自身的复制增殖^[39]。该研究发现, 转染 SCR-V-N 蛋白可以上调 Sc-c-Myc 和 GLS1 的表达, 说明 SCR-V 是通过 N 蛋白与 Sc-c-Myc 互作调控谷氨酰胺代谢。但本实验结果显示 GDH 和 IDH2 的表达无显著变化。GDH、IDH2 是谷氨酰胺代谢途径的关键酶, 但是其表达受 GLS 催化产物谷氨酸等代谢物的调控, 我们推测由于转染的质粒并不能模拟病毒复制, 因此, 虽然 GLS 表达提高, 但是为了维持细胞的稳态, 推测谷氨酸进入谷胱甘肽合成途径生成谷胱甘肽, 而未进入酵解途径和还原性途径, 因此, 依赖于底物调节的 GDH、IDH2 的表达无显著上调。

综上所述, SCR-V 通过 N 蛋白与宿主 Sc-c-Myc 互作, 从而调控谷氨酰胺代谢途径来满足自身复制增殖的需要。本实验针对 SCR-V 如何通过与 Sc-c-Myc 相互作用进而调控谷氨酰胺代谢这一科学问题, 研究了 Sc-c-Myc 在 SCR-V 感染诱导谷氨酰胺代谢重构中的作用, 发现了 SCR-V 通过 N 蛋白与宿主 Sc-c-Myc 互作, 初步揭示了 SCR-V 感染诱导谷氨酰胺代谢重构的分子机制, 这为阐明 SCR-V 致病机制和防治鳃弹状病毒病提供理论基

础和新思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 张奇亚, 李正秋. 在患病鳃鱼组织中观察到 3 种病毒 [J]. 科学通报, 1999, 44(2): 192-195.
Zhang Q Y, Li Z Q. Three different viruses observed from the tissues of diseased mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(5): 437-441.
- [2] Fu X Z, Lin Q, Liang H R, et al. The biological features and genetic diversity of novel fish rhabdovirus isolates in China[J]. Archives of Virology, 2017, 162(9): 2829-2834.
- [3] Walker P J, Freitas-Astúa J, Bejerman N, et al. ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae 2022[J]. Journal of General Virology, 2022, 103(6): 001689.
- [4] 陶建军. 鳃鱼弹状病毒的分离、鉴定及基因组测序分析 [D]. 北京: 中国科学院研究生院 (水生生物研究所), 2006.
Tao J J. Isolation, identification and complete genomic sequence analysis of the mandarin fish *Siniperca chuatsi* rhabdovirus[D]. Beijing: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2006 (in Chinese).
- [5] Lévy P, Bartosch B. Metabolic reprogramming: a hallmark of viral oncogenesis[J]. Oncogene, 2016, 35(32): 4155-4164.
- [6] Fontaine K A, Sanchez E L, Camarda R, et al. Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replica-

- tion[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(4): 2358-2366.
- [7] Sanchez E L, Lagunoff M. Viral activation of cellular metabolism[J]. *Virology*, 2015, 479-480: 609-618.
- [8] Mesquita I, Estaquier J. Viral manipulation of the host metabolic network[M]//Silvestre R, Torrado E. *Metabolic Interaction in Infection*. Cham: Springer, 2018: 377-401.
- [9] Moreno-Altamirano M M B, Kolstoe S E, Sánchez-García F J. Virus control of cell metabolism for replication and evasion of host immune responses[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 95.
- [10] DeBerardinis R J, Lum J J, Hatzivassiliou J, et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation[J]. *Cell Metabolism*, 2008, 7(1): 11-20.
- [11] Holleran A L, Briscoe D A, Fiskum G, et al. Glutamine metabolism in AS-30D hepatoma cells. Evidence for its conversion into lipids via reductive carboxylation[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1995, 152(2): 95-101.
- [12] Yoo H, Antoniewicz M R, Stephanopoulos G, et al. Quantifying reductive carboxylation flux of glutamine to lipid in a brown adipocyte cell line[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(30): 20621-20627.
- [13] Polcicova K, Badurova L, Tomaskova J. Metabolic reprogramming as a feast for virus replication[J]. *Acta Virologica*, 2020, 64(2): 201-215.
- [14] Chambers J W, Maguire T G, Alwine J C. Glutamine metabolism is essential for human cytomegalovirus infection[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(4): 1867-1873.
- [15] Fontaine K A, Camarda R, Lagunoff M. Vaccinia virus requires glutamine but not glucose for efficient replication[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(8): 4366-4374.
- [16] Fu X Z, Hu X Q, Li N Q, et al. Glutamine and glutaminolysis are required for efficient replication of infectious spleen and kidney necrosis virus in Chinese perch brain cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 2400-2412.
- [17] Sun L D, Yi L Z, Zhang C, et al. Glutamine is required for snakehead fish vesiculovirus propagation via replenishing the tricarboxylic acid cycle[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(11): 2849-2855.
- [18] Li C Y, Wang Y J, Huang S W, et al. Replication of the shrimp virus WSSV depends on glutamate-driven anaplerosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e146902.
- [19] Asim M, Jiang S J, Yi L Z, et al. Glutamine is required for red-spotted grouper nervous necrosis virus replication via replenishing the tricarboxylic acid cycle[J]. *Virus Research*, 2017, 227: 245-248.
- [20] 郭茜茜, 付小哲, 梁红茹, 等. 鳃弹状病毒调控谷氨酰胺还原性代谢途径促进自身增殖 [J]. *中国水产科学*, 2019, 26(5): 993-1003.
- Guo X X, Fu X Z, Liang H R, et al. Reductive glutamine metabolism promotes the efficient replication of *Siniperca chuatsi* rhabdovirus in Chinese perch brain cells[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(5): 993-1003 (in Chinese).
- [21] Yeh E, Cunningham M, Arnold H, et al. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2004, 6(4): 308-318.
- [22] Higashino F, Aoyagi M, Takahashi A, et al. Adenovirus E4orf6 targets pp32/LANP to control the fate of ARE-containing mRNAs by perturbing the CRM1-dependent mechanism[J]. *Journal of Cell Biology*, 2005, 170(1): 15-20.
- [23] Thai M, Thaker S K, Feng J, et al. MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication[J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 8873.
- [24] Cai Q L, Lan K, Verma S C, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent protein LANA interacts with HIF-1 α to upregulate RTA expression during hypoxia: latency control under low oxygen conditions[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(16): 7965-7975.
- [25] Liu J Y, Martin H J, Liao G L, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA protein stabilizes and activates c-Myc[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(19): 10451-10459.
- [26] Ye C M, Liu S G, Li N Q, et al. Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) p53 Regulates glutaminolysis induced by virus via the p53/mir145-5p/c-Myc pathway in Chinese perch brain cells[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0272721.
- [27] Fu X, Li N, Lai Y, et al. A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization[J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(1): 32-45.

- [28] Fu X Z, Li N Q, Liu L H, *et al.* Genotype and host range analysis of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)[J]. *Virus Genes*, 2011, 42(1): 97-109.
- [29] Ye C M, Li N Q, Niu Y J, *et al.* Characterization and function of mandarin fish c-Myc during viral infection process[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 120: 686-694.
- [30] Vastag L, Koyuncu E, Grady S L, *et al.* Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(7): e1002124.
- [31] Sanchez E L, Carroll P A, Thalhofer A B, *et al.* Latent KSHV infected endothelial cells are glutamine addicted and require glutaminolysis for survival[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(7): e1005052.
- [32] Smallwood H S, Duan S S, Morfouace M, *et al.* Targeting metabolic reprogramming by influenza infection for therapeutic intervention[J]. *Cell Reports*, 2017, 19(8): 1640-1653.
- [33] Eagle H, Habel K. The nutritional requirements for the propagation of poliomyelitis virus by the HeLa cell[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1956, 104(2): 271-287.
- [34] Shen Y A, Hong J X, Asaka R, *et al.* Inhibition of the MYC-regulated glutaminase metabolic axis is an effective synthetic lethal approach for treating chemoresistant ovarian cancers[J]. *Cancer Research*, 2020, 80(20): 4514-4526.
- [35] Panda S, Banerjee N, Chatterjee S. Solute carrier proteins and c-Myc: a strong connection in cancer progression[J]. *Drug Discovery Today*, 2020, 25(5): 891-900.
- [36] Banerjee A K. Transcription and replication of rhabdoviruses[J]. *Microbiological Reviews*, 1987, 51(1): 66-87.
- [37] Baresova P, Pitha P M, Lubyova B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus vIRF-3 protein binds to F-box of Skp2 protein and acts as a regulator of c-Myc protein function and stability[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(20): 16199-16208.
- [38] 杨航, 杨晶欣, 郑兰兰, 等. 核糖体蛋白 25(RPS25) 通过调节 c-Myc 促进肾透明细胞癌的发生发展 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(8): 1168-1184.
- Yang H, Yang J X, Zheng L L, *et al.* Ribosomal protein 25(RPS25) promotes the development of renal transparent cell carcinoma through regulating c-Myc[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2019, 39(8): 1168-1184 (in Chinese).
- [39] Shi F, He Y, Li J J, *et al.* Wild-type IDH2 contributes to Epstein-Barr virus-dependent metabolic alterations and tumorigenesis[J]. *Molecular Metabolism*, 2020, 36: 100966.

Identification of interaction between SCRV-N protein and Sc-c-Myc and its regulation of glutamine metabolism

ZHANG Qiushuang^{1,2}, YE Caimei^{1,2}, NIU Yinjie¹, LIN Qiang¹, LIANG Hongru¹,
LUO Xia¹, LI Ningqiu^{1*}, FU Xiaozhe^{1*}

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology and Green Breeding, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of

Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: With the continuous development of *Siniperca chuatsi* culture technology, the scale of *S. chuatsi* culture industry in China has been expanding. However, in recent years, outbreaks of *S. chuatsi* viral diseases have become more frequent, causing serious economic losses to farmers. Among them, *S. chuatsi* rhabdovirus (SCRV) disease is one of the most common diseases. Viruses are non-cellular organisms that rely on host cell metabolism to complete their replication and proliferation, and viruses induce host cell metabolic reprogramming to rapidly obtain the biomolecules and energy required for viral replication and proliferation, including glycolysis, glutamine metabolism, lipid metabolism, nucleotide biosynthesis and so on. In turn, c-Myc is a key transcription factor that regulates cellular metabolism, and can regulate the expression of glutaminase1 (GLS1), the rate-limiting enzyme of the glutaminase pathway, thereby regulating glutamine metabolism. Moreover, viruses can alter c-Myc protein stability or activity by encoding viral proteins that interact directly or indirectly with c-Myc, thereby regulating cellular metabolism. Therefore, in order to study the molecular mechanism of how SCRV regulates Sc-c-Myc and then regulates glutamine metabolism, the viral protein probably interacting with Sc-c-Myc was identified and analyzed by co-immunoprecipitation (Co-IP) and protein mass spectrometry in this study. SDS-PAGE results showed the specific protein bands of 45-65, 65-75, and 100-130 ku in SCRV-infected cells, and protein profiling showed that one viral protein was identified in the Sc-c-Myc IP sample, which was the nucleoprotein (N) of the SCRV, and the peptide intensity value of the hit was high. The Co-IP results showed that SCRV-N interacted with Sc-c-Myc. The SCRV-N ORF with Flag tag was obtained by PCR, and the pcDNA-N-Flag plasmid was constructed. Then pcDNA-N-Flag plasmids were transfected into Chinese perch brain cells (CPB cells), and fluorescence microscopy observation found that SCRV-N colocalized with Sc-c-Myc in the cytoplasm. Furthermore, quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression changes of Sc-c-Myc and key enzymes in the glutamine metabolism pathway (GLS1, GDH, and IDH2) in CPB cells transfected with pcDNA-N-Flag. RT-qPCR results showed that compared with the control, the expression of Sc-c-Myc and GLS1 mRNA was significantly upregulated after transfection with SCRV-N, increasing by 2.1 and 3.1 times, respectively, while the expression changes of GDH and IDH2 mRNA were not significant. Western blot results showed that the expression of Sc-c-Myc and GLS1 protein was significantly increased after transfection with SCRV-N, while the expression changes of GDH and IDH2 were not significant. In summary, it is observed that SCRV interacts with Sc-c-Myc through the N protein, thereby regulating the glutamine metabolism pathway to meet its own replication and proliferation needs. This study aimed to explore how SCRV regulates glutamine metabolism by interacting with Sc-c-Myc, investigating the role of Sc-c-Myc in SCRV-induced glutamine metabolism remodeling. The findings reveal that SCRV interacts with the Sc-c-Myc through the N protein, preliminarily uncovering the molecular mechanism of SCRV-induced glutamine metabolism remodeling. Therefore, it provides a theoretical basis and new insights for understanding the pathogenic mechanism of SCRV and for the prevention and treatment of SCRV.

Key words: *Siniperca chuatsi*; *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV); Sc-c-Myc; protein interaction; glutamine metabolism

Corresponding authors: FU Xiaozhe. E-mail: fuxiaozhe-1998@163.com;

LI Ningqiu. E-mail: liningq@126.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400701); Key Research and Development Program of Guangzhou City (2024B03J1263); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD48)