

冷激蛋白 CspA 家族

王振雄 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 冷激蛋白 CspA 家族在细菌适应低温环境方面起到重要作用。介绍了冷激反应的生理特征以及 CspA 家族的广泛性, CspA 家族结构、功能和诱导调控研究的最新进展。

关键词 冷激蛋白, CspA, 结构, 功能, 调节

分类号 Q51 **文献标识码** B **文章编号** 1000-3061(1999)02-0131-34

微生物具有很强的适应能力,当生活环境发生改变时,它们会迅速发生生理反应以适应这种变化了的环境。比如微生物中广泛存在的应激蛋白(Stress protein),它们往往由环境变化而诱导产生,能帮助细胞在新的环境下完成其生理功能。近十几年来,热激蛋白已经成为研究热点,这是因为一些热激蛋白可以作为蛋白质分子伴侣(Chaperone),帮助蛋白质正确折叠。目前冷激蛋白(CSP)的研究也正在悄然兴起,冷激蛋白在细胞适应低温环境和增强抗冻性方面起着极其重要的作用。比如,乳酸乳球菌在-20℃冷冻保存24h,其存活率大大下降,可是,如果冷冻前于10℃冷激2h,其存活率显著提高^[1]。

Escherichia coli 冷激后会发生一定的生理反应。从37℃转移到10℃的环境,它的生长会出现大约4h的暂时停滞。在这期间,绝大多数蛋白质的合成受到抑制,仅有24种蛋白被合成,其中14种是被暂时诱导的,它们当中许多在细胞的生理活动中起着非常重要的作用^[2,3]。4h后,其它蛋白质的合成逐渐恢复,*E. coli* 的生长得以继续,但生长速度非常缓慢。冷激反应的强度与导致冷激反应的温度差成正比,即温度下降越多,冷激反应越强烈。在*E. coli* 中,温度下降13℃即可导致冷激反应^[2]。与*E. coli* 不同,*Bacillus subtilis* 冷激后不会出现生长停滞期,而是持续低速生长。冷激后30~60min内,有36种蛋白被冷激诱导^[3]。

1 CspA 家族及其广泛性

在*E. coli* 的冷激蛋白中,CspA是最引人注目的。从37℃转移到10℃冷激,CspA表达量会增加200倍,它的合成占全部蛋白合成的13%^[4]。CspA是冷激后第一个被诱导产生的蛋白,也是唯一的在37℃检测不到的冷激蛋白^[3]。CspA在冷激反应中扮演着极其重要的角色,它已经成为研究的重点。CspA及其同源的CspB-1蛋白被称作CspA家族^[5]。

E. coli 的CspA家族包括9个成员。它们的等电点在5.53到10.72之间,氨基酸残基数目从69到74不等,具有比较高的序列同源性。如果从序列同源性差别上分,CspF和CspH可分在同一组,其它成员则被分在另一组。除了序列同源性以外,这两组成员中一个重要不同在于芳香族氨基酸含量,前者的含量远低于后者,而高含量的芳香族氨基酸是与RNA结合所必须的^[6]。

CspA家族在*B. subtilis* 中存在有CspB、CspC、CspD^[3],其中CspB与*E. coli* 的CspA具有61%的序列同源性。在嗜冷菌*B. cereus* 中,发现有CspA-E^[7]。Frnacis, K. P. 设计了一套通用寡核苷酸引物,采用PCR的方法,从超过30种革兰氏阴性和阳性细菌中扩增出长200个碱基对的DNA序列,通过分析证实,它们具有相当高的DNA序列同源性,这些细菌来自不同的属,包括*Lactococcus*、*Listeria*、*Pedioco-*

ccus、*Photobacterium*、*Proteus*、*Salmonella*、*Shigella*、*Staphylococcus*、*Streptococcus* and *Yersinia*^[8]。使人惊奇的是它们与真核 Y-BOX 转录因子的冷激域 (Cold shock domain) 也有 43% 的同源性^[9]。不过 CspA 家族并非总是以多基因形式存在的, *H. influenza* 中就仅存在 CspD。而且, 并非所有的原核生物都存在 CspA 家族, 从基因组序列分析, 肺炎枝原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) 和生殖道枝原体 (*Mycoplasma genitalium*)、蓝细菌 PCC6803 (*Synechocystis* PCC 6803)、詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 中就不存在^[6]。

2 结 构

E. coli 的 CspA 包括了 5 个反平行的 β 链 ($\beta 1 \sim \beta 5$) 形成由 2 个 β 折叠构成的折叠桶结构。其中一个 β 折叠包含 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 拥有总共 8 个芳香族氨基酸中的 7 个, 并且在溶液中都暴露在外表面, 由此形成了 2 个可与 RNA 结合的基元 (motif) RNP1 和 RNP2^[10]。*B. subtilis* 的 CspB 也有类似的 β 折叠结构, 其表面 3 个暴露的 phe 残基帮助其行使结合单链核苷酸的功能。不仅如此, 如果这 3 个残基分别被 Ala 替代, CspB 就变得不稳定了, 说明这 3 个 Phe 残基不仅有结合核苷酸的功能, 而且还起到稳定 CspB 结构的作用^[11]。在所有的 CspA 家族成员中, 一些参与形成 β 折叠结构的氨基酸残基总是很保守的, 这暗示了它们都形成类似的 β 折叠结构^[10]。这种折叠桶结构首先是在核糖体蛋白 S1 上发现的, 故称作 S1 结构域 (S1 domain), 后来在大量的 RNA 结合蛋白上都发现了 S1 结构域。它的特点是在 β 折叠表面上有一些保守的氨基酸残基, 它们与临近的环 (loop) 会形成一个可能的 RNA 结合位点。据推测, 这些具有 S1 结构域的蛋白都可能来自早期的 RNA 结合蛋白^[12]。

3 功 能

前边已从结构上表明, 由于存在 S1 结构域, CspA 可能起到 RNA 结合蛋白的作用。最近 Jiang. W 等^[13]提出 CspA 可能是 RNA 分子伴侣。*E. coli* 的 CspA 可与热变性的单链 RNA 结合, 使电泳迁移率改变。这种结合所需要的 CspA 最低浓度为 2.7×10^{-5} mol/L, 据估计, 冷激细胞中的 CspA 浓度大约为 10^{-4} mol/L。RNA 中并不存在与之特异结合的序列, 表明它们的结合是非特异性的。而且, 当 CspA mRNA 的 5' 非翻译区 142 个碱基被用作核糖核酸酶 A 和 T1 的底物时, 加入 CspA 可以显著提高核糖核酸酶的效率, 这是因为 CspA 会阻止 mRNA 形成对抗核糖核酸酶的稳定二级结构。同样, 在低温下, CspA 也会起到 RNA 分子伴侣的作用, 阻止 RNA 分子形成二级结构, 这个作用对有效的翻译是非常关键的, 它对转录也有一定影响。另一些研究表明, 在 *E. coli* 中, CspA 家族成员的功能具有互补性。CspA 缺失的突变体 Δ CspA 细胞在冷激后, CspB 和 CspG 表达量增加, 表达时间延长, 说明 CspB 和 CspG 能在一定程度上弥补 CspA 的功能^[14]。

对 *E. coli* 的研究表明^[6] CspA 家族按其功能可分为 5 组: 1) CspA、CspB、CspG 参与对低温的适应, 2) CspD 参与营养压力反应, 3) CspC、CspE 参与转录调控, 4) CspF 和 CspH 功能未知, 但其结构与其它成员明显不同, 5) CspI 功能未知。

通过对 *B. subtilis* 研究, Graumann. P^[15]等也认为 Csp 家族作为 RNA 分子伴侣在低温下帮助翻译的起始。*B. subtilis* 的 CspB、CspC、CspD 都是小的酸性蛋白, 同源性大于 70%。单个 CspC 或 CspD 基因的缺失都不会引起明显的表型变化, 而双突变体则在 15°C 和 37°C 下的细胞生长明显下降, 通过双向电泳分析, 双突变体中蛋白质合成下降, 并且一两种 Csp 的缺失会导致其余 Csp 合成的增加。除非引入一个携带有 CspB 的质粒, 否则三基因缺失突变体将无法生存。当将 *B. subtilis* CspB 基因于 37°C 在 *E. coli* 中表达, 此时 *E. coli* 本身的 CspA、CspB 是不存在的, 它将导致细胞生长速率的明显下降, 并且对其蛋白合成模式也有很大的影响, 比如, 以前依赖于 CspA 的蛋白 H-NS 的转录和合成现在都增加了, 说明 *B. subtilis* CspB 与 *E. coli* CspA 有相似的功能。

4 诱导调控

在 *E. coli* 中,调控方面的研究开展较多,它包括转录和翻译的调控。目前主要集中在以下几方面:

4.1 冷框(Cold Box)^[16,17]

CspA mRNA 有一个长长的 5'非翻译区(5'UTR),其中一段长 11 个核苷酸的保守序列称为冷框。以前的研究表明,冷激后细胞有一个冷适应延滞期,在此阶段 CspA 大量表达,而其它蛋白质表达被抑制,在延滞末期,其它蛋白开始表达,CspA 的表达则被抑制。可是当含有冷框的 5'UTR 序列被过量产生时,延滞末期的 CspA 表达被抑制现象就消失了,如果将 5'UTR 中的冷框破坏,或者过量表达 CspA,抑制现象又会重新出现。说明 CspA 和冷框在转录水平起着十分重要的调节作用。

4.2 CspA 自身^[4]

来自于染色体 CspA::Cat 基因的 5'UTR 在冷激后没有被抑制,而当一个独立生产 CspA 的系统被引入 deltaCspA 菌株时,CspA::Cat 基因的 5'UTR 产生量大大下降,研究表明,CspA 强烈调节着它自身的产生,这种调节主要是在转录水平。同时,作为 RNA 分子伴侣,CspA 使 mRNA 的二级结构变得不稳定,易受到核糖核酸酶的降解,起到调节表达的作用。

4.3 5'UTR^[18]

CspA 的 5'UTR 对其 mRNA 稳定性有很大影响。当在 Shine-Dalgarno 序列中有 3 个碱基被替换,其 mRNA 的稳定性提高了 150 倍,因而使得在 CspA 在 37°C 也能持续表达。

4.4 BD 框(Downstream Box)^[19]

启动密码子下游 12 个碱基处有一个长 14 个碱基的 BD 框,它与 16sRNA 的一段区域互补,它对生长延滞期的翻译是必须的,在此期间,其它蛋白由于缺乏冷激特异的核糖体因子,难以形成翻译起始复合物,导致非冷激蛋白的翻译在低温下难以进行。在 DB 框的帮助下,冷激蛋白则可以进行翻译。

4.5 启动子

CspA 基因-35 区上游的富 AT 序列(-47 到 -38)在 37°C 和 15°C 的转录都起到关键作用^[19];启动子核心部分(-40 到 +16)会对冷激产生响应,在 -36 位置的一个突变在低温下会使启动子活性提高 3 倍^[20]; -40 上游序列能促进 37°C 表达,但对冷激无响应;下降序列(+81 到 +165)于 37°C 降低了其表达能力,但增加了冷激反应的强度,在 GCACATCA 和 CCAAT 结构中的突变不会影响冷激反应;冷激以后,蛋白质合成的机制可能发生改变,即优先翻译 CspA mRNA。

4.6 RbfA^[21]

冷激蛋白 RbfA 是一个 30S 核糖体结合因子,参与核糖体的成熟和翻译的起始。它的缺乏会触发冷激反应。低温下,核糖体因对冷不适应而失去翻译的能力,它可以使之恢复这种能力。

4.7 CspD^[22]

它尽管与 CspA 具有很高的同源性,但其表达却不是冷激所诱导的,它的诱导主要发生在稳态生长期,且不依赖稳态期 Sigma 因子。它的表达取决于生长速度,而且可被葡萄糖饥饿所诱导(P)PPGPP 是其表达的一个正调节因子。

4.8 (P)PPGPP^[23]

(P)PPGPP 水平也是影响冷激反应的一个因素。在冷激前增加(P)PPGPP 水平,会使冷激诱导水平下降,而突变体 relAspoI(几乎不产生(P)PPGPP)冷激后,则诱导出大量的冷激蛋白。

4.9 对其它蛋白的调控^[24]

CspA 可能对其它冷激蛋白起正调控作用。当过量表达时,冷激后会加速 CIP,G55.0,G41.2 和 GyrA 的合成。从凝胶迁移实验得知,CspA 可以结合 gyrA 启动子区的 ATTGG 序列。

总之,越来越多的实验结果表明,冷激蛋白在帮助细胞适应低温环境方面起到很重要的作用。CspA 家族无疑是研究冷激蛋白的关键,尽管对其功能、结构、调控的研究已经取得一些进展,但是目前的研究

工作大多仍然处于探索阶段,所提出的种种假设需要进一步的实验来验证,尤其在功能研究方面还有很多的工作要做。

参 考 文 献

- [1] W. S. Kim , N. W. Dunn. *Curr. Microbiol.* ,1997 **35** (1) :59~63.
- [2] P. G. Jones , M. Cashel , G. Glaser *et al.* *J. Bacteriol.* ,1992 **174** :3903~3914.
- [3] P. Graumann , M. A. Marahiel. *Arch. Microbiol.* ,1996 **166** :293~300.
- [4] P. G. Jones , R. A. VanBogelen , E. C. Neidhard. *J. Bacteriol.* ,1987 **169** :2092~2095.
- [5] S. F. Altschul , W. Gish , W. Miller *et al.* *J. Mol. Biol.* ,1990 **215** :403~410.
- [6] K. Yamanaka , L. Fang , M. Inouye. *Mol. Microbiol.* ,1998 **27** (2) :247~255.
- [7] B. Mayr , T. Kaplan , S. Lechner *et al.* *J. Bacteriol.* ,1996 **178** :2916~2925.
- [8] K. P. Francis , G. S. Stewart. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* ,1997 **19** :286~293.
- [9] G. Wistow. *Nature* ,1990 **344** :823~824.
- [10] K. Newkirk , W. Feng , W. Jiang *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* ,1994 **91** :5114~5118.
- [11] T. Schindler , D. Perl , P. Graumann *et al.* *Proteins.* ,1998 **30** (4) :401~406.
- [12] M. Bycroft , T. J. Hubbard , M. Proctor *et al.* *Cell* ,1997 **88** :235~242.
- [13] W. Jiang , Y. Hou , M. Inouye. *J. Bio. Chem.* ,1997 **272** :196~202.
- [14] W. Bae , P. G. Jones , M. Inouye. *J. Bacteriol.* ,1997 **179** :7081~7088.
- [15] P. Graumann , T. M. Wendrich , M. H. Weber *et al.* *Mol. Microbiol.* ,1997 **25** :741~756.
- [16] L. Fang , Y. Hou , M. Inouye. *J. Bacteriol.* ,1998 **180** :90~95.
- [17] W. Jiang , L. Fang , M. Inouye. *J. Bacteriol.* ,1996 **178** :4919~4925.
- [18] L. Fang , W. Jiang , W. Bae *et al.* *Mol. Microbiol.* ,1997 **23** :355~364.
- [19] M. Mitta , L. Fang , M. Inouye. *Mol. Microbiol.* ,1997 **26** :321~335.
- [20] D. Goldenberg , I. Azar , A. B. Oppenheim *et al.* *Mol. Gen. Genet.* ,1997 **256** :282~290.
- [21] P. G. Jones , M. Inouye. *Mol. Microbiol.* ,1996 **21** :1207~1218.
- [22] K. Yamanaka , M. Inouye. *J. Bacteriol.* ,1997 **179** :5126~5130.
- [23] P. G. Jones , M. Inouye. *Mol. Microbiol.* ,1994 **11** :815~818.
- [24] P. G. Jones , R. Krah , S. Tarfuri *et al.* *J. Bacteriol.* ,1974 **74** :5798~5802.

Cold Shock Protein-CspA Family

Wang Zhenxiong Zhou Peijin

(*Institute of Microbiology , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080*)

Abstract CspA family in bacteria plays an important role for cold adaption. A brief introduction to the physiology of the cold shock protein (CSP) and the conservation of CspA family in a variety of bacteria is given ; the recent research advances in structure , function and regulation of induction of CspA family are described in more detail.

Key words CspA , structure , function , regulation