

# 抗冻肽的研究和应用

商慧深 许政恺

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

## 提 要

抗冻肽是一些寒带动物在秋季体内产生的一类能降低细胞间液体冰点的多肽或糖肽。文内综述抗冻肽的研究进展, 重点介绍抗冻肽分子的结构和功能。

**关键词** 抗冻肽, 结构, 基因表达, 抗冻机制

抗冻肽 (antifreeze peptide, AFP) 是一些寒带鱼类和一些在极地生活的昆虫、蜘蛛等小动物在秋、冬季体内产生的一类能降低细胞间液体冰点的多肽或糖肽 (antifreeze glycopeptide)。它能使鱼类在冰水中生活, 而不致于体液结冰。近年来, 国内外学者对抗冻肽的结构与功能的相互关系进行了大量研究, 陆续发表了抗冻肽的蛋白序列及碱基序列, 并对各种不同来源的抗冻肽进行了同源分析。本文从抗冻肽的结构、功能、生物合成、多基因簇的结构以及抗冻肽在别的生物体内的表达、应用等方面作一介绍。

## 1 抗冻肽的结构

目前已发现的抗冻肽有四种类型: a. 富含丙氨酸重复序列, 具有  $\alpha$  螺旋结构的多肽, 其间散布着一些极性氨基酸片段, 主要以美洲拟鲽<sup>[1]</sup>为代表。b. 富含胱氨酸的、具有  $\beta$  结构的多肽<sup>[2]</sup>。c. 不同于以上两种, 无一定结构的多肽<sup>[3]</sup>。d. 抗冻糖肽<sup>[4]</sup>。

**1.1 富含丙氨酸的抗冻肽** Duman 和 DeVries 首先从美洲拟鲽 (*Pseudopleuronectes americanus*) 血清中分离出三种分子量分别为 12kD, 8kD 和 6kD 的富含丙氨酸的抗冻肽<sup>[5]</sup>, 并按它们从 DE AE 柱上洗脱下的先后顺序编号。Hew 和 Yip<sup>[6]</sup> 从美洲拟鲽的血清中发现分子量为 10kD 的具有抗冻活力的蛋白。从氨

基酸顺序分析的资料来看, Duman 和 DeVries 用凝胶过滤和 SDS 凝胶电泳估计的分子量为 12kD 的蛋白就是 Hew 和 Yip 估计的分子量为 10kD 的蛋白。

Davies<sup>[1]</sup> 等用反相高压液相层析法证明这个分子量为 10 kD 的蛋白含有 A 和 B 两组分, 两者都能降低冰点。他们从美洲拟鲽的抗冻肽 mRNA 建立了抗冻肽的 cDNA 克隆。从 DNA 序列分析推断, 成熟的抗冻肽有 37 个氨基酸, 它具有三个 11 肽段的重复性结构单位。这与 Lin 和 Gross<sup>[7]</sup> 的发现一致。

Fourney<sup>[8]</sup> 用反相高压液相层析从美洲拟鲽的抗冻肽中分离出 7 个不同的组分。其中 5 个组分分子量都在 3.3kD 左右, 其氨基酸组成都相似。另外 2 个组分的分子量在 4.5 kD 左右, 并含有缬氨酸。其中的 6, 8 两组分(按出峰的次序划分)就是 Davies 等发现的 A, B 两组分<sup>[1]</sup>。

虽然在美洲拟鲽中, 三重重复肽段的抗冻肽占绝对优势, 但 Gourlie 等<sup>[9]</sup>也在 cDNA 水平上发现了一种 4 重复肽段的抗冻肽。Lin 和 Gross<sup>[7]</sup> 还在基因文库基础上报道了一种 5 重复肽段的抗冻肽。

**1.2 富含胱氨酸的具有  $\beta$ -折叠结构的抗冻肽**<sup>[2]</sup> 以绒杜父鱼 (*Hemitripterus americana*)

nus) 为代表。这类抗冻肽的一个显著特点是富含胱氨酸。还原剂(如二硫苏糖醇)会降低其活力。

**1.3 以美洲大绵鲡 (*Macrozoarces americanus*) 为代表的第三类抗冻肽<sup>[10]</sup>** 它们的氨基酸组成没有明显的偏向性, 也没有一定的二级结构。

Hew 等<sup>[11]</sup>发现, 美洲大绵鲡的抗冻肽的分子量都在 6kD 到 7kD 之间。由于它们在离子交换层析柱上的色谱行为不同而被分成 5 个组。其中一个组结合于 QAE-Sephadex (QAE-1) 柱上而被命名为 QAE-1。另外 4 组能结合于 SP-Sephadex 而被分别称作 SP-1 至 4。在反相高压液相色谱上, QAE-1 组显示单峰; 而 SP 组中的每一个都含有 12 个组分。除了在离子交换层析柱上的结合特性不同之外, QAE-1 组与所有的 SP 组分在免疫交叉活力方面也不同。抗 QAE-1 的抗血清对 SP 组分没什么反应, 反之亦然。

**1.4 抗冻糖肽** 抗冻糖肽的主要代表是南极鳕鱼 (*Antarctic nototheniid*)。它们产生类似的或几乎完全相同的抗冻糖肽。这是一些各种长度的糖三肽的多聚体。其结构是丙氨酸-丙氨酸-苏氨酸通过一个配糖键与双糖-半乳糖-N-乙酰半乳糖胺相连 (Ala-Thr-Ala)<sub>n</sub>, 其顺序是 G(β-1 → 3)-GalNAc-(α-0-)<sup>[12]</sup>。

## 2 抗冻机制

抗冻肽都是在低于溶液的平衡冰点之下的温度时, 阻止冰晶生长。虽然各种抗冻肽效力不同, 但它们都在类似的温度范围内抑制冰晶生成。这表明所有的抗冻肽都以同样的机制起作用。

抗冻(糖)肽的作用机制还未完全知道, 它们不是作为溶质而使水溶液冰点下降, 而是吸附于冰晶表面, 降低水的冰点<sup>[12]</sup>。抗冻肽吸附于冰晶表面的证据是: 当冰晶在溶液生长时, 抗冻肽不像其它溶质那样会被浓缩于液相。抗冻肽还能改变冰晶在溶液生长的惯态。在高浓度的抗冻肽溶液中 (10mg/ml) 生长的冰晶

特征性地长成细长针状体。

抗冻肽吸附在冰晶上的机制也不清楚, 然而, 氢键肯定参与吸附。因为所有的羟基、羧基和氨基都能与冰晶格中的氧原子和氢原子形成 H 键。假定抗冻肽分子中的羟基、羧基和氨基的空间排列都有利于它们与冰晶格中的水分子结合, 那么具有最多氢键的抗冻肽与水(冰)有最强的吸附力。

DeVries 和 Lin<sup>[13]</sup> 对美洲拟鲈的抗冻肽进行了序列研究。这些富含丙氨酸的抗冻肽是 α-螺旋结构。主要组分是 37 个氨基酸长的片段, 由三个 11 氨基酸的重复肽段组成, 其模式为 Thr-(Xaa)<sub>2</sub>-Asx-(Xaa)<sub>7</sub>。这里的 Xaa 基本上全是丙氨酸。每 11 个氨基酸的肽段组成 1 个完整的 α-螺旋, 共有 3 个 α-螺旋。其中, 前两个 α-螺旋上亲水的 Thr 和 Asx 侧链都在 α-螺旋的同侧。据此, 他们提出了一个更详细的分子模型: 抗冻肽 α-螺旋上所有亲水的 Thr 和 Asn 都突起在 α-螺旋的同一侧, 导致一种具有亲水和疏水面的两亲结构。这些突起在 α-螺旋一侧的亲水侧链与微小的冰晶表面形成氢键, 因而抑制冰晶在最倾向结冰的 a 轴方向上的生长。Scott<sup>[14]</sup> 提出了支持这一模型的证据: Thr 和 Asx 之间的 0.45nm 的间隔正好与模型沿着 a 轴的冰晶格中的氧原子的距离一致。从美洲拟鲈的抗冻肽序列上可直接看出其二级结构的特点及其作用机制; 而从美洲大绵鲡的抗冻肽序列上则完全不能分析其二级结构的情况以及它们是如何起抗冻作用的。

Hew 等<sup>[10]</sup>比较了美洲大绵鲡及狼鱼 (*Anarhichas lupus*, 美洲大绵鲡的远缘科) 抗冻肽的同源顺序, 发现 65 个氨基酸中约 50% 的氨基酸是完全保守的。大多数的长度变化发生在末端, 这可能是翻译后加工的结果。完全保守的 4 个碱基是苏氨酸和天冬酰胺。结构完全不同的美洲拟鲈的抗冻肽也有 6 至 7 个保守的苏氨酸和天冬酰胺残基。一般认为, 冰晶就是与这几个氨基酸结合的。

Schrag<sup>[15]</sup> 分析了从南极绵鲡 (*Rhigophila dearborni*) 和北极绵鲡 (*Lycodes polaris*) (两

种鱼同属绵鳚科, *Zoaridae*) 中提取的抗冻肽。尽管地理上的遥远距离完全分离了这两个种, 但两者的氨基酸顺序显示高度的同源, 其中约 80% 的残基是一致的。

抗冻糖肽的一级结构也显示出一种极性基团的周期性结构, 这与美洲拟鳚抗冻肽的两亲结构类似。Bush<sup>[15]</sup> 从光谱学获得的数据结合构象能量的计算得出的抗冻糖肽构象模型是: 双糖侧链的疏水表面被紧紧缠绕在三折左手螺旋的肽骨架中, 双糖的亲水侧链排成一线, 可以与垂直于冰晶快速生长轴线的表面 (即冰晶的棱柱面) 结合, 因而抑制正常的冰晶生长。已知双糖的化学修饰会导致抗冻糖肽的活力下降。

在某些物理、生物系统中, 由于冰的表面积与冰体积的比例增高会导致表面自由能的增加, 因而使水的冰点降低。要使水结冰, 就必须降低温度把能量从系统中移去。在较低温度下出现的冰晶可被认作是具有较低冰点的水。

六方晶形的冰晶有六个棱柱面和上下两个呈正六边形的底面。平行于棱柱面的轴称为 *a* 轴。垂直于 *a* 轴的轴称为 *c* 轴。当水分子结合在冰晶的底面上, 温度又充分低时, 冰晶开始沿 *a* 轴生长。冰晶长到一定大小, 第二层水又结合到新生成的底面上, 沿 *a* 轴方向扩大面积。如此周而复始, 冰晶沿 *c* 轴方向延伸, 其外形象若干不同直径的六棱柱体迭加而成的金字塔。在抗冻肽存在的情况下, 抗冻肽分子就会吸附在冰晶的棱柱面上, 阻止吸附区域的冰晶生长, 但抗冻肽分子之间的区域继续生长, 结果使原来平直的棱柱面变成许多被抗冻肽隔开的短曲面。这些短曲面使冰晶表面积与体积比增大, 因而导致其表面自由能增加。当冰晶表面积与体积比超过某一临界点 (即当曲面的半径等于两个抗冻肽分子之间的距离一半时), 冰晶沿 *a* 轴方向的生长停止。吸附在冰晶上的抗冻肽分子间隔越小, 冰点抑制的效果越大。根据计算, 冰晶生长与其曲面半径成反比。降低冰点的效果与抗冻肽浓度的平方根成正比。对于抗冻肽和大分子量的抗冻糖肽来说, 运用上述关系式推导的预测结果与实验所得的数据十分一致。

但小分子量的抗冻糖肽的预测结果大约是实验值的二倍。

### 3 生物合成

Hew 用 [<sup>3</sup>H] 丙氨酸标记美洲拟鳚抗冻肽的结果表明, 成熟的抗冻肽是从抗冻肽前体蛋白经过加工剪切后生成的<sup>[16]</sup>。

鱼在肝中合成有 82 个氨基酸的前抗冻肽原 (prepro AFP)<sup>[16]</sup>。它含有一个 11 氨基酸的信号肽和一个抗冻肽原 (prosequence)。一般认为, 信号肽能使抗冻肽容易穿过内质网膜并使抗冻肽的多肽链能正确折叠。在血液中, 59 个氨基酸的抗冻肽原 (pro AFP) 在蛋白翻译后的 48 h 内, 其 N 末端的 21 个氨基酸的 pro 区和 C 末端的甘氨酸被去除, 这样产生了 37 个氨基酸的成熟抗冻肽<sup>[16]</sup>。美洲大绵鳚抗冻肽的前体没有确定的“pro”区, 即没有抗冻肽原这一阶段, 经体内加工去除 21 个氨基酸的信号肽, 然后从 N 末端和 C 末端去除 1 或 2 个氨基酸进一步加工成成熟的抗冻肽<sup>[17]</sup>。

### 4 抗冻肽的多基因族

美洲拟鳚的抗冻肽由一组的 40 个基因的多基因族编码, 其中大多数基因位于一个 7—8 kb 的串联重复序列中。单个的基因约占 1 kb 的重复序列, 并编码 82 个氨基酸的前抗冻肽原。它们具有典型的真核控制元件和 1 个 0.6 kb 的内含子, 将编码分成信号肽和抗冻肽原的片段<sup>[18]</sup>。

狼鱼 (*Anarhichas lupus*) 的抗冻肽基因由一组 80 到 85 个拷贝数的多基因族组成。它可分成两个部分, 其中 1/3 连结在一起, 其间有不规则间隔。另 2/3 是 8 kb 的串联重复序列。每个重复序列含 2 个反向排列的基因。DNA 顺序分析结果表明, 两个基因都具有功能。它们可能运用特殊的 DNA 结构以阻止两个基因互相干扰对方的转录<sup>[19]</sup>。

美洲大绵鳚的抗冻肽基因组含 150 个拷贝的 0.7 kb 的抗冻肽基因。它们之中的大多数是紧密连结的, 但有不规则间隔<sup>[18]</sup>。

### 南极鳕 (*Notothenia coriiceps neglecta*)

产生 8 个抗冻糖肽,其结构基因含有 46 个串联重复片段,每个片段编码一个抗冻糖肽及一个 3 氨基酸的间隔序列<sup>[20]</sup>。

## 5 应 用

将美洲拟鲾的抗冻肽注射入不会产生抗冻肽的虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 体内,虹鳟会产生抗冻力,而且抗冻力与注入血液中的抗冻肽的量成正比<sup>[47]</sup>。这说明,抗冻肽直接与鱼的抗冻力有关,抗冻肽在行使其功能时,不需要种属特异的抗冻肽受体。

有人已将鱼类抗冻肽前体的基因导入果蝇<sup>[21]</sup>,大肠杆菌<sup>[22]</sup>使之表达。表达的产物的抗冻活力与天然抗冻肽一样。将抗冻肽导入别的不抗冻的动<sup>[47]</sup>植物<sup>[7]</sup>体内,能够改善它们的抗冻性。Cutler<sup>[23]</sup>用真空渗透法将抗冻肽导入马铃薯,莴苣 (*Brassica napus*) 和拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*) 的叶中,发现三个特点: a. 能显著抑制冰点 (使冰点平均下降 1.8℃)。这说明抗冻肽可在植物组织中发挥抗冰晶成核剂的作用。 b. 可减少任何给定温度下细胞中可冻水结冰的量。这说明抗冻肽可作为抗冻保护剂。 c. 抗冻肽减低冰晶形成的速率。这些研究成果说明了通过导入抗冻肽基因改善植物耐寒性的可行性,使我们有可能探索将抗冻肽基因导入一些不耐寒的植物中去,使之受控表达,解决一些植物的抗冻(耐寒性)问题。Georges<sup>[24]</sup>等已设计合成了美洲拟鲾的抗冻肽基因并在植物细胞中瞬间表达成功。

如果能用基因工程的方法得到大量抗冻肽,我们就能获得一种有效的抗冻的新手段。抗冻肽在化工、食品、日用化学品等方面可望有

广泛的应用前景。

抗冻肽在鱼体内是受温度,光周期,激素等因素调节的,因而存在着类似于动、植物中的热休克 (heat shock) 蛋白启动子的冷激启动子的可能性。探索及寻找冷激启动子及抗冻肽的调控序列,使我们有可能通过导入抗冻肽基因使之受控表达,改善动、植物的耐寒性。

## 参 考 文 献

- 1 Davies P L et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79(2): 335
- 2 Ng N F et al. *J Biol Chem*, 1986; 261(33): 15690
- 3 Schrag J D et al. *Biochim Biophys Acta*, 1987; 915(3): 357
- 4 DeVries A L. *Comp Biochem Physiol*, 1988; 90B(3):611
- 5 Duman J G, DeVries A L. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem*, 1976; 54(3): 375
- 6 Hew C L, Yip C. *Biophys Res Commun*, 1976; 71: 845
- 7 Lin Y, Gross J K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78(5): 2825
- 8 Fournay et al. *Can J Zool*, 1984; 62(1): 28
- 9 Gourlie B et al. *J Biol Chem*, 1984; 259(23): 14960
- 10 Hew C L et al. *J Biol Chem*, 1988; 263(24): 12049
- 11 Hew C L et al. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol*, 1984; 155(1): 81
- 12 Raymond J, DeVries A L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74(6): 2589
- 13 DeVries A L, Lin Y. *Biochim Biophys Acta*, 1977; 495(2): 388
- 14 Scott G K et al. *Eur J Biochem*, 1987; 168: 629
- 15 Bush C A et al. *Arch Biochem Biophys*, 1984; 232(2): 624
- 16 Hew C L et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978; 85(1): 421
- 17 Li X et al. *J Biol Chem*, 1985; 260(24): 12904
- 18 Scott G K et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82(9): 2613
- 19 Scott G K et al. *Mol Cell Biol*, 1988; 8(9): 3670
- 20 Hsiao K et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 9265
- 21 Derrick E R et al. *Mol Cell Biol*, 1987; 7(6): 2188
- 22 Peters I D et al. *Protein Eng*, 1989; 3(2): 145
- 23 Cutler A J et al. *J Plant Physiol*, 1989; 135: 351
- 24 Georges F et al. *Gene(AMST)*, 1990; 91(2): 159