

大肠杆菌周质和外膜蛋白的定位

葛高翔 林其谁¹⁾

(中国科学院上海生命科学院, 上海生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 大肠杆菌周质和外膜蛋白发挥功能必须首先到达其特定亚细胞分区。大肠杆菌通过一系列与蛋白质分泌有关的蛋白 (Sec 蛋白) 将周质和外膜蛋白转运至内膜。在切除了信号肽后, 与周质蛋白的定位不同的是, 外膜蛋白的最终定位还需要其他因子的协助。外膜蛋白的定位近来认为是以周质作为中介的。

关键词 蛋白质转位, Sec 基因, 周质, 外膜蛋白

学科分类号 Q503

所有细胞内的物理、化学反应都是在一定的由脂双层分隔的亚细胞分区内完成的。通过这种分区化, 大部分的反应会因为局部的底物高浓度而变得十分有效, 同时, 也避免了一些不相兼容的生物反应之间的冲突。以脂双层作为亚细胞分区标准, 革兰氏阴性菌如大肠杆菌可以分为四个分区: 胞质区、内膜、周质和外膜。后三者又构成了细胞的包被。但所有蛋白质的合成都是在胞质中完成的。最终定位于周质和外膜的蛋白质必须首先横跨过内膜才能被运送到正确的区域。

1 周质和外膜蛋白的合成

在大肠杆菌中, 所有的周质和外膜蛋白的氨基端均以带一段信号肽的前体形式合成。这段信号肽使得前体蛋白和一组与内膜转位有关的蛋白质相互作用。在转位过程中, 信号肽被特定的蛋白酶切除, 产生成熟形式的蛋白质, 并随之被运送到特定的区域。

信号肽的合成和去除都需要能量, 这似乎说明信号肽是蛋白质传送过程中所必需。但也有例外, 周质中的一个碱性磷酸酯酶 PhoA 和一个外膜蛋白 LamB 的编码信号肽部分即使被切除, 仍然可以在特定分区中检测到它们的低水平表达。而在 *prl⁻* (protein localization) 的大肠杆菌株中, 这两种突变体蛋白的传送得到了极大的恢复。因此前体中的成熟蛋白部分可能对前体蛋白的转运也有一定的贡献。可能是促进了与转运机构的相互作用, 也可能是维持了转运前的非折叠状态, 由此提高了转运的效率, 从而使得即便在信号肽突变的情况下, 也可以有少量的转运。

2 与胞外蛋白质转运有关的胞质组分

2.1 SecB

最早用于寻找蛋白质分泌相关因子的一种方法是将麦芽糖结合蛋白 (maltose binding protein, MBP) 的氨基端与 β -半乳糖苷酶 (LacZ) 组成一个融合蛋白。MBP 定位于周质中, 而 β -半乳糖苷酶定位于胞质中。然而 MBP-LacZ 的融合蛋白却定位于内膜上, β -半乳糖苷酶的活力也受到了抑制。若在系统中加入影响蛋白质转运的因素, 由于抑制了 MBP-LacZ 的转运从而会使 MBP-LacZ 积聚于胞质中, 胞质中 MBP-LacZ 的 β -半乳糖苷酶活力不被抑制, 因而总活力就比对照高。通过这种方法, 找到了一些与分泌有关的基因, 称为 Sec (secreted) 基因, 其中包括 SecB。

SecB 编码了一个胞内的同四聚蛋白^[1]。SecB 对一系列的周质和外膜蛋白的非折叠形式有高亲和力。SecB 的无义突变使得 MBP、LamB 和外膜蛋白 OmpA 的转运受到了抑制, 而对 PhoA 和核糖结合蛋白 (ribose-binding protein, RBP) 则无影响。

SecB 与分泌蛋白的非折叠形式相互作用, 通常被认为是与转运有关的分子伴侣。当缺少 SecB 时, MBP 前体迅速折叠成不能转运的形式。但 SecB 与其他分子伴侣如 DnaK、GroEL 不同的是 SecB 与前体蛋白的结合与解聚不需要 ATP 的参与。实验表明 SecB 与前体蛋白中的成熟蛋白部分 (超过 150 个氨基酸残基) 相互作用, 使得前体蛋

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (021) 64338357, E-mail: qslin@server.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-10-19, 修回日期: 2000-02-25

白维持在一个蛋白酶超敏的、可传送的状态。另外的实验表明 SecB 既可结合完整的前体蛋白, 也可以与核糖体上未翻译完全但已达到 150 个氨基酸残基以上的蛋白质结合。

在蛋白质转运的最初阶段, 前体蛋白首先要到

达内膜。SecB 也参与了这一过程, SecB 可与内膜蛋白 SecA 的羧端 22 个氨基酸残基相互作用^[2]。Zn²⁺ 在 SecB 与 SecA 的结合中起了重要作用^[3]。因此, SecB 可能具有维持前体蛋白非折叠形式和转运前体蛋白至内膜胞浆侧的双重功能 (图 1)。

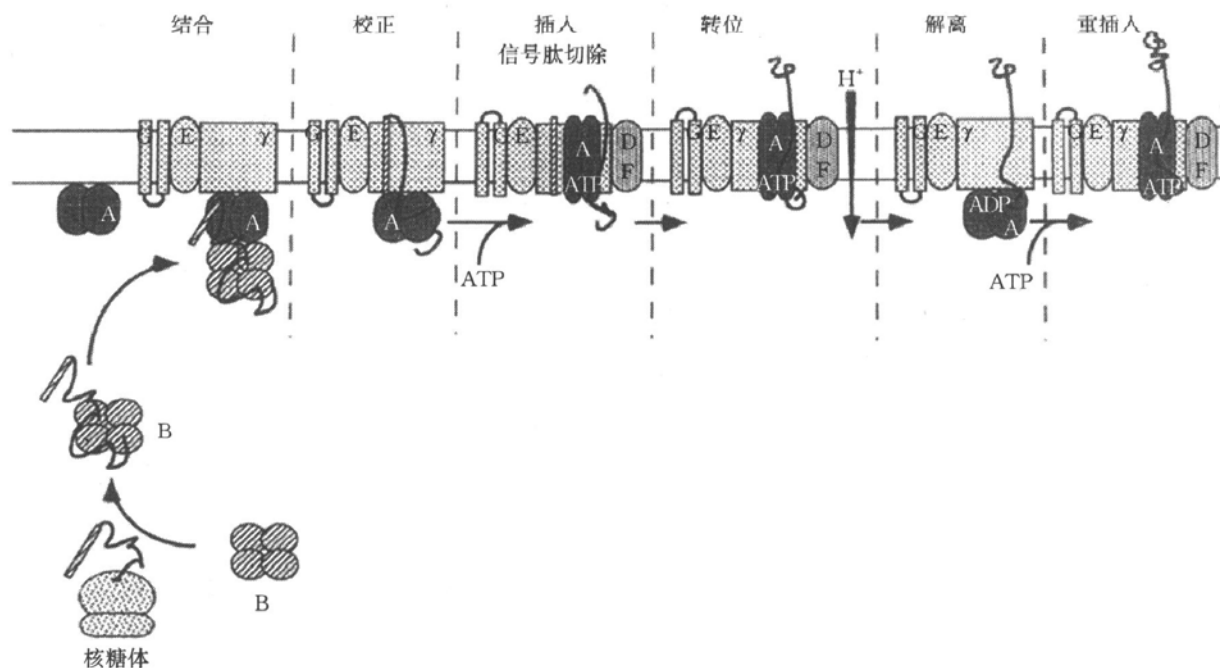


图 1 蛋白质转运过内膜示意图

——: 信号肽; ~: 转运中多肽。

但是有一部分蛋白质, 如 β -Lactamase 前体、RBP, PhoA 前体的转运并不依赖 SecB, 因此必然还有别的因子起着与 SecB 相类似的作用。

2.2 Ffh/4.5SRNA FtsY

体外实验表明, Ffh 蛋白和 4.5S RNA 可以形成一个核蛋白体, 同时 Ffh 蛋白可以共价交联至大肠杆菌粗抽提液中的信号肽上。而 Ffh/4.5S RNA 和 FtsY 可以替代哺乳动物体外转位系统中的信号肽识别颗粒 (signal recognition particle, SRP) 和 SRP 的 α 亚基^[4]。这些实例表明 Ffh/4.5S RNA 和 FtsY 至少在体外可以起到膜定位的作用。

而在细胞内, 分别有 Ffh、4.5S RNA、FtsY 缺陷的菌株都会导致 β -Lactamase 前体的大量积聚和 RBP、PhoA 前体的中等积聚。值得一提的是, 这些积聚的蛋白质都是在转位过程中无需 SecB 的蛋白质。这提示大肠杆菌可能利用 SecB 和 Ffh/4.5S RNA 两套不同的体系进行蛋白质的转运。体外实验显示在完全去除 SecA/B 及 SRP 系统的大肠杆菌抽提液中, 磷酸烯醇式丙酮酸-甘露糖醇磷酸转移酶的转运在加入 Ffh、4.5S RNA 及 FtsY 后得

到恢复, 但并不能为 SecA/B 所驱动。这就证明了大肠杆菌中 SecA/B 及 Ffh/4.5S RNA 是两套独立的蛋白质转运系统^[5]。

在实验中 RBP 和 PhoA 只是中等程度的积聚, 这就提示前体积聚可能并不是这些基因缺陷的直接结果。Ffh、4.5SRNA 和 FtsY 可能还参与了其他的过程。例如, 4.5S RNA 的缺陷同时严重抑制了蛋白质的合成, 说明 4.5S RNA 可能首先是控制了蛋白质的翻译过程^[6]。

2.3 其他的胞内分子伴侣

大肠杆菌中 Hsp70 的同源蛋白 DnaK 和其他一些相关蛋白 DnaJ、GrpE 参与了大肠杆菌中的蛋白质转运。LamB 的转运优先通过 SecB 完成, 而在 SecB⁻ 的菌株中, 同样有少量 LamB 可以成功转位, 而进一步 GrpE 的缺陷则完全抑制 LamB 的转位, 这说明 GrpE 对 SecB 的功能有一定补偿作用。而 DnaK⁻、DnaJ⁻、SecB⁻ 的菌株中, 都有 RBP 和 β -Lactamase 的中等积聚。这说明 SecB、DnaK、DnaJ、GrpE 和 Ffh/4.5S RNA 系统的功能有相互交叉的地方。一条途径的阻断, 可以通过另一条途

径补偿^[1].

近来发现了一种完全独立于 Sec 系统的蛋白质转运体系. 大肠杆菌周质蛋白 TMAO 还原酶 (trimethylamine N-oxide reductase, TMAO reductase) 的转运需要钼元素的参与. 与 Sec 转运系统不同的是, TMAO 还原酶的转运是在翻译完成以后进行的. 它的转运看来主要是跨膜质子梯度推动的结果^[7]. 进一步的研究表明, 这种转运系统与类囊体中非 Sec 依赖型的转运有相似之处^[8]. 它们的共同特点是蛋白质前体信号肽部分有一个保守的双精氨酸的结构花色 (RRXFLK)^[9]. 两个基因 *tatABCD*、*tatE* (for twin-arginin translocation) 的基因产物可能与这种具有金属共因子的蛋白质转运有关^[10].

3 与胞外蛋白质转运有关的内膜组分

3.1 SecA (prlD)

上面已经讲到, 不同的前体蛋白是利用不同的胞内因子实现膜定位的. 而所有具有特征性信号肽的前体蛋白, 它们转运过内膜的过程都需要 SecA 的作用.

SecA 是由两个相同亚基组成的一个多功能的蛋白质, 每个亚基各有一个与 ATP 结合的高、低亲和力的位点. SecA 处于胞质蛋白、内膜表面蛋白和内膜整合蛋白三种不同的细胞内定位的一种平衡状态. 胞质中的 SecA 有两个功能. 首先, 通过与自身 mRNA 的结合负调控自身的合成. 当蛋白质转运受到抑制时, 这种自身负调控减弱, SecA 的水平随之上升. 通过这种负调控, SecA 适应了蛋白质转运的需要. 而胞质 SecA 的第二个功能便是与前体蛋白向内膜的导运有关. 胞质 SecA 与前体蛋白结合, 通过与内膜胞质面的结合将前体蛋白带到内膜上的转运机构^[2].

作为内膜表面蛋白, SecA 既可以和脂双层的极性头非特异性地结合, 也可以与膜上由 SecE、SecG、SecY 组成的复合物高亲和力地结合 (图 1)^[1]. 蛋白质转运就发生在这个高亲和力位点.

近来的一系列研究表明, 随着 ATP 与高亲和力位点的结合, 内膜表面的 SecA 和与之结合的前体蛋白整合入膜^[11]. 而随着 ATP 的水解, SecA 又会从内膜上解离^[12].

SecA 的这种向内膜可逆整合提供了一种前体蛋白通过内膜的可能机制. SecA 将前体蛋白带到内膜复合物 SecEGY 的胞质面, ATP 与 SecA 的结

合使得 SecA 的结构发生变化, 从而 SecA 能够整合进内膜. 而 SecA 整合入膜, 前体蛋白有了部分转运, 信号肽酶可以切除信号肽. 膜结合形式的 SecA 由 SecD、SecF 和 YajC 所稳定, 而跨膜质子梯度又以一种目前尚不了解的方式进一步推动了转运的进行. 而伴随着 ATP 的水解, SecA 从前体蛋白上解离下来并脱离内膜, 而另外的 ATP 与 SecA 高亲和力位点的结合使 SecA 重新整合到内膜上并推动了进一步的转运^[13]. 目前还不清楚 SecA 上 ATP 低亲和力结合位点的功能. 虽然这个位点也与转运有密切联系, 但对 SecA 和内膜的整合却没有贡献^[12]. 可能 SecA 还有其他未被发现的功能.

3.2 SecE/G/Y (PrlG/H/A)

已有实验证明了 SecY (PrlA) 和 SecE (PrlG) 这两个内膜蛋白既是转运所必需, 也直接参与了转运. 利用纯化的 SecB、SecA、SecY、SecE、前体蛋白、磷脂和 ATP, 可得到完全有功能的转运体系.

SecE 是一个三次跨膜的蛋白, 其 N 端朝向内膜胞质面. SecE、SecY 稳定地相互作用形成复合物. 与 SecY 相互作用的区域包括 SecE 的第二个胞内结构域、第三个跨膜结构域和第二个周质结构域^[14]. 共价交联实验显示 SecE 的第三个螺旋与 SecY 的第二个螺旋及邻近的 SecE 的第三个螺旋相互作用. 而 SecE 二体的形成并不影响 SecA 与 SecYEG 的高亲和力的结合和 ATP 的水解, 但阻断了蛋白前体的转运和 SecA 从转运复合物上的解离. SecE 可能是调控了 SecA 介导的蛋白前体的转运^[15].

SecY 看来是形成了一个可供信号肽穿过内膜的孔道. 共价交联实验表明, 转运中的多肽可与 SecY 共价交联, 但不能与周围的脂质或 SecE、SecG 相交联^[16]. 而真核细胞中 SecY 的同源蛋白 Sec61a, 在电子显微镜下清楚地显示形成一个具有 2 nm 孔径的环状结构. 电镜显示 SecY/E 复合物形成了类似的环状结构^[17]. 这个环状结构被认为是蛋白质转运的通道.

SecY 的另外一个功能可能是起到识别、校正 SecA 带来的信号肽的功能. 与带错误信号肽序列的 OmpA 前体蛋白结合的 SecA 和 SecYEG 的作用是短暂的, 而 SecY 的突变体 PrlA4 与 SecA 的相互作用要强得多, 并使得突变的 OmpA 前体可以正常转运^[18]. 这说明 PrlA4 失去了校正的能力, 从而 SecA 有充足的时间去实现结合前体的转运.

除了 SecE、SecY 这两个完全必需的转位因子外, 体外转位系统的效率还会因为加入了 SecG 而得到大大升高. SecG 最初被称为带 I 或 P12, 是一个与 SecY、SecE 位于同一组分中的内膜蛋白^[1], 它对体内蛋白质转运的作用目前还不清楚. 现有的证据显示 SecG 的功能可能与其拓扑结合的变化有关. SecG 是一个二次跨膜的内膜蛋白, 其 N 端、C 端都朝向内膜周质面. 在有利于 SecA 整合入膜的条件, SecG 的拓扑结构发生了变化, N 端和 C 端都朝向胞质 (图 1). 可能 SecG 的拓扑结构的变化有利于 SecA 的整合入膜. 但目前还没有 SecA、SecG 的直接相互作用或是 SecG 拓扑结构与 SecA 整合间关系的报道.

3.3 SecD/F/YajC

除 SecY、SecE 和 SecG 这三个内膜蛋白外, 另两个内膜蛋白 SecD 和 SecF 已被证明在蛋白质的转运过程中也有作用. SecD 和 SecF 的基因是位于另一个内膜蛋白 YajC 的调控元件中, YajC 可能在蛋白质转运过程中也起到了重要作用^[13]. *SecD*⁻、*SecF*⁻ 的菌株严格地对温度敏感, 只能在 37 °C 条件下生长. 虽然体内实验表明 SecD、SecF 并不是转运所必需, 但它们的存在大大升高了转位的效率.

体外实验表明 SecD、SecF 与 SecEYG 复合物的相互作用是一个弱的、瞬时的相互作用. SecD、SecF、YajC 的存在稳定了 SecA 的膜结合形式并抑制了 SecA 结合的前体蛋白的正向或逆向转位^[13]. 这就提示 SecA 与前体蛋白的复合物插入内膜后, SecD、SecF 和 YajC 与 SecYEG 复合物相互作用, 抑制了 SecA-前体复合物的逆向转位. 而 SecD、SecF 可能从 SecYEG 上解离下来或是暂时失活, 使得 SecA 可以从膜上解离.

4 外膜与周质蛋白的定位

虽然对外膜与周质蛋白向内膜的运送和穿越内膜的过程已经有了较多的了解, 但对此后的过程仍然知之甚少.

4.1 周质蛋白的定位

周质蛋白的定位在其信号肽被切除后通常不需要其他因素的协助. 首先, 大部分的胞浆蛋白可以通过加上一个可切除的信号肽序列而定位至周质; 其次, 多种外膜蛋白在缺失了信号肽序列后会错误定位至周质, 这说明外膜蛋白需要另外的顺式作用元件以确保它们的正确定位.

也有一些胞浆蛋白在增加了信号肽序列后并不

导致它们向周质的转运. 进一步的实验表明, 这些不能转运的突变胞浆蛋白是由于信号肽邻近序列与信号肽的相互作用^[19]. 由此, 还是可以认为周质蛋白的转运在信号肽切除后无需其他因子的协助.

4.2 外膜蛋白 (OMP) 的转运

OMP 从内膜向外膜的转运过程有两种可能的机制. 拜耳连接 (Bayer's Junction) 模型认为 OMP 向外膜的转运是通过外膜与内膜间的连接来完成的. Bayer 等在质壁分离的大肠杆菌细胞的电镜分析中发现了外膜与内膜之间的连接. 每个细胞有超过 50 个这样的连接. 并指出只有在一种以较快速度固定的样品中才可观察到, 因此是真实地反映了细胞本身的情况. 而周质中介模型 (periplasmic intermediate model) 认为 OMP 首先从内膜上游离下来, 穿过周质, 并通过一种目前不清楚的机制插入外膜.

许多实验并没能严格区分 Bayer's Junction 模型和周质中介模型^[1]. MacIntyre 等在 OmpA 中插入一个疏水结构域, 使得 OmpA 定位于内膜上. Nikaido 认为如果 OmpA 是通过 Bayer's Junction 进行 OmpA 转位, 则 OmpA 仍应定位于外膜上, 而不应受此疏水结构域的影响. 所以, OmpA 可能是通过周质途径的. 然而 Shinkai 等在 OmpC 中插入一个疏水的膜结合结构域, OmpC 仍定位于外膜上. Carlson 等构建了突变体 LamBA23D, 这一突变体的信号肽不能被正常切除, 结果信号肽部分则成为一个内膜的结合区, 但这个突变体在外膜上仍有相当的分布.

OmpA、PhoE、FhuA 的部分缺失使得这些蛋白质在周质中积聚. 这比较有力地说明了这些蛋白质可能是通过周质途径的. Freudl 等发现当 OmpA 过量表达时, 有一部分 OmpA 滞留于周质中. Jackson 等通过利用不同浓度的去垢剂证明 FhuA 在形成膜稳定结合形式之前经过了一个非膜的过程. 而这一过程条件与周质中非常相似. Fourel 等利用构象专一性的抗体跟踪了 OmpF 的成熟过程. 发现了一种存在于周质中处于亚稳态的 OmpF 三体, 说明 OmpF 向外膜转运过程至少部分是在周质中进行的.

Tomassen 等^[20]发现一种催化二硫键形成的周质蛋白 DsbA, 可以催化 PhoE 中一个亚基的二硫键形成. 而成熟的 PhoE 三体中, 这个亚基与周质并无接触. 这就暗示 PhoE 可能经过周质而到达外膜, 在运送过周质的过程中, PhoE 与 DsbA 相

互作用, 而形成了正确的二硫键. 但是, 这个实验与 Bayer's Junction 模型也并不矛盾. PhoE 也可能是通过粘着斑进行转运, 只是在整合入外膜前, 与周质有短时的接触, 在这个接触过程中, 完成了二硫键的氧化.

虽然大多数实验结果都支持周质途径, 但还不能排除 Bayer's Junction 模型, 也不能将两者完全割裂开来看. 可能一部分蛋白质通过周质途径, 而另一部分蛋白质通过粘着斑; 也可能在转运过程中一个阶段通过粘着斑, 而另一个阶段通过周质. 寻找各个蛋白质的转运中间体是重要的. 转运中间体的存在形式, 是周质蛋白, 还是膜结合蛋白, 将为最终解决这个问题提供重要依据.

参 考 文 献

- Danese P N, Silhavy T J. Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Ann Rev Genet*, 1998, **32**: 59~ 94
- Fekkes P, van der Does C, Driessen A J. The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J*, 1997, **16** (20): 6105~ 6113
- Fekkes P, de Wit J G, Boorsma A, *et al.* Zinc stabilizes the SecB binding site of SecA. *Biochemistry*, 1999, **38** (16): 5111~ 5116
- Powers T, Walter P. Co-translational protein targeting catalyzed by the *Escherichia coli* signal recognition particle and its receptor. *EMBO J*, 1997, **16** (16): 4880~ 4886
- Koch H G, Hengelage T, Neumann-Haefelin C, *et al.* *In vitro* studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. *Mol Biol Cell*, 1999, **10** (7): 2163~ 2173
- Nakamura K, Fujii Y, Shibata T, *et al.* Depletion of *Escherichia coli* 4.5S RNA leads to an increase in the amount of protein elongation factor EF-G associated with ribosomes. *Eur J Biochem*, 1999, **259** (1~ 2): 543~ 550
- Santini C L, Ize B, Chanal A, *et al.* A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 1998, **17** (1): 101~ 112
- Bogsch E G, Sargent F, Stanley N R, *et al.* An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J Biol Chem*, 1998, **273** (29): 18003~ 18006
- Mori H, Cline K. A signal peptide that directs non-Sec transport in bacteria also directs efficient and exclusive transport on the thylakoid Delta pH pathway. *J Biol Chem*, 1998, **273** (19): 11405~ 11408
- Sargent F, Bogsch E G, Stanley N R, *et al.* Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J*, 1998, **17** (13): 3640~ 3650
- Ramamurthy V, Oliver D. Topology of the integral membrane form of *Escherichia coli* SecA protein reveals multiple periplasmically exposed regions and modulated by ATP binding. *J Biol Chem*, 1997, **272** (37): 23239~ 23246
- Economou A, Pogliano J A, Beckwith J, *et al.* SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. *Cell*, 1995, **83** (7): 1171~ 1181
- Duong F, Wickner W. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J*, 1997, **16** (16): 4871~ 4879
- Murphy C K, Beckwith J. Residues essential for the function of SecE, a membrane component of the *Escherichia coli* secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (7): 2557~ 2561
- Kaufmann A, Manting E H, Veenendaal A K, *et al.* Cysteine-directed cross linking demonstrates that helix 3 of SecE is close to helix 2 of SecY and helix 3 of a neighboring SecE. *Biochemistry*, 1999, **38** (28): 9115~ 9125
- Joly J C, Wickner W. The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J*, 1993, **12** (1): 255~ 263
- Meyer T H, Menetret J F, Breitling R, *et al.* The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J Mol Biol*, 1999, **285** (4): 1789~ 1800
- van der Wolk J P W, Fekkes P, Boorsma A, *et al.* PrlA prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *EMBO J*, 1998, **17** (13): 3631~ 3639
- Rasmussen B A, Silhavy T J. The first 28 amino acids of mature LamB are required for rapid and efficient export from the cytoplasm. *Genes Dev*, 1987, **1** (2): 185~ 196
- Eppens E F, Nouwen N, Tommassen J. Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *EMBO J*, 1997, **16** (14): 4295~ 4301

Targeting of Periplasmic and Outer-membrane Proteins in *Escherichia coli*. GE Gao-Xiang, LIN Qi-Shui (State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract To actively transport many of its proteins to extracytoplasmic compartments such as the periplasm and outer membrane, *E. coli* employs a collection of Sec (secretion) proteins that catalyze the translocation of various polypeptides through the inner membrane. The targeting of periplasmic proteins after the cleavage of signal peptide is commonly regarded as a default process, while the final destination of outer-membrane proteins needs the help of other factors and is well accepted as a periplasmic intermediate process.

Key words protein translocation, Sec (secretion) genes, periplasm, outer-membrane protein (OMP)