

综述与专论

蛋白质：生物界中又一类信息的储存者和传递者*
——对 prion 生物学相关知识的重新解读俞国华^{1,2)} 刘思国¹⁾ 成国祥^{1)**}⁽¹⁾上海转基因研究中心, 上海 201203; ⁽²⁾中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 蛋白质在相当一段时间内一直被认为只是 DNA 或 RNA 等遗传物质的表达形式, 其单独不具有储存和传递生物信息的功能, 而储存和传递生物信息却是遗传物质的两个基本属性. 随着近年来 prion 生物学的出现和研究的逐步深入, 人们已经认识到蛋白质单独就具有储存和传递生物信息的功能, 从这个意义上讲, 蛋白质也是一类遗传物质. 所以很有必要站在这个角度对 prion 生物学的相关知识进行重新的梳理和再认识, 通过对哺乳动物 prion 生物学和真菌 prion 生物学各自发展历程的简要回顾和最新研究成果的介绍, 以及它们之间相同点和不同点的比较, 总结出蛋白质储存和传递生物信息的一般规律并指出其表现形式的多样性.

关键词 prion 生物学, 生物信息的储存和传递, 蛋白质空间构象

学科分类号 Q51

在生物学发展过程的早期, 人们一直坚持认为蛋白质是生物体的遗传物质, 该观念到 1944 年却发生了逆转, 那年 Avery 通过细菌转化实验证明了 DNA (而非蛋白质) 才是生物体的真正遗传物质. 而后又发现一些生物体 (比如 RNA 病毒) 的遗传物质并不是 DNA 而是 RNA. 至此, 人们认为生物界中只有核酸(DNA 或 RNA)才可以作为生物体的遗传物质. 所谓遗传物质必须同时具备以下两个特征: a. 具有储存生物信息的功能; b. 具有传递生物信息的功能, 即能将自身携带的生物信息通过一定途径传递给子代分子, 使子代分子携带有相同的生物信息. DNA 和 RNA 都同时具备以上两个特征, 所以可以成为遗传物质. 那么生物界中是否只有 DNA 和 RNA 可以同时具有生物信息的储存和传递两种功能呢? 随着 prion 生物学的出现和研究的逐步深入, 看来该观念必须得到进一步的补充, 即蛋白质 (至少某些蛋白质) 也同时具有储存和传递生物信息的功能.

“Prion”这个词目前在国内还没有一个统一的译名, 可以说非常混乱, 总共可能有十几个译名之多, 比如, 朊病毒、朊蛋白、普里昂、蛋白质感染颗粒等, 这里不一一列举, 总的来说并没有一个译名特别贴切和有说服力. 其实, 在英文文献里, “prion”这个词的意义也没有统一, 主要是因为 “prion”这个词的意义随着时间一直在发展和变化. 最初, “prion”这个词是在 1982 年由 Prusiner 提

出的^[1], 是为了解释一类发生在哺乳动物上的传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSE) 的病原体时提出的, 由 “proteinaceous infectious particle” 三个词衍生而来. 当时 “prion” 的本义就是指 TSE 疾病的病原体, 是一种蛋白质性质的感染颗粒. Prusiner 是根据 TSE 疾病的病原体具有抵抗一些可以破坏核酸的处理 (如电离辐射、紫外照射) 但是可以被一些蛋白质变性剂灭活的性质, 推断蛋白质是 TSE 疾病的病原体中必不可少的成分^[2,3], 从而创造出 “prion” 这个词来特指 TSE 疾病的病原体. 当时并没有排除这种蛋白质性质的感染颗粒一定不含核酸也没有指出该颗粒由几种蛋白质组成. 后来, 大量的实验证据基本排除了 TSE 疾病的病原体含有核酸的可能性, 并且证明, 该病原体很有可能完全由一种细胞内正常表达的蛋白质 (命名为 PrP^C) 经异常折叠而形成的构象体 (命名为 PrP^{Sc}, 其中 “PrP” 来自 “Prion Protein”, 上标 “Sc” 来自当时研究的一种叫 “Scrapie” 的 TSE 疾病, 而将细胞内表达的执行正常生理功能的构象体叫 PrP^C, 其中上标 “C” 来自单词 “Cellular”) 组成. “Prion” 这个词就发展成为指哺乳动物中具有感染能力的蛋白质

*上海市自然科学基金资助项目(04ZR14134).

** 通讯联系人.

Tel: 021-58951015-200, E-mail: chenggx@cngn.cn

收稿日期: 2005-02-02, 接受日期: 2005-02-28

(infectious proteins)^[4], 一般就是指 PrP^{Sc}. 再后来, 由于 “prion” 也用来解释一些发生在真菌的非孟德尔 (non-Mendelian) 遗传现象, 这个词的含义又有很大的扩展. 现在 “prion” 已经发展成生物学的一门亚分支学科: Prion 生物学, 它专门研究生物界中一类蛋白质, 这类蛋白质至少存在两种构象体, 其中某个(或某些)构象体不具有自我增殖 (self-propagating) 能力, 但必需至少存在一种具有自我增殖能力的构象体, 这两类构象体往往拥有不同的生理功能. 在本文中, 没有把 “prion” 翻译成中文, 因为确实无法找到一个适用于全文又符合英文原义的中文译名.

下面, 将通过对哺乳动物 prion 生物学和真菌 prion 生物学各自研究历史的简要回顾以及它们之间相同点和不同点的比较, 来认识蛋白质是如何储存和传递生物信息的.

1 哺乳动物 prion 生物学

1.1 TSE 疾病概述

哺乳动物 prion 生物学是在 TSE 疾病的研究过程中发展起来的. TSE 疾病是一类具有传染能力的神经退行性疾病, 该类疾病的共同特征就是患病动物的脑部由于神经细胞的大量死亡出现类似海绵状的空泡, 也因此得名. 经研究, 这是由于动物体内编码 PrP 蛋白的基因突变或别的因素导致 PrP 蛋白的异常折叠引起的, 所以 TSE 疾病又叫 prion 疾病. 该类疾病既可以发生在人身上, 具体包括库鲁病 (Kuru)、克雅氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、GSS (Gerstmann-Straussler-Sheinker) 综合症、致死性家庭失眠症 (fatal familial insomnia, FFI)、新型克雅氏病 (Variant Creutzfeldt-Jakob disease, vCJD) 等, 也可以发生在很多其他的哺乳动物身上, 比如发生在绵羊或山羊上的羊搔痒病 (scrapie)、发生在牛群的牛海绵状脑病 (bovine spongiform encephalopathy, BSE, 即俗称的 “疯牛病”) 等^[4].

1.2 TSE 疾病的病原体是具有感染能力的蛋白质

寻找 TSE 病原体的过程是一个复杂而充满争议的过程, 总的来说, 大概经过三个主要阶段.

第一阶段: 证明 TSE 疾病的可传播性. TSE 疾病最早是在绵羊身上发现的, 早在 18 世纪中叶, 就有了羊搔痒病的一些症状的记录. 这并不难理解, 因为在工业革命的初期羊毛产业在经济中起着举足轻重的作用. 在这以后的近两百年时间里, 人们并不知道该疾病是一种可传染的疾病. 直到 1937 年,

发生在苏格兰一个农场的一个偶然事件改变了人们的观念. 农场工作人员直接使用经福尔马林处理的绵羊脑部抽提液作为一种病毒的疫苗, 用来接种羊群, 后来发现用来制作疫苗的绵羊死于羊搔痒病, 这一事件导致了约 10% 的羊感染上羊搔痒病^[5]. 从此, 人们开始怀疑 TSE 疾病是一种可传染的疾病, 后来大量的实验证实了该疾病的可传播性^[6-9] (表 1).

第二阶段: 排除 TSE 的病原体是病毒、细菌或其他已知的病原体. 1966 年, Alper 等^[10]发现羊搔痒病病原体最小只需约 200 ku 就具有感染能力, 该病原体是如此之小, 比一般的病毒小得多, 可以排除是病毒或是其他更大病原体的可能性. 而后 Alper 等^[2]又发现 TSE 的病原体对于一些破坏 DNA 的处理 (比如电离辐射、紫外照射等) 具有极强的抵抗能力. 这样就进一步排除了 TSE 的病原体含有长链 DNA 的可能性.

第三阶段: Protein-only 假说的提出, 到逐步证明. 1967 年, Griffith^[11]首次提出羊搔痒病病原体可能为蛋白质 (protein-only) 的假说. 1982 年, Prusiner^[1]正式提出 prion 概念, 认为 TSE 的病原体是蛋白质性质的感染颗粒. 现在已有大量的实验证据表明 (表 1): TSE 的病原体如果不是全部至少主要由一种具有自我增殖能力的蛋白质分子 (PrP^{Sc}) 组成. 这些证据主要可以分为以下几类: a. 一个由动物常染色体基因编码的蛋白质的异常构象体 (PrP^{Sc}) 与 TSE 的感染能力特异相关^[12-14], 而且该编码基因的敲除小鼠具有抵抗 TSE 病原体感染的能力^[15]; b. PrP 特异抗体可以在体外和体内中和 TSE 病原体的感染能力^[16, 17]; c. PrP 基因的突变可以引起一些家族性 TSE 疾病^[18], 这些家族性 TSE 疾病既是典型的遗传病又是可传染的疾病, 从而为 protein-only 假说提供了强有力的证据; d. TSE 病原体不同株系 (strains) 的 PrP^{Sc} 具有不同的空间构象, 并且 PrP^{Sc} 可以在体外和体内将自己携带的空间构象信息传递给 PrP^C ^[19-23]; e. 大肠杆菌表达的经纯化的 PrP 重组蛋白, 在一定条件下, 可以在体外折叠成具有感染能力的构象体^[24], 这一实验为 protein-only 学说提供了最直接和最有说服力的实验证据. 但也有些科学家对此实验结果表示有疑义, 主要因为在这个实验中用于接种的实验小鼠不是野生型小鼠, 而是高表达 (相当于野生型小鼠表达的 PrP 蛋白水平的 16 倍) 缺失了 N 端的 PrP 蛋白的突变体转基因小鼠, 有人怀疑该小鼠在没有接种的情况下也会自发出现

TSE疾病，甚至有人怀疑那些接种了经体外折叠的 PrP 重组蛋白的小鼠出现 TSE 疾病是因为在接种时污染了别的 TSE 病原体导致的结果^[25]。不过，类似的实验在真菌 prion 研究中却取得了完美的成功(见下文真菌 prion 生物学部分)。

Table 1 Essential chronology of mammalian prion biology
表 1 哺乳动物 prion 生物学大事年表

年份	重大事件	参考文献
1939	通过实验证明羊搔痒病可以在羊群中传播.	[6]
1961	成功地将羊搔痒病传播给了小鼠.	[7]
1966	成功地将库鲁病传播给了实验动物黑猩猩. 发现羊搔痒病病原体最小只需约 200 ku 就具有感染能力.	[8] [10]
1967	发现羊搔痒病病原体具有非常强的抵抗一些破坏 DNA 的处理，比如电离辐射、紫外照射等. Griffith 首次提出羊搔痒病病原体可能为蛋白质.	[2] [11]
1968	成功地将 CJD 疾病传播给了实验动物黑猩猩.	[9]
1980	从感染了羊搔痒病原体的仓鼠大脑中分离到了具有抗蛋白酶水解的高度疏水的蛋白质.	[3]
1982	Prion概念正式提出.	[1]
1985	编码 PrP 蛋白的基因被成功克隆.	[12]
1986	证明 PrP ^C 和 PrP ^{Sc} 由同一个宿主染色体基因编码.	[13]
1988	发现羊搔痒病的病原体感染能力在体外可以被抗 PrP 蛋白的抗体中和.	[16]
1989	首次证实一种家族性 TSE 疾病(GSS 疾病)可能是由于 PrP 基因的突变引起的.	[18]
1993	发现 PrP 基因敲除小鼠具有抵抗 TSE 病原体感染的能力. 证明 PrP ^C 和 PrP ^{Sc} 两个构象体的空间构象存在明显不同.	[15] [14]
1994	用无细胞体系，在 PrP ^{Sc} 存在下，成功地将 PrP ^C 转变成与 PrP ^{Sc} 具有相似抗蛋白酶水解性质的构象体，命名为 PrP ^{Res} ¹⁾ .	[19]
1996	证明在动物体内，同一个 PrP ^C 分子可以由于接种的 PrP ^{Sc} 的不同而折叠成为具有不同空间构象的 PrP ^{Sc} 分子.	[20]
1998	发现不同株系(strains)的 PrP ^{Sc} 具有不同的空间构象.	[21]
2001	证明了 PrP ^C 可以在体外经过一个叫 PMCA (protein-misfolding cyclic amplification)的循环操作高效转化成 PrP ^{Res} .	[22]
2003	RNA分子在体外实验中具有促进 PrP ^C 向 PrP ^{Res} 转变的能力. 注射的 PrP 抗体在动物体内可以抑制 PrP ^{Sc} 形成和延迟疾病的发生. 小鼠体内转基因表达的可溶性二聚化的 PrP 蛋白 (PrP-Fc2) 可以与 PrP ^C 竞争结合 PrP ^{Sc} ，从而抑制 TSE 疾病的发生.	[23] [17] [26]
2004	证明大肠杆菌表达的 PrP 重组蛋白，在一定条件下，可以在体外折叠成具有感染能力的构象体.	[25]

¹⁾ PrP^{Res} 的 “Res” 上标来自单词 “Resistant”，只表明该构象体的 PrP 蛋白分子具有抵抗蛋白酶水解的能力，但未必有感染动物能力. 现在一般用 PrP^{Sc} 指在体内产生的具有感染能力的构象体，而用 PrP^{Res} 指在体外经实验手段转化 PrP^C 产生的构象体。

1.3 PrP^{Sc} 的独特属性

首先，与传统的传染病病原体 (如真菌、细菌、病毒等) 相比，作为 TSE 病原体的 PrP^{Sc} 具有很多独特的理化性质. 它对于常用的各类消毒方法 (如紫外照射、电离辐射、福尔马林浸泡、湿热灭菌等) 都不敏感. 要灭活 PrP^{Sc}，必须采取极其严格的

消毒条件或使用一些强烈的蛋白质变性剂，例如：在 132℃ 下湿热灭菌数小时，用 2% 的次氯酸钠、1 mol/L 的 NaOH 或 4 mol/L 的盐酸胍处理数小时^[27]. PrP^{Sc} 这些独特的理化性质可能与它的空间构象密切相关，经研究发现 PrP^{Sc} 含有较多的 β 折叠 (约占 43%)， α 螺旋相对较少 (约 30%)，而 PrP^C 含

有较多的 α 螺旋(约 42%), β 折叠的含量却极少(只有约 3%)。

其次, 作为蛋白质分子, PrP^{Sc} 具有与一般蛋白质分子不同的性质. 例如与 PrP^{C} 比较: a. PrP^{Sc} 更易于聚集, 在体外往往聚集成淀粉样纤维 (amyloid fibres), 而 PrP^{C} 只以单体的形式存在; b. PrP^{C} 可溶于去污剂, 而 PrP^{Sc} 不溶; c. PrP^{C} 可以被蛋白酶 K 完全降解, 而 PrP^{Sc} 只能被部分降解, 经蛋白酶 K 消化后会留下一个分子质量在 27~30 ku 的片段^[4]。

最后, PrP^{Sc} 是可以储存和传递生物信息的蛋白质分子. PrP^{Sc} 可传递的信息是储存在它的空间构象上的. 这种储存在蛋白质空间构象的信息与蛋白质的氨基酸排列顺序 (即蛋白质的一级结构) 所含的信息不同, 也就是说氨基酸排列顺序相同的蛋白质其空间构象可以不同, 即同一种多肽可以折叠成多种不同的构象体. 其实, 这正是 TSE 病原体之所以会出现不同株系 (strains) 的分子基础. 具有相同遗传背景的小鼠, 在接种不同株系的 TSE 病原体后会在很多方面表现出不同, 比如潜伏期的长短不同、脑部空泡化的组织不同等. 经实验证明这些不同株系 PrP^{Sc} 分子的氨基酸序列相同, 只是空间构象不同而已^[20, 21]. 此外, PrP^{Sc} 还可以将自己携带的空间构象信息通过一定途径传递给 PrP^{C} , 使后者拥有与前者相同的空间构象, 新形成的 PrP^{Sc} 又可以将相同的信息传递给另外的 PrP^{C} 分子, 经过如此反复循环, PrP^{Sc} 的数量就可以得到增加, 也就是上文所说的自我增殖。

2 真菌 prion 生物学

2.1 真菌 prion 现象概述

真菌 prion 生物学是在研究真菌中的一类非孟德尔(non-Mendelian)遗传现象的过程中发现和发展起来的, 现在把介导这类非孟德尔遗传现象的因子叫做真菌 prions (fungal prions). 到目前为止, 已经肯定的真菌 prions 包括发生在啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 $[\text{PSI}^+]$ 、 $[\text{URE3}]$ 、 $[\text{RNQ}^+]$ 和发生在一种丝状真菌 (*Podospora anserina*) 的 $[\text{Het-s}]$. 与 PrP^{Sc} 在哺乳动物中会引起 TSE 疾病不同, 没有证据表明真菌 prions 会引起任何病理学变化, 而是参与了广泛的生物学基本过程, 比如: $[\text{PSI}^+]$ 、 $[\text{URE3}]$ 、 $[\text{RNQ}^+]$ 分别参与了 *Saccharomyces cerevisiae* 蛋白质翻译的终止、氮源的利用以及别的 prions 的诱导, 而 $[\text{Het-s}]$ 则决定了 *Podospora anserina* 不同株系之间融合后产生的异核体

(heterokaryon) 是否相容. 由于真菌 prions 参与了各种不同的生物学过程, 并且其相关的术语还没有统一, 很难对每个真菌 prion 进行一一详述, 况且没有这个必要. 本文只对研究最早并且研究最为深入的啤酒酵母 $[\text{PSI}^+]$ 进行比较详细的介绍。

2.2 $[\text{PSI}^+]$ 的决定因子 (determinant) 是一个具有感染能力的蛋白质

与哺乳动物 TSE 疾病病原体的研究相似, $[\text{PSI}^+]$ 决定因子的寻找和研究也是一个曲折但非常有趣的过程. 总的来讲可以分成两个大的阶段, 以 1994 年 Wickner^[28] 提出用哺乳动物的 prion 概念来解释啤酒酵母的 $[\text{PSI}^+]$ 和 $[\text{URE3}]$ 两个非孟德尔遗传现象为分水岭。

第一阶段: 1965 年到 1994 年(表 2)。

$[\text{PSI}^+]$ 最初是在 1965 年由 Cox^[29] 在以啤酒酵母为实验材料筛选无义突变抑制子 (nonsense suppressors) 的过程中发现的. “无义突变”是指会导致在蛋白质编码区出现终止密码子 (UAA、UAG、UGA) 的基因突变, 出现无义突变的基因会在进行蛋白质翻译的时候提前终止, 这样往往导致该基因无法表达出具有正常生理功能的蛋白质而失活. “无义突变抑制”是指一些与蛋白质翻译终止相关的基因 (如 tRNA 基因、一些核糖体蛋白的编码基因以及一些蛋白质翻译终止因子的编码基因) 的突变可以导致核糖体在翻译蛋白质的时候偶尔可以“读过(read-through)”这些无义突变, 最终翻译出具有正常生理功能的完整蛋白质. 筛选“无义突变抑制子”就是寻找那些会导致出现无义突变抑制的基因突变. Cox 使用带有无义突变的 *ADE2* 基因的啤酒酵母为实验模型, 进行无义突变抑制子的寻找. *ADE2* 基因的无义突变将导致酵母菌在缺乏腺嘌呤 (adenine) 的培养基中不能生长, 而如果生长在丰富培养基中, 将会由于一种有颜色的代谢中间物的沉积使酵母菌落呈现红色. 如果酵母菌出现了导致无义突变抑制的基因突变, 将使酵母菌的生长不依赖腺嘌呤的存在, 同时菌落呈现白色或粉红色. Cox 通过实验找到了一个白色且不依赖腺嘌呤的菌落, 并且证明该菌落含有一种 tRNA 抑制子叫 *SUQ5*. 接着发生了一系列令 Cox 迷惑不解的实验现象. 首先, 这些含 *SUQ5* 抑制子的白色菌落中偶尔会出现红色的菌落, 而接种这些白色菌落或红色菌落绝大多数都能在平板上长出相应的白色或红色菌落, 但是发现白色菌落偶尔会转变成红色菌落, 红色菌落偶尔也会转变成白色菌落. Cox 起初以为白

色菌落转变成红色菌落是由于 *SUQ5* 的丢失所致. 但是检查结果却发现白色菌落和红色菌落两者都含有 *SUQ5*, 这表明菌落颜色的转变不是 *SUQ5* 引起的, 而是存在另外一个可以增强 *SUQ5* 的无义抑制效率的因子. 当该因子存在时, 无义抑制效率较高使菌落成白色, 而该因子丢失时无义抑制效率较低菌落呈红色. 接着, Cox 试图通过一系列的遗传学杂交实验寻找出该未知因子. 实验结果却发现, 与以往发现的无义突变抑制子不同, 该未知因子并不遵循孟德尔遗传学规律. 例如: 如果让红色 *SUQ5* 酵母菌与白色 *SUQ5* 酵母菌进行杂交, 得到的双倍

体酵母菌是白色的(即白色性状对红色性状是显性), 这并不奇怪, 奇怪的是由此白色双倍体酵母菌减数分裂产生的四个单倍体酵母菌竟然都为白色. 这一结果说明该未知因子的出现不是由于酵母染色体基因的突变引起的. 而后的实验进一步发现, 该未知因子可以通过细胞质高效地从亲代细胞传递给子代细胞. Cox 把这个未知因子命名为[*PSI*], 其中的方括号表示该因子不遵循孟德尔遗传学规律, 大写字母 “*PSI*” 和上标 “+” 表示这是一个显性性状, 而把相应的隐性性状叫[*psi*].

Table 2 Essential chronology of fungal prion biology

表 2 真菌 prion 生物学大事年表

年份	重大事件	参考文献
1965	Cox 在筛选无义突变抑制子的实验中发现非孟德尔遗传因子[<i>PSI</i>].	[29]
1971	证明[<i>PSI</i>]的作用不仅限于 <i>SUQ5</i> , 还可以作用于别的 tRNA 抑制子.	[30]
1981	发现盐酸胍可以 100% 的使[<i>PSI</i>]表型转变成[<i>psi</i>]表型.	[31]
1982	排除[<i>PSI</i>]是由细胞质内的线粒体 DNA 引起的, 同时排除核内一种叫 2 μ 的染色体外质粒是[<i>PSI</i>]决定因子的可能性.	[32]
1988	首次提出[<i>PSI</i>]决定因子不是基因(当时叫 “[<i>PSI</i>] gene”)本身, 而是它的基因产物(gene product).	[33]
1993	发现 Sup35 蛋白的过量表达可以使酵母从[<i>psi</i>]表型转变成[<i>PSI</i>]表型.	[34]
	发现过量表达 Sup35 蛋白 N 端 114 个氨基酸片段单独就可以使酵母从[<i>psi</i>]表型转变成[<i>PSI</i>]表型.	[35]
1994	用 N 端缺失的 <i>SUP35</i> 突变体基因代替野生型 <i>SUP35</i> 基因, 将使原来为[<i>PSI</i>]表型的单倍体酵母转变成[<i>psi</i>]表型.	[36]
	Wickner 提出运用哺乳动物的 prion 概念来解释出现在酵母上的另一个非孟德尔遗传因子[URE3].	[28]
1995	分子伴侣 Hsp104 蛋白的过量表达或不表达都可以使[<i>PSI</i>]转变成[<i>psi</i>].	[37]
	发现 Sup35 蛋白直接参与翻译的终止, 是一个翻译终止因子.	[38]
1996	来自[<i>PSI</i>]和[<i>psi</i>]不同表型的 Sup35 蛋白具有不同的溶解度和不同的抵抗蛋白酶 K 消化的能力. 在细胞内表达 Sup35 与绿色荧光蛋白 GFP 的融合蛋白, 发现在[<i>psi</i>]细胞中荧光成均匀分布, 而在[<i>PSI</i>]细胞中荧光成分开的团块状.	[39]
1997	体外实验发现纯化的大肠杆菌表达的全长 Sup35 蛋白、它的 N 片段以及它的 NM 片段 ¹⁾ 三者, 在一定条件下都可以自动聚集成富含 β 折叠的淀粉样纤维, 并且发现如果在该体系内加入少量预先形成的淀粉样纤维, 该聚集过程将大大加快.	[40]
2000	从细菌中纯化的 Sup35 重组蛋白在体外可以折叠成具有自我增殖能力的构象体, 将该构象体导入酵母细胞可以诱导[<i>PSI</i>]表型的出现.	[41]
2002	从细菌中纯化的 HET-s 重组蛋白在体外可以折叠成淀粉样纤维, 将该淀粉样纤维导入 <i>Podospora anserina</i> 细胞可以诱导[Het-s]表型的出现.	[42]
2004	两个实验室独立地证明了: 同一种 Sup35 重组蛋白 N 端片段在体外不同条件下可以折叠成具有感染能力但空间构象不同的多种构象体.	[43,44]
	在体外实验中, 发现 Hsp104 在低浓度下可以催化 Sup35 重组蛋白 NM 片段(通过一寡聚中间体)形成淀粉样纤维, 而在高浓度下则具有抑制淀粉样纤维的形成和清除淀粉样纤维的能力.	[45]

¹⁾全长 Sup35 蛋白具有三个不同的结构域: N 端结构域(与[*PSI*]表型密切相关), 中间一段富含带电氨基酸的 M 结构域和 C 端结构域(直接参与蛋白质翻译的终止). N 片段只含 N 端结构域, 而 NM 片段包含 N 端结构域和 M 结构域.

随后的研究发现, $[PSI^+]$ 的作用不仅限于 $SUQ5$, 还可以作用于其他 tRNA 抑制子^[30, 46]. 后来又发现 $[PSI^+]$ 不仅对 tRNA 抑制子这类只能抑制一种无义突变的抑制子起调节作用, 还可以对由核糖体蛋白编码基因突变引起的全能抑制子(omnipotent suppressors)起调节作用^[47], 这类抑制子可以抑制所有导致出现三种终止密码子的无义突变.

$[PSI^+]$ 拥有如此广泛的作用, 又不遵循孟德尔遗传学规律, 探寻它的作用机制就成为科学家非常感兴趣的课题. 既然 $[PSI^+]$ 是非孟德尔遗传因子又可以通过细胞质传递, 首先怀疑 $[PSI^+]$ 是由一些位于细胞质内的核酸(如线粒体 DNA)或一些位于细胞核内但游离于染色体外的质粒引起的. 1982 年 Tuite 的实验排除了 $[PSI^+]$ 是由这些染色体外的核酸引起的可能性^[32](表 2). 接下来, 有人提出 $[PSI^+]$ 决定因子可能不是基因本身, 而是它的基因产物的假说^[33]. 而后发现 $[PSI^+]$ 与一种叫 SUP35 的基因直接相关, $[PSI^+]$ 表型的维持需要 Sup35 蛋白的持续表达, 而该基因的过量表达和一些缺失突变都会导致酵母 $[PSI^+]$ 表型的变化^[34-36].

第二阶段: 1994 年以后.

为了解释 $[PSI^+]$ 以及另一个酵母非孟德尔遗传因子 $[URE3]$, 1994 年 Wickner 提出运用哺乳动物的 prion 概念来解释这些出现在酵母上的非孟德尔遗传现象: 认为 $[psi^-]$ 转变成 $[PSI^+]$ 只是 Sup35 蛋白的空间构象改变, $[PSI^+]$ 状态的构象体(写成 Sup35^[PSI⁺])在一定条件下会自然出现, 但一旦形成就相对稳定且可以指导 $[psi^-]$ 状态的构象体(写成 Sup35^[psi⁻])转变成 Sup35^[PSI⁺]构象体, 从而使 Sup35^[PSI⁺]的分子数量增加, 而 Sup35^[psi⁻]的分子数量相应减少. 由于 Sup35^[PSI⁺]在细胞内趋于聚集成团块, 不能有效执行 Sup35^[psi⁻]作为蛋白质翻译终止因子的功能, 从而出现无义突变抑制的表型. 在细胞分裂的过程中 Sup35^[PSI⁺]会随着细胞质的分离进入子代细胞内^[28]. 根据该学说, 由于 $[PSI^+]$ 的决定因子不是基因本身而是拥有不同空间构象的蛋白质分子(Sup35^[PSI⁺]), 它当然不遵循孟德尔遗传学规律, 也就可以通过细胞质高效传递. 后来一系列的实验结果都证明了该学说的正确性(表 2): a. 酵母的 $[PSI^+]$ 表型与分子伴侣 Hsp104 的表达水平直接相关^[37], 而 Hsp104 已知的唯一功能是改变蛋白质的空间构象, 这暗示 $[PSI^+]$ 表型的改变是由于 Sup35 蛋白空间构象的改变造成的; b. Sup35^[PSI⁺]与 Sup35^[psi⁻]有许多明显不同的理化性质, 而 Sup35^[PSI⁺]具有很多与哺乳动物的

PrP^{Sc} 相似的一些性质^[39]; c. 从细菌中纯化的 Sup35 重组蛋白在体外可以折叠成富含 β 折叠的淀粉样纤维, 而将该淀粉样纤维导入酵母细胞可以诱导 $[PSI^+]$ 表型的出现^[41]; d. 同一种经纯化的 Sup35 重组蛋白 N 端片段在体外不同条件(比如不同温度)下可以折叠成具有感染能力但空间构象不同的多种构象体^[43, 44]. c. 和 d. 两组实验为 Wickner 的学说提供了最直接和最有力的实验证据, 充分证明了该学说的正确性.

3 哺乳动物 prion 生物学和真菌 prion 生物学的比较

上文简要回顾了哺乳动物 prion 生物学和真菌 prion 生物学各自的发展历程, 并介绍了该领域的一些最新研究成果. 作为一种由蛋白质介导的生物学现象, 二者有许多相同之处, 但在表现形式上二者又有许多不同之处. 为了更深刻地认识这一生物学现象, 有必要将二者进行比较, 总结出其中的相同点和不同点, 其中的相同之处往往是蛋白质储存和传递生物信息的一般规律, 而不同之处反映的是其表现形式的多样性.

3.1 哺乳动物 prion 现象和真菌 prion 现象的相同点

3.1.1 本质上二者都是由蛋白质介导的生物学现象, prion 决定蛋白质(如哺乳动物的 PrP 蛋白和真菌的 Sup35 蛋白)都各自存在至少两种不同的构象体, 其中的 prion 构象体(如哺乳动物的 PrP^{Sc} 和真菌的 Sup35^[PSI⁺])都具有自我增殖能力, 这是蛋白质之所以具有储存和传递生物信息功能的前提条件.

3.1.2 哺乳动物的 PrP^{Sc} 和真菌的 Sup35^[PSI⁺]具有非常相似的空间构象和理化性质. 比如: 二者都含有较丰富的 β 折叠; 都不易溶解, 易聚集成团块状, 在体外可以形成淀粉样纤维; 都具有不同程度的抵抗蛋白酶消化的能力.

3.1.3 Prion 表型的维持需要其相应的编码基因的持续表达, 删除其编码基因都将使 prion 表型消失, 这是由于 prion 构象体的增殖是通过不断改变 non-prion 构象体(如哺乳动物的 PrP^C 和真菌的 Sup35^[psi⁻])的空间构象来实现的.

3.1.4 都存在不同的“株系(strains)”现象: 即具有相同遗传背景的 prion 宿主, 可以产生不同的株系, 不同的株系在许多方面会表现出不同的性状. 这些不同的株系具有相同的氨基酸序列, 只是空间构象不同而已, 这是由于同一个 prion 决定蛋白质可以折叠成多个空间构象不同的构象体引起的. 这

与细菌或病毒的株系存在本质的区别, 后者往往是由于其基因组核苷酸序列突变引起的。

3.1.5 都存在“传播屏障(transmission barrier)”：来自不同物种的 prions 甚至来自同一物种但是不同株系的 prions 在感染宿主时具有不同的能力。例如：分离自小鼠的 PrP^{Sc} 很难感染黄金地鼠 (*Syrian hamsters*)，而分离自黄金地鼠的 PrP^{Sc} 也很难感染小鼠。真菌中也存在类似情况：分离自 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Candida albicans* 的 Sup35^[PSH] 同样不能互相感染。

3.2 哺乳动物 prion 现象和真菌 prion 现象的主要区别

3.2.1 哺乳动物 prions 和真菌 prions 的表型不同。已发现的哺乳动物 prions 会引起一类神经退行性疾病即 TSE 疾病，而真菌 prions 却参与了广泛的生物学基本过程，如蛋白质翻译的终止、氮源的利用等，没有证据表明真菌 prions 在这些过程中会对宿主产生不利的影响。

3.2.2 哺乳动物 prions 和真菌 prions 传递的表现形式不同。哺乳动物 prions 的传递表现为一种疾病的传播或感染，而真菌 prions 的传递往往表现为亲代细胞与子代细胞之间的非孟德尔遗传。

3.2.3 哺乳动物 prions 和真菌 prions 不同的“株系(strains)”各自引起的性状不同。哺乳动物 prions 不同株系在 TSE 疾病的潜伏期、脑部海绵状病变的部位等方面不同，而真菌 prions 不同株系在 Sup35^[PSH] 的活性、可溶性以及有丝分裂的稳定性等方面不同。

3.2.4 哺乳动物 prions 和真菌 prions 其决定蛋白质的氨基酸序列不存在明显的相似性，这也暗示 prion 现象不是个别现象，可能带有一定的普遍性。

4 总结和展望

从上文的讨论中我们可以得出如下结论：不论是哺乳动物 prion 现象还是真菌 prion 现象，其本质上是一样的，都是由蛋白质介导的生物信息的储存和传递。只不过在此过程中蛋白质储存和传递的生物信息是通过其空间构象来实现的，这与从 DNA 或 RNA 传递给蛋白质的信息不同，后者只是决定了蛋白质的一级结构即氨基酸序列。从这个意义上讲，可以认为蛋白质也是一种遗传物质。这又进一步丰富了生物学“中心法则”，可以将生物学“中心法则”的发展和完善划分为三个主要阶段。第一阶段：是由 Crick 在 20 世纪 50 年代提出的。当

时认为遗传信息的传递是单方向进行的，即从 DNA 到 RNA 再到蛋白质。这与当时的认识水平有关，当时认为只有 DNA 可以作为遗传物质。自从认识到 RNA 也可以作为遗传物质后，“中心法则”就发展到了第二个阶段：这时已经认识到遗传信息的传递已经不是单方向的了，RNA 也可以将自己的信息传递给 DNA。可以说“中心法则”现在已经发展到了第三阶段：蛋白质也可以作为遗传物质，它可以通过复制将自己储存的信息传递给子代分子。不过到目前为止，还没有证据证明蛋白质可以将自己储存的信息反向传递给 RNA 或 DNA。

其实，prion 生物学的研究不仅具有重大的理论意义，还有重大的实际意义。有证据表明，可能是由于食用了携带有疯牛病原体的牛肉而在人类引起的一种 TSE 疾病 (新型克雅氏病，vCJD) 已经在世界范围内导致了一百多人的死亡，造成了巨大的心理恐慌。为了阻止该疾病的大范围扩散，更是导致了几百万头牛被屠宰后掩埋或焚烧处理，造成了巨大的经济损失^[48]。

虽然我们对 prion 生物学的研究取得了辉煌的成就，但是仍然有许多实际问题和理论问题没能解决。实际应用上：a. 到目前为止，仍然没有开发出一种让人满意的足够灵敏和特异的活体 TSE 病原体检测技术。b. 也没有找到一种有效的 TSE 疾病的治疗药物或治疗手段，该疾病到目前为止依旧是不治之症。理论上：a. 在哺乳动物中仍然没能在体外利用纯化的重组 PrP 蛋白重新合成具有感染野生型小鼠的 prions。b. Prion 决定蛋白质在体内是如何从 non-prion 构象体转变成 prion 构象体的？这个转变过程是否需要别的细胞因子的参与？c. 哺乳动物中的 prions 是否只是 TSE 疾病的病原体 PrP^{Sc}？别的也是由于淀粉样聚集引起的神经退行性疾病 (如阿尔茨海默病，帕金森氏病，亨廷顿氏病等) 的病原体是否也是 prions？d. Prion 现象除了在哺乳动物和真菌存在外，别的门类的生物是否也存在这一现象？e. Prions 到底在多大范围参与和影响了生物学的基本过程？这类现象的出现究竟是自然选择的必然结果还是自然界的偶然事件？f. Prions 单独能称为生命体吗？在现今的自然界中或者在生命进化的某个阶段是否存在完全不依赖于核酸作为遗传物质的生命体？这其实涉及到在生命起源的初始阶段是先出现核酸分子还是先出现蛋白质分子的问题。要解决或正确回答上述这些问题，还需要科学家不懈的努力。

参 考 文 献

- 1 Prusiner S B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, **216** (4542): 136~144
- 2 Alper T, Cramp W A, Haig D A, *et al.* Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 1967, **214** (90): 764~766
- 3 Prusiner S B, Groth D F, Cochran S P, *et al.* Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry*, 1980, **19** (21): 4883~4891
- 4 Prusiner S B. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (23): 13363~13383
- 5 Gordon W S. Advances in veterinary research-looping ill, tick-borne fever and scrapie. *Vet Rec*, 1946, **58**: 516~520
- 6 Cuille J, Chelle P L. Experimental transmission of trembling to the goat. *C R Seances Acad Sci*, 1939, **208**: 1058~1160
- 7 Chandler R L. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, 1961, **1**: 1378~1379
- 8 Gajdusek D C, Gibbs C J, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, 1966, **209** (25): 794~796
- 9 Gibbs C J Jr, Gajdusek D C, *et al.* Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, 1968, **161** (839): 388~389
- 10 Alper T, Haig D A, Clarke M C. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966, **22** (3): 278~284
- 11 Griffith J S. Self-replication and scrapie. *Nature*, 1967, **215** (105): 1043~1044
- 12 Chesebro B, Race R, Wehrly K, *et al.* Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie infected and uninfected brain. *Nature*, 1985, **315** (6017): 331~333
- 13 Basler K, Oesch B, Scott M, *et al.* Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 1986, **46** (3): 417~428
- 14 Pan K M, Baldwin M, Nguyen J, *et al.* Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (23): 10962~10966
- 15 Bueler H R, Aguzzi A, Sailer A, *et al.* Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 1993, **73** (7): 1339~1347
- 16 Gabizon R, McKinley M P, Groth D, *et al.* Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (18): 6617~6621
- 17 White A R, Enever P, Tayebi M, *et al.* Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature*, 2003, **422** (6927): 80~83
- 18 Hsiao K, Baker H F, Crow T J, *et al.* Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, 1989, **338** (6213): 342~345
- 19 Kocisko D A, Come J H, Priola S A, *et al.* Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, 1994, **370** (6489): 471~474
- 20 Telling G C, Parchi P, DeArmond S J, *et al.* Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*, 1996, **274** (5295): 2079~2082
- 21 Safar J, Wille H, Itri V, *et al.* Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*, 1998, **4** (10): 1157~1165
- 22 Saborio G P, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 2001, **411** (6839): 810~813
- 23 Deleault N R, Lucassen R W, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 2003, **425** (6959): 717~720
- 24 Legname G, Baskakov I V, Nguyen H O, *et al.* Synthetic mammalian prions. *Science*, 2004, **305** (5684): 673~676
- 25 Couzin J. An end to the prion debate? Don't count on it. *Science*, 2004, **305** (5684): 589
- 26 Meier P, Genoud N, Prinz M, *et al.* Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) *in vivo* and antagonizes prion disease. *Cell*, 2003, **113** (1): 49~60
- 27 马文丽, 郑文岭. 疯牛病的分子基础与临床. 科学出版社, 2003. 1~10
Ma W L, Zheng W L. Molecular foundation and clinic of mad cow disease. Science Press, 2003. 1~10
- 28 Wickner R B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 1994, **264** (5158): 566~569
- 29 Cox B. [PSI], a cytoplasmic suppressor of super-suppression in yeast. *Heredity*, 1965, **20**: 505~521
- 30 Cox B S. A recessive lethal supersuppressor mutation in yeast and other *psi* phenomena. *Heredity*, 1971, **26** (2): 211~232
- 31 Tuite M F, Mundy C R, Cox B S. Agents that cause a high frequency of genetic change from [psi⁺] to [psi⁻] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1981, **98** (4): 691~711
- 32 Tuite M F, Lund P M, Futcher A B, *et al.* Relationship of the [psi] factor with other plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Plasmid*, 1982, **8** (2): 103~111
- 33 Cox B S, Tuite M F, McLaughlin C S. The *psi* factor of yeast: a problem in inheritance. *Yeast*, 1988, **4** (3): 159~178
- 34 Chernoff Y O, Derkach I L, Inge-Vechtomov S G. Multicopy SUP35 gene induces de novo appearance of *psi*-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1993, **24** (3): 268~270
- 35 Ter-Avanesyan M D, Kushnirov V V, Dagkesamanskaya A R, *et al.* Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Mol Microbiol*, 1993, **7** (5): 683~692
- 36 Ter-Avanesyan M D, Dagkesamanskaya A R, Kushnirov V V, *et al.* The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi⁻] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1994, **137** (3): 671~676
- 37 Chernoff Y O, Lindquist S L, Ono B, *et al.* Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [PSI⁺]. *Science*, 1995, **268** (5212): 880~884
- 38 Zhouravleva G, Frolova L, Le Goff X, *et al.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide

- chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J*, 1995, **14** (16): 4065~4072
- 39 Patino M M, Liu J J, Glover J R, *et al.* Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science*, 1996, **273** (5275): 622~626
- 40 Glover J R, Kowal A S, Schirmer E C, *et al.* Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of *[PSI+]*, a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell*, 1997, **89** (5): 811~819
- 41 Sparrer H E, Santoso A, Szoka F C, *et al.* Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast *[PSI+]* factor by in vitro-converted sup35 protein. *Science*, 2000, **289** (5479): 595~599
- 42 Maddelein M L, Dos Reis S, Duvezin-Caubet S, *et al.* Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (11): 7402~7407
- 43 King C Y, Diaz-Avalos R. Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*, 2004, **428** (6980): 319~323
- 44 Tanaka M, Chien P, Naber N, *et al.* Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature*, 2004, **428** (6980): 323~328
- 45 Shorter J, Lindquist S. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science*, 2004, **304** (5678): 1793~1797
- 46 Liebman S W, Sherman F. Extrachromosomal *psi⁺* determinant suppresses nonsense mutations in yeast. *J Bacteriol*, 1979, **139** (3): 1068~1071
- 47 Ono B, Chernoff Y O, Ishino-Arao Y, *et al.* Interactions between chromosomal omnipotent suppressors and extrachromosomal effectors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1991, **19** (4): 243~248
- 48 Knight R S, Will R G. Prion diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004, **75** (Suppl 1): i36~42

Protein-based Storage and Transmission of Biological Information: The Reinterpretation of Prion Biology*

YU Guo-Hua^{1,2)}, LIU Si-Guo¹⁾, CHENG Guo-Xiang^{1)**}

⁽¹⁾Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201203, China;

⁽²⁾Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract For a long time, proteins have been considered as the expression forms of DNA or RNA and proteins alone cannot store and transmit biological information. But storing and transmitting biological information are two essential characteristics of genetic materials. With the appearance and development of prion biology, people have known that proteins alone have the ability of storing and transmitting biological information. In some sense, proteins are also genetic materials. It is very necessary to rediscover and reinterpret prion biology in light of this new concept. Common rules of protein-based storage and transmission of biological information and the diversity of their manifestation can be seen by reviewing the history of mammalian prion biology and fungal prion biology and by introducing the latest progress in this field.

Key words prion biology, storage and transmission of biological information, protein conformation

*This work was supported by a grant from Shanghai Municipal Science and Technology Commission (04ZR14134).

**Corresponding author. Tel: 86-21-58951015-200, E-mail: chenggx@cngn.cn

Received: February 2, 2005 Accepted: February 28, 2005