

蓝藻的类金属硫蛋白及其研究进展

郭祥学 施定基¹⁾ 茹炳根

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 单细胞蓝藻中的类金属硫蛋白已经得到分离纯化, 并在蛋白质水平上与标准的哺乳动物金属硫蛋白做了对比性分析, 发现二者氨基酸组成和序列差异很大, 前者只形成一个结构域, 但二级结构和金属结合性质具有一定的相似性, 是进化上功能趋同的表现. 同时克隆并分析了它的基因 ORF 结构, 研究了金属诱导和逆向转录抑制对于蛋白质表达的调控及类似于哺乳动物金属硫蛋白基因具有的放大和重排现象机理, 提出了近期研究的重点和方向.

关键词 蓝藻, 类金属硫蛋白, smt-locus, MT 相关区域 1, 高度重复回文序列 1

1957 年 Margoshes 等在哺乳动物中发现金属硫蛋白 (metallothionein, MT), Olafson 等^[1]1984 年在蓝藻中也发现了一种具有多核硫基簇 (polynuclear thiol cluster) 的金属结合多肽, 称作蓝藻中的金属硫蛋白, 它实际上是一种类金属硫蛋白 (MT-like), 其氨基酸组成及基因 (smt-locus) 结构与前者差异很大, 共同之处仅限于高 Cys 含量, 低分子量和具有结合金属离子的性质等.

1 金属硫蛋白的诱导和结构分析

1984 年 Olafson 等在用金属离子诱导蓝藻 MT 产生的实验中发现, Cd^{2+} 最具有诱导效应, Zn^{2+} 其次 (类似于对哺乳动物 MT 的诱导), 而 Cu^{2+} 则没有明显的诱导效果, 同时发现金属离子对于蓝藻的生长有抑制效应, 并表现出一定浓度的耐受性, 认为 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 的耐受性是由于有效地导致 MT 高水平的表达, 而 Cu^{2+} 的耐受性则是通过膜外排机制实现的, 对蓝藻生长的抑制作用也最强, 蓝藻中 MT 对 Zn^{2+} 的优势选择有生理意义, 而 MT 结合 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} , 体现生物体对非必需元素的解毒作用, 利于生态环境自我调节.

1988 年, Olafson 等报道了唯一的蓝藻即聚球藻 PCC 6301 中的 MT 氨基酸序列, 它与

已知真核生物中如蟹、海胆、人和酵母等的 MT 序列相比, 同源率低于 20%^[1]. 主要差异在于: a. 分子前半部分有长达 6 个脂肪族氨基酸残基链, 分子中心部位还有相邻接的两个芳香族氨基酸残基, 使得这种 MT 呈较强的疏水性 (通常真核生物中 MT 的 N 端则为 4 个羟基氨基酸残基, 呈亲水性). b. 完全缺乏羟基氨基酸残基与 Cys 直接相连, 仅有 1 个碱性氨基酸与 Cys 相连接, 而这种连接在真核 MT 中是常见的, 尽管这种相连接的具体功能还不很清楚. 1985 年 Pande 等报道认为 Lys 的 ϵ -氨基与多核硫基簇存在氢键作用, 表明它对于分子构象形成应该有重要的作用, 聚球藻 PCC 7942 中的 MT 羧基端有 Gly-His-Thr-Gly 直接重复, 其中 His 在蓝藻 MT 家族中的独特出现, 证实了蓝藻 MT 可能起源于一个完全不同的原始祖先, 但从功能趋同上来比较 MT 二级结构, 则会发现有一些相似之处: a. 蓝藻 MT 的 Cys 含量为 19%, 低于高等生物 MT 平均含量 (约 32%), 也以 Cys-Cys, Cys-Xaa-Cys, Cys-Xaa-Xaa-Cys 等形式存在 (Xaa 指非 Cys 氨基酸). b. 圆二色性 (CD) 分析及 Chou 和 Fasman (1974 年) 经验定值研究表明

¹⁾中国科学院植物研究所光合作用研究室, 北京 100044.

收稿日期: 1995-06-21, 修回日期: 1995-09-18

蓝藻 MT 二级结构中, 类似于高等生物 MT, 没有 α 螺旋, 而有相当多的 β 转角和 β 折叠 (分别为 60% 和 30% 以上). 以 Cys 的巯基与金属相作用, 取代通常的氢键形成只有一个结构域的多核巯基簇结构, 而高等生物 MT 有 α 和 β 两个相对较独立的结构域, 后者更有效结合金属原子.

2 金属硫蛋白基因结构与表达

1993 年 Huckle 等^[2]在聚球藻 PCC 7942 分离出蓝藻 MT 基因: smt-locus (EMBL/Genbank/DDBJ 核苷酸序列数据库第 X64585 号), 并分析了基因的组成结构. smt B 表达一个抑制蛋白, 抑制与之反向读码框的 smt A 基因的转录, 从而阻止 MT 的表达. Smt B 直接作用于两个可译框架结构 (opening reading frame, ORF) 之间的 smt O-P 区^[3], 该区是典型的原核紧凑型基因启动区域, 在短短的 100 bp 区内有两个 ORF 的 SD-序列, -10 box, 及正、反向重复各一个, 转录起始位点各一个, 但未发现类似在 *E. coli* 中的 -35 box (图 1).

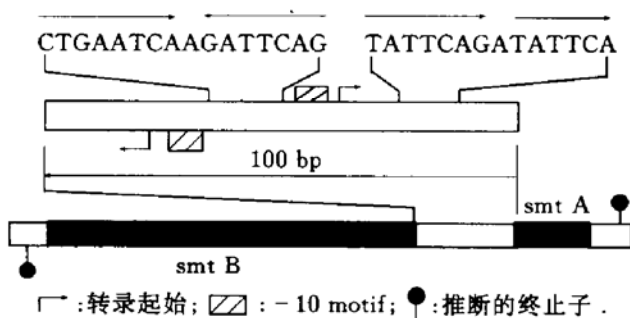


图 1 聚球藻 PCC 7942 smt-locus 的结构分析

Shi 等^[4]在大肠杆菌中用融合蛋白方式表达了 smt A 结构基因, 发现表达的蓝藻 MT 对 Zn^{2+} 等金属离子有高度的亲合性, 并把 *E. coli* 对 Zn^{2+} 的耐受力提高了 3 倍.

3 基因表达的调控及放大重排现象

Huckle 等^[2]分离 MT 基因的同时, 进行缺失试验研究了 smt A 5' 上游区的金属诱导性质, 在质粒 pPLACB₂ 上 O-P 区与 Lac Z 融合,

然后在 R₂-PIM₈ 中, 用 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 等离子诱导 Lac Z 表达并检测 β -半乳糖苷酶的活性, 结果表明: a. Zn^{2+} 最具有诱导效应, Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 其次, Co^{2+} 和 Hg^{2+} 作用很微小. b. 金属离子诱导作用于转录调控步骤, 其浓度对于转录体的稳定性没有影响. c. smt B 的完全缺失 (包括质粒和核 DNA 上 smt B 均缺失或被破坏) 表达效率最高, 高于本底 20 倍, 高于任何含 smt B 的藻表达量 4~5 倍.

Morby 等^[5]提出蛋白 Smt B 对 smt O-P 作用机理, 认为并证实在 smt O-P 区上结合一个受 Zn^{2+} 抑制的 DNA-蛋白复合物, 是 Smt B 的 69~88 位氨基酸形成的螺旋-转角-螺旋区域结合 DNA, 阻止 smt A 表达, 金属 Zn^{2+} 的螯合作用则有利于这种结合的解除, 该位点被称为 MT 相关区域 1 (metallothionein associated complex-1, MAC1), 位于 smt 的 O-P 区, 被 Zn^{2+} 竞争性结合, 诱导 MT 的表达. Gupta 等^[6]在研究聚球藻 PCC 6301 的镉耐受性时发现, Cd^{2+} 高抗藻落: C 3.2 染色体 smt A 片段杂交的结果出现 DNA 水平上增多的现象, 对 C 3.2 藻落的 smt 进行测序, 发现其 smt B 发生片段性缺失. 在缺失片段的两端存在等价的 8 碱基回文序列: 5'-GCGATCGC-3', 并以较高频率出现, 聚球藻中平均为 1 次/664 bp, PCC 6301 的 smt 中为 7 次/1326 bp, 进一步序列分析发现在其他藻类和细菌中也有存在,

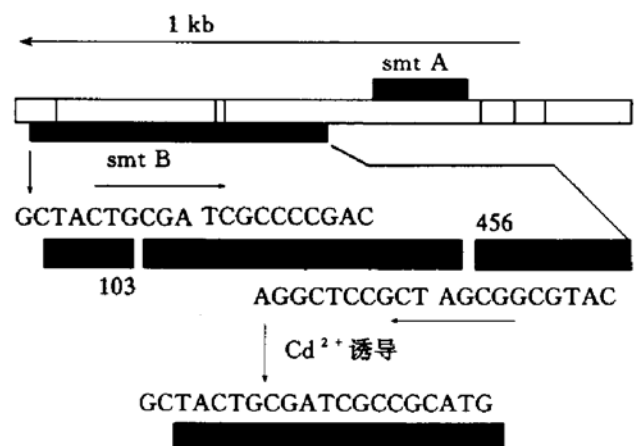


图 2 镉诱导下以 HIP1 为接头的 smt B 重排机理

被称作高度重复回文序列 1 (highly iterated palindrome, HIP1), 具有如下特点: a. 碱基数目少; b. 有极好的回文结构; c. 种系特异分布; d. 出现位置可以在蛋白编码区; e. 重复出现的频率高, 平均水平 4 倍于 REP/PU, 100 倍于 STRR.

HIP1 的存在使 smt B 在 Cd^{2+} 诱导下发生以 HIP1 为接头的基因内重排失活, 不能表达 Smt B 蛋白, 失去对 smt A 的转录抑制作用, 增强蓝藻 MT 表达和对镉的耐受能力 (图 2).

4 研究进展和存在的问题

目前, 在基因水平上研究蓝藻的 MT, 还仅限于单细胞蓝藻, 即聚球藻 PCC 6301 和 7942, 在聚球藻中通过插入失活构建出 $\text{R}_2\text{-PIM}_8$ (一种对金属离子高度敏感的基因工程藻)^[7]及同源重组构建外源基因整合平台^[8]为基因工程操作提供了方便.

虽然丝状体蓝藻 *Anabaena* PCC 7120 的转哺乳动物 MT 基因工作已经开展, 但外源 MT 基因能否得到有效表达及能否转入更有应用价值的藻种尚有待进一步深入, 聚球藻 PCC 7942 smt O-P 区, 是金属调控元件, 能否象哺乳动物 MT 启动子一样, 用于增强在清除环境中重金属污染有价值的蓝藻中 MT 表达, 是一种有意义的尝试.

参 考 文 献

- 1 Olafson R W, Mccubbin W D, Kay C M. *Biochem J*, 1988; **251**: 691
- 2 Huckle J W, Morby A P, Turner J S *et al.* *Molecular Microbiology*, 1993; **7** (2): 177
- 3 Dodd I B, Egan J B. *Nucleic Acids Research*, 1990; **18**: 5019
- 4 Shi J G, Lindsay W Y, Huckle J W *et al.* *FEBS Letter*,

1992; **303** (2.3): 159

- 5 Morby A P, Turner J S, Huckle J W *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1993; **21** (4): 921
- 6 Gupta A, Morby A P, Turner J S *et al.* *Molecular Microbiology*, 1993; **7** (2): 189
- 7 Turner J S, Morby A P, Whitton B A *et al.* *J Biol Chem*, 1993; **268** (6): 4494
- 8 der Plas J V, Hegeman H, de Vireze G *et al.* *Gene*, 1990; **95**: 39

Metallothionein and its Studying Trends in Cyanobacterium. Guo Xiangxue, Shi Dingji¹⁾, Ru Binggen (*College of Life Science, Peking University, Beijing 100871*; ¹⁾ *Botany institute, The Academy of Chinese Science, Beijing 100044, China*).

Abstract Unicellular cyanobacterium metallothionein (MT-like) has been isolated and analyzed comparing with mammal MT. Although there are many differences on their amino acid composition, primary sequence and domain numbers of tertiary structure, their secondary structure and metal-binding properties are similar to each other, showing a kind of function-trending evolution. The MT-like gene; smt-locus has also been cloned and studied about smt A ORF structure, expressional regulation by metal inducing and smt B reverse-transcribed inhibiting, and about the mechanism of the smt genetic amplification and rearrangement as mammal MT genetic unit. Some questions and focal points about cyanobacterium MT-like studying are suggested.

Key words cyanobacterium, metallothionein, MT-like, smt-locus, metallothionein associated complex-1, highly iterated palindrome 1