

- tumor necrosis factor- α messenger RNA. *Cancer Res*, 1997, **57** (23): 5426~ 5433
- 19 Hel Z, Skamene E, Radzioch D. Two distinct regions in the 3' untranslated region of tumor necrosis factor α mRNA form complexes with macrophage proteins. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (10): 5579~ 5590
- 20 Sanchez de Miguel L, Alonso J, Gonzalez-Fernandez F, *et al.* Evidence that an endothelial cytosolic protein binds to the 3'-untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA. *J Vasc Res*, 1999, **36** (3): 201~ 208

Tumor Suppressor Function and Expression Regulation of the 3'-Untranslated Region (3'-UTR) of Eukaryotic mRNA. LIU Ding-Gan (Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract In recent years the research on the roles of

eukaryotic mRNA 3' UTR in suppression of malignant phenotype of tumor cells has achieved very exciting advances. It has been found that the 3' UTR is involved in regulation of function of known oncogenes and antioncogenes; that the inactivation of some antioncogenes came from the structural changes of their 3' UTR; and that the 3' UTR of several genes exerted antioncogene activity after transfection into malignant cells. Apart from these, further studies have also been performed on the roles of 3' UTR in regulation of mRNA expression. Recent advances of part of studies in this field are reviewed.

Key words tumor suppression, expression regulation, 3' untranslated region

苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白的结构与功能研究进展

邵宗泽^{1,2)} 刘子铎¹⁾ 喻子牛^{1)*}

(¹⁾华中农业大学微生物科学技术系, 农业部农业微生物重点开放实验室, 武汉 430070; ²⁾山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

摘要 苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 杀虫晶体蛋白的毒性肽由三个典型的结构域组成。结构域 I 位于肽链的 N 端, 为一组由 6~ 7 个两亲的 α 螺旋围绕着一个疏水的 α 螺旋形成的 α 螺旋束, 参与了细胞膜的穿孔; 结构域 II 位于肽链的中间, 为三组以“希腊钥匙”(Greek key) 拓扑结构连接在一起的反平行的 β 折叠片层, 其顶端的突环参与了毒素与受体蛋白的结合; 位于 C 端的结构域 III 是由两组反平行的 β 折叠片层组成的夹心结构, 以 β 果酱卷 (jelly roll) 拓扑结构排列, 可能能够防止蛋白酶对毒素分子的过度降解。

关键词 苏云金芽胞杆菌, 杀虫晶体蛋白, 结构域

学科分类号 Q71

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一种重要的昆虫病原细菌, 杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs) 是其主要杀虫成分, 也是细菌毒素中结构与功能研究较为深入的一种^[1, 2]。目前, 已克隆到的杀虫晶体蛋白按氨基酸序列同源性分为 138 种^[3]。除 9 种 Cyt 蛋白外, 其他都是由 *cry* 基因编码的 Cry 蛋白, 它们在一级结构上存在 5~ 8 个保守区, 而空间结构都为相似的三结构域球状蛋白。这类蛋白质具有杀虫专一性, 对多种农林和卫生害虫有毒杀作用^[4]。苏云金芽胞杆菌制剂及转杀虫晶体蛋白基因植物已成为害虫生物防治的重要手段, 而杀虫晶体蛋白的结构与功能研究对于阐明其杀虫机理、提高杀虫活性具有重要的指导作用。

1 保守区与结构域

比较毒素的氨基酸序列, 发现大多数毒素在一级结构上都含有 5 个保守区, 一些大分子量毒素 (130~ 140 ku) 还含有另外位于 C 端非毒性区的 3 个保守区 (图 1)^[5]。氨基酸序列同源性系谱显示, 所有的杀虫晶体蛋白 (包括 Cry 蛋白和 Cyt 蛋白) 可明显分成五组, 外加一种 Cry15。第一组包括 Cry1、Cry3、Cry4、Cry7~ Cry10、Cry16、Cry17、Cry19 和 Cry20 共 11 类 Cry 蛋白, 它们全部含有第 1~ 5 个保守区 (图 1); 第二组包括 Cry5、

* 通讯联系人。

Tel: (027) 897396030, E-mail: yz41@public.wh.hb.cn

收稿日期: 1999-09-13, 修回日期: 1999-12-24

Cry12~ Cry 14 和 Cry21 共 5 类 Cry 蛋白, 它们都含有第 1、2、4、5 四个保守区, 而缺少第三保守区. 以上两组都含有非毒性区的 C 端的延伸和第 6~8 保守区. 第三组包括 Cry2、Cry11 和 Cry18 三类蛋白, 它们仅含第一和部分第二保守区. 其他毒素包括 Cyt 蛋白 (第四组) 和另外 3 类 Cry 蛋白则不含这些保守区. 保守区的存在表明不同杀虫晶体蛋白之间三维结构的相似性.

保守区-1 内含有结构域 I 中的 α_5 螺旋, 该部位的高度保守说明 α_5 螺旋对于维持结构域 I 的完整性以及在对昆虫中肠上皮细胞的膜穿孔中具有重要作用 (图 2a). 保守区-2 含有结构域 I 的 α_7 螺旋

和结构域 II 中的第一条 β 链, 它们构成了两结构域之间的连接, 该区内的三对盐键对于维持蛋白质分子的球状结构, 以及结构域 I 与膜作用时方向可变性都有重要作用. 保守区-3 是跨于结构域 II~III 的一条 β 链. 保守区-4 含有结构域 III 中的一条 β 链, 该区中心的四个精氨酸残基与疏水残基相间排列, 位于蛋白质分子的表面, 这些碱性残基可能在晶体形成过程中, 或毒性肽在膜穿孔的聚合过程中, 参与了分子间盐键的形成. 保守区-5 含有肽链的 C 端, 包埋于结构域 III 的 β 链中, 它对于防止蛋白酶对毒素分子的进一步降解有保护作用.

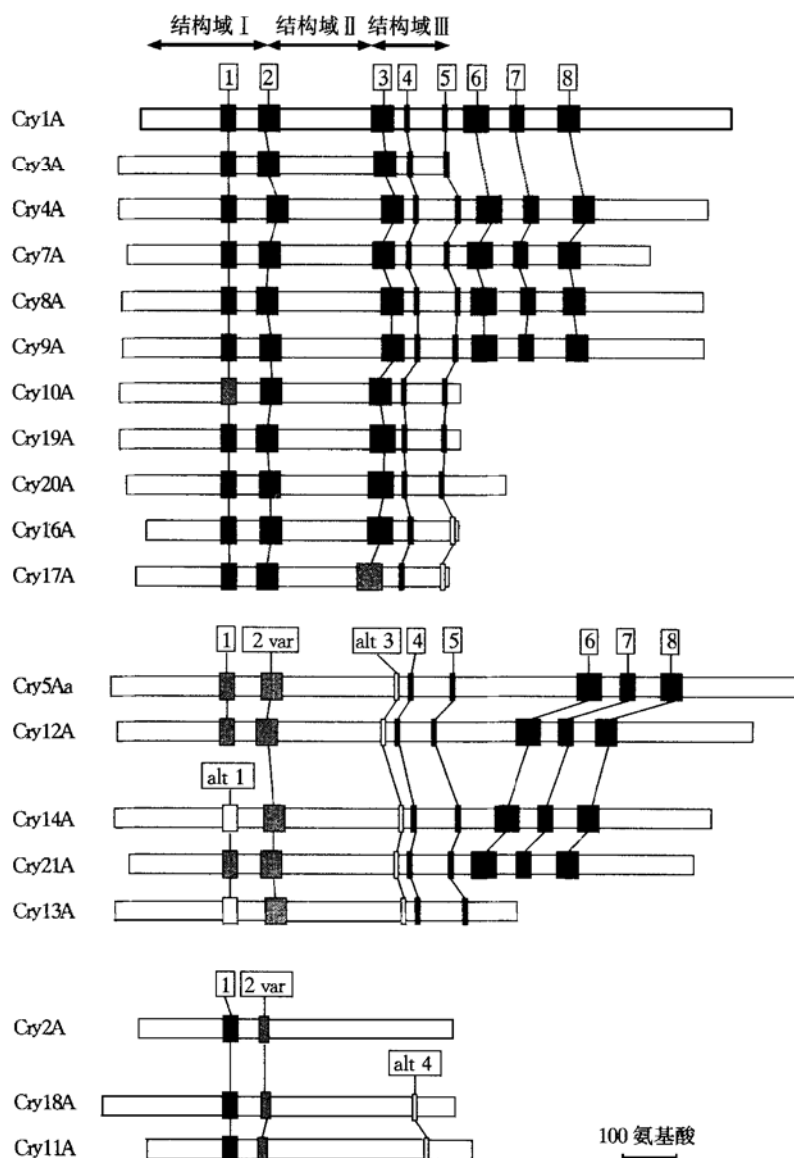


图 1 杀虫晶体蛋白的保守区

1~5 保守区位于毒性肽编码区, 6~8 保守区位于 130~140 ku 大分子毒素的 C 端, 详细说明见文中. 图中保守区的颜色分黑、灰、白, 分别代表高、中、低度保守.

2 三维结构

苏云金芽胞杆菌 ICPs 三维结构分析, 一般要先将天然的伴胞晶体溶解, 用蛋白酶将原毒素活化成毒性肽, 再经纯化、重结晶及重原子多对同晶置换 (multiple isomorphous replacement), X 衍射数据采集, 相角计算等过程最后获得图象. 蛋白质晶体是“湿晶体”, 因此, 获得的三维结构结果能够代表它们在溶液状态中的实际构象.

2.1 杀虫晶体蛋白 Cry3A 的结构

杀鳞翅目幼虫的 Cry3A 晶体蛋白由三个结构域构成 (图 2a)^[6], 位于 N 端的结构域 I 由 7 个 α 螺旋组成, 六个两亲的 α 螺旋 (amphipathic helices) 围绕着一个中央疏水的 (hydrophobic) α 螺旋 (α_5) 形成一个 α 螺旋束. 这些 α 螺旋, 特别是 α_3 和 α_7 较长, 含有 6~9 圈螺旋 (α 螺旋螺距为 0.55 nm). 这个长度足以跨过 3 nm 厚的双层膜的疏水区, 这一结构可能参与了细胞膜的穿孔. 结构域 II 由三组反平行的 β 折叠片层 (sheet) 组成, 以“希腊钥匙”拓扑结构 (“Greek Key” topology) 连接在一起, 呈 β -三棱柱状围成一个三角形的疏水内核, 位于它们顶端的突环 (loop) 集中, 形成整个分子的顶点. 它们可能参与了与膜受体蛋白的识别与结合. 结构域 III 是由两个反平行的 β 折叠片层组成的夹心结构, 呈 β -果酱卷拓扑结构 (β -jelly roll topology) 毒性肽分子的 C 端被深深地包埋于 β 折叠片层之间, 这种结构可能有利于防止昆虫肠道蛋白酶对毒性肽的进一步降解.

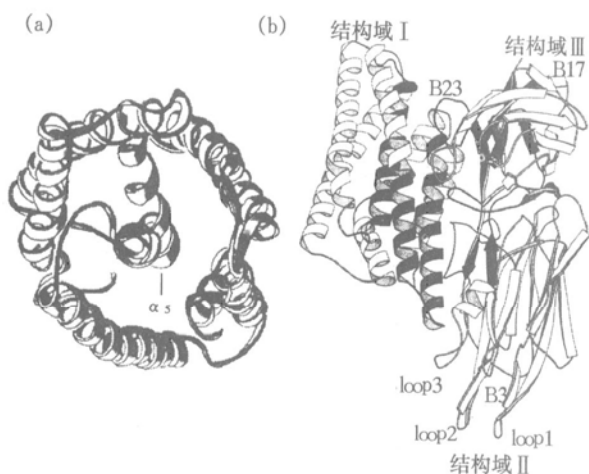


图 2 杀虫晶体蛋白 Cry3A 的分子结构^[6]

(a) 结构域 I; (b) 整个毒素分子的三结构域结构, 图中黑色部分为五个保守区段.

2.2 杀虫晶体蛋白 Cry1A 的结构

Grochowski 等^[7]用 X 光衍射分析杀鳞翅目幼虫的 Cry1Aa 的 65 ku 毒性肽 (原毒素为 133 ku), 发现它的结构域组成与 Cry3A 相似 (图 3). 略有不同的是, 其结构域 I 是由 8 个 α 螺旋组成的, 即由 7 个两亲的螺旋围绕一个位于中央的相对疏水的螺旋而成; 此外, 结构域 II 的片层的突环 2 较 Cry3A 大. 可能正是结构上这些细微的差别决定了它们杀虫专一性的不同. 与 Cry1Aa 高度同源的其他 Cry1A 晶体蛋白 (如 Cry1Ab、Cry1Ac), 根据氨基酸序列的计算机模拟表明它们也是由三个相似的结构域组成的^[8].



图 3 杀虫晶体蛋白 Cry1Aa 的分子结构^[7]
65 ku 的毒性肽部分.

2.3 杀虫晶体蛋白 Cry2Aa 的结构

Morse 等^[9]对具有双毒性 (即对鳞翅目和双翅目幼虫都有毒) 的 Cry2Aa (70 ku) 的原毒素作了晶体结构分析. 结果表明, 虽然 Cry2Aa 分子的整体构造与 Cry3A 和 Cry1Aa 一样. 其结构域 I 从 Ala 20 到第 273 个残基, 由 8 个反平行的螺旋束组成; 结构域 II 包括第 274 位的 Asn 到 474 位的 Ile, 该结构域虽然在一级结构上属高变区, 但在空间结构上还是保守的. 即也是由三个 β 折叠片层组成. 与其他毒素不同的是, 结构域 II 的第二个 β 折叠片层中的一条 β 链被一段 α 螺旋取代. 结构域 III 包括第 485 位的组氨酸到 C 端的第 633 位的酪氨酸, 是由卷曲的反平行的 β 折叠片层面对面堆集而成的夹心结构. 这三个结构域的相对取向 (以结构域 I 的螺旋束为参照) 与 Cry3A 和 Cry1Aa 相比, 结构域 II 分别偏移 21° 和 14° ; 结构域 III 分别偏移 5° 和 6° .

有意思的是, 该类蛋白质虽然缺少多个保守区, 但仍能维持与 Cry1 和 Cry3 相似的空间结构.



图 4 杀虫晶体蛋白 Cyt2A 的分子结构^[10]

2.4 杀虫晶体蛋白 Cyt 的结构

Cyt 蛋白是一种由 *cyt* 基因编码的溶细胞蛋白, 对各种细胞皆有毒性^[11], 是杀蚊幼虫的以色列亚种伴胞晶体的成分之一. Cyt1A 不仅能提高 Cry11A 的杀虫活性^[12], 而且可能对于克服昆虫对苏云金芽胞杆菌的抗性有作用. 虽然目前还不清楚它是如何增效和克服抗性的, 但这肯定与它独特的结构和作用机制有关.

与 Cry 蛋白不同, Cyt2Aa 为 α/β 单结构域 (α 螺旋 24%, β 折叠 33%), 是由两外层的 α 螺旋发卡被混杂的 β 折叠片层缠绕而成^[10] (图 4). 原毒素形式的 Cyt2A 为二聚体, 它们以由 12 条链组成的 β 折叠片层交互连接. 经蛋白酶酶切可释放出单体, 然后再切去 C 端尾巴, 即成为上述的活性形式. 推测 Cyt1A 也有类似结构. 在毒素分子与膜的相互作用及自装配过程中, Cyt2A 分子中的螺旋 A 和螺旋 C 起了主要作用, 但它们的长度不能跨过脂膜. 插入膜并造成膜穿孔是长的、两亲的 β 折叠片层 (3.6 nm), 而不是 α 螺旋^[13], 这是有别于疏水螺旋的另一种穿孔机制.

3 结构域功能

在 Cry 蛋白毒素分子中, 由数个两亲 α 螺旋围绕一个疏水螺旋形成的结构域 I 是典型的细胞膜穿孔结构, 与其他细菌毒素 (如大肠杆菌毒素 A 和白喉毒素) 的膜作用结构域的结构相似^[2]. 该结构域在与细胞膜作用前须先经较大的构象变化 (由结构域 II 与膜作用后引发), 位于螺旋束中央的 α_5 被弹出, 暴露出螺旋束的疏水面并进一步与细胞膜作用, 结果两亲的 α 螺旋插入到细胞膜中, 多个这样

的螺旋在细胞膜中聚合就形成了内表面 (腔面) 亲水、外表面 (膜面) 疏水的离子通道.

结构域 II 的 β 折叠片层上的突环参与了毒素分子与昆虫中肠上皮细胞膜受体蛋白的识别与结合. 结构域 II 位于高变区. 毒素不同, 突环的大小及氨基酸组成也不同. 因而, 每种毒素都呈现出特定的杀虫专一性.

根据其结构推测, 位于毒素分子 C 端的结构域 III 可能在防止昆虫肠道蛋白酶对毒素分子的过度降解中起一定作用. 此外, 在某些毒素中它还参与了与膜的结合并对离子通道活性有一定影响. 出于对 ICPs 作用机制的探讨和对高毒 ICPs 的渴求, 人们必将对这些结构域及其功能进行更深入的研究.

致谢 在图片的采集过程中, 剑桥大学的 Ellar 教授和华中农业大学的吴岚博士给予了大力帮助, 谨表谢忱.

参 考 文 献

- Hofte H, Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev, 1989, **53** (2): 242~255
- Lesieur C, Vecsey-Semjen B, Abrami L, et al. Membrane insertion: the strategies of toxins (Review). Mol Membrane Biol, 1997, **14**: 45~64
- Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, **62** (3): 808~813
- 喻子牛, 孙明, 陈亚华, 等. 生物活性蛋白基因在动、植物病虫害防治中的应用. 农业生物技术学报, 1995, **3** (1): 100~110
- Yu Z N, Sun M, Chen Y H, et al. J Agri Biotech, 1995, **3** (1): 100~110
- Schnepf E, Crickmore N, van Ran J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, **62** (3): 775~806
- Li J D, Carroll J, Ellar D J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature, 1991, **353** (31): 815~821
- Grochowski P, Masson L, Borisova S, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIAa insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J Mol Biol, 1995, **254** (3): 447~464
- Powell G K, Charlton C A, Yamamoto T. Recent advances in structure and function research on *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In: Feng T Y, eds. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental Benefits, Taipei: Hua Shiang Yuan Publishing Co. 1995. 1~20
- Morse R J, Powell G, Ramalingam V, et al. Crystal structure of Cry2Aa from *Bacillus thuringiensis* at 2.2 Å resolution: structure basis of dual specificity. VIIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control & IVth International Conference on *Bacillus thuringiensis*, Sapporo, Japan, 1998
- Li J D, Koni P A, Ellar D J. Structure of the mosquitoicidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* SP. kyushuensis and implications for membrane poration. J Mol Biol, 1996, **257** (1): 129~152
- 刘子铎, 孙明, 陈亚华, 等. 苏云金芽胞杆菌以色列亚种

20kDa 蛋白质对 CytA 蛋白溶细胞作用的影响. 遗传学报, 1999, 26 (1): 81~ 86

Liu Z D, Sun M, Chen Y H. *et al.* Acta Genetica Sinica, 1999, 26 (1): 81~ 86

- 12 Wu D, Johnson J J, Federici B A. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. Mol Microbiol. 1994, 13 (16): 965~ 972

- 13 Gazit E, Burshtein N, Ellar D J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxin associates specifically with its synthetic helices A and C in the membrane bound state: Implication for the assembly of oligomeric transmembrane pores. Biochemistry, 1997, 36 (49): 15546~ 15554

Advances in 3-Dimensional Structure and Function of Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. SHAO Zong-Ze^{1,2)}, LIU Zi-Duo¹⁾, YU Zi-Niu¹⁾ (¹⁾ Department of Microbial Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²⁾ Life Science College, Shandong Agricultural University, Taian 271018,

China).

Abstract Three-dimensional structure of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* has been revealed to be three distinct domains. It has been found that different Cry toxins share similar structures. Domain I, consisting of a bundle of α -helices in which a hydrophobic helix 5 is surrounded by 6~ 7 amphipathic helices, plays a unique role in pore formation. Domain II, consisting of three antiparallel β -sheets with a loop at each apex, is responsible for receptor binding. Domain III consists of two twisted, antiparallel β -sheets forming a $\alpha\beta$ -sandwich with a "jelly roll" topology, it might prevent the activated toxin from excessive degradation.

Key words *Bacillus thuringiensis*, insecticidal crystal proteins, domain

神经干细胞研究进展

唐炯 赵寿元 李昌本

(复旦大学遗传研究所, 上海 200433)

摘要 神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 是中枢神经系统中保持分裂和分化潜能的细胞, 对它的研究和应用已成为近年来脑科学研究的一个重要领域. 神经干细胞体外培养技术的建立提供了对其进行研究的有力手段. 目前的研究主要集中于神经干细胞在脑中的起源、分布及在中枢神经系统疾病治疗中的应用等方面.

关键词 神经干细胞, 分化, 移植, 帕金森氏综合征

学科分类号 Q343, Q954.52

神经干细胞的研究工作已成为近年来脑科学研究的一个重要领域. 它不仅改变了认为成年动物的神经细胞不能分裂的传统观点, 而且在研究脑的发育和分化以及疾病治疗上均具有重大价值.

早在 20 世纪 60 年代, Altman^[1]用同位素标记的胸腺嘧啶掺入脑中, 发现新皮层、海马、嗅球的细胞有同位素掺入, 证明这些区域有能分裂的细胞存在. 但作为干细胞必须具备以下特征: a. 能在动物的整个生命过程中持续分裂或保持分裂能力; b. 能通过分裂产生相同的干细胞来维持自身的存在, 同时也能产生子细胞并进一步分化成各种成熟的细胞^[2,3]. 由于当时的条件无法进行活体追踪, 体外培养也未能建立, 因此传统观点一直占优势^[4].

1 神经干细胞的特点

神经干细胞的分离和鉴定是由于体外培养技术的建立而获得成功的. 研究对象主要是啮齿类动物和人体细胞. 取自胚胎、新生和成年动物的脑组织均能在体外培养出神经干细胞. 获得神经干细胞的方式有三种: a. 用反转录病毒导入原癌基因, 如 v-myc 和 SV40 大 T 抗原等, 部分细胞因此获得持续分裂的能力^[2]; b. 用特殊的无血清培养条件结合表皮生长因子 (EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的作用, 使细胞在体外增殖^[2,3]; c. 通过诱导胚胎干细胞, 使其分化成神经干细

Tel: (021) 65642428, E-mail: syzhao@fudan.edu.cn

收稿日期: 1999-12-19, 修回日期: 2000-04-20