

冷激蛋白的研究进展*

郭建军 龚兴国**

(浙江大学生物技术系, 杭州 310027)

摘要 冷激蛋白 (CSPs) 广泛存在于革兰氏阳性菌和阴性菌中, 它是细胞在应对冷刺激时所产生的一系列 7 ku 左右的蛋白质, 结构上富含芳香族氨基酸, 起着重要的分子伴侣作用, 能够增强细胞抵御冷激环境胁迫的能力. 以大肠杆菌、枯草杆菌、嗜热链球菌、沙门氏杆菌等为例, 介绍各种冷激蛋白在产生、结构、调控等方面的异同, 以及它在生产、生活中的应用价值.

关键词 冷激蛋白, 分子伴侣, 细胞生长

学科分类号 Q51

细菌都能适应比其最佳生长温度低得多的低温环境, 当细胞对迅速下降的生长温度做出反应时, 一系列分子质量 7 ku 左右的蛋白质被强烈诱导产生, 这一系列蛋白质被称为冷激蛋白 (cold shock proteins, CSPs). CSPs 在细胞适应低温环境和增强抗冻能力方面发挥着重要作用, 这意味着对 CSPs 的研究有着广泛的应用价值. 典型的例子是选育乳酸菌的抗冻菌株. 乳酸菌是食品工业中重要的菌株, 工业中许多乳酸菌发酵都从添加冷冻的培养物开始, 这对菌株的抗冻能力有较高的要求, 因而增强菌种冷适应方面的研究引起人们广泛的兴趣^[1]. 正是 CSPs 的抗冻功能以及在生产、生活中对抗冻物种的需求促使了 CSPs 研究的逐渐兴起.

1 CSPs 在生物界的分布

CSPs 的分布非常广泛^[2], 几乎存在于所有的革兰氏阳性菌和阴性菌中, 比如大肠杆菌^[3] (*Escherichia coli*)、嗜热链球菌^[1] (*Streptococcus thermophilus*)、枯草杆菌^[4] (*Bacillus subtilis*)、沙门氏杆菌^[5] (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) 等都证实有 CSPs 的存在.

当 *E. coli* 从 37 °C 转到 10 °C 培养时, 会出现大约 4 h 的生长停滞, 此时绝大多数蛋白质的表达水平很低, 但有 24 种蛋白质表达水平明显偏高, 其中 15 种是暂时升高的, 4 h 后恢复到较低水平. CspA (cold shock protein A, 7 ku) 在正常状态下较少存在, 但冷激状态下最容易被观察到^[6]. 8 种 CSPs (CspB~ CspI) 与 CspA 具有同源性, 但仅有 CspA、CspB、CspG、CspH 和 CspI 是冷激诱导的, 其余 CSPs 的产生条件各不相同. 如 *E. coli* 在稳定期和营养缺乏时才产生 CspD, 而营养物增加时则

引起 CspA 的表达^[7,8].

与 *E. coli* 相似, 将嗜热链球菌于 20 °C 环境下保存 2~ 4 h 后, CSPs 的水平会增加 3~ 4 倍, 若把温度下调至 10 °C, 则基本上没发现 CSPs, 说明 10 °C 是该菌株所能耐受的最低温度. CspA 也是嗜热链球菌中最主要的 CSPs 之一, 当细胞从 42 °C 转到 20 °C 的环境后, CspA 表达水平大约会增加 3 倍, CspB、CspC、CspE、CspF 等虽然都有所表达, 但远不如 CspA 明显^[1], 同时该菌株的 CspD 也不被冷激诱导, 当然在 10 °C 时更不可能存在.

与前者不同, 枯草杆菌冷激后不会出现生长的停滞, 而是持续的缓慢生长. 当枯草杆菌的培养温度从 37 °C 降至 15 °C 时, 30~ 60 s 内有 36 种蛋白质被合成, 其中有一个同源的酸性小蛋白质家族 (CspB、CspC、CspD, 其同源性超过 70%) 得到鉴定^[3,4], 并发现 CspA 不是其成员, 此时 CspB 取代了它的位置. CspB 一般在培养温度小于 20 °C 时才存在, 但并不代表在正常生长时就不表达, 因为当枯草杆菌从指数期进入稳定期后, 蛋白质的合成方式会发生明显的变化, 这时 CspB、CspC 两种同源酸性小蛋白都能被诱导, 而 CspD 一直没有出现^[9]. 这一点与 *E. coli* 也存在着显著的差异.

E. coli 和沙门氏杆菌都含有 CspH 基因^[5], 当沙门氏杆菌在 15 °C 冷激后, CspH 的水平大约会上升 4~ 5 倍, 但稳定期内它并不表达. 此外 CspH 被诱导也可以发生在 37 °C 条件下指数期早期内.

虽然产生 CSPs 的细菌种类非常广泛, 其含有

* 浙江省自然科学基金资助项目 (396007) 及浙江大学曹光彪科技基金项目 (171026).

** 通讯联系人. Tel: 0571-87951537

E-mail: gongxg@cls.zju.edu.cn, gongxg@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 2002-03-14, 接受日期: 2002-05-08

的 CSPs 也千差万别, 但并不是在所有的细菌内都有 CSPs 的存在, 有人报道 *Campylobacter jejuni* 就是未检测出 CSPs 的一种菌株^[10].

2 CSPs 的结构特点

绝大部分 CSPs 都属于一个蛋白质家族 (CspA

家族), 它们的同源性极高, 蛋白质结构也非常相似. 如 CspA、CspB 和 CspD 就存在极大的相似性 (它们所编码蛋白质的氨基酸序列如图 1 所示^[11]), 从图 1 可以看出, 它们都有两个富含芳香族氨基酸残基的 ssRNA 结合位点.



Fig. 1 Alignment of the deduced amino acid sequence of some CSPs^[11]

图 1 几种细菌的 CSPs 的氨基酸序列比较^[11]

S. thermophilus CNRZ302 (CspA^s)、*S. thermophilus* ST1-1 (Csp *S. therm* ST1-1)、*S. dysgalactiae* (Csp *S. dys*)、*S. pyogenes* (Csp *S. pyo*)、*L. lactis* (CspA^L, CspD^L)、*B. subtilis* (CspB^B) 等细菌 CSPs 的氨基酸序列比较, 阴影部分表示 RNA 结合的部位——模体 1 和模体 2 (RNP1、RNP2)。

X 射线晶体分析和核磁共振光谱分析表明, *E. coli* 的 CspA 由 70 个氨基酸组成, 蛋白质的二级结构中包含了 5 条反向平行的 β 链, 形成两个类似“桶”的结构 (其中一个“桶”含有 3 条 β 链). 同时有 7 个含芳香环的保守氨基酸残基暴露在外, 形成疏水的表面, 这其中存在一个结构域, 称为冷激域 (cold shock domain, CSD). 其含有两个能与 ssRNA 结合的模体 (motif) RNP1 和 RNP2^[2, 11]. 这可能是 CspA 执行其分子伴侣功能的部位.

与 CspA 类似, CspB 也有一个富含芳香环的外表面, 在其 CSD 中假定的 RNA 结合位点 (RNP1 和 RNP2) 上含有三个苯丙氨酸残基 (F15、F17、F27). 研究证实^[12], 它们都是结合 ssRNA 所必需的, 若 F15、F17、F27 被 Ala 代替或 His29 被 Glu 代替, CspB 将丧失对 ssRNA 的结合能力, 而 F15 被 Try 代替, 则能提高结合能力.

绝大部分 CSPs 都具有 ssRNA 分子伴侣的功能, 执行此功能的必要条件是存在与 ssRNA 结合的结构域, 且此结构域一般富含芳香族氨基酸残基. 所以, 具有一个富含芳香族氨基酸的疏水外表面应该是 CSPs 共有的特点.

一般认为 CspA 家族成员都含有 8 个芳香族氨基酸残基 (6 Phe, 1 Tyr, 1 Trp), 但研究发现^[5], CspF 和 CspH 所含的芳香族氨基酸残基 (3 ~ 4 个) 比其他 CSPs 少得多, 这也许表明它们所

执行的功能不同于其他 CSPs, 因为相比之下, 含芳香族氨基酸残基少的 CSPs 更容易与 DNA 结合, 而不是 RNA.

3 CSPs 的表达调控

CSPs 有一个复杂的表达调控机制, 大部分 CSPs 都存在基因转录、mRNA 稳定性和翻译水平三个层面上的表达调控.

3.1 转录水平的调控

嗜热链球菌 CSPs 的 mRNA 水平在 42 °C 时很低, 而经过 2~4 h 20 °C 冷激后, mRNA 水平陡增 7~9 倍^[1]. 在冷激状态下, 枯草杆菌的 CspB 和 CspC 的基因转录水平也增加了 4 倍. 这些都表明 CSPs 基因表达水平在冷激过程中明显增加, 这种冷激后 mRNA 转录水平增加的原因可能在于其启动子结构上, 研究证明, *E. coli* 的 CspA 启动子 -35 区包含一个 25 bp 的富含 AT 的上游序列^[13], 枯草杆菌的 CspB 启动子也有着序列上的相似性. 猜测该结构在 CSPs 低温转录的起始过程中起着重要作用.

3.2 mRNA 的稳定性

E. coli 在 37 °C 时基本上观察不到有 CspA 的表达 (营养增加时除外), 而在冷激状态下却有大量 CspA 产生. 是不是因为 CspA 基因在 37 °C 不表达呢? 有研究证实, *E. coli* CspA 的启动子在 37 °C 时

有很强的活性, 说明该温度下基因转录应该是正常的. 事实上 *E. coli* CspA 的 mRNA 在 37 °C 时非常不稳定, 相反在冷激状态下变得稳定起来, 看来 mRNA 的不稳定性才是 CspA 在 37 °C 微量表达或不表达的最主要原因, 所以说 *E. coli* CspA 的表达是一种典型的转录后调控. 有资料显示^[2, 14], CspA 基因的 5' 非翻译区 (5'-untranslation region, 5'-UTR) 对 mRNA 的稳定性有着极大的影响, 特别是当 SD (Shine-Dalgarno, SD) 序列中有 3 个碱基被取代时, mRNA 的稳定性将大大提高. 再则, 37 °C 时 CspH 的 mRNA 比任何其他 CSPs 的 mRNA 都稳定^[5] (半衰期 70 s, 而 CspA mRNA 的半衰期只有 20 s), 其 mRNA 的 5'-UTR 也极短. 以上这些都提示: CSPs 表达调控深层次的原因或许在于其 5'-UTR. 枯草杆菌 CspB 和 CspC 的基因转录水平在冷激状态下有所增加, 而在此过程中, mRNA 的水平却保持稳定. 这种现象并不是由 37 °C 时 CspB 和 CspC mRNA 的不稳定引起的, 因为 CspA 和 CspB 在低温表达时有着不同的调控机制.

在冷适应后期, 冷激蛋白 mRNA 水平的明显降低是否也由 5'-UTR 长短决定呢? 事实并非如此, 因为这种 mRNA 的选择性降解与多聚核苷酸磷酸化酶 (PNPase) 有关系^[15]. PNP 突变菌株在冷激后 24 h 内维持着高水平 CSPs, 而高水平的

CSPs mRNA 会抑制冷激后菌株的继续生长, 因此 25 °C 以下无法形成菌落. 由此可见, 这两个阶段 mRNA 的稳定性调节机制不同, 因为 37 °C 时 mRNA 的降解与 PNPase 并无关系.

3.3 翻译水平的调控

CspA 和 CspB 的 mRNA 都含有特殊的长链 5'-UTR (159~161 nt), 且具有着相似的二级结构 (图 2)^[9]. 对 *E. coli* 的研究发现^[16], 若把该结构的 $\Delta 56\sim 86$ 和 $\Delta 86\sim 117$ 敲除, 37 °C 时 CspA 的表达会明显增强, 说明在此区域有对翻译起负面作用的顺式作用元件存在. 若把 $\Delta 28\sim 55$ 、 $\Delta 86\sim 117$ 和 $\Delta 118\sim 143$ 敲除, 则引起冷激状态下 CspA 表达明显减弱, 即使仅 $\Delta 118\sim 143$ 突变都能降低 CspA mRNA 的翻译效率. 在 $\Delta 123\sim 135$ (SD 序列上游 11 nt) 处有一个 13 nt 的 UB 框 (upstream-box, UB). 根据上述实验, UB 框应是 CspA 翻译调控的一个控制位点, 因为 UB 包含一个回文序列, 能够形成稳定的二级结构, 抑制 SD 二级结构的形成, 若 UB 被敲除, SD 就能形成稳定的二级结构, 阻碍 mRNA 与核糖体的结合. 总的看来, 冷激时 CspA mRNA 5'-UTR 的二级结构 (尤其是围绕 SD 序列和 UB 序列) 可能与 37 °C 时很不相同, 这种结构的变化可易化 mRNA 与核糖体的结合. 这便是 UB 调节翻译效率的机理.

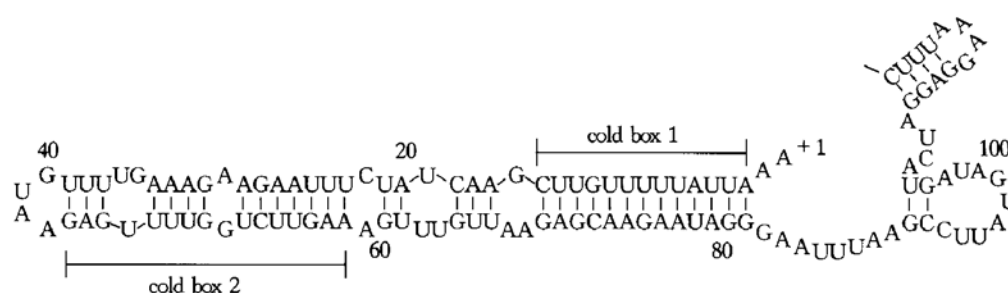


Fig. 2 Possible secondary structure formation in the 5'-UTR of CspB^[9]

图 2 CspB 5'-UTR 可能的二级结构^[9]

Graumann 等根据 Zuker 描述的算法用 RNA 折叠软件作出, 其中 cold box1、cold box2 是 Graumann 等证实的冷框.

同时, *E. coli* mRNA 5'-UTR 中的两个冷框 (cold box1、cold box2) 在调控中也起着重要的作用. 若冷框序列被敲除, 则 CspA 水平明显下降, 相反, 5'-UTR 序列过量产生时, CspA 表达水平又会反弹^[17], 说明冷框序列也是参与 CSPs 转录调控的因素之一.

此外, 枯草杆菌 CspB 的低温诱导还需要一个顺式作用元件 DB 框 (downstream box) 的存在.

DB 框是一个位于翻译起始密码子下游 12 nt 处的长度为 14 nt 的保守序列^[18], 作为翻译增强子, 它能抵消冷激导致的翻译抑制的影响^[2, 9], 当然 DB 框的作用也并不孤立, 它与 SD 序列共同作用, 完成对 CspB 表达的调控, 但 DB 框是否还与 16 S rRNA 上的反 DB 框配对呢? 至今还没有定论^[19]. 不管怎样, DB 是除了 SD 和 UB 序列外的又一影响 mRNA 翻译效率的顺式作用元件.

4 冷激蛋白的生理作用

CSPs 的主要功能与生物体的抗冻性有关, 特别是在细菌的抗冻方面, CspB 扮演着重要的角色. 研究表明, 将枯草杆菌的 CspC 和 CspD 基因敲除, 并不会引起很大的表型变化, 而敲除一个 CspB 基因就能降低枯草杆菌在 15 °C、37 °C 以及稳定期的存活率. 若 CspB/C/D 三倍体变异, 只有将其重组到一个未缺失 CspB 的质粒载体上, 产生的突变体才能够生存^[2,9]. 以上证据足以说明 CspB 在细菌低温生存中的重要性.

CspA、CspB、CspC 和 CspD 都具有 ssRNA 结合蛋白的功能, 因此 CSPs 被认为是一种 RNA 分子伴侣, 与 mRNA 的转录和翻译都有关. 一方面, 人们发现 *E. coli* CspA 以及其在 37 °C 时的同源蛋白 CspE、CspC 在基因转录时都有抗终止因子的作用 (特别是对不依赖 ρ 因子的转录终止子), 可以减少转录的终止, 也可以减少转录时的停顿^[20]. 另一方面 CSPs 能易化 mRNA 的翻译过程. 人们借助荧光免疫技术找到了 CSPs 与翻译有关的证据: 37 °C 生长的枯草杆菌细胞中, CspB 主要集中在拟核周围的胞质空间内, 冷激状态下也保持不变, 若在培养液中添加利福平, CspB 却会脱离它原来的定位而遍布整个细胞, 而加入氯霉素则对它的定位无明显影响^[21]. 这也许说明 CSPs 的功能主要发生在与翻译相关的位置, 至少是与 mRNA 紧密联系的.

CSPs 之所以成为 RNA 分子伴侣, 是由于其具有高度保守的 CSD 区域. 此区域与 RNA 序列中的一个含有 ATTGG 的顺式作用元件 (Y-box 模体) 有很强的亲和力, 使得 CSPs 易与 mRNA 结合. 同时有证据显示: CspA 和 CspB 结合到 mRNA 上会增强后者对核糖核酸酶消化的感受性, 而形成稳定二级结构的 mRNA 对核糖核酸酶消化的感受性差, 这说明 CSPs 可能阻止了 mRNA 二级结构的形成. CSPs 的这两种特性是相辅相成、缺一不可的. 例如, 人们挑选出一个没有抗终止因子作用的 *E. coli* CspE 突变体, 体外实验证明, 虽然这种 CspE 依然能结合到 RNA 上, 却不能阻止 mRNA 二级结构的形成^[22], 也许 CSPs 抑制终止子发夹结构的形成正是其具有抗终止因子作用的分子基础.

如此, CSPs 易化翻译过程的作用就显而易见了. 例如在低温和低 CspB 浓度时, 亲水的 mRNA 将发生折叠反应, 从而使 mRNA 的翻译发生困难; 而 CspB 的存在, 将有效阻止 mRNA 二级结构的形

成, 从而易化 mRNA 的翻译过程^[23].

不管怎样, CSPs 的 ssRNA 伴侣作用一定是和其与 RNA 的高亲和力以及阻止 RNA 形成二级结构的特性相关联的. 正是由于其分子伴侣的作用, 使之具有了抗冷冻功能, 因为膜的稳定性和大分子变性与否是细菌冷冻后生存的重要因素, 而 CSPs 作为分子伴侣, 使得体内的大分子保持着活性状态, 帮助细胞经受住低温的考验.

5 展 望

近十几年来, 热激蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 已经成为研究热点, 这是因为一些热激蛋白可以作为蛋白质分子伴侣, 帮助蛋白质正确折叠, 使生物体能适应艰难的环境生存下来. 同样, CSPs 也有类似的功能, 在细胞冷环境适应方面具有重要作用. 虽然 CSPs 的研究刚刚兴起, 然而其研究成果在生产、生活中的应用价值是显而易见的. 相信在食品、医药等工业需求的推动下, 会有越来越多的人参与到这项工作中来.

参 考 文 献

- 1 Wouters J A, Rombouts F M, de Vos W M, *et al.* Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (10): 4436~4442
- 2 王振雄, 周培瑾. 冷激蛋白 CspA 家族. *生物工程学报*, 1999, **15** (2): 131~134
Wang Z X, Zhou P J. *J Bioengine*, 1999, **15** (2): 131~134
- 3 Graumann P, Marahiel M A. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch Microbiol*, 1996, **166** (5): 293~300
- 4 Graumann P, Wendrich T M, Weber M H, *et al.* A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cell growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol Microbiol*, 1997, **25** (4): 741~756
- 5 Kim B H, Bang I S, Lee S Y, *et al.* Expression of CspH, encoding the cold shock protein in *Salmonella enterica* serovar typhimurium UK-1. *J Bacteriol*, 2001, **183** (19): 5580~5588
- 6 Goldstein J, Pollitt N S, Inouye M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (1): 283~287
- 7 Yamanaka K, Fang L, Inouye M. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol Microbiol*, 1998, **27** (2): 247~255
- 8 Yamanaka K, Inouye M. Induction of CspA, an *E. coli* major cold-shock protein, upon nutritional upshift at 37 degrees C. *Genes Cells*, 2001, **6** (4): 279~290
- 9 Graumann P L, Marahiel M A. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol*, 1999, **171** (2): 135~138
- 10 Hazeleger W C, Wouters J A, Rombouts F M, *et al.* Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** (10): 3917~

- 3922
- 11 Feng W, Tejero R, Zimmerman D E, *et al.* Solution NMR structure and backbone dynamics of the major cold-shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: evidence for conformational dynamics in the single-stranded RNA-binding site. *Biochemistry*, 1998, **37** (31): 10881~10896
 - 12 Schindler T, Perl D, Graumann P, *et al.* Surface exposed phenylalanines in the RNPI/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*. *Proteins*, 1998, **30** (4): 401~406
 - 13 Mitta M, Fang L, Inouye M. Deletion analysis of CspA of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for CspA transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction. *Mol Microbiol*, 1997, **26** (2): 321~335
 - 14 Fang L, Jiang W, Bae W, *et al.* Promoter-independent cold-shock induction of CspA and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. *Mol Microbiol*, 1997, **23** (2): 355~364
 - 15 Yamanaka K, Inouye M. Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001, **183** (9): 2808~2816
 - 16 Etchegaray J P, Inouye M. CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli* are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. *J Bacteriol*, 1999, **181** (6): 1827~1830
 - 17 Yamanaka K, Mitta M, Inouye M. Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock CspA mRNA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, **181** (20): 6284~6291
 - 18 Morita M T, Tanaka Y, Kodama T S, *et al.* Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev*, 1999, **13** (6): 655~665
 - 19 La Teana A, Brandi A, O'Connor M, *et al.* Translation during cold adaptation does not involve mRNA-rRNA base pairing through the downstream box. *RNA*, 2000, **6** (10): 1393~1402
 - 20 Bae W, Xia B, Inouye M, *et al.* *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (14): 7784~7789
 - 21 Giangrossi M, Exley R M, Le Hegarat F, *et al.* Different *in vivo* localization of the *Escherichia coli* proteins CspD and CspA. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, **202** (2): 171~176
 - 22 Phadtare S, Inouye M, Severinov K. The nucleic acid melting activity of *Escherichia coli* CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells. *J Biol Chem*, 2002, **277** (9): 7239~7245
 - 23 Lopez M M, Yutani K, Makhatadze G I. Interactions of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* with single-stranded DNA. Importance of the T base content and position within the template. *J Biol Chem*, 2001, **276** (18): 15511~15518

Progress in Cold Shock Protein^{*}

GUO Jian-Jun, GONG Xing-Guo^{**}

(Department of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract A set of 7 ku proteins (named cold shock proteins) is strongly induced in response to a rapid decrease in growth temperature when bacteria adapt to temperatures below their growth temperature. They are rich in aromatic and basic amino acids, suggested to function as molecular chaperones and make cell enhance ability to survive freezing after a cold shock treatment. The similarity and difference of cold shock proteins were described in structure, regulation of expression and function etc. In addition, the value of them for human kind is in mention.

Key words cold shock protein, molecular chaperone, cell growth

^{*} This work was supported by grants from The Nature Science Foundation of Zhejiang Province (396007) and The CAO Guang Biao Science and Technology Foundation of Zhejiang University (171026).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-571-87951537, E-mail: gongxg@cls.zju.edu.cn, gongxg@mail.hz.zj.cn

Received: March 14, 2002 Accepted: May 8, 2002