

甜味蛋白研究的新进展

吕利群 齐义鹏

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072)

摘要 甜味蛋白 (thaumatin) 是世界上已知最甜的物质, 具有很大的应用前景. Thaumatin 的基因核苷酸和蛋白质氨基酸序列都已测定. 晶体分析表明它具有高稳定的四级结构. 在味蕾小孔中发现了介导 thaumatin 发生作用的物质. Thaumatin 自身的功能仍不清楚. 在多种生物中发现了 thaumatin 类似蛋白质, 具有不同的生物活性. 用基因工程手段实现了 thaumatin 在多种原核和真核生物中的表达, 但迄今仍未得到理想的基因工程产品.

关键词 甜味蛋白, Thaumatin, 结构域, 基因工程

甜味蛋白 (thaumatin) 是从一种叫 *Thaumatococcus daniellii* Benth 的热带作物的果实的胶质假种皮中分离出来的可食用的蛋白质, 它被认为是世界上已知的最甜的物质. 大约 2×10^{-8} mol/L 即可感受到甜味, 比蔗糖甜 10 万倍. 近年来, 由于 thaumatin 被认为有希望发展成为食品工业中营养性碳水化合物化合物的替代品, 人们对 thaumatin 产生了越来越浓厚的兴趣. 但由于移植在西非以外地区的模拟环境中 *T. daniellii* 不能产生正常的含 thaumatin 的果实, 大规模通过从植物中提取 thaumatin 的工作遇到了阻力, 致使商品化 thaumatin 产品异常昂贵. 为了能够生产出大量的廉价的 thaumatin 产品, 许多国家都在积极探寻用基因工程方法生产 thaumatin 的新途径.

1 Thaumatin 的生物学基础研究

甜味蛋白 thaumatin 是由一个基因家族编码的, 已知最少存在 5 种蛋白产物: thaumatin I, II, III, b, c. 它们的分子质量均约为 22 ku, 其中最主要的是两种: 22.209 ku 的 thaumatin I 和 22.293 ku 的 thaumatin II. Thaumatin I 和 thaumatin II 的区别仅在于 5 个保守氨基酸的变化.

Edens 等^[1] 合成并测定 thaumatin II 的

cDNA 序列. 甜味蛋白翻译的起始产物是 N 端含有 22 个氨基酸残基, C 端含有 6 个氨基酸残基的甜味蛋白质前体. 在加工成熟过程中, 这些氨基酸残基可被剪切掉而成为有活性的含 207 个氨基酸的甜味蛋白. 在 *T. daniellii* 中, 科学家们猜测这些被剪切掉的多肽含有定位甜味蛋白的信息^[2]. 甜味蛋白的等电点 pH 值为 12, 在生理环境中其中一些带电荷的极性氨基酸经化学修饰后进行功能分析, 被认为是引起甜觉的主要功能基团^[3].

Kirm 等^[4] 对 thaumatin I 的晶体结构分析表明, thaumatin I 蛋白晶体分子包含 3 个结构域. 其核心结构域为一夹在两个锁钥结构 (Greek key motif) 中的含 11 个片层的 β 折叠片结构. 除 N 端片层和 C 端片层这两个折叠片互相平行外, 其他 β 片层均为反平行. 在 β 折叠片的一边存在两个 β 突起 (β -bulge). 另两个结构域位于 β 片层的同一侧. 其中一个结构域为一端为环状, 一端为 *cis* 构象脯氨酸残基的 β 带状结构 (β -ribbon), 另一个结构域富含二硫键, 从 β 折叠片层向外展开, 它含 1 个 α 螺旋 (α -helix) 和 3 个短的螺旋片段. 蛋白质的定点突变结果分析显示, 这两个结构域是甜味受体的识别区域. Thaumatin 的这种富含

收稿日期: 1996-03-12, 修回日期: 1996-07-22

二硫键的稳定结构可使其经高温煮沸 1 h 后仍可复性成天然结构。

对甜味蛋白致甜机理的研究工作已比较深入。其甜度约比蔗糖甜 10 万倍。当甜味蛋白的浓度稀释到 10^{-8} mol/L 的阈值时, 再也觉察不到甜味, 但研究表明, 此时甜味蛋白可以起到选择性地增强其他物质的味觉强度的作用。如它可以使薄荷的感觉浓度阈值下降 90%^[5,6]。Menco 等^[7]用 5 nm 的金颗粒标记纯化的 thaumatin 蛋白质去观察 thaumatin 在猴子舌头上的分布。结果显示, 金标记 thaumatin 只结合在味蕾小孔中的一种带电荷性质不明的似海绵状的分泌物质中。味蕾中的微纤毛不含金标颗粒。Thaumatin 的味觉受体复合物是包括 thaumatin 结合区域, 未知分泌物和味蕾微纤毛的复合结构。

事实上, 在高等双子叶植物中都存在与甜味蛋白类似的蛋白质。1992 年, Frendo 等^[8]报道, 非生物环境(指高盐, 高温, 紫外线, 创伤, 化学物质处理等)可以诱使玉米产生一种类似于甜味蛋白质的蛋白质, 它们的同源性可达 50% ~ 60%。Robert 等^[9]总结指出, 多种植物中发现的 thaumatin 类似蛋白大都与渗透压紧张有关, 其功能大致有 3 种: 抗真菌活性, α -淀粉酶活性和蛋白酶活性。

2 甜味蛋白的基因工程

2.1 在原核系统中的表达

Edens 等^[1]分别在半乳糖启动子和色氨酸启动子下游克隆进甜味蛋白 II 型的前体蛋白质的逆转录 cDNA, 在大肠杆菌中进行了低水平的表达。大约每个细胞 500 个分子。但是分离出来的基因产物比预计的要大一些, 可能是大肠杆菌不能完全加工甜味蛋白基因的起始转录前体, 留下了 N 端信号肽序列, 很可能 C 端多肽也没被剪切掉。令人失望的是, 大肠杆菌的表达产物并不具备甜味蛋白所具有的甜味。

Illingworth 等^[10]将甜味蛋白 II 的 cDNA 克隆在 α -淀粉酶引导肽的编码序列下游, 在枯草杆菌中表达了 α -淀粉酶-甜味蛋白的融合蛋

白。表达产物分泌在培养基中, 浓度可高达 1 g/L, 但也没有甜味。

2.2 在真菌系统中的表达

Illingworth^[10]1989 年在 *S. lividans* 中表达了 β -半乳糖苷酶引导肽-甜味蛋白融合蛋白。Hahm 等^[11]在 1990 年也成功地在曲霉中利用酵母中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子表达了分泌性的甜味蛋白, 但其产物均无甜味^[2]。

为了在酵母中表达出有天然性状的甜味蛋白, Lee 等^[12]根据 thaumatin II 的 cDNA 序列合成了甜味蛋白基因, 在合成基因中改用了酵母偏爱密码, 并去除了氨基端和羧基端多肽编码序列, 在 5' 端插入了甲硫氨酸密码子。此合成基因被置于 3-磷酸甘油酸激酶启动子下游在 *S. cerevisiae* 中表达。表达的重组甜味蛋白不能溶解, 可占酵母不溶解蛋白的 20%。由于当天然甜味蛋白二硫键数目减少时, 其正常二级结构不能形成, 会呈不溶性状, 因此推测可能是由于二硫键结构不能正常形成才导致产生不溶的甜味蛋白。有意义的是, 此不溶性的重组甜味蛋白质在体外经变性, 再复性后会产生甜味。最近, Weickmann 等^[13]报道已实现了 thaumatin 在酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 上的高效表达。其产物与天然 thaumatin 仍有很大差距。

2.3 在高等植物中的表达

1990 年, Witty^[14]应用毛根转化技术(hairy root transformation technique)将甜味蛋白基因插入马铃薯基因组中。甜味蛋白 II 先被克隆在植物穿梭载体 pWIT2 中的花椰菜花叶病毒启动子 CaMV 35 S 下游, 然后将此克隆载体与农杆菌 Ti 质粒一起接种在马铃薯愈伤组织中。待毛根组织形成后, 可以分离培养出完整植株。

对 0.1 g 毛根组织样品的味觉检测试验(blind taste test)表明, 此转基因毛根组织具有天然蛋白特有的甜味。表达的甜味蛋白的浓度约为 3×10^{-8} mol/L。值得一提的是, 整个植株都是甜的。

3 甜味蛋白基因工程的研究趋势

由于微生物表达系统在产生功能蛋白方面的不理想, 科学家们逐渐将注意力集中在转基因植物的研究上. 在马铃薯中的表达成功启示可以将甜味蛋白基因转进其他畜用或人用经济作物中表达, 从而增加其食用价值. 同时由于甜味蛋白的表达量仍然偏低, 培养出高效表达的转基因植株仍是一大难题.

投入大工业生产最有效的途径仍是微生物发酵生产. 近年来科学家们对真核基因在原核中表达产物的功能进行了充分研究, 认为有些基因产物尽管加工过程不完善, 只要给予合适的体外环境, 它们可以重折叠成具备真核基因功能的三维构象, 从而恢复功能活性. 因此选择合适的表达载体和摸索合适的体外条件去形成有完全或部分活性的功能蛋白仍是一项有吸引力的工作.

考虑到利用高强真核启动子在细胞中已实现了许多外源基因的高表达, 且利用病毒载体在动物中表达外源基因的技术业已成熟, 也许通过此途径可以生产出适用于医疗保健领域的能被接受的产品.

参 考 文 献

- 1 Edens L, Heslinga L, Klok R *et al.* Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 1982, **18** (1): 1~12
- 2 Witty M. Thaumatin II-a palatability protein. *Trends in biotechnology*, 1990, **8** (5): 113~116
- 3 Vander Wel H. Structure-activity relationships in the thaumatin molecular. *Thaumat* 1994, 1994, (1): 115~122
- 4 Kirm S-H, Weickmann J L. Crystal structure of thaumatin I and its correlation to biochemical and mutational studies. *Thaumat* 1994, 1994, (1): 135~149
- 5 Higginbotham J D. *Developments in Sweetness*. New York: Applied Science Publishers, 1979, 87~123
- 6 Higginbotham J D, Lindley M, Stephens P. *The Quality of Food and beverages*. New York: Academic press, 1981, 91~112
- 7 Menco B M, Hellekant G. Ultrastructure evidence for a binding Substance to the Sweet-tasting protein thaumatin inside taste bud pores of rhesus monkey foliate papillae. *Microsc Res Tech*, 1993, **26** (2): 133~141
- 8 Frendo P, Didierjean L, Passelegue E *et al.* Abiotic stresses induce thaumatir-like protein in maize; cDNA isolation and sequence analysis. *Plant Sci*, 1992, **85** (1): 61~69
- 9 Robert D, Felix M, Cornelia R. Thaumatin-like Proteins. *Thaumat* 1994, 1994, (1): 193~199
- 10 Illingworth C, Larson G, Hellekant G. Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin in *Streptomyces Lividans*. *J Ind Microb*, 1989, **4** (1): 37~42
- 11 Hahn Y T, Batt C A. Expression and secretion of thaumatin in *Aspergillus oryzae*. *Agric Biol Chem*, 1990, **54** (10): 2513~2520
- 12 Lee J H, Weickmann J L, Koduri R K *et al.* Expression of synthetic thaumatin genes in yeast. *Biochemistry*, 1988, **27** (7): 5101~5107
- 13 Weickmann J L, Blair L C, Wilcox G L. High level expression of thaumatin in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Thaumat* 1994, 1994, (1): 151~169
- 14 Witty M. Preprothaumatin II is processed to biological activity in *Solanum tuberosum*. *Biotechnol Lett*, 1990, **12** (2): 131~136

Recent Progress on the Study of Sweet Protein.

LU Liquan, QI Yipeng (*Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract Sweet protein thaumatin is the sweetest substance known so far. Thaumatin has many features that make it attractive to food and feed manufacturers. Its nucleic acid sequence and amino acid sequence have been reported. Structure analysis showed that thaumatin has high stable tertiary structure. The substance mediated between thaumatin and microvilli of the taste bud pores has been found. The exact function of thaumatin and thaumatin like protein is still not clear. Thaumatin has been expressed in some procaryotic and eucaryotic expression systems, but no satisfied products can be got through the way of gene engineering by now.

Key words sweet protein, thaumatin, domain, gene engineering