

环境应激蛋白 PprM 研究进展

潘宝平¹, 马云², 何淑雅^{1,2*}

(1. 南华大学公共卫生学院放射医学教研室, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学生物化学与分子生物学教研室)

摘要: 耐辐射奇球菌(DR)是迄今为止地球上发现的辐射抗性最强的生命形式之一,具有快速高效的 DNA 损伤修复能力。PprM 是 DR 菌特有的抗辐射响应蛋白,同时具有热休克蛋白(Hsp)和冷休克蛋白(Csp)特性,而且对电离辐射、氧化、干燥等压力胁迫都表现出极强的抗性。本文从 PprM 结构功能分析与预测、应激特性、分子伴侣活性与结合特性对目前 PprM 研究的最新进展做一综述,以期推动 PprM 进一步研究。

关键词: PprM; 热休克蛋白; 冷休克蛋白; 抗辐射; 抗氧化

中图分类号: R811 **文献标识码:** A

耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR)最出名于它对 γ 辐射的极端抗性,但是它也被证明对紫外辐射,干燥,高压真空,重离子袭击和过氧化氢等都具有极强的抗性。DR 菌对这些压力抗性的分子基础正在被广泛研究当中,特别受关注的是它的 DNA 修复系统。该细菌具有强大的 DNA 修复能力,一个 5 kGy 辐射能导致 DR 菌基因组 200 个双链断裂(double-strand breaks, DSBs),但是这种细菌却能在数小时内精确地从 DNA 碎片中重新装配到基因组中,主要原因是它能够调动机体约 1/3 的基因来抵抗致命的辐射损伤而存活。而对于其他几乎所有生物而言,少数几个 DNA 双链断裂都是致死性的。但目前这种高效快速的 DNA 修复机制尚不清楚。

已经证实 DR 菌中很多基因(如 pprI、pprA 和 recA 等)在 DNA 损伤修复中发挥重要作用。2009 年 Ohba H^[1] 在比较野生菌株与 pprI 基因缺陷突变株时发现一种新型的调节蛋白,经鉴定为一种冷休克蛋白(Cold-shock protein, Csp)同源物并命名为 PprM,并证实 PprM 参与了在 DR 菌中 PprI 介导的辐射响应,而 pprI 是 DR 菌 DNA 损伤修复的总开关基因,在 DR 的极端抗性机制中起到非常重要的作用^[2],PprI 充当一个总开关在辐射之后能够调节许多不同通路的蛋白质的表达,至少约 210 个基因的

转录水平上调了,包括 21 个 DNA 修复和复制相关的基因,而这种潜在的机制并不清楚。细菌 Csp 主要在温度快速下降后被诱导以调节机体对冷应激的适应性,但也存在于正常条件下来调控其他生物学功能^[3]。

1 PprM 结构功能分析与预测

运用多种在线工具(包括 CCD、SSDB 和 SMART 等)对 PprM 蛋白的结构域进行分析(图 1),发现 PprM 编码蛋白是一种含有 S1-like RNA 结合域及 ssDNA 结合结构域的 RNA 结合蛋白, S1-like RNA 结构域是 RNA 结合蛋白结合结构域, ssDNA 结构域是抗转录终止因子结合结构域。进一步的 pprM 基因结构分析发现 pprM 是一种冷休克蛋白基因。PprM 蛋白与来自 *D. geothermalis* 和 *Thermophilus* 的冷休克蛋白一样属于同一个亚基家族的不同进化分支。纯化的 PprM 蛋白在生理条件下以二聚体的形式存在,类似于大肠杆菌的冷休克蛋白 D^[1]。S1-like superfamily 即核糖体蛋白 S1-like RNA 结合域,在各种 RNA 结合蛋白中均有发现。最初被定义为 S1 核糖体蛋白,这个超家族还包含与 S1 结构域同源的冷休克域(CSD)。抗转录终止因子结合域的抗终止作用主要见于某些噬菌体的时序控制。早期基因与其后基因之间以终止子相隔开,抗终止因子可以使 RNA 聚合酶得以越过终止子继续转录,同时打开其后基因的表达,此过程称为通读。

收稿日期:2016-10-24;修回日期:2016-12-30

基金项目:国家自然科学基金(编号 81272993)、南华大学研究生科研创新项目(标号 2016XCX39)。

* 通讯作者, E-mail: heshuya8502@163.com.

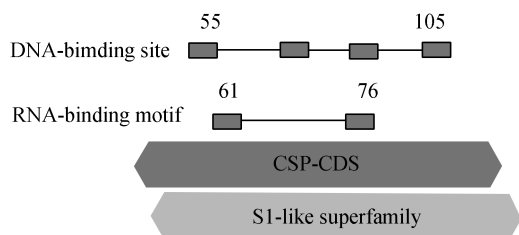


图1 PprM 蛋白结构域分析

2 PprM 应激特性

所有生物必须具备能力去适应环境变化包括营养和一般物理参数,如渗透压和温度的变化。关于冷休克,有学者定义了特定的实际条件,例如对于嗜温细菌,将冷休克定义为温度在几分钟内从 37 °C 降到 15 °C,即从最佳生长温度到接近最低极限的温度下生长。在已知的耐热性和低温耐受性的基础上,已经确认了 DR 菌最佳的热休克和冷休克温度,在 52 °C 的致死温度下 42 °C 的热休克和在反复冻融下 20 °C 的冷休克能够出现最大化存活,并证实 DR 菌在热休克和冷休克处理下分别有 67 种蛋白和 42 种蛋白的表达量增加。Csps 一般在较低温度下的表达量会大量增加,以保证菌体在较低温度下的生存,但除低温外,紫外线照射、H₂O₂ 和缺氧等应激也可激发其表达,PprM 就是在 42 °C 的热应激下被诱导的大量蛋白之一,为热休克诱导蛋白。但同时 pprM 又具有冷休克蛋白结构域,具有冷休克蛋白特性,所以被大量学者将其归属于冷休克蛋白的同源物。

PprM 蛋白在辐射诱导下能高表达,其 pprM 缺失突变株对于 γ 辐射的敏感性显著增加,同时 pprM 与 pprA 双缺失突变株比 pprM 与 pprA 基因单缺失突变株具有更高的辐射敏感度^[1, 4],可见 PprM 对 DR 菌的辐射抗性起到重要作用。同时 PprM 在氧化应激下也发挥重要作用,pprM 突变菌种显示出过氧化氢酶活性降低,同时在相同环境下相比野生型 DR 菌对 H₂O₂ 的抗性下降,主要原因是 pprM 的敲除降低了 KatE1 的 mRNA 和蛋白的水平,它是 DR 菌中主要的过氧化氢酶,表明 PprM 蛋白在氧化应激中也发挥重要作用^[5]。同时将 pprM 基因转入大肠杆菌能提高它的抗盐碱、耐干旱能力^[6]。这些研究表明 pprM 基因是非常重要的抗逆基因,未来可能在农业、辐射防护和环境治理等方面有极好的应用前。

3 PprM 分子伴侣活性与结合特性

许多研究表明细菌中的 Csps 可以作为分子伴侣,能够结合 RNA 和 DNA,促进一系列的细胞过程,比如转录和翻译等。说明 Csps 很可能为一全局性的转录性的调节分子,能够调节正常生长,冷适应和各种应激反应和渗透胁迫反应。当某些环境改变后,细胞生理上会发生一些重要的变化,例如膜流动性和核酸的二级结构的稳定性下降,最终会导致 RNA 转录,翻译和降解的效率降低^[7]。而冷休克反应使细胞来抵消这些不利的变化,主要是通过选择性产生一组特定的蛋白质,即 Csps。大多数 Csps 都参与了 RNA 代谢,例如 RNA 解旋酶 DeaD 和核酸外切酶 RNase R 和 PNPase,其中 RNase R 是大肠杆菌中唯一的 3~5' 核酸外切酶,能有效降解双链 RNA。冷休克蛋白主要功能之一作为 RNA 分子伴侣(RNA chaperone)与 mRNA 结合,参与 RNA 新陈代谢,防止二级结构形成或促进结构化 RNA 的降解,RNA 伴侣分子可以帮助 RNA 正确折叠或抑制 RNA 错误折叠,可以使错误折叠的 RNA 构象解链并形成正确的空间折叠^[8-10]。这表明调节 RNA 代谢是适应的关键过程。PprM 蛋白能结合 RNA,是一种 RNA 分子伴侣蛋白。李伟等^[11]利用 RNA pull down 等技术初步筛选到了与 PprM 蛋白相结合的 4 个 mRNA,其中包括 DR_A0355,它是双组分调控系统(two-component system, TCS)重要成分之一,编码产物为组氨酸蛋白激酶(histidine kinase, HK) CheA 相关蛋白,该系统有助于细菌感知环境变化,并作出相应的应激反应,对生物体适应不断变化甚至极端的环境起到非常重要的调节作用^[12]。已经证明 DR 菌中存在 23 个组氨酸蛋白激酶和 29 个反应调节蛋白(response regulator, RR)^[13],它们共同组成了 DR 的双组分调控系统,对于 DR 菌感知和响应温度、氧化、干燥等压力胁迫起着至关重要的作用。

PprM 蛋白也能结合 DNA, Lu 等^[14]对 pprI 进行染色质免疫沉淀技术分析,发现 PprI 蛋白能特异性结合 pprA 和 recA 等 DNA 修复基因的启动子,它们已被证明在 DNA 损伤修复中发挥重要作用^[15-18],而且在电离辐射诱导下,结合活性加强。已经证实 PprM 是一种 PprI 依赖性 DNA 损伤应答的一个调节器,但是 PprM 以何种方式参与了 PprI 介导的辐射损伤响应并不清楚,有学者认为它可能像大多数 DNA 损伤修复基因一样也受到 PprI 的表达调控,但是结

果发现 PprI 蛋白并不结合 pprM 的启动子^[19]。然而最近有人发现 PprM 蛋白可能能够结合一些参与 DNA 修复的基因的启动子,比如 recA 和 pprA^[20]。那么 PprM 是不是对 pprI 也有结合作用,促进或抑制 PprI 的表达? PprM 的结合特性,尤其对 DNA 的结合,可能在整个 PprM 作用机制中起到关键作用。虽然目前对 PprM 蛋白的分子伴侣活性和结合特性研究数据甚少,但是该蛋白所拥有的极端抗性可能与它的分子伴侣活性和结合特性是密不可分的。

纵观 PprM 蛋白的辐射应激响应,该蛋白含

RNA 特异性或者非特异性结合域及抗转录终止子结合域,可使 RNA 聚合酶越过终止子通读,其前后基因同时快速转录生成 mRNA 表达蛋白质,符合辐射应激时细胞 RNA 需庇护及需大量快速生成的要求,故有理由认为 PprM 可能就是被进化成能非特异性结合众 RNA 或特异性结合抗辐射相关蛋白的靶 mRNA 及 ssDNA,呈现 RNA 的保护、稳定与大量生成效应的 RNA 辐射应激开关。

终上所述,根据 PprM 结构功能分析与预测及目前取得的研究成果进行总结,见图 2。

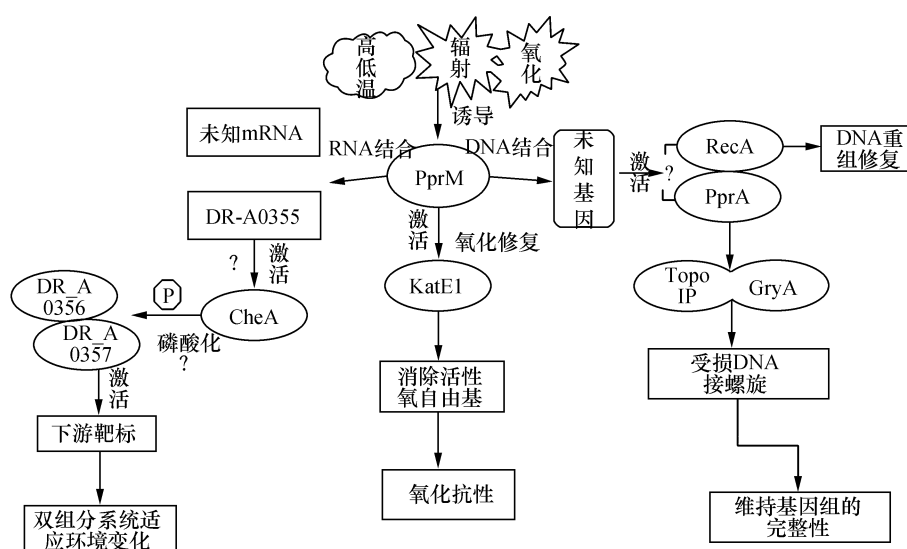


图 2 预测耐辐射奇球菌 PprM 调控网络

4 展 望

本文回顾了近年来对 PprM 功能研究领域取得的成果,主要从结构分析与预测、应激特性、分子伴侣活性与结合特性阐明了 PprM 在 DR 菌中的重要作用。总而言之,因 PprM 蛋白在热休克下被大量诱导而称为热休克蛋白 (Heat-shock protein, Hsp), 或因其具有冷休克特性而命名为 Csp, 或因其含有抗转录终止因子具有抗终止作用,辐射应急时保护 RNA,而称之为辐射应激蛋白,这些都只体现了 PprM 蛋白某个方面的特点,基于以上数据可以看出 PprM 蛋白不仅可以响应高低温压力胁迫,而且对电离辐射、氧化、干燥等都发挥着重要的抵抗性,故将 PprM 命名为环境应激蛋白,它可能充当一个全方位的救火员,响应各种极端环境变化。

目前,PprM 在 DR 菌中具体的作用机制并不完

全清楚,但是它在 DNA 损伤修复中的角色是无可代替的。众所周知,DR 菌极强的抗性主要在于它具有强大的修复系统,而这个系统是由千千万万的基因构成的错综复杂的调控网络,每个基因都不可能单独发挥作用。PprM 既结合 RNA 又结合 DNA,同时还有抗转录终止因子等特性,它可能构成一个庞大的信号通路运用到 DR 的多个修复途径中。PprM 作为环境应激蛋白,也正在被一步步转入到真核细胞甚至动物体内,观察其对环境的适应能力。随着生物技术的不断发展,相信在不久的将来,环境应激蛋白 PprM 的作用机制乃至 DR 菌强大的极端抗性网络必将被人们所熟知,并能为人类抵抗潜在的辐射危险提供重要的新思路。

参考文献:

- [1] Ohba H, Satoh K, Sghaier H, et al. Identification of

- PprM; a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans* [J]. *Extremophiles*, 2009, 13(3):471-479.
- [2] Hua Y, Narumi IG, Tian B, et al. PprI; a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(2):354-360.
- [3] Horn G, Hofweber R, Kremer W, et al. Structure and function of bacterial cold shock proteins [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(12):1457-1470.
- [4] 杨杰. pprM 及其 DNA 结合域基因敲除对耐辐射奇球菌辐射抗性影响[D]. 南华大学, 2014.
- [5] Jeong SW, Seo HS, Kim MK, et al. PprM is necessary for up-regulation of katE1, encoding the major catalase of *Deinococcus radiodurans*, under unstressed culture conditions [J]. *J Microbiol*, 2016, 54(6):426-431.
- [6] 王伟, 宋素琴, 张志东, 等. 耐辐射奇球菌 pprM 基因克隆及功能预测 [J]. *新疆农业科学*, 2012, 49(8):1449-1455.
- [7] Phadtare S. Recent developments in bacterial cold-shock response. [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2004, 6(2):125-136.
- [8] Matos RG, Barbas A, Arraiano CM. RNase R mutants elucidate the catalysis of structured RNA; RNA-binding domains select the RNAs targeted for degradation [J]. *Biochem J*, 2009, 423(2):291-301.
- [9] Phadtare S. Unwinding activity of cold shock proteins and RNA metabolism [J]. *RNA Biol*, 2010, 8(3):394-397.
- [10] Barria C, Malecki M, Arraiano C M. Bacterial Adaptation to Cold. [J]. *Microbiology*, 2013, 159(12):2437-2443.
- [11] 李伟. 耐辐射奇球菌 PprM 蛋白相互作用 RNA 的筛选及鉴定 [D]. 南华大学, 2015.
- [12] Francez-Charlot A, Kaczmarezyk A, Fischer HM, et al. The general stress response in Alphaproteobacteria [J]. *Trends Microbiol*, 2015, 23(3):164-171.
- [13] Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, et al. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *deinococcus radiodurans* viewed from the Perspective of comparative genomics [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65(1):44-79.
- [14] Lu H, Chen H, Xu G, et al. DNA binding is essential for PprI function in response to radiation damage in *Deinococcus radiodurans* [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2011, 11(2):139-145.
- [15] Warfel JD, Licata VJ. Enhanced DNA binding affinity of recA protein from *deinococcus radiodurans* [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2015, 31:91-96.
- [16] Repar J, Cvjetan S, Slade D, et al. RecA protein assures fidelity of DNA repair and genome stability in *Deinococcus radiodurans* [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2010, 9(11):1151-1161.
- [17] Narumi I, Satoh K S, Funayama T, et al. PprA; a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 54(1):278-285.
- [18] Kota S, Rajpurohit YS, Charaka VK, et al. DNA Gyrase of *Deinococcus radiodurans* is characterized as Type II bacterial topoisomerase and its activity is differentially regulated by PprA in vitro [J]. *Extremophiles*, 2016:1-11.
- [19] 王秋岩. 耐辐射奇球菌 pprM 启动子鉴定及其与 Ppr I 蛋白的相互关系研究 [D]. 南华大学, 2015.
- [20] 付亮. 耐辐射奇球菌 PprM 蛋白靶 DNA 的筛选与鉴定 [D]. 南华大学, 2016.

(本文编辑:蒋湘莲)