

非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的研究进展

刘树柏^{1,2,#}, 何英英^{1,2,#}, 钱金桥^{1,2,3}, 李文辉¹, 张云^{1,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室, 生物毒素研究室, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 昆明医学院第一附属医院 麻醉科, 云南 昆明 650032)

摘要: $\beta\gamma$ -晶状体蛋白是主要分布于脊椎动物眼睛晶状体内的水溶性结构蛋白。非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白从微生物到高等哺乳动物都有报道。微生物中发现的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白主要作为环境胁迫应急蛋白, 在恶劣环境中发挥对细菌的自我保护作用, 如 Protein S。在哺乳动物中, 非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白被推测能够参与胚胎的皮肤发育与分化调节, 具有肿瘤抑制等重要的生理功能, 如黑色素瘤缺失蛋白。但是, 对于它们的生化特性、生理功能和作用机制知之甚少。本文从蛋白结构、基因起源和生物学功能等方面简要介绍目前非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的相关研究进展。

关键词: 非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白; 非晶状体 $\beta\gamma$ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物; 黑色素瘤缺失蛋白
中图分类号: Q959.5; Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)06-0679-10

Research Progression of Non-lens $\beta\gamma$ -crystallins

LIU Shu-bai^{1,2,#}, HE Ying-ying^{1,2,#}, QIAN Jin-qiao^{1,2,3}, LEE Wen-hui¹, ZHANG Yun^{1,*}

(1. *Biotoxin Units, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, China*; 2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*;
3. *Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming Yunnan 650032, China*)

Abstract: In vertebrates, $\beta\gamma$ -crystallins are mainly expressed in the lens as structural protein, a lot of non-lens $\beta\gamma$ -crystallins were also discovered in microbes and mammals, such as Protein S and Absent in Melanoma 1, which act as microbial stress-inducible protective protein in bacterial, participate in epidermis development and has tumor suppression function in mammals, respectively. However, little is known about the biochemical properties, functions and action mechanisms of these non-lens $\beta\gamma$ -crystallins in vertebrates. In this paper, we mainly review the research progression of non-lens $\beta\gamma$ -crystallins in the protein structure, gene evolution and biological function.

Key words: Non-lens $\beta\gamma$ -crystallin; $\beta\gamma$ -CAT; AIM1

晶状体蛋白最早(Mörner, 1893)发现于脊椎动物眼睛晶状体中。作为一种水溶性结构蛋白, 其含量占眼球晶状体总质量的 30%—35%, 从而命名为晶状体蛋白。在晶状体中, 晶状体蛋白能够形成从中央到外周、由高到低的蛋白浓度梯度, 从而调节晶状体的透光性和折射率。最初根据这一大类蛋白具有随着分子量的降低而等电点升高的特点, 将晶状体蛋白分为 α 、 β 、 γ 晶状体三类, 每一类晶状体蛋白由一系列蛋白组成一个家族(Graw, 1997;

Piatigorsky, 1981; Bloemendal, 1982)。 β 、 γ 晶状体蛋白因为含有相同的希腊钥匙模体(Greek key motifs)而将它们归为 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白超家族。 α 、 β 、 γ 三类晶状体蛋白在基因结构, 表达调节模式和参与的相关疾病的发生等方面存在着很大的差别。眼球晶状体中 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的 N-端和 C-端氨基酸的突变会导致发生白内障(Graw, 1997; Malinowski & Manski, 1980)。研究表明 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白在眼球的发育过程中可能参与调节眼球血管稳定, 再造和凋亡, 但是

收稿日期: 2008-05-26; 接受日期: 2008-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(30630014; 30570359); 中国科学院重要研究方向基金(KSCX2-YW-R-088)

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zhangy@mail.kiz.ac.cn

#并列第一作者: 刘树柏(1978-), 男, 博士, 研究方向为天然活性蛋白和多肽的药理学研究, E-mail: liutonny@hotmail.com; 何英英(1979-), 女, 博士, 研究方向为天然活性蛋白和多肽的药理学研究, E-mail: peard_liu@hotmail.com

详细的分子作用机制和功能目前尚不清楚(Zhang et al, 2005)。随着相关研究的不断深入,在脊椎动物的眼球晶状体中还发现了具有种属特异性的其他类型的晶状体蛋白,如主要分布在大多数鸟类和爬行动物中的 δ -crystallin,特异性分布在蛙和壁虎中的 ρ -crystallin。这些种属特异的晶状体蛋白质,一般具有各种酶活性和辅酶作用(Wistow & Piatigorsky, 1988; Wistow, 1993; Bloemendal et al, 2004)。

目前研究表明,在眼球晶状体之外也检测到有 α 、 β 、 γ 三类晶状体蛋白的表达。非晶状体 α -晶状体蛋白属于小热休克蛋白超家族,主要作为分子伴侣,具有自我激活的酶活性,参与 γ -晶状体蛋白基因的激活,与神经系统功能失调具有协同相关性(Ganea, 2001; Narberhaus, 2002; Reddy et al, 2006)。非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白从微生物到高等哺乳动物都有报道(Wistow & Piatigorsky, 1988; Bhat, 2004),包括微生物来源的应急蛋白和脊椎动物中的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白,例如Protein S(Nelson & Zusman, 1983), Spherulin 3a (Nelson & Zusman, 1983; Rosinke et al, 1997),来源于四膜虫*Tetrahymena thermophila*的转运蛋白Cargo proteins (Haddad et al, 2002),表皮分化专一蛋白(epidermis differentiation-specific proteins, EP37)(Takabatake et al, 1992; Wistow et al, 1995; Ogawa et al, 1997),大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离得到的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白与三叶因子复合物($\beta\gamma$ -CAT)的 α 亚基和哺乳动物中的黑色素瘤缺失蛋白(absent in melanoma 1, AIM1)(Ray et al, 1997; Teichmann et al, 1998)。尽管EP37蛋白和AIM1基因参与表皮发育和肿瘤抑制,被认为是一个潜在的肿瘤抑制基因(Ogawa et al, 1997; Ogawa et al, 1998; Ray et al, 1997; Teichmann et al, 1998)。但是,对于脊椎动物中的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的生化特性,生理功能和分子作用机制了解尚少。本文结合目前对非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的结构,基因起源和生物学功能的相关研究,对非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的研究进展进行简要介绍。

1 非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白家族的结构和基因起源

非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体超家族蛋白或其相关基因从微生物到高等哺乳动物(例如人)都已有相关报道,按其来源可分为单细胞生物来源和多细胞生物

来源。目前发现的单细胞生物来源的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白主要集中在细菌,例如土壤中革兰氏阴性细菌(*Myxococcus xanthus*)的孢子专一蛋白Protein S (Inouye et al, 1979; Nelson & Zusman, 1983);细菌*Physarum polycephalum*的囊泡形成蛋白Spherulin 3a (Bernier et al, 1987; Wistow, 1990; Kretschmar et al, 1999);细菌*Methanosarcina acetivorans*的M-crystallin (Barnwal et al, 2006);细菌*Streptomyces nigrescens* TK-23的SMPI (streptomyces metalloproteinase inhibitor)(Ohno et al, 1998);从土壤细菌培养物*Streptomyces* F-287上清中分离得到的蛋白SKLP(streptomyces killer toxin-like protein)(Ohki et al, 2001);*Williopsis mrakii*酵母的WmKT(killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*) (Antuch et al, 1996)。目前报道的多细胞生物来源的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白有:来源于海洋海绵动物*Geodia cydonium*的Geodin (Giancola et al, 2005);在日本蝶螈胚胎早期和成体皮肤组织,胃表皮细胞上表达中大量表达的(epidermis-specific protein, EP37)表皮分化蛋白家族蛋白,包括EP37、EP37A1和EP37A2、EP37L1、GEP(gastric epithelial cell protein)(Takabatake et al, 1992; Wistow et al, 1995; Ogawa et al, 1997; Ogawa et al, 1998);从中国西南地区特有两栖动物大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离纯化得到的 $\beta\gamma$ -CAT ($\beta\gamma$ -crystallin and trefoil factor complex)的 α 亚基(Liu et al, 2008);来源于哺乳动物的黑色素瘤缺失蛋白(absent in melanoma 1, AIM1) (Ray et al, 1997)。

非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白在原核和真核生物中都有发现,提示这一家族蛋白具有物种多样性。序列比对分析表明,非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白均含有一个或者多个 $\beta\gamma$ -晶状体结构域,每个结构域由两个希腊钥匙模体(Greek key motifs)组成,一个希腊钥匙模体由大约40个氨基酸残基组成,含有4个 β -折叠结构(图1),其氨基酸序列特征为:(LIVMFYWA)-x-(DEHRKSTP)-(Y)-(DEQHKY)-x(3)-(FY)-x-G-x(4)-(LIVMFCST)(Bloemendal et al, 2004)。两个结构域之间由一段短肽相连,并具有一个比较短的C-末端;整个分子呈高度对称,能够形成一系列大小不同的多聚体的形式。晶状体蛋白所具有的复杂而有序的三级和四级结构特征与其维持眼球晶状体的折光性,透明性和适应性的功能密切相关(Slingsby et al, 1997)(图1)。非

晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白家族成员之间在一级序列上相似度很低, 只有维持希腊钥匙模体(Greece motif)结构必需的几个氨基酸位点很保守。因此推测其祖先基因可能通过基因内部的复制和交换, 对称进化而来(图 2)(Clout et al, 2001)。

2 非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的功能

从微生物到高等哺乳动物, 都发现了非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白(Wistow & Piatigorsky, 1988; Bhat, 2004), 包括微生物来源的应急蛋白和脊椎动物中的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白。不同来源的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白具有复杂多样的生物学功能。

2.1 原核生物中的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白——环境胁迫应急蛋白

目前在原核生物中发现的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白有 Protein S、Spherulin 3a、SMPI 和 SKLP。研

究表明它们主要作为一种因恶劣环境胁迫而诱导产生的一类应急蛋白, 其相关功能研究进展如下:

土壤中革兰氏阴性黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*)分泌的参与孢子形成的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白质 Protein S, 由 173 个氨基酸组成, 具有由四个希腊钥匙模体形成的两个对称的 $\beta\gamma$ -晶状体结构域(图 3D), 分子量为 19 kDa(Inouye et al, 1979; Nelson & Zusman, 1983)。在黄色粘球菌形成子实体的早期(3—6h), Protein S 以可溶性蛋白的形式合成并积累在发育的细胞中; 在 24 h 内, Protein S 的浓度逐渐达到最大峰值, 占总蛋白合成量的 15%。在子实体形成晚期(15—18h), Protein S 通过跨细胞质膜转运分泌出来。在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 存在的情况下, Protein S 可被诱导成不溶的蛋白复合物, 并最终驻留在孢子的最外层细胞膜上(72 h)(Nelson & Zusman, 1983)。在非常干燥的环境中,

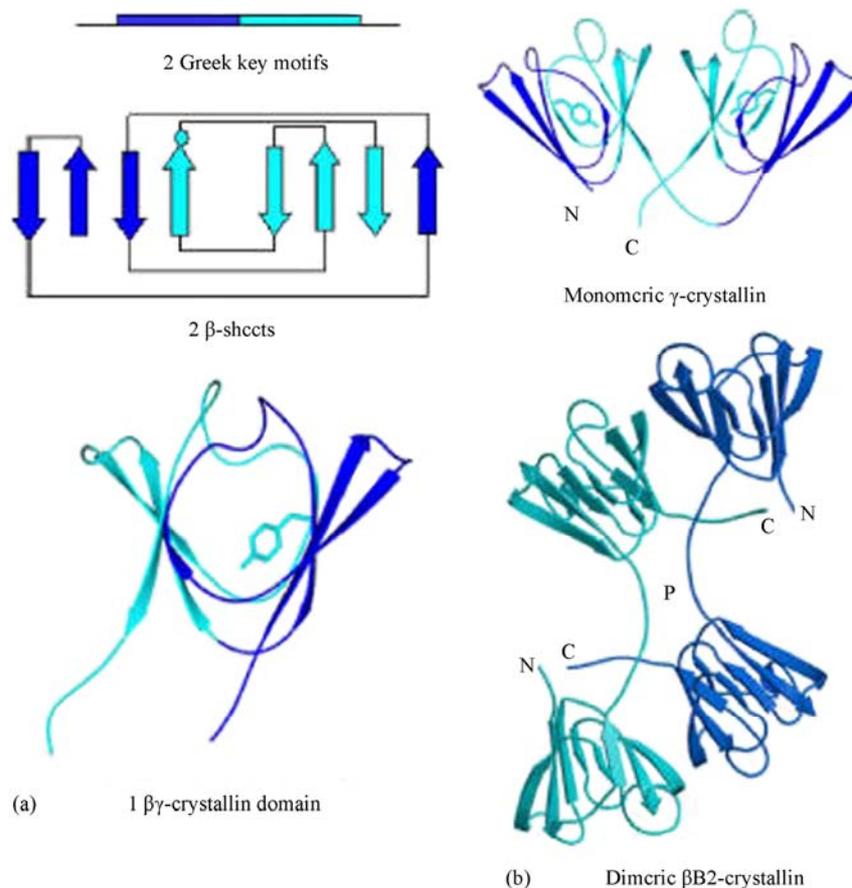


图 1 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的分子模体结构

Fig. 1 The modular structure of the $\beta\gamma$ -crystallins

- (a) 每个 $\beta\gamma$ -晶状体结构域有两个线性排列的希腊钥匙模体组成, 整个 $\beta\gamma$ -晶状体分子通过 β -片层的形式形成高度对称紧密的结构。
 (b) 含有 $\beta\gamma$ -晶状体结构域的眼球晶状体蛋白(引自 Bloemendal et al, 2004)。
 (a) Each $\beta\gamma$ -crystallin domain is made from two linear sequencerelated Greek key motifs that intercalate on folding to form two b-sheets.
 (b) All lens $\beta\gamma$ -crystallins comprise two domains (cited from Bloemendal et al, 2004).

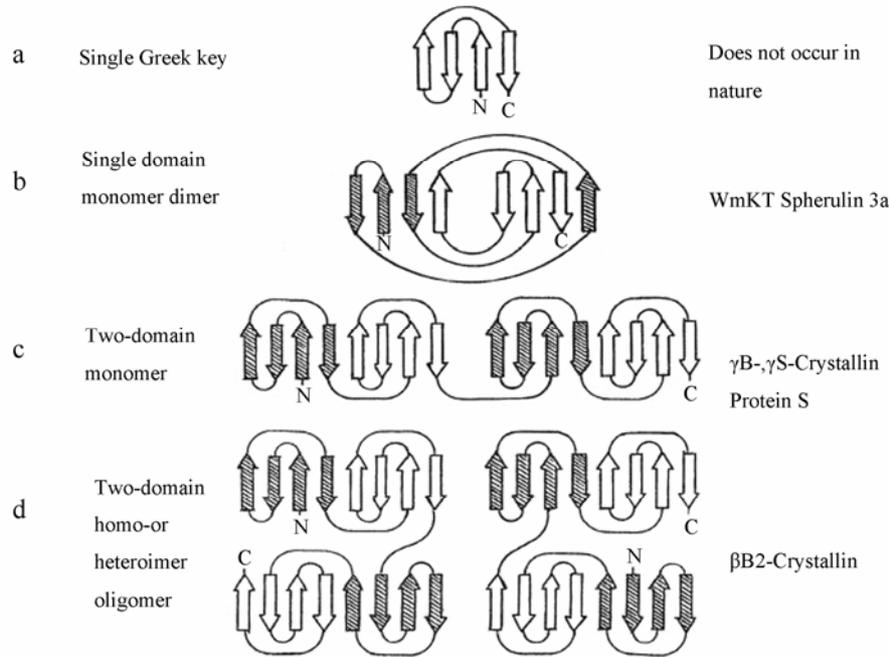


图 2 含有多个希腊钥匙模体组成的 $\beta\gamma$ -晶状体结构域的蛋白质的结构层次(引自 Jaenicke & Slingsby, 2001)

Fig. 2 Hierarchy of proteins with the $\beta\gamma$ -crystallin fold as multiples of Greek-key motifs (cited from Jaenicke & Slingsby, 2001)

- (a) 1 Greek key with 4 β -strands. (b) 2 intercalating Greek keys form a single domain with two β -sheets.
(c) 4 Greek keys form a two-domain monomer. (d) 2×2 -domain monomer domain swaps to form a dimer.

Protein S 能够结合钙离子后通过寡聚化作用, 形成多聚体复合物, 在细菌表面组装形成多层衣壳, 并能够介导孢子和孢子之间的相互作用, 保护黄色粘球菌度过严酷的环境条件(Bagby et al, 1994)。

Yersinia 非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白来源于鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*, 肠杆菌科耶尔森氏菌属, 兼性厌氧革兰氏阴性菌), 具有和 $\beta\gamma$ -crystallins 高度同源的结构, 含有与 Protein S 和 Spherulin 3a 相似的钙结合位点。*Yersinia* 晶状体蛋白的钙结合活性对鼠疫耶尔森氏菌的体外存活和增殖具有重要作用(Jobby & Sharma, 2005)。

Spherulin 3a 为多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*, 团毛菌目, 粘菌属)在各种环境胁迫下形成囊胞和休眠时特异合成的蛋白质(Wistow 1990)。Spherulin 3a 由 103 个氨基酸组成, 只含有一个 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白结构域(图 3B), 能够形成同源二聚体和四聚体(Jaenicke & Slingsby, 2001), 因此推测 Spherulin 3a 是 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白家族祖先的雏形, 提示了 $\beta\gamma$ -crystallins 超家族蛋白的原始起源和可能通过基因复制、融合的进化过程(Rosinke et al, 1997)。Spherulin 3a 在孢子期大量表达, 具有钙离子结合活

性, 与其他蛋白一起形成衣壳。因此, 推测 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白作为一个压力应急蛋白, 在恶劣环境中起到保护作用(Rosinke et al, 1997; Kretschmar et al, 1999; Clout et al, 2001)。

SMPI(streptomyces metalloproteinase inhibitor) 是从链霉菌 (*Streptomyces nigrescens* TK-23) 中分离得到的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体家族蛋白质(图 3A), 由 102 个氨基酸组成, 具有 2 对二硫键, 含有两个 $\beta\gamma$ -晶状体结构域(Ohno et al, 1998)。SMPI 为一类金属蛋白酶抑制剂, 能够专一性抑制 Gluzincin 家族的金 属蛋白酶, 如特异性抑制金属蛋白酶 Thermolysin 的活性 (Ohno et al, 1998)。

SKLP (streptomyces killer toxin-like protein, 链球菌杀手毒素样蛋白) 是从链霉菌(*Streptomyces* sp. F-287)中分离得到的只含有一个 $\beta\gamma$ -晶状体结构域的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白, 对出芽酵母和分裂酵母具有杀伤作用, 但是 SKLP 不能够结合钙离子(Ohki et al, 2001)。

2.2 低等真核生物中的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白——简单的多功能蛋白

低等真核生物中已有报道的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状

体蛋白包括 WmKT、Igr1 和 Gcry, 这些非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白开始具有简单的多功能蛋白的雏形。

WmKT 为酵母菌株(*Williopsis mrakii*)分泌到细胞外基质中的 Killer toxin, 能够抑制其他酵母菌株生长的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白(Antuch et al, 1996)。WmKT 由 88 个氨基酸残基组成, 分子量为 9.5 kDa, 等电点为 9.1。它只含有两个希腊钥匙模体, 是单 $\beta\gamma$ -晶状体结构域蛋白质的另一个典型例子(图 3C)。WmKT 能够抑制 β -葡聚糖的合成, 从而破坏敏感酵母菌株的细胞壁。WmKT 的稳定性非常强, 在 pH 2.0—11.0, 温度 100°C 处理 10 min 的条件下, 还能够保持活性。

运输蛋白 Igr1(induced during granule regeneration)是从嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*, 原生动物门, 纤毛虫纲)分离到的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白质(Haddad et al, 2002)。四膜虫的细胞大分子内容物可在高尔基体合成, 并由运输蛋白运送到致密核心小泡(dense core granules, DCG)中富集, 通过

迅速的胞吐作用而调节细胞内的环境。Igr1 在嗜热四膜虫的致密核心小泡运输中释放出来, 作为运输蛋白调节致密核心小泡的运输。Igr1 蛋白的 C-末端具有 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白结构类似的结构域, 但二者的一级序列相似度很低, 只有核心的结构区域的关键氨基酸和 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白相一致。

Gcry 是从最低等的无脊椎动物多孔动物门的寻常海绵纲(*Geodia cydonium*)中克隆到的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白(Kraskor et al, 1997), 其基因中不含内含子, 推导出的氨基酸由 163 个氨基酸残基组成, 具有两个晶状体蛋白结构域。序列比对发现 Gcry 与脊椎动物中的 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白具有很高的序列相似度, 这一数据进一步支持高等真核生物中的 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白是从一个共同的祖先进化而来的假说(Di Maro et al, 2002)。

2.3 两栖类中的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白——具有复杂功能的生理蛋白

目前在两栖动物中发现的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体

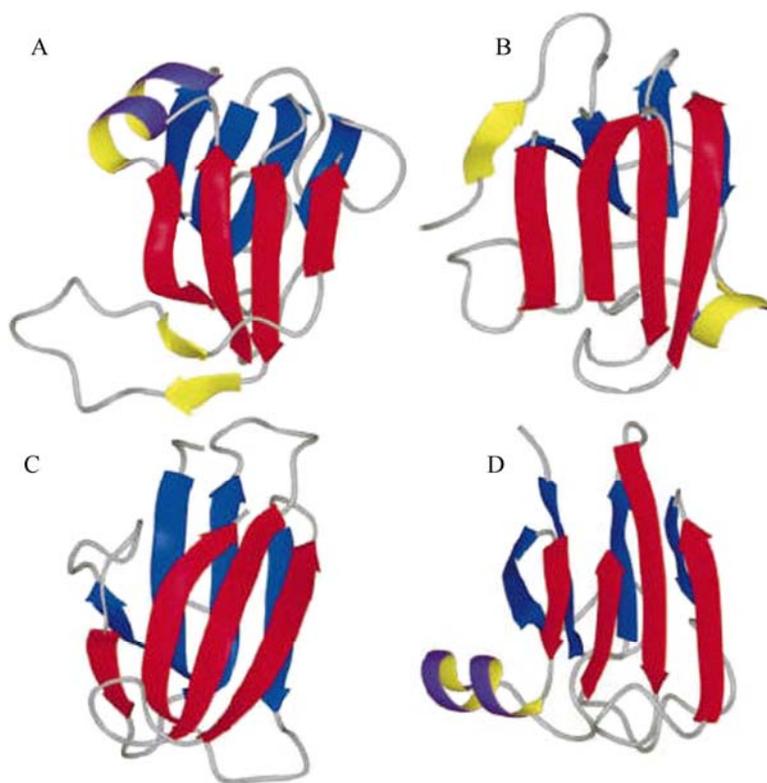


图 3 非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白超家族的四级结构

Fig. 3 Tertiary structures of proteins in the $\beta\gamma$ -crystallin superfamily

(A) SMPI; (B) Spherulin 3a; (C) yeast killer toxin (WmKT); (D) Protein S 的 N 端区域 (引自 Ohki et al, 2001)。

N-terminal domain of SMPI (1BHU) (A), spherulin 3a (1A4G) (B), yeast killer toxin (WmKT) (C) and protein S (1PRR) (D) (cited from Ohki et al, 2001).

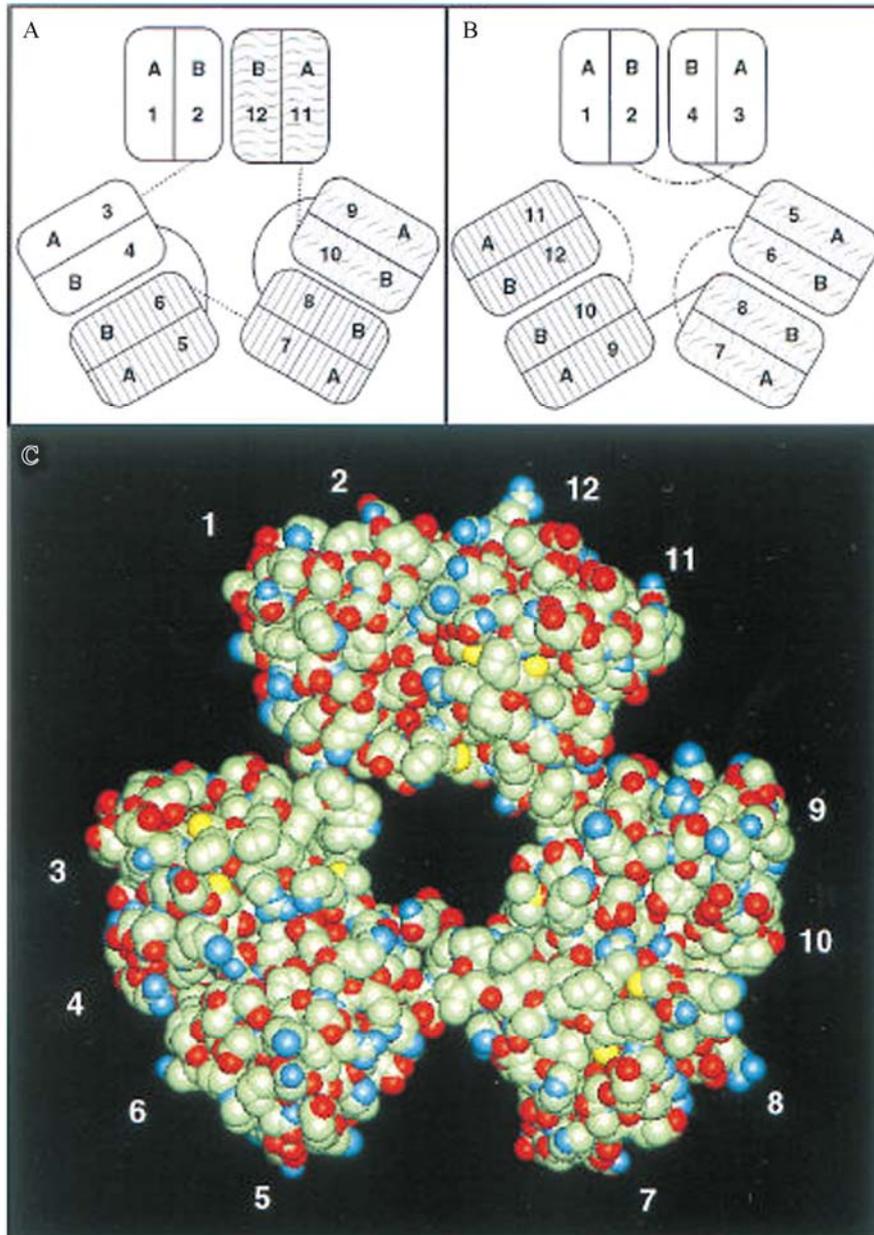


图 4 黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 的 $\beta\gamma$ -模体的结构模拟

Fig. 4 Modeling structure of the AIM1 $\beta\gamma$ -motifs

A 和 B 为黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 的假想结构模型, C 为黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 的假想的三维结构(引自 Ray et al, 1997)。

A and B schematics of pseudo-threefold AIM1 structures, C: A conceptual illustration of the pseudo-threefold structure (cited from Ray et al, 1997).

蛋白有 EP37 家族蛋白和非晶状体 $\beta\gamma$ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物。

表皮分化特异性蛋白 EP37(epidermis-specific protein, 包括 EP37、EP37A1 和 EP37A2、EP37L1、GEP)是高等脊椎动物中一类新颖的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白, 在两栖动物的胚胎发育中特异表达 (Takabatake et al, 1992; Ogawa et al, 1997)。例如以日本蝾螈(Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*)为代

表, 幼虫期和变态前, EP37 L1/L2 分布于表皮细胞的质膜上, 推测参与维持细胞的完整性。在变态后的成体动物中, EP37 A1/A2 表达分布于皮肤腺体, 推测这种基因表达的转变和在皮肤上位置分布的变化是一种对两栖类生活环境的适应(Wistow et al, 1995; Mikhailov et al, 1997; Ogawa et al, 1997)。GEP 为分布在胃表皮细胞上的 EP37 同源物, 分子量 39 kDa, 其 N-端具有 4 个 $\beta\gamma$ -crystallin 模体结构。在

成体和幼虫中, 表达分布于表面粘膜细胞的管腔内面和胃基底的腺体中, 推测具有保护其免于物理和化学损伤的作用, 保护消化过程的物理磨损和自体消化(Ogawa et al, 1998)。GEP 的 C-端区域和苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* subsp. *Thompsoni*)中的 crystal 蛋白(80—290)区域具有一定的相似性, 而该蛋白与其囊膜内毒素的形成和晶状体蛋白包涵体的形成相关, 提示 GEP 可能也具有类似的功能。因此, EP37 在两栖类胚胎发育中的广泛分布和在时空表达上的有序调节, 提示该家族蛋白在两栖类胚胎的皮肤和消化系统的分化, 发育过程中发挥重要作用。

非晶状体 $\beta\gamma$ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物(non-lens $\beta\gamma$ -crystallin and trefoil factor complex, $\beta\gamma$ -CAT)为从大蹼铃蟾(*Bombina maxima*)皮肤分泌物中分离纯化的一个全新的天然分子量为 72kDa 的蛋白复合物 (Liu et al, 2008)。 $\beta\gamma$ -CAT 的 α -亚基属于非晶状体 $\beta\gamma$ 晶状体蛋白家族, 与蝶螈(*Cynops pyrrhogaster*)表皮分化蛋白 EP37 和人源黑色素瘤缺失蛋白 AIM1 具有很高的序列相似度。 $\beta\gamma$ -CAT 的 α -亚基在一级序列上由两部分组成: N-端含有两个 $\beta\gamma$ 晶状体结构域(第 1—170 个氨基酸残基), 与 EP37L1 和 AIM1 具有很高的序列相似度; C-端含有(第 173—287 个氨基酸残基)与细菌(*Clostridium perfringens*)来源的孔道形成蛋白毒素 ETX(epsilon toxin)中孔道形成结构域(第 118—209 个氨基酸残基)高度相似的结构域。 $\beta\gamma$ -CAT 的 β -亚基含有 3 个三叶因子结构域, 为世界上第一次报道, 与人源三叶因子 hTFF2 和 hTFF3 具有很高的相似度(Liu et al, 2008)。 $\beta\gamma$ -CAT 由 α -亚基和 β -亚基以 $\alpha\beta_2$ 的分子形式通过非共价键连接。

实验结果表明, $\beta\gamma$ -CAT 具有复杂多样的生物学功能: $\beta\gamma$ -CAT 的 α 亚基中含有典型的 GTP/ATPase 的保守结构模体 Walker A 和 Walker B, 在体外实验体系中检测到 $\beta\gamma$ -CAT 具有 ATPase 和 GTPase 水解酶活性和核苷酸(GTP/ATP)结合活性, 可能为一类尚未报道过的 ATPase 和 GTPase 酶(He et al, 2008a)。 $\beta\gamma$ -CAT 能够通过孔道形成作用在人源红细胞膜上形成孔径为 2.0 nm 的孔道, 使红细胞内钾离子迅速外流引起胶体渗透压改变而溶血(Liu et al, 2008a)。电子显微镜观察 $\beta\gamma$ -CAT 处理红细胞引起的早期形态学变化, 发现红细胞体积增加、肿胀, 少数红细胞表面向外形成棘状异常突起, 部分肿胀

细胞内的血红蛋白通过棘状突起缺口向细胞外喷射血红蛋白(Liu et al, 2008b)。 $\beta\gamma$ -CAT 不与红细胞膜上常见的脂类(如胆固醇、磷脂、鞘磷脂等)和糖类分子(如半乳糖、海藻糖等)结合, 提示可能与红细胞膜上的未知蛋白受体结合。Western blotting 分析表明, $\beta\gamma$ -CAT 的 α -亚基能够在红细胞膜寡聚形成分子量大于 240 kDa 的大分子寡聚体(Liu et al, 2008a)。在人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中, $\beta\gamma$ -CAT 能够通过单泛素化修饰, α 亚基和 β 亚基参与形成约 150 kDa 含有泛素化修饰信号的大分子复合物, 以囊泡化的方式从细胞外直接转运到细胞核中调节细胞的基因表达, 从而调节细胞的生理状态, 例如细胞迁移、脱落、生长和凋亡(He et al, 2008a)。 $\beta\gamma$ -CAT 在皮摩尔水平(50 pmol/L)具有促进 HUVEC 创伤修复的活性(Liu et al, 2008a)。 $\beta\gamma$ -CAT 在体外纳摩尔水平能够杀死多种肿瘤细胞, 抑制肿瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞脱落和凋亡(He et al, 2008b)。 $\beta\gamma$ -CAT (纳摩尔水平)能够内皮依赖的诱导离体的兔胸主动脉产生快速而持续的收缩, 在 $\beta\gamma$ -CAT(25 nmol/L)处理的主动脉环的内皮细胞层检测到肿瘤坏死因子- α 的释放。同时, $\beta\gamma$ -CAT 能够诱导原代培养的兔胸主动脉内皮细胞(RAEC)快速释放肿瘤坏死因子- α (Liu et al, 2008c)。静脉注射 $\beta\gamma$ -CAT (2 μg)能够引起兔心脏骤停和血压迅速下降, 血小板和白细胞大量减少, 并分泌大量的炎症因子(Qian et al, 2008a)。临床研究报道, 心衰病人的血清中三叶因子和炎症因子异常高表达。 $\beta\gamma$ -CAT (2 nmol/L)在体外能够迅速引起离体兔心脏骤停, 并分泌大量的炎症因子, 如肿瘤坏死因子- α 、IL-1 和 IL-6 等(Qian et al, 2008b)。这些结果提示大蹼铃蟾非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物可能参与行使多种生理功能, 并发挥重要作用。但是, 目前其生物学功能和详细分子作用机制尚不清楚。

2.4 高等哺乳动物中的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白——潜在的肿瘤抑制相关蛋白

根据目前研究报道, 在高等哺乳动物中发现的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白主要为黑色素瘤缺失蛋白(absent in melanoma 1, AIM1)。黑色素瘤缺失蛋白 AIM1, 为一类首先在黑色素瘤疾病模型中缺失的与肿瘤抑制相关的新基因。皮肤癌位居人类癌症的第三位, 包括基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤几类。恶性黑色素瘤(melanoma)是皮肤癌中的主要致死种类, 人群中的发生率不断增加(Teichmann

et al, 1998)。在从黑色素细胞到恶性黑色素瘤转变的过程中, 染色体 1、6、7 和 11 的变化最为明显 (Thompson et al, 1995; Matsuta et al, 1997), 而染色体 6 长臂的丢失, 是其中重要的变化。恶性黑色素瘤(melanoma)是皮肤癌中的主要致死种类, 人群中的发生率不断增加(Teichmann et al, 1998)。人源 AIM1 定位于染色体带 6q21, 而小鼠 AIM1 定位于染色体 10 号上, 二者间有相同的保守基因连锁群。在人和小鼠中, 都存在第二个 AIM1 样的基因, 提示 AIM1 以基因家族的形式存在的(Teichmann et al, 1998)。从 cDNA 推导出来人和小鼠的 AIM1 蛋白具有很高的同源性, 在 $\beta\gamma$ -crystallin 区域和 C-末端的区域的同源性高达 90%。人源 AIM1 蛋白具有 12 个 $\beta\gamma$ -crystallin 的结构模体, 分为三簇, 之间由间隔的连接肽相连(图 4)(Ray et al, 1997; Teichmann et al, 1998)。在小鼠中, Northern 分析表明, AIM1 的表达受到时空的调节, 在胚胎发生中大量表达于毛囊轴区和假定的胚盘上, 而在黑色素细胞和黑色素细胞前体细胞上未检测到, 在成体中 AIM1 大量表达于皮肤、肺、心脏、肝和肾等器官(Teichmann et al, 1998)。AIM1 胚胎发育和在成体组织中的高表达, 暗示了该蛋白质对皮肤发育和维持成体的某些生理功能, 发挥着重要的作用。同时通过转染 AIM1 基因的实验, 发现 AIM1 具有肿瘤抑制因子的作用, 强烈提示 AIM1 可能作为一个未知的抑癌基因(Ray et al, 1997)。最近 Aravind et al (2006)通过体外重组表达人源 AIM1 蛋白, 对其晶体结构做了一定的研究。但是, 目前对于 AIM1 的生物学功能和详细的分子作用机制还很不清楚。

3 展 望

随着大规模基因组测序和蛋白质组学分析技术

的进步, 大量的高等哺乳动物来源的非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白家族相关的序列数据被提交到 GenBank。但是, 有关非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白的功能和分子作用机制研究的报道很少, 特别在高等哺乳动物中由于天然成熟蛋白表达量极低且非常难以分离, 所以对它们的功能与作用机理知之甚少。但是, 根据对现有几个该家族的蛋白质研究结果强烈提示这一类蛋白质分子, 在体内除了作为压力反应蛋白外, 可能参与了胚胎发育, 组织分化, 肿瘤发生等重要的生理过程并在其中发挥重要的作用。

大蹼铃蟾(*Bombina maxima*)主要分布在中国西南的云南省和四川省, 是我国特有的资源性两栖动物种类。目前从大蹼铃蟾皮肤分泌物中已经发现了大量的肽类和蛋白活性组分, 包括作为两栖动物天然免疫系统的重要组成部分的抗菌肽, 具有调节或者激素的功能的肽类(例如缓激肽、缓激肽增强肽和缓激肽拮抗肽、缓激肽基因相关肽、富含脯氨酸铃蟾肽及其基因相关肽、神经调节素 U 和 Bv8 肽等)、三叶型蛋白和蛋白酶抑制剂等(Lai et al, 2002; Lai et al, 2003; Lee et al, 2005; Zhang, 2006)。Erspamer 根据大量的研究结果预测在两栖类皮肤中发现的蛋白质和多肽, 往往能在高等哺乳动物中找到相同或类似分子的存在(Bevins & Zasloff, 1990)。两栖类动物可作为研究生物医学和生物学基本问题的一个优秀模型, 为研究高等哺乳动物中的类似分子和作用机制提供线索和思路。因此, 通过对大蹼铃蟾非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物的生物学功能和详细分子作用机制的研究, 将有助于揭示高等哺乳动物中非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白(例如 AIM1)的生理和病理功能及其分子作用机制。

参考文献:

- Antuch W, Guntert P, Wuthrich K. 1996. Ancestral beta gamma-crystallin precursor structure in a yeast killer toxin [J]. *Nat Struct Biol*, **3** (8): 662-665.
- Aravind P, Rajini B, Sharma Y, Sankaranarayanan R. 2006. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic investigations on a beta gamma-crystallin domain of absent in melanoma 1 (AIM1), a protein from *Homo sapiens* [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **62**: 282-284.
- Bagby S, Harvey TS, Eagle SG, Inouye S, Ikura M. 1994. Structural similarity of a developmentally-regulated bacterial spore coat protein to betagamma-crystallins of the vertebrate eye lens [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91** (10): 4308-4312.
- Barnwal RP, Jobby MK, Sharma Y, Chary KVR. 2006. NMR assignment of M-crystallin: a novel Ca^{2+} binding protein of the betagamma-crystallin superfamily from *Methanosarcina acetivorans* [J]. *J Biomol NMR*, **36**: 32-32.
- Bernier F, Lemieux G, Pallotta D. 1987. Gene families encode the major encystment-specific proteins of *Physarum polycephalum plasmodia* [J]. *Gene*, **59** (2-3): 265-277.
- Bevins CL, Zasloff M. 1990. Peptides from frog skin [J]. *Annu Rev Biochem*, **59**: 395-414.
- Bhat SP. 2004. Transparency and non-refractive functions of crystallins-a

- proposal [J]. *Exp Eye Res*, **79** (6): 809-816.
- Bloemendal H. 1982. Lens proteins [J]. *CRC Crit Rev Biochem*, **12** (1): 1-38.
- Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, Lubsen NH, Slingsby C, Tardieu A. 2004. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, **86** (3): 407-485.
- Clout NJ, Kretschmar M, Jaenicke R, Slingsby C. 2001. Crystal structure of the calcium-loaded spherulin 3a dimer sheds light on the evolution of the eye lens betagamma-crystallin domain fold [J]. *Structure*, **9** (2): 115-124.
- Di Maro A, Pizzo E, Cubellis MV, D'Alessio G. 2002. An intron-less betagamma-crystallin type gene from the sponge *Geodia cydonium* [J]. *Gene*, **299** (1-2): 79-82.
- Ganea E. 2001. Chaperone-like activity of alpha-crystallin and other small heat shock proteins [J]. *Curr Protein Pept Sci*, **2** (3): 205-225.
- Giancola C, Pizzo E, Di Maro A, Cubellis MV, D'Alessio G. 2005. Preparation and characterization of geodin-A betagamma-crystallin type protein from a sponge [J]. *FEBS J*, **272** (4): 1023-1035.
- Graw J. 1997. The crystallins: Genes, proteins and diseases [J]. *Biol Chem*, **378** (11): 1331-1348.
- Haddad A, Bowman GR, Turkewitz AP. 2002. New class of cargo protein in *Tetrahymena thermophila* dense core secretory granules [J]. *Eukaryotic Cell*, **1** (4): 583-593.
- He YY, Liu SB, Qian JQ, Lee WH, Zhang Y. 2008a. Mechanism of betagamma-CAT cell nuclear transported and select killed tumor cells [J]. *Zool Res*, **29**(4): 386-398. [何英英, 刘树柏, 钱金桥, 李文辉, 张云. 2008b. 非晶状体 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物的细胞核转运及其选择性杀伤肿瘤细胞机制的研究. *动物学研究*, **29**(4): 386-398.]
- He YY, Liu SB, Lee WH, Zhang Y. 2008b. Melanoma cell growth inhibition by betagamma-CAT, which is a novel non-lens betagamma-crystallin and trefoil factor complex from frog *Bombina maxima* skin [J]. *Toxicol*, **52**(2): 341-347.
- Inouye M, Inouye S, Zusman DR. 1979. Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development-specific protein of *Myxococcus xanthus* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76** (1): 209-213.
- Inouye M, Inouye S, Zusman DR. 1979. Gene expression during development of *Myxococcus xanthus*: pattern of protein synthesis [J]. *Dev Biol*, **68** (2): 579-591.
- Jaenicke R, Slingsby C. 2001. Lens crystallins and their microbial homologs: Structure, stability, and function [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **36** (5): 435-499.
- Jobby MK, Sharma Y. 2005. Calcium-binding crystallins from *Yersinia pestis*: Characterization of two single beta gamma-crystallin domains of a putative exported protein [J]. *J Biol Chem*, **280** (2): 1209-1216.
- Krasko A, Muller IM, Muller WEG. 1997. Evolutionary relationships of the metazoan beta gamma-crystallins, including that from the marine sponge *Geodia cydonium* [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **264** (1384): 1077-1084.
- Kretschmar M, Mayr EM, Jaenicke R. 1999. Homo-dimeric spherulin 3a: a single-domain member of the beta gamma-crystallin superfamily [J]. *Biol Chem*, **380** (1): 89-94.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2002. A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesin) from toad *Bombina maxima* [J]. *Peptides*, **23** (3): 437-442.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2003. Two novel Bv8-like peptides from skin secretions of the toad *Bombina maxima* [J]. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, **134** (3): 509-514.
- Lee WH, Liu SB, Shen JH, Jin Y, Zhang Y. 2005. Cloning of bradykinin precursor cDNAs from skin of *Bombina maxima* reveals novel bombinakinin M antagonists and a bradykinin potential peptide [J]. *Regul Pept*, **127** (1-3): 207-215.
- Liu SB, He YY, Zhang Y, Lee WH, Qian JQ, Lai R, Jin Y. 2008a. A novel non-lens betagamma-Crystallin and trefoil factor complex from amphibian skin and its functional implications [J]. *PLoS ONE*, **3** (3): e1770.
- Liu SB, He YY, Qian JQ, Zhang Y. 2008b. Electron microscopic analysis of $\beta\gamma$ -CAT pore-forming effect on human erythrocyte membrane [J]. *Zool Res*, **29**(5): 503-510. [刘树柏, 何英英, 钱金桥, 张云. 2008b. 电镜分析非晶状体 $\beta\gamma$ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物在人红细胞膜上的孔道形成效应. *动物学研究*, **29**(5): 503-510.]
- Liu SB, He YY, Qian JQ, Zhang Y. 2008c. Betagamma-CAT, induced isolated rabbit thoracic aortic rings sustained contraction in endothelial-dependent manner [J]. *Zool Res*, **29**(5): 493-502. [刘树柏, 何英英, 钱金桥, 张云. 2008c. 非晶状体 $\beta\gamma$ 晶状体蛋白与三叶因子蛋白复合物诱导兔胸主动脉环内皮依赖的持续收缩效应. *动物学研究*, **29**(5): 493-502.]
- Malinowski K, Manski W. 1980. An immunochemical study of the different proteins in the beta and gamma crystallin families [J]. *Exp Eye Res*, **30** (5): 519-526.
- Matsuta M, Imamura Y, Matsuta M, Sasaki K, Kon S. 1997. Detection of numerical chromosomal aberrations in malignant melanomas using fluorescence *in situ* hybridization [J]. *J Cutan Pathol*, **24** (4): 201-205.
- Mikhailov AT, Simirskii VN, Aleinikova KS, Gorgolyuk NA. 1997. Developmental patterns of crystallin expression during lens fiber differentiation in amphibians [J]. *Int J Dev Biol*, **41** (6): 883-891.
- Mörner CT. 1893. Untersuchungen der Proteinstoffen in den lichtbrechenden Medien des Auges [J]. *Z Physiol Chem*, **18**: 61-106.
- Narberhaus F. 2002. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: Socializing minichaperones in the context of a multichaperone network [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66** (1): 64-93.
- Nelson DR, Zusman DR. 1983. Transport and localization of protein S, a spore coat protein, during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus* [J]. *J Bacteriol*, **154** (2): 547-553.
- Ogawa M, Takabatake T, Takahashi TC, Takeshima K. 1997. Metamorphic change in EP37 expression: Members of the betagamma-crystallin superfamily in newt [J]. *Dev Genes Evol*, **206** (7): 417-424.
- Ogawa M, Takahashi TC, Takabatake T, Takeshima K. 1998. Isolation and characterization of a gene expressed mainly in the gastric epithelium, a novel member of the ep37 family that belongs to the betagamma-crystallin superfamily [J]. *Dev Growth Diff*, **40** (5): 465-473.
- Ohki S, Kariya E, Hiraga K, Wakamiya A, Isobe T, Oda K, Kainosho M. 2001. NMR structure of Streptomyces killer toxin-like protein, SKLP: Further evidence for the wide distribution of single-domain betagamma-crystallin superfamily proteins [J]. *J Mol Biol*, **305** (1): 109-120.
- Ohno A, Tate S, Seeram SS, Hiraga K, Swindells MB, Oda K, Kainosho M. 1998. NMR structure of the Streptomyces metalloproteinase inhibitor, SMPI, isolated from Streptomyces nigrescens TK-23: Another example of an ancestral beta gamma-crystallin precursor structure [J]. *J Mol Biol*, **282** (2): 421-433.
- Piatigorsky J. 1981. Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features [J]. *Differentiation*, **19** (3): 134-153.
- Qian JQ, Liu SB, He YY, Lee WH, Zhang Y. 2008a. Acute toxicity of betagamma-CAT, a naturally existing non-lens betagamma-crystallin and trefoil factor complex from frog *Bombina maxima* skin secretions [J]. *Toxicol*, **52**(1): 22-31.
- Qian JQ, Liu SB, He YY, Lee WH, Zhang Y. 2008b. Betagamma-CAT, a non-lens betagamma-crystallin and trefoil factor complex from amphibian skin secretions, caused endothelium-dependent myocardial depression in isolated rabbit hearts [J]. *Toxicol*, **52**(2): 285-292.

- Ray ME, Wistow G, Su YA, Meltzer PS, Trent JM. 1997. AIM1, a novel non-lens member of the beta gamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (7): 3229-3234.
- Reddy GB, Kumar PA, Kumar MS. 2006. Chaperone-like activity and hydrophobicity of alpha-crystallin [J]. *Iubmb Life*, **58** (11): 632-641.
- Rosinke B, Renner C, Mayr EM, Jaenicke R, Holak TA. 1997. Ca²⁺-loaded spherulin 3a from *Physarum polycephalum* adopts the prototype gamma-crystallin fold in aqueous solution [J]. *J Mol Biol*, **271** (4): 645-655.
- Slingsby C, Norledge B, Simpson A, Bateman OA, Wright G, Driessen HPC, Lindley PF, Moss DS, Bax B. 1997. X-ray diffraction and structure of crystallins [J]. *Prog Retin Eye Res*, **16** (1): 3-29.
- Takabatake T, Takahashi TC, Takeshima K. 1992. Cloning of an epidermis-specific Cynops cDNA from neurula library [J]. *Dev Growth Diff*, **3** (3): 277-283.
- Teichmann U, Ray ME, Ellison J, Graham C, Wistow G, Meltzer PS, Trent JM, Pavan WJ. 1998. Cloning and tissue expression of the mouse ortholog of AIM1, a beta gamma-crystallin superfamily member [J]. *Mamm Genome*, **9** (9): 715-720.
- Thompson FH, Emerson J, Olson S, Weinstein R, Leavitt SA, Leong SP, Emerson S, Trent JM, Nelson MA, Salmon SE, Taetle R. 1995. Cytogenetics of 158 patients with regional or disseminated melanoma. Subset analysis of near-diploid and simple karyotypes [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, **83** (2): 93-104.
- Wistow G. 1990. Evolution of a protein superfamily: relationships between vertebrate lens crystallins and microorganism dormancy proteins [J]. *J Mol Evol*, **30** (2): 140-145.
- Wistow G. 1993. Lens crystallins: gene recruitment and evolutionary dynamism [J]. *Trends Biochem Sci*, **18** (8): 301-306.
- Wistow G, Jaworski C, Rao PV. 1995. A non-lens member of the beta gamma-crystallin superfamily in a vertebrate, the amphibian Cynops [J]. *Exp Eye Res*, **61** (5): 637-639.
- Wistow GJ, Piatigorsky J. 1988. Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue [J]. *Annu Rev Biochem*, **57**: 479-504.
- Zhang C, Gehlbach P, Gongora C, Cano M, Fariss R, Hose S, Nath A, Green WR, Goldberg MF, Zigler JS, Sinha D. 2005. A potential role for beta- and gamma-crystallins in the vascular remodeling of the eye [J]. *Dev Dyn*, **234** (1):36-47.
- Zhang Y. 2006. Amphibian skin secretions and bio-adaptive significance--Implications from *Bombina maxima* skin secretion proteome[J]. *Zool Res*, **27**(1): 101-112.[张云. 2006. 两栖类动物皮肤分泌物及其生物学适应意义——大蹼铃蟾皮肤分泌物蛋白质多肽组的启示. 动物学研究, **27**(1): 101-112.]