

枯草芽孢杆菌中一个受二硫键还原剂诱导 并与伸长因子 Tu 同源的蛋白质*

王 台

(中国科学院植物研究所 北京 100093)

Kadokura H Yada K Yamasaki M

(东京大学生物工学 日本东京 113)

摘 要 分析了 β -巯基乙醇(β -ME)和二硫苏糖醇(DTT)对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)细胞蛋白质组分的影响。在 LB 培养基中, β -ME和 DTT 处理能诱导一个 50kD 蛋白质(P50)的合成。在正常生长条件下 P50 是一个组成性(constitutive)合成的细胞质蛋白质。热激也能诱导 P50,但是孢子形成(sporulation)不能诱导 P50。在 Schaeffer 孢子形成培养基中, β -ME和 DTT 都不能诱导 P50,表明二硫键还原剂诱导 P50 的能力依赖于特定的生理条件。用 V8 蛋白酶有限降解 P50,得到 4 个主要的多肽片段,测定了其中两个片段的 N-端氨基酸序列。同源性检索发现 P50 高度同源蛋白质合成的伸长因子 Tu。

关键词 枯草芽孢杆菌,二硫键还原剂诱导蛋白质,伸长因子 Tu

分类号 Q936

在热激(heat shock)条件下,生物体通过合成热激蛋白(heat shock proteins)来维持自身的生存,目前已知热激蛋白质能被许多热激之外的胁迫(stress)因子诱导,因此热激蛋白有时也叫胁迫蛋白(stress proteins)。一般认为变性蛋白质的积累是胁迫因子诱导胁迫蛋白质合成的直接原因^[1~4],细菌(*Escherichia coli*)细胞积累变性蛋白质能诱导热激蛋白质 Dnak 合成^[1]。Cox 等^[5]提出细胞内有一个变性蛋白质信号传递链,它可将内质网中变性蛋白质增加的信号传递到细胞核内,并激活胁迫蛋白质的基因。在酵母中,一个跨膜的精氨酸 / 苏氨酸激酶是这个传递链的必要成份^[5]。

与真核细胞不同,原核细胞没有复杂的亚细胞结构,而一般认为细胞质由于有较高的还原势而缺乏稳定的二硫键。原核细胞由于没有复杂的防护机制,而且直接与外界环境接触,更容易受环境胁迫的影响,近几年对原核细胞特别是细菌抗热激能力有过较深入的研究,但几乎不知道原核细胞如何应答二硫键还原剂等胁迫因子。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种重要的工业菌,研究它对环境胁迫的反应有重要的意义。本文报道了一个受二硫键还原剂诱导的蛋白质,讨论了它在枯草芽孢杆菌的环境胁迫反应中的功能。

* 本研究受日本政府、联合国科教文组织和国际细胞学联合会资助。

收稿日期: 1996-07-02

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) DB101 (his), DB104 (his nprR2 nprE18 Δ nprA3), 168 (trpC) 和 WB600 (trpC2 Δ nprR2 Δ aprE Δ epf Δ bpf Δ npr Δ nprB)。(东京大学微生物学研究室保存菌株)。

一般培养用 LB 培养基。孢子形成实验用 Schaeffer 孢子形成培养基 (SSM)。细胞经 80℃ 热处理 10min, 用 Tryptose blood 琼脂培养基附加 0.5% 葡萄糖检测孢子形成情况。

1.2 二硫键还原剂或热激处理

细菌用 LB 培养基 (L 形试管, 每管 10 ml) 37℃ 培养, 当细胞生长至后对数期 ($OD_{550} = 0.8 \sim 1.0$) 时, 将 β -ME 或 DTT 加入培养基, 最终浓度为 10 mmol / L (由预备实验决定); 或将细胞转移到 45℃, 除特别注明外, 处理时间均为 2h。8 000 \times g 离心 10 min, 收集细胞。用 SDS 样品缓冲液^[6]悬浮细胞, 用超声波破碎后, 12 000 \times g 离心 15 min 除去细胞碎片, 上清液用于 SDS-PAGE 分析。

1.3 细胞质和细胞膜的制备

细胞在 10 ml 培养基中培养, 培养条件同前。8 000 \times g 离心 10 min 收集细胞。细胞经缓冲液 A (50 mmol / L Tris-maleate, pH7.2) 冲洗 2 次后, 悬浮于 1 ml 缓冲液 B (50 mmol / L Tris-maleate, pH7.2, 含蔗糖 0.5 mol / L, $MgCl_2$ 5 mmol / L 和纤维素酶 500 μ g / ml), 在 37℃ 保温, 并缓慢摇动。原生质体经 3 000 \times g 离心 15 min 收集, 悬浮于 5 ml 无纤维素酶的缓冲液 B 中。悬浮液在 3 000 \times g 离心 10 min, 沉淀的原生质体用缓冲液 C (磷酸钠 10 mmol / L pH6.8, 含 EDTA 2 mmol / L 和 PMSF 1 mmol / L) 表面冲洗后, 再悬浮于缓冲液 C 中。超声波 15s 破碎原生质体, 上清液在 100 000 \times g 离心 90 min。离心后的上清液为细胞质组分, 沉淀为膜组分。

1.4 蛋白质的纯化

培养条件同前。300 ml LB 培养基分装于 30 个 L 形试管中。细胞经 8 000 \times g 离心 10 min 沉淀后, 悬浮于缓冲液 D (磷酸钠 10 mmol / L pH6.8, 含 EDTA 2 mmol / L, PMSF 1 mmol / L 和 β -ME 2 mmol / L), 随后用超声波破碎。10 000 \times g 离心 10 min, 去掉细胞碎片, 上清液在 100 000 \times g 离心 45 min。最终的上清液为粗细胞质组分。细胞质蛋白质上样至 2 \times 24 cm 的羟基磷灰石柱。层析柱用 100 ml 缓冲液 D 冲洗至基线后; 用 10 ~ 500 mmol / L 磷酸钠线性梯度, pH6.8 (含 EDTA 2 mmol / L, PMSF 0.1 mmol / L 和 β -ME 2 mmol / L) 洗脱。收集每个洗脱峰, 用 SDS-PAGE 检测层析结果。

用 Lowry^[7]的方法测定蛋白质含量。

1.5 蛋白质的有限酶切

用 SDS-PAGE 分离经羟基磷灰石柱层析的蛋白质。电泳后, 凝胶用考马斯亮兰短暂染色, 切下所需的蛋白质带。将蛋白质带在浓缩胶缓冲液中平衡 30 min, 随后切成小片。将小胶片放入一个新凝胶的样品槽内, 在胶片的周围充满缓冲液 F (0.125 mmol / L Tris-HCl pH6.8, 含 0.1% SDS 和 20% 甘油), 在胶片的上表面加入适量的含 1 μ g / μ l 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) V8 蛋白酶的缓冲液 F。28 mA 稳流电泳, 当溴酚兰进入

浓缩胶中部时,中止电泳 5 min。随后重新开始电泳至结束。

1.6 凝胶电泳

依据 Laemmli^[6]的方法进行 SDS-PAGE。分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 4.5%。染色液是 0.1% 考马斯亮兰、50% 甲醇和 10% 醋酸溶液, 脱色液是 5% 甲醇-7% 醋酸溶液。

1.7 N-端序列分析

SDS-PAGE 后, 依照 Matsudaira^[8]的方法将蛋白质或多肽片段电印渍至 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜上, 用 Applied Biosystem Model 477A 蛋白质序列分析仪分析 N-端氨基酸序列。

2 实验结果

2.1 受二硫键还原剂诱导的蛋白质

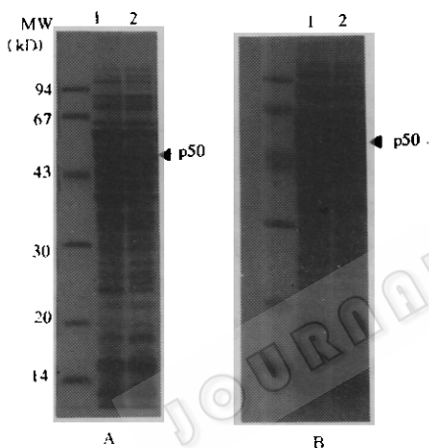


图 1 巯基乙醇 (β -ME) (A) 或二硫苏糖醇 (DTT) (B) 处理对枯草芽孢杆菌细胞蛋白质组分的影响 (示受 β -ME 或 DTT 诱导的一个 50 kDa 蛋白质 P50)

1. 对照; 2. 处理。

Fig. 1 The effect of β -mercaptoethanol (β -ME) (A) or dithiothreitol (DTT) (B) on protein components of *Bacillus subtilis* (Showing induction of a 50 kDa protein (P50) by β -ME or DTT)

1. Control; 2. Treatment.

当用 10 mmol / L β -ME 或 DTT 处理后对数生长期的枯草芽孢杆菌 DB104 细胞时, 它们能明显诱导一个 50 kDa 蛋白质的合成, 简称 P50。P50 本身是一个组成性合成的主要的细胞蛋白质 (图 1)。用枯草芽孢杆菌 168、DB101 和 WB600 实验, 得到类似的结果。原核细胞的许多热激蛋白质都是组成性合成、受热激诱导的, 如细菌的热激蛋白质 DnaK 和 GroEL, GroEL 占细胞质总蛋白质的 1%, 当用热激处理时, 其含量增加到 10% 左右^[1]。

2.2 热激能诱导 P50 合成

通常胁迫蛋白质是多功能的, 能被多种胁迫因子诱导。本文分析了热激对 P50 的影响。当细胞从 37℃ 转移到 45℃ 培养时, 热激处理明显诱导 P50。热激诱导 P50 的能力稍弱于二硫键还原剂。

2.3 孢子形成过程不能诱导 P50

从营养生长到孢子形成涉及到剧烈的生理生化变化。在酵母中, 孢子形成能诱导热激蛋白质 Hsp26 和 Hsp28 合成^[9]。比较在 Sachaeffer 孢子形成培养基 (SSM) 上培养 6h (此时导致孢子形成的生化和分子生物学过程已完全启动^[10]) 和 24h (此时将细胞在 80℃ 处理 10min 后在 Typtose blood 琼脂培养基上检测发现几乎所有的细胞均形成游离的孢子) 细胞蛋白质的电泳图谱发现在枯草芽孢杆菌中孢子形成不能诱导 P50。这些游离的孢子几乎没有高分子量的蛋白质, 仅有一些低分子量的蛋白质, 它们可能是核蛋白质。

2.4 β -ME和 DTT 在 SSM 中不能诱导 P50

在与用 LB 培养基培养细胞的相同条件下, 用 β -ME 或 DTT 处理生长在 SSM 中的细胞, 二者均不能诱导 P50。这暗示 β -ME 和 DTT 诱导 P50 需要特殊的生理环境。已有研究表明枯草芽孢杆菌孢子形成过程中的细胞和营养生长期的细胞含有不同的调节因子^[10], 许多热激蛋白质的合成是调节因子依赖性的^[11, 12]。

2.5 P50 的纯化

比较不同细胞组分的 SDS-PAGE 图谱表明 P50 是一个细胞质蛋白质(图 2)。将细胞质蛋白质上样至羧基磷灰石柱、经磷酸钠线性梯度 10~500 mmol/L pH6.8 洗脱后, 得到两个洗脱峰。峰 2 主要含 P50, 峰 1 包含了大部分杂蛋白质(图 3~4)。

2.6 P50 N-端氨基酸序列分析

将经层析后的 P50 经 SDS-PAGE 分离后, 电印渍至 PVDF 膜上, 切下 P50 直接用序列仪测定 N-端序列, 但是即使用较大的量的 P50, 也不能测定到其 N-端序列。这暗示其 N-端氨基酸被化学修饰了, 无法直接分析。为了分析 P50 的 N-端序列, 采用 SDS-PAGE 进一步纯化 P50, 将纯的 P50 经蛋白酶有限降解后, 得到 4 个主要的多肽片段。我们分析了多肽片段 2 和 4 的 N-端氨基酸序列, 同源性检索发现它们与枯草芽孢杆菌的蛋白质合成的伸长因子 Tu(EF-Tu) 的同源性分

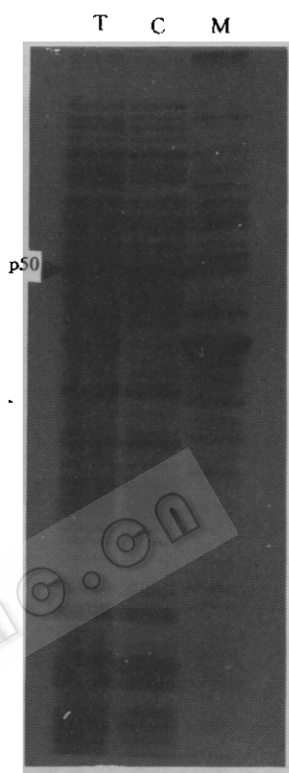


图 2 P50 的细胞定位

T, 总蛋白质; C, 细胞蛋白质; M, 膜蛋白质。

Fig.2 Cellular localization of P50

T, Total Proteins; C, Cytoplasmic proteins;

M, Membrane proteins.

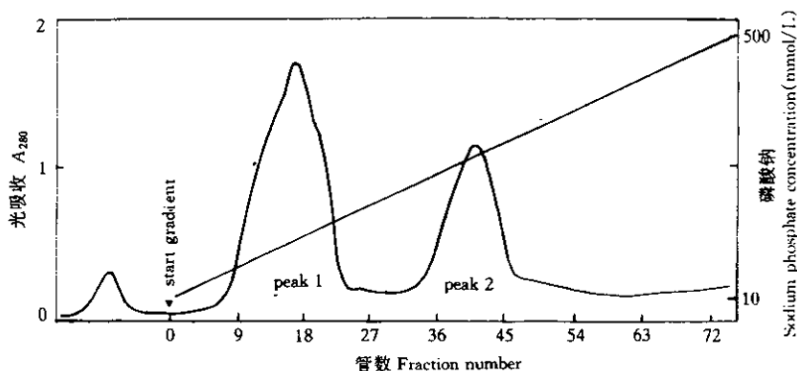


图 3 P50 的柱层析纯化图

Fig.3 Purification of P50 by column chromatograph

别是 92.9% 和 62.5%。以上结果表明 P50 高度同源源于 EF-Tu 或可能是 EF-Tu (图 5)。

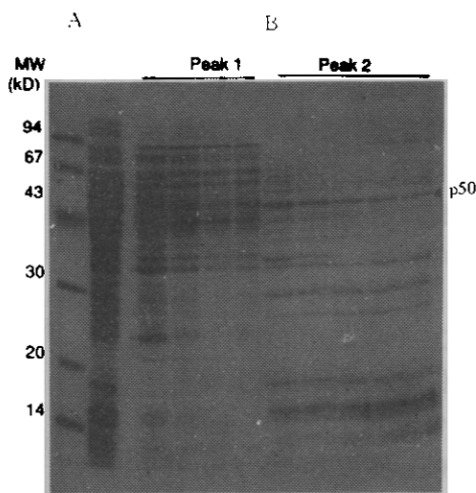


图 4 细胞质蛋白质(A)和不同洗脱组分的
SDS-PAGE图谱(B)

Fig.4 SDS-PAGE pattern of cytoplasmic proteins(A)
and different fractions(B)

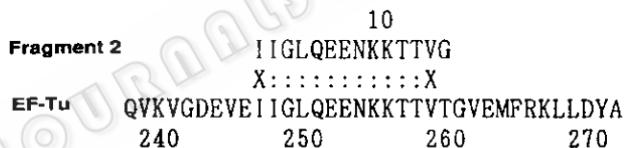


图5 片段2的N-端氨基酸序列和同源性比较

Fig.5 N-terminal sequence of fragment 2 and homologous comparison

3 讨论

二硫键是维持蛋白质二维和三维结构的重要因素之一。 β -ME和 DTT 是最常用的二硫键还原剂,被认为通过阻止二硫键的形成或破坏已有的二硫键影响蛋白质的折叠。在酵母中,用 β -ME处理能诱导内质网内积累变性蛋白质,后者诱导 BiP 和 GRP94 合成^[13, 14]。当 TPA 或 HSA 在细菌中合成时,不能形成适当的二硫键,处于变性状态,它们能诱热激蛋白质合成^[11]。

用 β -ME和 DTT 处理枯草芽孢杆菌细胞,均能诱导 P50 合成(图 1),表明二硫键还原剂诱导 P50 的能力可能归因于它们对二硫键的影响。阻止二硫键形成或打断已有的二硫键将会导致变性蛋白质积累,后者可能是诱导 P50 的直接原因。

我们已在枯草芽孢杆菌细胞质中发现一个含稳定二硫键的 23kD 蛋白质(P23)。在 LB 培养基中,P23 在后对数期的细胞中开始积累、在静止期的细胞中有高的含量,而在早

对数期的细胞中含量很低。在 SSM 中培养的细胞内,几乎检测不到 P23。这似乎说明了 β -ME和 DTT 对生长在 LB 和 SSM 中细胞影响不同的原因。因此,枯草芽孢杆菌细胞中可能有一个变性(或未折叠)蛋白质反应链,它能探测和传递变性蛋白质积累的信号。此外,由于热激也能诱导 P50,因此 P50 在抵抗环境胁迫的反应中可能有广泛的意义。

P50 是一个组成性合成的、主要的细胞质蛋白质,并受胁迫因子(二硫键还原剂和热激)诱导。原核细胞的大多数热激蛋白有这种特性^[1]。P50 高度同源源于蛋白质合成的伸长因子 Tu(EF-Tu),二者的分子量基本一致^[15]。已有实验表明真核细胞中的蛋白质合成的伸长因子 1_α (EF- 1_α)的 N-端氨基酸是被化学修饰的^[16],与本结果有相似性。因此,P50 很可能是 EF-Tu。

近几年,许多实验表明蛋白质合成的伸长因子是一种多功能的蛋白质。在真核细胞中,EF- 1_α 能与磷酸肌醇和肌动蛋白结合^[17]。在海胆中,一个类似 EF- 1_α 的蛋白质能与有丝分裂装置结合^[18]。在原核细胞中,EF-Tu能作为 Q β 复制酶的一个功能组分,并有结构蛋白质如微管蛋白质和肌动蛋白质的某些特性^[19]。

最近,Gonen 等^[16]发现 EF- 1_α 是一些蛋白质在以 ubiquitin 为分子标签的降解系统中降解的必需因子。在这个水解系统中,EF-Tu能代替 EF- 1_α 。EF- 1_α 可能维持待降解蛋白质处于对 26S 蛋白酶体(proteasome)水解敏感的构象。

现在尚不知道 P50 在环境胁迫反应中的功能。它可能有着与 EF- 1_α 类似的功能。参与了变性蛋白质的降解过程,这个假设遇到的主要问题是在原核细胞中还没有发现以 ubiquitin 为分子标签的蛋白质降解系统的组分。但是一些实验证据表明原核细胞中可能有类似的降解系统,①在细菌中,N-端作用存在,②Clp 蛋白酶复合体的结构与真核细胞的 26S 蛋白酶复合体的相似^[20]。Tobias 等^[21]证明一套遗传工程修饰的 β -半乳糖苷酶在细菌细胞中能通过 N-端氨基酸识别被 Clp 蛋白酶复合体降解。

参 考 文 献

- [1] Gething M J, Sambrook J. *Nature*, 1992, **355**: 33~45.
- [2] Ananthan J, Goldberg A L, Voellmy R. *Science*, 1986, **232**: 522~524.
- [3] Dörner A J, Wasley L G, Kaufman R J. *EMBO J*, 1992, **11**: 1563~1571.
- [4] Kozutsumi Y, Ségall M, Normington K *et al.* *Nature*, 1988, **332**: 462~464.
- [5] Cox J S, Shamu C E, Walter P. *Cell*, 1993, **73**: 1197~1206.
- [6] Laemmli K. *Nature*, 1970, **227**: 680.
- [7] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265.
- [8] Matsudaira P. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 10035~10038.
- [9] Kertz S, Bossi J, Petko L *et al.* *Science*, 1986, **231**: 1154~1157.
- [10] Maruo B, Yoshikawa H. *Bacillus subtilis*; Molecular biology and industrial application, Elsevier, Amsterdam-oxford-New York-Tokyo, 1989.
- [11] Goff S A, Goldberg A L. *Cell*, 1985, **41**: 587~595.
- [12] Christman M F, Morgan R W, Jacobson F S *et al.* *Cell*, 1985, **41**: 753~762.
- [13] Lee A S. *Trends Biochem Sci*, 1987, **12**: 20~23.
- [14] Shamu C E, Cox J S, Walter P. *Trends Cell Biology*, 1994, **4**: 56~60.
- [15] Landini P, Bandera M, Soffientin A *et al.* *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 769~774.

- [16] Gonen H, Smith C E, Siegel N R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 7648~7652.
- [17] Riis B, Rattan S I S, Clark B F C *et al.* *Trends Biochem Sci*, 1990, **15**: 420~424.
- [18] Ohta K, Toriyama M, Murofushi H *et al.* *J Biol Chem*, 1990, **265**: 3240~3247.
- [19] Beck B D. *Eur J Biochem*, 1979, **84**: 495~502.
- [20] Rechsteiner M, Hoffman L, Dubiel W. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 6065~6068.
- [21] Tobias J W, Shrader T E, Rocap G *et al.* *Science*, 1991, **254**: 1374~1377.

IDENTIFICATION OF A SULFHYDRYL-REDUCING AGENT- INDUCIBLE PROTEIN HIGHLY HOMOLOGOUS TO PROTEIN SYNTHESIS ELONGATION FACTOR Tu IN *BACILLUS SUBTILIS*

Wang Tai

(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Kadokura H Yada K Yamasaki M

(Department of Biotechnology, The University of Tokyo, Tokyo 113)

Abstract It was examined that the effect of β -mercaptoethanol and dithiothreitol treatments, which should affect disulfide bond formation of proteins, on cellular protein components of *Bacillus subtilis*. In LB medium, the treatments induced the synthesis of a 50kD protein (P50), which is synthesized constitutively under normal growth condition and is a major cytoplasmic protein. P50 was also induced by heat shock, but not by sporulation. In Schaeffer's sporulation medium, however, P50 was not induced by the sulfhydryl-reducing agents. This suggests that the sulfhydryl-reducing agent-inducibility of P50 might depend on specific physiological condition(s). The amino terminal sequences of two of the four main V8 protease fragments of P50 were determined. A search in databases revealed that P50 was highly homologous to protein synthesis elongation factor Tu of *B. subtilis*.

Key words *Bacillus subtilis*, Sulfhydryl-reducing agent-inducible protein, Elongation factor Tu