

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(5):621-627; 4 May 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 嗜压蛋白氨基酸残基溶剂可及性对其稳定性的影响

张光亚, 李红春, 高嘉强, 方柏山\*

(华侨大学生物工程与技术系, 厦门 361021)

**摘要:**【目的】研究嗜压微生物中蛋白质在不同结构区域的特点对了解其稳定的结构基础及设计新型嗜压酶具有重要意义。【方法】利用 43 对嗜压和非嗜压同源蛋白的晶体结构信息, 将氨基酸所处结构分成 3 种: 分子表面、中间区及内核区, 统计了不同结构状态中氨基酸的差异。【结果】统计分析结果表明, 嗜压蛋白具有明显的溶剂可及性结构特点: 其分子表面 Cys、Asp、Asn 和 Lys 含量显著高于非嗜压蛋白, 而 Pro 和 Arg 则相反; 中间区域 Ile、Met 含量显著高, 而 Trp 则相反; 内核区 Cys、Ile 含量显著高, 而 Ala 则相反。同时, 非嗜压氨基酸在嗜压蛋白分子表面及内核区含量均显著高于非嗜压蛋白。【结论】嗜压和非嗜压蛋白在分子表面差异最为明显, 将是改造嗜压酶的首选区域; 同时, 需要统计更多的样本, 对氨基酸压力不对称指数进行修订。

**关键词:** 嗜压微生物; 溶剂可及性; 系统分析; 结构分析; 适压机制

**中图分类号:** Q936      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0621-07

嗜压微生物是指能在高压条件下存活的微生物, 其范围较广, 分属于细菌域和古菌域, 通常生长在海底, 有的甚至生长在大洋底部, 其压力超过 117 MPa。如此高压的条件能导致普通微生物细胞膜腊化 (waxy) 而使营养物质无法通过, 而嗜压微生物通过进化却适应了这种极端环境<sup>[1-3]</sup>。了解嗜压微生物中生物大分子的稳定性机制不仅可以发现对其基因组和蛋白质组稳定性有贡献的因子<sup>[4-5]</sup>, 而且对蛋白质工程也具有潜在应用价值<sup>[6-7]</sup>。

然而, 多数研究仅比较了一两个直系同源序列 (orthologs), 且主要是为深海动物中的蛋白质 (如: 乳酸脱氢酶 A)<sup>[8-9]</sup>, 而对微生物中嗜压蛋白的研究很少<sup>[10]</sup>。有研究比较了 *Shewanella* 属不耐压、兼性耐压和专性耐压菌株的单链 DNA 结合蛋白 (SSB), 结果表明随着压力的增加, Gly 和 Pro 的组成减少, 这主要是由于 Pro 能破坏  $\alpha$  螺旋而 Gly 则能使  $\alpha$

螺旋变得不稳定, 这降低了 SSB 的柔性 (flexibility), 说明嗜压蛋白可能具有更好的柔性<sup>[11]</sup>。Di Giulio 首次利用蛋白质组信息, 系统比较了 141 个直系同源序列 (orthologs), 结果发现侧链较小甘氨酸 (Gly), 缬氨酸 (Val) 和天冬氨酸 (Asp) 在嗜压蛋白质中含量很高, 而一些侧链较大的氨基酸如酪氨酸 (Tyr) 和色氨酸 (Trp) 则含量很低<sup>[12]</sup>。最近, 嗜压微生物 *Photobacterium profundum* SS9 和 *Shewanella benthica* KT99 基因组中某些与压力呈正相关的基因被找出, 同时其同源序列的氨基酸替换率也被计算出来<sup>[13]</sup>。

上述研究主要针对一维的氨基酸序列, 而对其高级结构并未涉及。大量研究证实, 在蛋白质分子内核区及表面存在不同的相互作用, 这对蛋白质稳定性至关重要<sup>[14-16]</sup>。由此可见, 氨基酸在不同区域的分布会导致不同的物理化学相互作用, 因而对蛋

基金项目: 国家自然科学基金 (20806031); 福建省自然科学基金 (2009J01030)

\* 通信作者。Tel: +86-595-22691095; E-mail: fanghs@hqu.edu.cn

作者简介: 张光亚 (1975-), 男, 湖北黄冈人, 博士, 副教授, 从事酶与生物信息学研究。E-mail: zhgygh@hqu.edu.cn

收稿日期: 2009-11-26; 修回日期: 2010-01-03

白质稳定性的贡献也可能存在差异。故而,阐明蛋白质分子表面及内核区氨基酸组成的差异对了解其稳定性机制意义重大。为此,计算了蛋白分子溶剂可及表面积。所谓溶剂可及表面积(Solvent accessible surface area, SASA)是指溶剂即水分子所接触到的蛋白质表面。蛋白质表面溶剂可及性(Accessibility)是描述蛋白质疏水性的重要参数,而氨基酸残基的疏水性是影响蛋白质折叠的重要物理因素。通过SASA的计算,可分析蛋白质的疏水自由能及其结构稳定性<sup>[16]</sup>。迄今为止,未见有计算氨基酸溶剂可及性并用以探讨嗜压蛋白稳定性机制的报道。

本文挑选了43对嗜压和非嗜压同源蛋白(orthologs),从蛋白质结构数据库PDB(<http://www.pdb.org/>)获取其晶体结构信息,通过计算其SASA值,将氨基酸所处的结构状态分为3类,即:分子表面、中间区域及分子内核区。系统分析了它们在组成上的差异,报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 蛋白质晶体结构信息的获取

按照相关文献报道<sup>[10,12,17]</sup>,选取了三种嗜压微生物,分别为:*Geobacillus kaustophilus*, *Methanocaldococcus jannaschii* 和 *Pyrococcus abyssi*。*Geobacillus kaustophilus* 属细菌,从深海泥床中分离到,其较适合的生长压力为109 MPa,细胞呈短杆状;*Methanocaldococcus jannaschii* 属古菌,从2600 m深的“白烟口”附近分离到,需要在26 MPa才能生长良好,能厌氧产甲烷;*Pyrococcus abyssi* 属古菌,从3500 m深海温泉中分离到,需要在20 MPa下才能良好生长,呈不规则球形。三种微生物除嗜压外,也同时是嗜热微生物(最适生长温度都在65℃以上)。

取得3种微生物之后,蛋白晶体结构的获取按以下方法进行:(1)从PDB数据<sup>[18]</sup>分别获取来源于这三种微生物的蛋白质晶体结构,为了减少序列冗余,剔除了同一性(Identity)大于30%的序列,得到的蛋白结构数量分别为:33、136和30个;(2)利用上一步获得具高级结构的蛋白质序列,分别利用BlastP程序搜索PDB数据库,E值为其默认值 $1.0 \times 10^{-10}$ 。从返回的结果中寻找来源于嗜热非嗜压微生物的同源蛋白;(3)若返回多条符合要求的结果,则选取和目标序列最为匹配且具有较高晶体结构分辨率的蛋白;若未返回结果,则原始嗜压蛋白结构也舍弃;(4)将所得序列再次使用BlastP进行两

两比对,选取同一性大于20%且相似性(similarity)大于30%的同源序列;这样经过199次BlastP后,得到了43对嗜压和非嗜压同源蛋白,这些蛋白在PDB数据库的ID号及来源微生物列于表1。

### 1.2 溶剂可及性计算及氨基酸所处区域的确定

溶剂可及性的计算借助于DSSP<sup>[19]</sup>以及PaleAle@UCD<sup>[20]</sup>。氨基酸所在区域的确定参照文献21进行。具体方法如下:当某个氨基酸溶剂可及性面积与其在PDB数据库相应氨基酸的最大溶剂可及性面积的比值趋近于0时( $< 4\%$ ),该氨基酸被定义为内核区(internal)氨基酸;当比值较大( $> 25\%$ )时,该氨基酸被定义为表面(external)氨基酸,剩余的氨基酸在被定义为中间区域(intermediate)氨基酸。

为了进一步了解其差异,参考相关文献<sup>[12,22]</sup>把氨基酸分成16种类型,包括:带电的(DEKHR)、脂肪族(ILV)、芳香族(FHWY)、极性的(DERKQN)、中性的(AGHPSTY)、疏水性的(CVLIMFW)、带正电(HKR)、带负电(DE)、微小的(ACDGST)、小的(EHILKMNPQV)、大的(FRWY)、含硫的(CM)、酰胺(NQ)、嗜压的(RSVDG)、中度嗜压(LHFMEACW)和非嗜压(NKTIPQY)。在此,为了减少篇幅,氨基酸采用了单字母缩写。

### 1.3 统计分析

经计算,样本中包含的氨基酸总数量为19625,足够用于统计学分析。为了比较嗜压和非嗜压蛋白在不同结构区域氨基酸的差异程度,进行了 $t$ -检验。本研究中,自由度 $d.f. (= N_{Pi} + N_{Np} - 2)$ 为84。其中, $N_{Pi}$ 和 $N_{Np}$ 分别表示嗜压蛋白和非嗜压蛋白的数量,均为43。 $t$ 检验中的 $p$ 值为结果可信程度的一个递减指标。 $0.05 \geq p > 0.01$ 被认为是具有统计学意义,即差异显著, $0.01 \geq p > 0.001$ 被认为具有高度统计学意义,即差异非常显著,而 $p \leq 0.001$ 被认为差异极显著。

## 2 结果和分析

### 2.1 嗜压和非嗜压蛋白在分子表面氨基酸组成的差异

蛋白质结构经溶剂可及性计算后分别统计位于不同部位氨基酸组成,结果如表2所示。可见,在蛋白质分子表面,嗜压蛋白中半胱氨酸(Cys)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)和赖氨酸(Lys)含量显著高于非嗜压蛋白,而Lys的差异则更为显著,它在嗜压和非嗜压蛋白分子表面的平均含量分别为

16.82%和13.09%;Lys和Asp在正常生理pH条件下会带电荷,容易形成静电引力,这对维持嗜压蛋白在高压条件下的稳定至关重要。与此同时,脯氨酸(Pro)和精氨酸(Arg)则相反,它们在非嗜压蛋白中含量显著高于嗜压蛋白,Arg的差异更为显著,它在两种蛋白分子表面的平均含量分别为7.33%和10.04%。而对不同类型氨基酸进行分类后统计的结果表明,嗜压蛋白分子表面非嗜压氨基酸(Asn、Lys、Thr、Ile、Pro、Gln和Try)含量显著高于非嗜压蛋白,其平均含量分别为39.25%和35.03%;而中性氨基酸(Ala、Gly、His、Pro、Ser、Thr和Tyr)以及大的氨基酸(Phe、Arg、Trp和Tyr)含量显著低于非嗜压蛋白,在两类蛋白中其含量相差分别为2.97%和2.06%。

由表2还可以看出,在两种蛋白分子表面,20个氨基酸中有6个含量差异达到显著水平,所占比例为30%;而按照理化性质进行分类的16类氨基酸中,有3类氨基酸存在显著差异,所占比例为18.8%。此外,20个氨基酸中也有一些氨基酸,如:

苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)和异亮氨酸(Ile)在嗜压和非嗜压蛋白分子表面差异微小;而按照理化性质进行分类的16类氨基酸中,有3类氨基酸,分别为带电、带正电荷及带负电的氨基酸在二者之间几乎没有差别。这是一个非常令人费解的结果,一般认为,分布于分子表面的一些带电的氨基酸(正电或者负电)比较容易形成静电引力或者是盐桥,这对维系蛋白质高级结构的稳定性至关重要<sup>[23]</sup>。经核查后发现,导致这种结果的原因是由于几个带电的氨基酸Asp、Glu、Lys、His和Arg在两类蛋白中的分布不均造成的,例如:Asp在嗜压蛋白含量较高,而同为带负电的Glu则相反;Lys在嗜压蛋白中含量很高,而同为带正电的His和Arg则相反;然而,Asp的侧链小于Glu,而Lys也小于Arg和His,在高压条件下,侧链较小的氨基酸残基更容易占据蛋白分子外部空间,从而更容易让蛋白质折叠成相应结构<sup>[24]</sup>,而这也能从嗜压蛋白中大的氨基酸含量显著降低得到证实。

表1 43对同源蛋白及其来源

Table 1 43 pairs of piezophilic and non-piezophilic proteins

OS	Piezo	N-piezo	Organism	ID/%	OS	Piezo	N-piezo	Organism	ID/%		
<i>Geobacillus kaustophilus</i>					<i>Pyrococcus abyssi</i>						
2EBB	:A	1USM	:A	<i>Thermus Thermophilus</i>	29	1KK1	:A	2YWE	:A	<i>Aquifex aeolicus</i>	29
2EEY	:A	2IHH	:A	<i>thermus thermophilus</i> HB8	52	1MKH	:A	2E8G	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	36
2EG0	:A	1V3W	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	44	1XTY	:A	1WN2	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	48
2EGU	:A	2ZSJ	:A	<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	27	1YRB	:A	1J8M	:F	<i>Acidianus ambivalens</i>	26
2EMQ	:B	1PVM	:B	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	26	2AUS	:A	2G5C	:A	<i>Aquifex aeolicus</i>	23
2P20	:D	3FS8	:B	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	53	2BFW	:A	2ZBW	:A	<i>Thermus thermophilus</i>	26
2PCS	:A	2NS9	:A	<i>Aeropyrum pernix</i> K1	23	2JJQ	:A	1WXX	:A	<i>Thermus thermophilus</i>	28
2QYH	:D	1L6R	:A	<i>Thermoplasma acidophilum</i> 0175	21	2V7F	:A	2QAI	:A	<i>Pyrococcus furiosus</i>	50
2YR1	:A	1MIH	:A	<i>Aquifex aeolicus</i>	38	3BK7	:A	1OXX	:K	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	31
2YWI	:A	2CVB	:A	<i>thermus thermophilus</i> HB8	50	1S3M	:A	2FE1	:A	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	83
2Z01	:A	2Z1E	:A	<i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1	23	2B98	:A	1NQU	:A	<i>Aquifex aeolicus</i>	34
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>					<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>						
1A79	:A	2CV8	:A	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	41	2EIF	:A	1UEB	:A	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	31
1DUS	:A	1L31	:A	<i>Methanothermobacter thermotrophicus</i>	33	2EJ9	:A	2DXU	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	35
1F9A	:A	1EJ2	:A	<i>M. thermotrophicus</i>	57	2H6R	:A	1VC4	:A	<i>Thermus thermophilus</i>	22
1G8S	:A	1G8A	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	55	2P5D	:A	2HD9	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	59
1J1U	:A	1H3F	:A	<i>Thermus thermophilus</i>	27	2PKP	:A	1V7L	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	44
1J97	:A	1WR8	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	43	2R7K	:A	2R85	:A	<i>Pyrococcus furiosus</i>	49
1JEO	:A	2D0I	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	31	2VAP	:A	2R75		<i>Aquifex aeolicus</i>	45
1MJH	:A	2Z08	:A	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	31	3CPQ	:A	2FC3	:A	<i>Aeropyrum pernix</i> L7Ae	27
1NH9	:A	2BKY	:A	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	59	3D71	:A	2CWQ	:A	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	30
1PKH	:A	1J08	:A	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	30	3DM3	:A	3CBN	:A	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	30
OS: Organism, Piezo: piezophilic, N - piezo: none piezophilic, ID, identity					3F9T: A 2EH6: A <i>Aquifex aeolicus</i> VF5 21						

## 2.2 嗜压和非嗜压蛋白在分子中间氨基酸组成的差异

如表 2 所示,在嗜压和非嗜压蛋白分子中间区域的氨基酸中,异亮氨酸(Ile)、甲硫氨酸(Met)和色氨酸(Trp)的组成差异显著。其中,前两个在嗜压蛋白分子中间区域含量较高,其含量相差分别为 2.6% 和 1.17%; Trp 在嗜压和非嗜压蛋白中间区域的平均含量分别为 1.08% 和 1.85%; Ile 和 Met 分子侧链较小,容易使蛋白折叠,而 Ile 分子中具有分支的异丙基,能增加蛋白分子的柔性<sup>[14]</sup>,故而在嗜

表 2 嗜压和非嗜压蛋白氨基酸及氨基酸类型组成的差异

Table 2 Difference of amino acids and amino acid groups in piezophilic and non-piezophilic proteins

aa	Residue structure state		
	Internal	Intermediate	External
Ala (A)	↓ 0.0055	↓ 0.6898	↓ 0.3027
Cys (C)	↑ 0.0085	↑ 0.2108	↑ 0.0353
Asp (D)	↑ 0.6918	↑ 0.6993	↑ 0.0174
Glu (E)	↓ 0.8484	↓ 0.2676	↓ 0.1071
Phe (F)	↓ 0.8452	↓ 0.2545	↑ 0.9985
Gly (G)	↑ 0.3269	↓ 0.3166	↓ 0.5765
His (H)	↑ 0.2358	↑ 0.7983	↓ 0.0692
Ile (I)	↑ 0.0144	↑ 0.0283	↑ 0.6400
Lys (K)	↑ 0.3454	↑ 0.8081	↑ 0.0033
Leu (L)	↑ 0.8818	↓ 0.1767	↓ 0.4769
Met (M)	↑ 0.4866	↑ 0.0262	↑ 0.5050
Asn (N)	↑ 0.6972	↑ 0.4538	↑ 0.0343
Pro (P)	↓ 0.8992	↑ 0.9087	↓ 0.0110
Gln (Q)	↑ 0.5227	↑ 0.3653	↓ 0.5798
Arg (R)	↓ 0.3185	↓ 0.7559	↓ 0.0013
Ser (S)	↓ 0.2893	↓ 0.9699	↓ 0.8550
Thr (T)	↑ 0.9070	↓ 0.2030	↑ 0.6126
Val (V)	↓ 0.1312	↓ 0.8471	↑ 0.5565
Trp (W)	↓ 0.4891	↓ 0.0349	↑ 0.2886
Tyr (Y)	↑ 0.3106	↑ 0.5356	↑ 0.2247
Charged	↑ 0.7068	↓ 0.8464	↑ 0.9840
Aliphatic	↑ 0.3445	↑ 0.5415	↑ 0.8571
Aromatic	↑ 0.6866	↓ 0.5337	↓ 0.6737
Polar	↑ 0.7617	↑ 0.7991	↑ 0.1666
Neutral	↓ 0.0689	↓ 0.3471	↓ 0.0393
Hydrophobic	↑ 0.1074	↑ 0.5220	↑ 0.3661
Positive charged	↑ 0.7189	↑ 0.9312	↑ 0.9672
Negative charged	↑ 0.8345	↓ 0.6418	↓ 0.9911
Tiny	↓ 0.1267	↓ 0.3310	↑ 0.4732
Small	↑ 0.1126	↑ 0.0722	↑ 0.4445
Large	↓ 0.9360	↓ 0.4112	↓ 0.0382
Sulfur	↑ 0.0393	↑ 0.0091	↑ 0.1592
Amide	↑ 0.5144	↑ 0.2191	↑ 0.1111
Barophilic	↓ 0.1376	↓ 0.4373	↓ 0.2781
M barophilic	↓ 0.1318	↓ 0.2620	↓ 0.0529
N barophilic	↑ 0.0025	↑ 0.0656	↑ 0.0099

*p* values were obtained from *t*-test, with the significant results marked with bold font; the arrows indicate the direction of change, ↑ indicate more in piezophilic proteins.

压蛋白中含量更高;另一方面,Trp 含有芳香结构,其分子中的  $\pi$  电子能够与带正电的离子如钠离子和钾离子相互作用,被称为“阳离子- $\pi$ ”相互作用(cation- $\pi$  interaction),这对维系蛋白分子结构稳定性非常重要<sup>[25]</sup>。但是,在蛋白分子中间区域,金属离子难以进入和 Trp 发生相互作用,因此,这种“阳离子-派”相互作用在蛋白分子中间区域发挥的作用有限;相反,由于其侧链的芳香结构体积较大,增加了空间位阻,不利于与其它残基发生相互作用。因此,在嗜压蛋白分子中间区域含量较低。而对不同类型氨基酸进行分类后统计的结果表明,嗜压蛋白分子中间区域含硫的氨基酸(Cys 和 Met)含量也显著高于非嗜压蛋白,其平均含量分别为 4.14% 和 2.51%; Cys 含有巯基,容易和另一个 Cys 形成二硫键,Cys 的侧链也比其它大多数氨基酸短,其空间位阻较小,为非极性氨基酸,可增加分子中疏水相互作用,对维系蛋白分子高级结构具有积极作用<sup>[26]</sup>。

由表 2 还可看出,在两种蛋白分子中间区域,20 个氨基酸中有 3 个含量差异达到显著水平,所占比例仅为 15%;而按照理化性质进行分类的 16 类氨基酸中,仅 1 类氨基酸存在显著差异,所占比例为 6.25%,相比于分子表面,嗜压和非嗜压蛋白在中间区域的差异较小。此外,20 个氨基酸中也有一些氨基酸,如:丝氨酸(Ser)、脯氨酸(Pro)和缬氨酸(Val)在嗜压和非嗜压蛋白分子中间区域差异微小;而按照理化性质进行分类的 16 类氨基酸中,带正电荷、带电以及极性氨基酸在二者之间几乎没有差别。

## 2.3 嗜压和非嗜压蛋白在分子内核氨基酸组成的差异

表 2 也列出了两种蛋白在分子内核氨基酸组成的差异。由表可知,丙氨酸(Ala)、Cys、Ile 的组成在两种蛋白中差异显著,其中 Ala 在嗜压蛋白内核含量较低,它在嗜压和非嗜压蛋白中平均含量分别为 11.71% 和 15.91%;而 Cys 和 Ile 含量则较高,它们在两类蛋白中含量的差异分别为 0.97% 和 3.81%。由于 Ile 的侧链可以在空间采取 4 种不同的旋转构象,使它比较容易在蛋白内核组装(core packing)过程中填充不同的空隙(void)<sup>[27]</sup>,因此,在嗜压蛋白内核区含量更高。Ala 属于脂肪族氨基酸,比较容易形成疏水相互作用,同时其分子量也较小,这都对蛋白质的稳定性有重要贡献<sup>[28]</sup>。然而,它也能中断其它氨基酸形成的离子对,从而降低分子的稳定性<sup>[29]</sup>,这可能就是它在嗜压蛋白内核区含量低的原因。

因。对不同类型氨基酸进行分类后统计的结果表明,嗜压蛋白分子内核区含硫的氨基酸(Cys 和 Met)含量显著高,其平均含量分别为 5.13% 和 3.82%;此外,非嗜压氨基酸(NKTIPQY)的含量也显著高,平均含量分别为 29.4% 和 24.55%。

由表 2 还可知,在两种蛋白分子内核区,20 个氨基酸中有 3 个含量差异达到显著水平,所占比例仅为 15%;而按照理化性质进行分类的 16 类氨基酸中,仅 2 类氨基酸存在显著差异,所占比例为 12.5%,相比于分子表面,两类蛋白在内核区差异也较小,但略高于中间区域。此外,20 个氨基酸中也有一些氨基酸,如:苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、亮氨酸(Leu)、谷氨酸(Glu)和苯丙氨酸(Phe)在嗜压和非嗜压蛋白分子内核区域差异微小;而按照理化性质进行分类的 16 类氨基酸中,大的氨基酸、带负电的氨基酸和极性氨基酸在二者之间几乎没有差别。

从上述结果可以看出,嗜压和非嗜压蛋白在蛋白分子表面的氨基酸组成差异最大,其次为其内核区域,而在中间区域的差异最小。另一个值得注意的问题是,在嗜压蛋白分子表面及内核区域非嗜压氨基酸含量显著升高,其  $p$  值均小于 0.01。经核查后发现,多数非嗜压氨基酸(除酪氨酸 Tyr 外)分子量均较小,在高压条件下,小的氨基酸残基更容易占据蛋白分子内外空间,更容易让蛋白质折叠成相应结构。

### 3 讨论

本研究的主要目的是为了探寻嗜压蛋白在高压条件下稳定性结构基础,结果表明在嗜压蛋白内柔性和刚性互相作用,这主要和氨基酸分子所处的结构状态有关,其中增加分子的柔性可能更为重要。本文选取了 43 对具有晶体结构的嗜压和非嗜压蛋白,通过计算氨基酸所处的结构状态以其找出二者在统计学上具有显著差异的氨基酸,结果证实尽管在一级结构(序列)上它们具有较高的同源性,但在不同结构状态中氨基酸残基差异显著。

在前期研究中发现嗜压和非嗜压蛋白在  $\beta$  折叠和无规则卷曲中氨基酸组成差异明显。 $\beta$  折叠中,嗜压蛋白含更多的缬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸,更少的精氨酸,赖氨酸,天冬氨酸;无规则卷曲中,嗜压蛋白含更多的缬氨酸和异亮氨酸,更少的甘氨酸和脯氨酸<sup>[30]</sup>。在该研究中,二级结构状态为理论预测的结果,虽然具有相对较高的精度,但仍有差错。本

文所利用的高级结构信息均来自于实验结果,且蛋白晶体具有较高的分辨率。在考虑氨基酸及氨基酸类型组成差异的时候,充分考虑了其结构信息,这是与其它同类研究的明显差异之处。本研究表明,嗜压和非嗜压蛋白在其分子表面差异最大,嗜压蛋白表面一些带电荷的氨基酸明显较多(Asp 和 Lys),而且趋向于使用侧链较小的带电氨基酸,既可增加分子表面的电荷相互作用,又可使分子表面具有更多的柔性,从而增加其在高压条件下的稳定性,另一方面,嗜压蛋白分子表面极性氨基酸含量也显著升高,分子表面的极性氨基酸可以和嗜压蛋白所处环境中的水分子相互作用,形成氢键<sup>[31]</sup>,增加其高压条件下的稳定性;在其分子内核及中间区域,两类蛋白差异较小,其中 Ile 含量均较高,这也是和它侧链空间结构有关;另一个明显标志是二者在内核及中间区域,含硫的氨基酸均明显较多,其中 Cys 能和另一个 Cys 形成共价二硫键,这能增强分子在内部区域结构的刚性,进而维持在高压条件下的稳定性。上述基于结构的氨基酸及氨基酸种类的差异可认为是嗜压蛋白适应高压环境的重要特征。因此,本文结果有助于了解嗜压蛋白的结构基础,对设计或改造嗜压蛋白具有重要参考价值。

最后,需要指出的是,之前研究<sup>[30]</sup>及本文结果均表明,嗜压蛋白中嗜压氨基酸并不一定含量更高,相反非嗜压氨基酸则明显上升。因此,如有可能,需要统计更多的样本,对 Massimo Di Giulio 提出的氨基酸压力不对称指数(Pressure asymmetry index, PAI)<sup>[12,24]</sup>进行修订。

### 参考文献

- [1] 刘敏,李越中. 深海细菌及其适压机制. 微生物学杂志(*Journal of Microbiology*), 2003, 23(4): 32-34, 44.
- [2] Sharma A, Scott JH, Cody GD, et al. Microbial activity at gigapascal pressures. *Science*, 2002, 295, 1514-1516.
- [3] Fumiyoshi A. Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71, 2347-2357.
- [4] Bartlett DH. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica Biophysica Acta*, 2002, 1595, 367-381.
- [5] Vezzi A, Campanaro S, D Angelo M, et al. Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science*, 2005, 307, 1459-1461.

- [ 6 ] Saito R. and Nakayama A. Differences in malate dehydrogenases from the obligately piezophilic deep-sea bacterium *Moritella* sp. strain 2D2 and the psychrophilic bacterium *Moritella* sp. strain 5710. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233, 165-172.
- [ 7 ] Jaenicke R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 202, 715-728.
- [ 8 ] Somero GN. Adaptations to high hydrostatic pressure. *Annual Review of Physiology*, 1992, 54, 557-577.
- [ 9 ] Yoshikazu N, Tetsuya M, Fumiyo A. Pressure-adaptive differences in lactate dehydrogenases of three hagfishes: *Eptatretus burgeri*, *Paramyxine atami* and *Eptatretus okinoseanus*. *Extremophiles*, 2008, 12, 477-480.
- [ 10 ] Francesca S, Stefano C, Federico ML, et al. Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126, 11-25.
- [ 11 ] Chilukuri LN, Bartlett DH. Isolation and characterization of the gene encoding single-stranded-DNA-binding protein (SSB) from four marine *Shewanella* strains that differ in their temperature and pressure optima for growth. *Microbiology*, 1997, 143, 1163-1174.
- [ 12 ] Di Giulio M. A comparison of proteins from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus abyssi*: barophily in the physicochemical properties of amino acids and in the genetic code. *Gene*, 2005, 346, 1-6.
- [ 13 ] Stefano C, Laura T and Giorgio V. Protein evolution in deep sea bacteria: an analysis of amino acids substitution rates. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8; 313 doi: 10.1186/1471-2148-8-313.
- [ 14 ] Pack SP, Yoo YJ. Protein thermo-stability: structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins. *Journal of Biotechnology*, 2004, 111 (3), 269-277.
- [ 15 ] Samad J, Ebrahim BA, Parviz A, et al. Protein psychrophilicity: Role of residual structural properties in adaptation of proteins to low temperatures. *Journal of theoretical Biology*, 2007, 248, 721-726.
- [ 16 ] 孙桂鸿, 郭明雄, 龚睿, 等. 人朊病毒蛋白及其突变体的溶剂可及性和模拟分析. *中国病毒学(Virologica sinica)*, 2004, 19(2), 158-162.
- [ 17 ] Ma B, Song Q, Zhang H. C<sub>v</sub>P-bias as an index to predict the life style of last common ancestor. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2006, 23, 555-558.
- [ 18 ] Berman HM. The Protein Data Bank: a historical perspective. *Acta Crystallographica*, 2008, A64, 88-95.
- [ 19 ] Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 1983, 22 (12), 2577-2637.
- [ 20 ] Gianluca P, Alberto JMM, Catherine M, et al. Accurate prediction of protein secondary structure and solvent accessibility by consensus combiners of sequence and structure information. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8; 201 doi: 10.1186/1471-2105-8-201.
- [ 21 ] Glyakinal AV, Garbuzynskiy SO, Lobanov MY, et al. Different packing of external residues can explain differences in the thermostability of proteins from thermophilic and mesophilic organisms. *Bioinformatics*, 2007, 23(17), 2231-2238.
- [ 22 ] Yu X, Cao J, Cai Y, et al. Predicting rRNA-, RNA-, and DNA-binding proteins from primary structure with support vector machines. *Journal of Theoretical Biology*, 2006, 240, 175-184.
- [ 23 ] Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*, 2000, 13, 179-191.
- [ 24 ] Di Giulio M. The ocean abysses witnessed the origin of the genetic code. *Gene*, 2005, 346, 7-12.
- [ 25 ] Ma JC, Dougherty DA. The cation- $\pi$  interaction. *Chemical Reviews*, 1997, 97, 1303-1324.
- [ 26 ] Shirai T, Ishida H, Noda J, et al. Crystal structure of alkaline cellulase K: insight into the alkaline adaptation of an industrial enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 310, 1079 - 1087.
- [ 27 ] Britton KL, Baker PJ, Borges KMM, et al. Insights into thermal stability from a comparison of the glutamate dehydrogenases from *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 229, 688 -695.
- [ 28 ] Akasako A, Haruki M, Oobatake M, et al. Conformational stabilities of *Escherichia coli* RNase HI variants with a series of amino acid substitution at a cavity within the hydrophobic core. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 18686-18693.
- [ 29 ] Yokota K, Satou K, Ohki S. Comparative analysis of protein thermostability: differences in amino acid content and substitution at the surfaces and in the core regions of thermophilic and mesophilic proteins. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2006, 7 (3), 255-262.
- [ 30 ] 张光亚, 李红春, 高嘉强, 等. 氨基酸和二肽组成对嗜压微生物蛋白质稳定性的影响. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(2): 198-203.
- [ 31 ] Mattos C. Protein-water interactions in a dynamic world. *Trends in Biochemical Science*, 2002, 27; 203-208.

# Protein piezophilicity: Solvent accessibility-based difference of amino acid in adaptation of proteins to high hydrostatic pressure

Guangya Zhang, Hongchun Li, Jiaqiang Gao, Baishan Fang \*

(Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the structural distribution responsible for protein piezophilicity is important for understanding the stability of piezophilic protein and would help to develop a practical strategy for designing piezophilic proteins. [Methods] We introduced a systematic comparative analysis of 43 pairs of piezophilic and non-piezophilic proteins. Three kinds of residue structural states such as external, intermediate and internal were considered for analyzing the structural patterns of single amino acids and amino acids in different groups. [Results] The statistical tests revealed that higher frequency in external state of Cys, Asp, Asn and Lys at the expense of Pro and Arg, higher frequency in intermediate state of Ile and Met at the expense of Trp, higher frequency in internal state of Cys and Ile at the expense of Ala, higher frequency in external and internal state of non-barophilic amino acids groups, lower frequency in external state of neutral and large amino acids groups could be critical factors related with protein piezophilicity. [Conclusion] The external state was the domain that had the most differences between piezophilic and non-piezophilic proteins, and it should be a hot spot for designing and engineering new piezophilic proteins. At the same time, the pressure asymmetry index should be revised based on more datasets.

**Keywords:** Piezophilic microbes; structure analysis; systematical analysis; solvent accessibility; piezophilic adaptation

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (20806031) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (2009J01030)

\* Corresponding author. Tel: +86-595-22691095; E-mail: fangbs@hqu.edu.cn

Received: 26 November 2009/Revised 3 January 2010

## 1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表  
2010 年 5 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008	月刊	48	1 - 12
2009	月刊	49	1 - 12
2010	月刊	50	5