

# 抗冻蛋白结构与抗冻机制

谢秀杰 贾宗超<sup>1</sup> 魏 群\*

(北京师范大学生命科学学院, 生物化学与分子生物学系, 北京 100875;

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Queen's University, Kingston, Ontario K7L 3N6, Canada)

**摘要** 抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)是20世纪60年代从极地鱼血淋巴中分离的一种大分子抗冻剂, 迄今为止科学工作者已从陆地昆虫、植物、细菌和真菌等各类生物中分离到多种抗冻蛋白, 并测得了它们的基因序列及一些晶体结构, 近些年的工作主要集中在该类蛋白质抗冻机制的研究上。抗冻蛋白具有广泛的应用前景, 它不但可以应用于食物的冷鲜贮存及移植器官的低温保存, 还可通过转基因提高经济作物的抗冻能力。

**关键词** 抗冻蛋白; 晶体结构; 抗冻机制; 转基因

抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)是20世纪60年代首先从极地鱼血淋巴中分离的一种蛋白质, 它可以抑制冰晶的生长并以非依数形式降低溶液的冰点, 不影响熔点, 因而导致溶液的冰点与熔点出现一差值, 该差值称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)。自 AFPs 发现以来引起很多实验室的研究兴趣, 尤其是结构与抗冻机制的研究更是关注的热点。

## 1 抗冻蛋白的种类与结构

从鱼类、昆虫、植物、细菌及真菌中提取的抗冻蛋白, 在基因序列上几乎无同源性并且结构各异, 现分别介绍如下。

### 1.1 鱼类中的抗冻蛋白

鱼类中至少有6大类型, 分别为抗冻糖蛋白(antifreeze glycoprotein, AFGPs)、I型抗冻蛋白(AFP-I)、II型抗冻蛋白(AFP-II)、III型抗冻蛋白(AFP-III)和IV型抗冻蛋白(AFP-IV)以及Hyperactive-AFP。

AFGPs 主要由3肽糖单位[-Ala-Ala-Thr(双糖基)-]以不同重复度串联而成。AFGPs 的分子量一般在2.5~33.7 kDa之间, 糖基是抗冻活性形成的主要基团, 且活性与分子量有关, 分子量大者, 一般活性也高。推测它形成一种与多聚脯氨酸II相似的左手螺旋结构, 其双糖疏水基团面向碳骨架, 亲水基团面向溶液<sup>[2]</sup>。

AFP-I是由3个[-Thr-X(2)-Asx-X(7)-]串联而成的 $\alpha$ 螺旋单体结构<sup>[3]</sup>, 富含丙氨酸(60%以上), 且部分螺旋具有双嗜性。冬鲈(winter flounder, wf)产

生的AFP-I包括两种亚型, 即: 肝脏型(liver-type AFPs, wflAFPs)和皮肤型(skin-type AFPs, wfsAFPs), wfsAFPs的活性是wflAFPs的二分之一, 它们是由不同的基因家族编码且表达上具有组织特异性<sup>[4]</sup>。

AFP-II是从鲱鱼体内分离得到的一类与C型凝集素同源的抗冻蛋白, 分子量约15 kDa, 有2个 $\alpha$ 螺旋, 2个 $\beta$ 折叠和大量无规结构, 后来又从生活在低纬度淡水中日本胡瓜鱼(*Hypomesus nipponensis*)体内分离到此类II型AFP, 它N端的氨基酸序列与鲱鱼相比有75%的同源性且核苷酸顺序85%相同, 分子量为16.7 kDa, 结构上含有至少一个 $\text{Ca}^{2+}$ 结合结构域, 但 $\text{Ca}^{2+}$ 去除并未使它的活性完全丧失<sup>[4]</sup>。

AFP-III主要存在于绵鲷亚科鱼类是7 kDa球状蛋白, 其二级结构主要由9个 $\beta$ 折叠组成, 其中8个组成一种 $\beta$ 折叠三明治夹心结构, 另一个 $\beta$ 折叠则游离在其外, 这种三明治的“夹心”就是两个反向平行的3个串联 $\beta$ 折叠, 其外则是两个反向平行的 $\beta$ 折叠。三级结构由3个 $\beta$ 折叠反向排列成川字形, 两个川字形结构互相垂直排列成三级结构的主体部分, 其余 $\beta$ 折叠则处于连接位置上<sup>[2]</sup>。

AFP-IV是从多棘床杜父鱼(*Myoxocephalus octodecimspinosus*)中纯化出一种AFP, 约108个氨基酸残基, Glu的含量高达17%。该蛋白质和膜载脂蛋白具有22%的同源性。圆二色谱分析表明它们

收稿日期: 2004-06-08 接受日期: 2004-08-31

海外香港青年学者合作基金资助项目(No.30228006)

\* 通讯作者。Tel: 010-58807365, Fax: 010-58807365, E-mail:

Weiq@bnu.edu.cn

结构类似, 有较高的 $\alpha$ 螺旋结构, 其中4个 $\alpha$ 螺旋反向平行排列, 疏水基团向内, 亲水基团向外<sup>[2]</sup>。

Hyperactive -AFP是新近发现的一种抗冻蛋白, 该蛋白质也是从冬鲈中分离出来的, 它的分子量大于来源于同一生物中的AFP-I且活性远远高于后者。该蛋白质是真正赋予冬鲈在零下1.9摄氏度的海水中生活的主要原因。而AFP-I只能使冬鲈的低温生活极限达到零下1.5摄氏度<sup>[5]</sup>。

## 1.2 昆虫中的抗冻蛋白

昆虫中分离的抗冻蛋白主要来源于以下几种昆虫: 甲虫(*Tenebrio molitor*)、云杉蚜虫(*Choristoneura fumiferana*)、美洲脊胸长椿(*Oncopeltus fasciatus*)和毛虫(*Dendroides canadensis*)等。

甲虫AFP(*Tenebrio molitor*, TmAFP)为8.4 kDa的右手 $\beta$ 螺旋, 即螺旋本身是 $\beta$ 片层结构, 每一圈由12个氨基酸(CTXSXXCXXAXT)组成, 共7个螺周。TmAFP富含Thr和Cys, 8个二硫键分布在螺旋内侧, 因而赋予该分子一定的刚性结构。TmAFP的热滞活性比鱼的高出很多, 二聚体的活性更高, 在毫摩尔浓度时活性可达鱼的10~100倍<sup>[6]</sup>。

云杉蚜虫AFP(*Choristoneura fumiferana*, CfAFP)包括许多同型蛋白质, 但大多分子量集中在9.0 kDa左右, 呈左手 $\beta$ 螺旋, 每螺圈呈三角形包括15个氨基酸残基, Thr-X-Thr模体重复出现在每一螺圈当中, 三角形的边是 $\beta$ 折叠片层。这些三角形的螺圈堆叠在一起使之形成一立体的三棱镜样结构。三棱镜的每一侧面上规则地排列着Thr, 这种特殊的结构赋予它极高的热滞活性, 为鱼的热滞活性的3~4倍<sup>[6]</sup>。在CfAFP的同型中有一种分子量12 kDa的蛋白质CfAFP-501具有极高的热滞活性, 它比CfAFP多30~31个氨基酸残基, 即多出两个螺周。多出的这两圈上同样具有Thr-X-Thr模体, Thr的排列具有同样的规则。它的热滞活性比鱼的高出10~100倍<sup>[7]</sup>。

毛虫*Dendroides canadensis*的AFP(DcAFPs)包括很多类型, 其中研究较清楚的DAFP-1和DAFP-2, 分子量大约是8.7 kDa, 分别含83和84个氨基酸残基。它们组成7个含12或13氨基酸残基的重复单元: -C-T-X3-S-X5-X6-C-X8-X9-A-X11-T-X13-。每1个重复单元中第1个与第7个半胱氨酸都形成二硫键, 共8对二硫键, 其中7对二硫键位于重复单元内, 一对位于重复单元之间, 这8对二硫键限制了它的二级结构。在25度时46% $\beta$ 折叠, 39%转角, 2%螺旋, 13%无规则结构。当遇到

冰时 $\beta$ 折叠和转角增多而转角和无规则结构减少<sup>[8]</sup>。

## 1.3 细菌中的抗冻蛋白

来源于南极洲的细菌中有6种可以产生抗冻蛋白, 其中热滞活性最高的一种AFP是由82号菌株(*Moraxella sp.*)产生的一类脂蛋白(AFLP), N端氨基酸顺序与该菌的外膜蛋白有很高的相似性, 这是首次报道的第一类抗冻脂蛋白<sup>[9]</sup>。

## 1.4 植物中的抗冻蛋白

苦甜茄属植物*Solanum dulcamara*中分离的热滞蛋白(sthp-64)含有两个分别由56和57个氨基酸残基组成的锌指结构域, 两个锌指结构域之间为酸性结构域, 第一个锌指结构域上游为富含谷氨酸的区域, C端有10个保守的13个氨基酸的重复。该重复与动物抗冻蛋白具有共性<sup>[10]</sup>。

长青黑麦草(*Lolium perenne*)中分离的AFP由118个氨基酸残基组成, 具有特殊的 $\beta$ 折叠二级结构, 推测它的空间结构为 $\beta$ 片层卷曲成8圈, 每一环包含14~15个氨基酸残基。缬氨酸分布在内侧形成一疏水核心而天冬氨酸以阶梯状排列在 $\beta$ 卷曲的两端。它具有较高的抑制冰晶再形成活性但却具有较低的热滞活性<sup>[11]</sup>。

通过冷诱导(胁迫)方法还从许多种植物中分离出抗冻蛋白(如胡萝卜、烟草等)。

## 2 抗冻蛋白的抗冻机制

从鱼、昆虫、植物以及细菌中分离的抗冻蛋白虽然结构和组成上具有很大的差别, 但它们却具有相同的功能, 都可以不同程度的降低溶液的冰点。对于它们的抗冻机制的解释还存在分歧, 各有其实验证据。

在抗冻机制不十分清楚的情况下, 澳大利亚悉尼大学的研究人员利用重组方法构建了AFP-I的类似物, 即在它的N端加上两个氨基酸残基, 再通过圆二色谱及核磁共振方法测得了它的结构仍为 $\alpha$ 螺旋, 但与野生型相比却具有很低的热滞活性, 说明N端是活性的关键部位, 并进一步证实了他们原来提出的假设:  $\alpha$ 螺旋的疏水面朝向冰-水交界处的冰晶面, 亲水面朝向水并与之形成氢键, 从而抑制冰晶的增长<sup>[12]</sup>。这与AFP-III的研究结果一致, AFP-III以16位的Ala为中心形成冰晶结合平面, 通过氨基酸替换实验证明疏水相互作用在抑制冰晶生长过程中起着重要的作用<sup>[13]</sup>。

加拿大Queen's大学的研究人员利用X射线晶

体衍射等方法获得了 TmAFP 的晶体结构后, 继续抗冻机制研究, 给出的机制模型为: 在 TmAFP 三棱镜样结构的一个侧面上 Thr-Cys-Thr 模体重复出现在每一个  $\beta$  片层(三角形的边)中使得 Thr 在二维空间上排成两行并且这两行 Thr 上羟基氧之间的距离可以极好的与冰的晶格匹配, 它们的紧密结合排除了水与冰晶的接触, 从而抑制冰晶的增长<sup>[4]</sup>。其后, 又得到了 CfAFP 的晶体结构, 由于 CfAFP 与 TmAFP 的结构很不一样, 因此他们对抑制冰晶增长的机制给出新的模型, 即结构互补模型: 冰晶表面与 AFP 表面互相吻合, 该模型不但适合于昆虫的 AFP 也适用于鱼类 AFP<sup>[7]</sup>。加拿大阿尔伯达大学的研究人员利用核磁共振方法研究 Thr 侧链的柔韧性时发现在接近冷冻温度时, 在 AFP-冰晶结合面处的 Thr 以最适与冰晶表面相咬合的构型存在, 非结合面处的 Thr 以多种构型存在。因此得出结论: 规则的 Thr 排列使 AFP 与冰晶表面紧密吻合, 这种形态互补结合是抑制冰晶生长的关键<sup>[15]</sup>, 该结论进一步证实了表面结构互补理论。

新加坡国立大学的研究人员将小冰晶成核技术应用用于 AFP-III 的抗冻机制研究, 发现 AFP-III 可以吸附到小晶核和尘埃颗粒上, 从而阻碍冰晶的成核作用, 使之首次从数量上来检测 AFP 的抗冻机制<sup>[16]</sup>。该实验支持吸附抑制假说, 此假说是目前较公认的。

实验表明昆虫 *Dendroides canadensis* 的 AFP (DcAFP) 的构型随温度降低而趋于更规则, 这种变化反映了它结构的柔韧性, 为解释它通过改变构型更好地与冰晶面相吻合从而抑制冰晶增长提供了证据<sup>[13]</sup>。

2002 年, 北京师范大学化学系与加拿大 Queen's 大学生物化学系的研究人员应用量子力学, 首次将分子轨道计算方法应用于 AFP-II, 结果表明一含 19 氨基酸残基 (K37, L38, Y20, E22, Y21, I19, L57, T56, F53, M127, T128, F129, R17, C7, N6, P5, G10, Q1, W11) 的冰结合面恰与冰晶表面吻合, 因而为抑制冰晶增长提供证据<sup>[17]</sup>。

一项关于黑麦草 (*Lolium perenne*) AFP 机制的研究提出了一种新说法, 该种 AFP 具有比鱼和昆虫都低得多的热滞活性, 它与冰晶的作用方式也与鱼和昆虫的不同, 即它是通过蛋白骨架吸附到冰晶表面的, 这与以往提出的吸附方式是不同的, 因而引起

了广泛的探讨<sup>[18]</sup>。

### 3 抗冻蛋白的应用

南极鱼的抗冻之谜被揭开之后, 生物学家们在研究抗冻蛋白结构特点和物理化学性质的同时也在着手探索它在实践中的意义。

哈尔滨师范大学生物系的黄永芬教授等, 将美洲拟鲮的 AFP 基因, 注入番茄花粉管, 得到基因变异的种子。用分子杂交的方法对该种子的植株进行检测, 发现 AFP 基因已整合到植物的染色体上。经 6 年的不断筛选培育, 终于得到转基因番茄抗寒新品系<sup>[19]</sup>。

以色列示巴女王医学中心的研究人员利用抗冻蛋白对哺乳动物的心脏进行低温保存, 不但延长了保存时间, 也使器官移植的成活率大大提高<sup>[20]</sup>。

这些只是正面的例子, 抗冻蛋白无论在低温储存还是对冰晶生长的影响上都存在着双重作用。在一定剂量和一定类型的 AFP 作用下, 它可以对细胞膜起保护作用, 在其他情况下可能具有细胞毒性。同样, 在一定情况下它可以抑制冰晶生长, 而在另一种情况下却有促进冰晶成核作用<sup>[21]</sup>。随着 AFP 转基因等各项工作的展开, 抗冻蛋白的应用会越来越广泛。

### 参考文献 (References)

- [1] DeVries AL *et al. Science*, 1969, **163**: 1073
- [2] DeVries AL. *Science*, 1971, **172**: 1152
- [3] Low WK *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 10334
- [4] Yamashita Y *et al. Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, **67**: 461
- [5] Marshall CB. *Nature*, 2004, **429**: 153
- [6] Graether SP *et al. Nature*, 2000, **406**: 325
- [7] Leinala EK *et al. Structure (Camb)*, 2002, **10**: 619
- [8] Li N *et al. Arch Biochem Biophys*, 1998, **360**: 25
- [9] Yamashita Y *et al. Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66**: 239
- [10] Huang T *et al. Plant Mol Biol*, 2002, **48**: 339
- [11] Kuiper MJ *et al. Biophys J*, 2001, **81**: 3560
- [12] Fairley K *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 24073
- [13] Baardsnes J *et al. Biochim Biophys Acta*, 2002, **1601**: 49
- [14] Liou YC *et al. Nature*, 2000, **406**: 322
- [15] Daley ME *et al. Protein Sci*, 2003, **12**: 1323
- [16] Du N *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 36000
- [17] Cheng Y *et al. Biophys J*, 2002, **83**: 2202
- [18] Pudney PD *et al. Arch Biochem Biophys*, 2003, **410**: 238
- [19] 黄永芬等. *生物化学杂志*, 1997, **13**: 418
- [20] Amir G *et al. Ann Thorac Surg*, 2004, **77**: 1648
- [21] Wang JH. *Cryobiology*, 2000, **41**: 1

## Antifreeze Protein Structure and Antifreeze Mechanism

Xiu-Jie Xie, Zong-Chao Jia<sup>1</sup>, Qun Wei\*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Queen's University, Kingston, Ontario K7L 3N6, Canada)

**Abstract** Antifreeze proteins (AFPs) are macromolecular antifreeze first isolated from blood serum of Antarctic Cod. Various AFPs have been found from insects, plants, bacteria and fungi and so on. Their gene sequences and several crystal structures have been determined. Recent studies are focused on their antifreeze mechanism in attempts to better understand how exactly AFPs work. AFPs have wide applications. They can aid in the food storage and transplant organ cryopreservation, also by transgene they could enhance the antifreeze ability of crops.

**Key words** antifreeze proteins; crystal structure; antifreezing mechanism; transgene

Received: June 8, 2004 Accepted: August 31, 2004

This work was supported by the Joint Research Fund for Young Scholars in Hong Kong and Abroad (No.30228006)

\*Corresponding author. Tel: 86-10-58807365, Fax: 86-10-58807365, E-mail: WeiQ@bnu.edu.cn

### “第五届国际转基因动物学术讨论会”第二轮通知

“第五届国际转基因动物学术讨论会”暨“国际转基因研究学会成立大会”将于2005年6月15~17日在中国广州南方医科大学(原第一军医大学)举办。以下是部分大会报告,更多内容请登陆大会专用网址: [www.icta5th.com](http://www.icta5th.com)。

**朱作言院士** 国家自然科学基金委员会副主任、国家淡水生态与生物技术重点实验室主任

报告题目: 转基因鱼及其生物安全性(Transgenic carp and the biosafety)

**曾溢滔院士** 上海市儿童医院上海医学遗传研究所所长

报告题目: 人慢粒白血病(CML)的山羊模型研究

**陈永福教授** 农业生物技术国家重点实验室教授、博士生导师

报告题目: 绵羊 Myostatin 基因的剔除

**杨晓博士** 军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室研究员、博士生导师

报告题目: Generation of mouse models for human diseases using conditional gene targeting approaches

**张必良博士** Department of Molecular Medicine University of Massachusetts Medical School

报告题目: RNA 干扰技术用于转基因动物的研究

Richard Behringer, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center

Mario Capecchi, University of Utah Thomas Saunders, University of Michigan

Thomas White, State University of New York at Stony Brook

En Li, Novartis Institute for Biomedical Research

Zhi Chen, ZymoGenetics

Kevin Foley, Synta Pharmaceuticals Corp.

**征集论文:** 广泛征集转基因相关内容论文,中英文皆可(英文更佳)。凡未在公开发行人物发表的有关动物转基因技术研究等均属征文范围。**征文截止:** 2005年4月30日。

**学术、会务联络处:** 南方医科大学(原第一军医大学)组织胚胎学教研室

地址: 广州市同和路, 邮编: 510515, 电话: 020-61648204、61648205, 传真: 020-87730321, E-mail: icta5th@yahoo.com.cn

**招展、会务联络处:** 广州维尔曼科学仪器有限公司

地址: 广州市广州大道北 1521 号恒隆大厦 B 座 601 室, 邮编: 510510, 电话: 020-87249375、87249376, 传真: 020-87249377, E-mail: info@wellman.com.cn, 联系人: 朱定军