

细菌蛋白质 Tat 转运系统的研究进展*

张明**

(安徽农业大学生物工程系, 合肥 230036)

摘要 蛋白质 Tat 转运系统不同于细菌中普遍存在的 Sec 转运系统, 而与植物叶绿体中蛋白质转运的 ΔpH 依赖系统相似. 通过 Tat 系统转运的蛋白质底物含有特征性的双精氨酸保守序列核心 S/T-R-R-x-F-L-K 的信号肽, 其 h 区的疏水性低, c 区有由高赖氨酸、高精氨酸构成的避开 Sec 系统信号, 信号肽和成熟蛋白质的组成对蛋白质的转运都有影响. TatA、TatB、TatC 和 TatE 四种蛋白质参与了大肠杆菌的 Tat 转运系统. 被转运的底物蛋白质绝大多数为与细菌厌氧呼吸有关的含氧化还原辅因子的酶, 并以折叠形式转运.

关键词 细菌, 蛋白质 Tat 转运系统, 双精氨酸保守序列核心

学科分类号 Q502

细菌合成的蛋白质通过细胞内膜到达周质空间的过程称为蛋白质的转运 (translocation), 现已建立了比较完善的 Sec (Sec machinery) 转运系统. 1998年, 在大肠杆菌中又发现了一种新的转运系统, 因其信号肽中有双精氨酸保守序列核心 S/T-R-R-x-F-L-K^[1-6], 故称为 Tat (twir arginine translocation) 转运系统. 目前有关 Tat 蛋白质转运系统的转运模型仍处于推测阶段, 尚有一些问题有待于解决. 本文仅就 Tat 转运系统信号肽组成的特点、影响转运因素、系统的组成和其转运底物蛋白质的特点四个方面综述该系统研究的进展.

1 双精氨酸信号肽的组成特点

Tat 转运系统的信号序列称为双精氨酸信号肽 (twir arginine signal peptide), 它和 Sec 信号肽一样分为三个区域: 即位于 N 端的带正电荷的 n 区、形成 α 螺旋的疏水性的 h 区和位于 C 端的含有信号肽酶切点的 c 区. Cristóbal^[7] 对这两个信号肽各区的氨基酸组成进行分析表明 Tat 信号肽除在 n 区和 h 区交接处存在双精氨酸保守序列核心外, 在 h 区甘氨酸含量 (13.3%) 高于 Sec 信号肽 (4.2%), 用 Tat/Sec 表示为 13.3/4.2, 而亮氨酸含量则低为 14.7/26.3, 从而使 h 区疏水性较 Sec 信号肽小, 另外在 h 区结束处常有一脯氨酸; 在 c 区有由高赖氨酸 (2.2/0.5) 和高精氨酸 (6.5/0.8) 构成的避开 Sec (sec avoidance) 系统信号^[8]; 在 n 区精氨酸 (16.8/10.8), 甘氨酸 (9.1/2.8) 和带负电的氨基酸含量皆较高. 在整个 Tat 信号肽中还含有 2 倍于 Sec 信号肽的脯氨酸含量, 并且在距信号肽酶切点

前第 6 位处脯氨酸出现频率很高. Tat 信号肽通常比 Sec 信号肽长, 两者分别含 26~58 和 18~26 个氨基酸残基^[9], 增长部分主要位于 n 区.

2 影响 Tat 转运系统的因素

双精氨酸对转运起着决定性的作用, 绝大多数情况下是不可取代的. 如用赖氨酸全部或单个替换 *Zymomonas mobilis* 中葡萄糖-果糖氧化还原酶信号肽上的两个精氨酸, 将完全阻断此酶的转运^[10]. 在其他细菌中结果也相似. 但在大肠杆菌中将用 *Desulfovibrio vulgaris* 中氢酶的 Tat 信号肽与 β -lactamase 组成的嵌合体进行表达时则出现了例外情况, 用一系列氨基酸如赖氨酸取代第一个精氨酸只能部分地阻断 β -lactamase 的转运^[11]. 除此之外, 用 TMAO (trimethylamine N-oxide) 还原酶的 Tat 信号肽 TorA 或经不同改造了的 TorA 和以 Sec 系统转运的蛋白质 Lep (Leader peptidase) 或 Lep 的组成之一 P2 (以可溶状态存在于周质空间)、或逆向插入 Lep 构成各嵌合体来研究蛋白质转运与信号肽的关系^[7], 结果表明只有 TorA/P2 可通过 Tat 系统转运, 而用赖氨酸取代 TorA 中双精氨酸形成的 TorA [KK] /P2 则不能通过 Tat 系统转运, 用 Sec 信号肽构建的 Sec/P2 仍依靠 Sec 系统转运, 因此 P2 本身不能改变转运系统. 但 TorA/Lep 和 TorA/Lep^{inv} 仍以 Sec 系统转运, Lep 除含有 P2

* 国家留学基金委 97 基金资助 (97834018).

** 通讯联系人.

Tel: 0551-3636140, E-mail: zhangjuw@mail.hf.ah.cn

收稿日期: 2000-06-22, 接受日期: 2000-08-23

外还含有两段跨膜片段, 说明后者影响了 Tat 信号肽发挥作用. 采用 LAL₈ 取代 TorA h 区中的全部 19 个氨基酸形成 TorA [19: 10] / P2, 或取代中心的 10 个氨基酸形成 TorA [10: 10] / P2 以增加疏水性, P2 的转运从 Tat 系统转成 Sec 系统, 表明 h 区的低疏水性可使 Tat 信号肽抵抗 Sec 系统的作用. 再进一步用天冬酰胺和谷氨酰胺取代 c 区的精氨酸, 可加快 P2 Sec 的转运速度并使转运更完全. 所以影响转运的因素是多方面的, 双精氨酸保守序列中的双精氨酸、h 区的疏水性、c 区的 Sec 避开序列和成熟蛋白质的组成在 Tat 转运系统中都起到关键性的作用.

3 Tat 系统的组成和遗传学

一般认为大肠杆菌中 Tat 系统是由 TatA、TatB、TatC 和 TatE 四种蛋白质组成的, 其他细菌的相应蛋白质称为 Tat 相似蛋白质 (Tat-like proteins), 编码这些蛋白质的基因定位于大肠杆菌染色体 14 (*ybeC*) 和 86 (*ybeT UW*) 分钟处, 现统称为 *tat* (twir-arginine translation) 基因, 包括 *tatE* (*ybeC*) 和 *tatA*、*tatB*、*tatC* 和 *tatD* (*ybeT UW*), 但 *tatD* 的产物与 Tat 系统无关. *tat* 基因曾被称为 *mtt* (membrane targeting and transport) 基因^[2], 大肠杆菌 *mttA* 的第 128 位氨基酸 (P128L) 突变株 D-43 不能使一些带有 Tat 信号肽的酶正确地插入或转运过细胞膜, 从而首次在分子水平上证实了该系统的存在. 在随后的研究中^[4, 5, 12], 用基因插入和缺失的方法获得了各 *tat* 基因的突变株, 根据它们对相关酶转运的影响可知 TatB 和 TatC 是 Tat 系统的重要组成成分, TatA 和 TatE 在功能上有一定的互补作用, 因为只有在 *tatA* 和 *tatE* 双重突变的情况下才能阻止相关蛋白质的转运. TatA 和 TatE 在氨基酸序列上有 60% 的相同, 而 TatB 与以上两者只有约 25% 的相同. 现推测 TatA、TatB 和 TatE 在 N 端有一跨膜的螺旋, 紧接其后是一段位于细胞质内的双极性的螺旋^[13], 再后是 C 端形成长短不一的可溶性片段. 在双极性螺旋中, 正电荷和负电荷的平均比率约为 3: 1, 这可能是使得双极性螺旋通过静电作用而存在于细胞膜非极性脂类和极性水的界面上. 从整体上说 TatA/B/E 序列上的保守性很低, 仅在跨膜的螺旋和双极性螺旋之间存在一个绝对不变的氨基酸——甘氨酸, 一般情况下甘氨酸后还跟有一个脯氨酸, 它们在两个螺旋之间形成了一个易于弯曲的连

接 (bend) 或绞链 (hinge), 这一结构非常重要, 如在 D-43 中仅一个脯氨酸被亮氨酸取代则影响了相关蛋白质的转运. TatC 与 TatA/B/E 不同, 它有 6 个跨膜片段, N 端和 C 端都位于细胞质内, 在已知氨基酸序列的真细菌中 TatC 有 15 个氨基酸是绝对保守的, 它们分别位于跨膜的螺旋和位于胞质内的各螺旋之间相连的部分. TatA、TatB、TatC 和 TatE 的跨膜螺旋可能形成蛋白质转运的通道, 各成分在系统中的具体作用还处于推测之中.

近期对 Tat 基因结构的统计学分析表明 *tat* 基因在不同生物中的组成和拷贝数是不同的^[14]. 在每一分类组中具高度的保守性. 不仅细菌的基因组可编码 TatC, 其他生物的细胞器如藻类、高等植物和原生动物的线粒体中也存在着 TatC 类似物. 从 TatA/B/E 和 TatC 的进化树分析推测 Tat 系统起源于细菌, 但在动物的线粒体中没有发现 *tat* 基因, 可能是在进化的过程中丢失了, 但目前仍无确切的实验依据.

4 依赖于 Tat 转运系统转运的蛋白质特点

通过对依赖于 Tat 系统转运的蛋白质研究发现它们绝大多数为带有辅因子的酶, 特别是含金属的、与细菌厌氧呼吸有关的酶, 按辅因子的类别可将之分为含镍、钼、铜和 NADP 的酶及铁硫蛋白五类. 这些蛋白质都是在细胞质中先与辅因子结合后方能转运到周质空间或插入到细胞膜上. 辅因子的缺失将阻止转运的进行, 重新加入辅因子可恢复正常的转运. 脱辅基蛋白与辅因子的结合是在胞内其他蛋白质因子的作用下进行的, 这种蛋白质因子与脱辅基蛋白之间的相互作用说明了蛋白质前体已处于折叠状态, 这一特性是通过 Tat 系统转运的蛋白质的主要特性. 大肠杆菌细胞外膜蛋白氢酶 (HYD2) 由大、小两个亚基组成, 它们通过 Tat 系统转运, 但只有小亚基带有 Tat 信号肽, 而大亚基不带有任何信号肽. 位于小亚基的 Tat 信号肽不仅介导了小亚基的转运, 还介导了大亚基的转运和镍与大亚基的结合, 反过来缺失了大亚基也会影响小亚基的转运^[15]. 这说明了大、小亚基之间在转运上存在着相互关系, 从某种意义上也说明了 HYD2 的大、小亚基在转运前已处于折叠状态.

参 考 文 献

- 1 Settles A M, Yonetani A, Baron A, et al. Sec-independent protein translocation by the maize Hef106 protein. Science, 1997,

- 278 (21): 1467~ 1470
- 2 Weiner J H, Shaw G, Turner R J, *et al.* A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell*, 1998, **93** (3): 93~ 101
 - 3 Santini C-L, Ize B, Chanal A, *et al.* A novel Sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 1998, **17** (1): 101~ 112
 - 4 Sargent F, Bogsch E, Stanley N R, *et al.* Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J*, 1998, **17** (13): 3640~ 3650
 - 5 Bogsch E, Sargent F, Stanley N R, *et al.* An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J Biol Chem*, 1998, **273** (29): 18003 ~ 18006
 - 6 Berks B C. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?. *Mol Microbiol*, 1996, **22** (3): 393~ 404
 - 7 Cristóbal S, de Gier J-W, Nielsen H, *et al.* Competition between Sec- and Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 1999, **18** (11): 2982~ 2990
 - 8 Bogsch E, Brink S, Robinson C. Pathway specificity for a Δ pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *EMBO J*, 1997, **16** (13): 3851~ 3859
 - 9 Fekkes P, Driesser D M. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, **63** (1): 161~ 173
 - 10 Halbig D, Wiegert T, Blaudeck N, *et al.* The efficient export of NADP-containing glucose fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem*, 1999, **263** (2): 543~ 551
 - 11 Nivière V, Wong S L, Voordouw G. Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a β -lactamase fusion protein. *J Gen Microbiol*, 1992, **138** (part 10): 2173~ 2183
 - 12 Chanal A, Santini C L, Wu L F. Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1998, **30** (3): 674 ~ 676
 - 13 Berks B C, Sargent F, Palmer T. The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol*, 2000, **35** (2): 260~ 274
 - 14 Wu L-F, Ize B, Chanal A, *et al.* Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotech*, 2000, **2** (2): 179~ 189
 - 15 Rodrigue A, Chanal A, Beck K, *et al.* Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway. *J Biol Chem*, 1999, **274** (19): 13223~ 13228

Progress on the Bacterial Tat Protein Translocation System*

ZHANG Ming**

(Department of Biological Engineering, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract The bacterial Tat protein translocation system is different with the Sec machinery which is general protein translocation system in the bacteria, but similar to Δ pH-dependent pathway used for importing chloroplast proteins into the thylakoid. This system can export proteins with a twin-arginine signal peptide bearing a consensus (S/T)-R-R-x-F-L-K motif and in the folded conformation. Moreover most of these proteins are always containing redox cofactor enzymes with relations to the bacterial anaerobic respiratory. This protein translocation system is affected by a kind of factors such as the twin arginines in the consensus motif, the hydrophobicity of h-region, sec-avoidance signal of the c-region of the signal peptide and the constitution of mature proteins. And there are four proteins (TatA, TatB, TatC and TatE) involved with this system of *E. coli*.

Key words bacterium, Tat protein translocation system, twin-arginine signal peptide

* This work was supported by a grant from China Scholarship Council (97834018).

** Corresponding author. Tel: 86-551-3636140, E-mail: zhangjuw@mail.hf.ah.cn

Received: June 22, 2000 Accepted: August 23, 2000