

合浦珠母贝 26S 蛋白酶体 S4, S7 亚基基因片段的分离与分析 *

姜铁民^{1,2} 张 勇¹ 黄 洁¹ 谢莉萍¹ 吴移谋²
张荣庆^{1**}⁽¹⁾ 清华大学生物科学与技术系, 海洋生物技术研究所 北京 100084)⁽²⁾ 南华大学医学院 衡阳 421001)

提要 26S 蛋白酶体是真核生物中一种具有 ATP 依赖性的蛋白酶复合体, 主要通过泛肽途径选择性降解细胞内与代谢调控、细胞周期有关的功能蛋白及异常蛋白, 参与多种细胞活动的调控过程。26S 蛋白酶体由具有催化活性的 20S 亚复合体和一个具有调节作用的 19S 亚复合体组成, 其中 19S 亚复合体中的 ATP 酶亚基是调节 26S 蛋白酶体活性的重要组件。本文通过简并引物 PCR 手段, 从软体动物合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 中扩增到参与构成 19S 亚复合体的 S4 和 S7(MSI) 两个亚基的基因片段。这两个基因片段所编码的 ATP 酶组件包含有 Gx4GKT, DEID, SAT 和 H/ QRxGRxxR 等 26S 蛋白酶体 ATP 酶亚基的共同功能基序。这是首次在软体动物中报道 26S 蛋白酶体的 ATP 酶亚基基因序列, 为研究软体动物中 26S 蛋白酶体的结构与功能奠定了分子基础。

关键词 合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*), 26S 蛋白酶体, ATP 酶亚基, S4 亚基, S7 亚基
中图分类号 Q81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003) 04-0028-07

26S 蛋白酶体(26S proteasome)是真核生物中一种具有 ATP 依赖性的蛋白酶复合体, 主要通过泛肽 (Ubiquitin) 依赖性蛋白降解途径实现对细胞内参与代谢调控和细胞周期的功能蛋白及异常蛋白的选择性降解, 对多种细胞活动进行调控^[1-3]。26S 蛋白酶复合体由 20S 和 19S(又称 PA700) 两个亚复合体组成, 其中 20S 亚复合体是由 14 个亚基形成的中空圆柱体, 是 26S 复合体的核心催化颗粒, 不具有 ATP 和泛肽依赖性。19S 亚复合体至少包括 15 个分子量在 42 ~ 110ku 之间的亚基, 是 26S 蛋白酶体的调控体, 调节 20S 的催化活性; 其中至少有 S4(YTA5), S6(TBP7/ YTA2), S7(MSI/ YTA3), S8(TBP1/ YTA1), SUG1 和 SUG2 六个亚基具有 ATP 酶活性, 与其它亚基一起, 通过对底物蛋白的识别、去折叠和促进底物进入酶解中心等参与 26S 蛋白酶体对底物的降解, 并使 26S 蛋白酶体具有 ATP 和泛肽依赖性^[1-6]。其中 S4, S6, S7, S8 和 SUG1 还作为转录因子, 调节一些功能蛋白基因, 包括细胞周期蛋白基因的转录, 并参与细胞的程序性死亡^[6,7]。此外, Gordon 等^[8]也发现酵母 S4 和 S7 蛋白突变使细胞不能完成有丝分裂, 导致细胞周期受阻, 说明这两个亚基在细胞分裂中起重要作用。

AAA 蛋白是一类最近发现的与多种细胞活动有关的 ATP 酶的一个亚家族, 不仅参与细胞周期调控、细胞分裂、细胞内液泡介导的蛋白运输及功能蛋白降解等过程, 而且在 RNA 代谢或 RNA 转录或转录后调控过程中起作用, 是机体不可缺少的一种调控蛋白酶。到目前, 已在不同生物体内, 包括原核生物和真核生物, 发现多个 AAA 蛋白家族成员, 并对它们的结构特征和功能进行了分析研究^[4-6]。ATP 酶组件是由 200 ~ 250 个氨基酸构成的保守序列, 是 AAA 家族蛋白的主要功能区域, 其中包含有 ATP 结合基序 (又称

* 国家 863 计划资助项目 2001 AA621140 号; 国家自然科学基金项目 30170732 号。

** 通讯作者: 清华大学生物科学与技术系, 北京, 100084。E-mail: rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn
第一作者: 姜铁民, 出生于 1971 年, 在读硕士研究生, 主治医师; 目前参与课题项目“合浦珠母贝生物矿化相关功能基因的研究与开发”。

收稿日期: 2002-07-23; 修回日期: 2002-11-18

Walker A Box, P-loop) “Gx4GKT”和 ATP 水解基序(或称 walker B Box)“DEID”两个特征性结构域^[5,6]。参与构成 26S 蛋白酶体 ATP 酶亚基的 ATP 酶组件不仅包括 AAA 蛋白的这两个特征结构域,而且还具有 RNA/DNA 螺旋酶的特征性基序“SAT”,“H/QRxGRxxR”等功能基序^[9]。

26S 蛋白酶体 ATP 酶亚基已在真菌、植物及哺乳动物中得到广泛研究^[10-13],但目前软体动物中 26S 蛋白酶体结构与功能的研究尚未见报道。合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)是我国培育海水珍珠的主要贝类,其外套膜是分泌形成天然珍珠的主要器官。外套膜不仅分泌基质蛋白直接参与珍珠的形成,还通过复杂的胞内机制对珍珠质的矿化周期进行调控^[14-17]。因此,其细胞内蛋白的合成、修饰与代谢活动十分活跃。26S 蛋白酶复合体作为细胞内蛋白代谢的重要调控因子之一,研究其在软体动物合浦珠母贝中的结构与功能特点将有助于揭示生物矿化的机理。本文以外套膜总 RNA 为研究材料,根据脊椎动物 26S 蛋白酶体的 ATP 酶亚基保守序列设计简并引物,从合浦珠母贝外套膜中,首次扩增到软体动物 S4 和 S7 基因片段,为研究 26S 蛋白酶体的结构及功能奠定了分子基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源

合浦珠母贝取自广西壮族自治区北海市珍珠总公司珍珠养殖场,迅速取下外套膜组织,于 RNAlater (Ambion, Inc.) 中浸泡。

1.2 RT-PCR

模板 cDNA 合成,利用总 RNA 提取试剂盒 RNeasy (Biotecx Laboratories, TaKaRa) 提取外套膜组织的总 RNA 后,取 1 μ g 总 RNA 为模板,参照反转录试剂盒 (TaKaRa RNA PCR Kit, TaKaRa) 说明合成 cDNA。

引物合成,根据 Makino^[9]和 Dubiel^[11]等对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 和人 (*Homo sapiens*) 26S 蛋白酶体 ATP 酶亚基的序列分析,选取 S4, S7 (序列登录号:大鼠 Q03527 和 Q63347,人 A44468 和 BAA01868) 中包含 ATP 酶组件的上下保守序列 GIE/ KPPKG 和 CTEAGM/L,在 Primer Premier 5.0 软件辅助下设计简并引物 P1: 5'-GGI AT(T/ C) (A/ G) AG CQ(A/ T) CCI AA(G/ A) GG 3' 和 P2: 5'-CA(G/ A/ T) ICC AGC(C/ T) TC TGT(G/ A) CA 3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 50 μ L 反应体系中含 2 μ mol/L 引物, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 200 μ mol/L dNTP, 2.5 U Taq DNA 聚合酶, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L KCl 及

cDNA 模板 2 μ L (约 1 μ g)。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54.5 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 PCR 产物纯化与克隆

PCR 反应完毕后进行琼脂糖凝胶 (1.5%) 电泳检测, 切下与预期分子量 (570 bp) 大小相同的目的片段, 用 PCR 产物纯化试剂盒 (Wizard[®] PCR Prep DNA purification resin, Promega) 纯化回收, 然后亚克隆至载体 pGEM[®]-T Easy Vector (Promega), 转化大肠杆菌 DH5- α , 经阳性克隆筛选、提质粒、酶切及 PCR 确认重组体。

1.4 测序及序列分析

将含有目的片段的 pGEM[®]-T Easy Vector 重组质粒进行测序, 测序由上海生物工程公司完成。测序结果通过 GenBank 中搜索工具 Blast 进行同源检索, 并利用 Clustal W、Clustal X (1.81) 软件完成同源性比较、序列分析和 NJ (Neighbor Joining) 进化树的绘制。

2 结果

2.1 RT-PCR

图 1 为合浦珠母贝 26S 蛋白酶体 S4 和 S7 亚基基因片段的 PCR 扩增结果。在扩增长约 570 bp 和 470 bp 的两个片段中, 570 bp 符合上下保守序列间隔区段应包含的碱基数, 为目的产物。

2.2 序列分析

测序后得到如图 2 所示的两段 DNA 序列。经

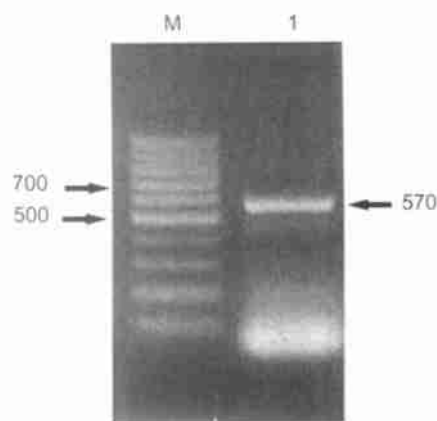


图 1 合浦珠母贝 26S 蛋白酶体 S4 和 S7 亚基基因 PCR 扩增结果

M: 核酸分子量标准 (100bp ladder); 1: PCR 扩增结果

Fig. 1 The electrophoretic results for PCR of S4 and S7 subunit of 26S proteasome from *Pinctada fucata*

Blast 搜索 GenBank, 两段序列分别与脊椎动物 26S 蛋白酶体的 ATP 酶亚基 S4 和 S7 基因的相应区域具有 75% 以上的同源性。同时, 对这两段基因编码的 190 个氨基酸进行 Blast 保守序列搜索及序列分析发现, 第 7~190 位氨基酸都属于 ATP 酶组件序列, 其中

12~19 位氨基酸 (GPPGTGKT) 为 ATP 结合基序, 71~74 为 ATP 水解基序 DEID, 115~116 及 128~134 位氨基酸分别为 RNA/ DNA 螺旋酶的特征性基序“MAT”和“I/ MRPGRI/ LDR”, 从而证实它们分别为合浦珠母贝 26S 蛋白酶体的 S4, S7 两个亚基的基因片段(图 2)。序

S4	
GGAATCAAACCTCCTAAAGGTGTCATTCTGTATGGGCCACCTGGAACAGGAAAAACATTA	60
G I K P P K [G V I L Y G P P G T G K T L	20
TTAGCAAAGGCTGTAGCCAACCAACATCAGCCACATTCTCCGAGTTGTTGGCTCAGAA	120
L A K A V A N Q T S A T F L R V V G S E	40
CTCATTCAAAAATATTTGGGTGATGGTCCCAAGCTTGTTCGAGAATTATTCAGGGTGCCT	180
L I Q K Y L G D G P K L V R E L F R V A	60
GAGGAGCATGCACCTTCGATTGTATTTATTTGATGAAATTGATGCTATTGGTACTAAAAGA	240
E E H A P S I V F I D E I D A I G T K R	80
TATGACTCAAATTCAGGGGGAGAGAGAGAAATACAAAGGACTATGTTAGAATTCTTAAT	300
Y D S N S G G E R E I Q R T M L E L L N	100
CAGCTAGATGGTTTCGACTCCAGAGGGGATGTAAGGTTGTGATGGCAACAAATCGTATA	360
Q L D G F D S R G D V K V V M A T N R I	120
GAAACACTTGATCCCGCTCTTATCCGTCCTGGCCGTATAGACAGGAAGATAGAATTTCCA	420
E T L D P A L I R P G R I D R K I E F P	140
CTCCCCGACGAGAAAACCAAGCGAAGAATATTTCCCAATACATACAAGCAGGATGACGCTA	480
L P D E K T K R R I F P I H . T S R M T L	160
GCCGATGACGTGAATATAGATGATTATGTCATGGCAAAGGATGATTTATCGGGAGCTGAT	540
A D D V N I D D Y V M A K D D L S G A D	180
ATTAAGGCCATCTGTACAGAGGCAGGGCTC	570
I K A I C T E A G L]	190
S7	
GGTATTGAGCCACCCAAGGGTGTGCTGTTATTTGGTCCCCCAGGGACGGGGAAGACGTTA	60
G I E P P K [G V L L F G P P G T G K T L	20
TGTGCCAGGGCCGTGGCTAACAGAACAGATGCCTGCTTCATCAGAGTCATAGGATCAGAG	120
C A R A V A N R T D A C F I R V I G S E	40
TTAGTACAGAAATATGTAGGAGAGGGTGCCAGAATGGTCCGTGAATTATTTGAAATGGCC	180
L V Q K Y V G E G A R M V R E L F E M A	60
AGGAGTAAAAAAGCATGTATCATCTTCTTTGACGAGATCGATGCCGTAGGAGGTGCCCGA	240
R S K K A C I I F F D E I D A V G G A R	80
TTTGACGACGGAGCAGGTGGGGATAACGAAGTACAAAGAACTATGTTAGAATCATTAAAC	300
F D D G A G G D N E V Q R T M L E L I N	100
CAATTAGACGGTTTTGATCCCCGTGGTAACATTAAGGTAATCATGGCAACCAACAGGCCC	360
Q L D G F D P R G N I K V L M A T N R P	120
GACACCCCTAGACCCTGCCCTTATGAGGCCAGGAAGGCTTGATAGGAAAATAGAATTTGGT	420
D T L D P A L M R P G R L D R K I E F G	140
TTACCAGATCTGGAGGGAAGAACTCACATTTTCAAATCCATGCTCGATCCATGAGTGTA	480
L P D L E G R T H I F K I H A R S M S V	160
GAGAAAGACATTCGATATGAACCTTCTGGCCAGGTTATGTCCCAACAGTACAGGAGCAGAG	540
E K D I R Y E L L A R L C P N S T G A E	180
ATTCGTAGTGTATGTACAGAAGCCGGCATG	570
I R S V C T E A G M]	190

图 2 S4 和 S7 亚基基因片段的 cDNA 序列及编码的氨基酸

括号内为 ATP 酶组件, 4 个功能基序用粗体字母表示

Fig.2 The sequence of the cDNA fragment and deduced amino acid of S4 and S7 subunit
The ATPase module was showed in bracket and the four highly conserved motifs were indicated in bold

列分析也表明, GPPGTGKT与 DEID之间相隔 51 个氨基酸, DEID与 MAT, MAT与 I/ MRPGR1/ LDR之间插入的氨基酸残基分别是 40 和 10, 与 Makino 等对鼠类 26S 蛋白酶体 ATP 酶亚基的结构特征的研究一致^[9], 与其它生物同源体的序列比较发现也得到相同结果 (图 3a)。

2.3 同源性比较及生物进化

同源性比较表明合浦珠母贝 26S 蛋白酶体的 S4

和 S7 亚基的 ATP 酶组件有 57.6 % 的氨基酸相同, 而与其它真核生物同源体的 ATP 酶组件有着 80 % 96.7 % 的同源性, 其中与动物同源体的同源性明显高于西芹 (*Ambidopsis thaliana*) 和酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的同源蛋白(图 3b)。同时, 从图 3b 也可看出合浦珠母贝 26S 蛋白酶体的 S7 亚基与其同源体的同源性高于 S4 亚基与其同源体的同源性, S7 亚基与人类、青蛙 (*Xenopus laevis*) 等脊椎动物的同源性达

(a)

合浦珠母贝 S4	GVILYGP	PPGTGK	TLLAKAVANQTSATFLRVVGSELIQKYLGDGPKLVRELFRVAEEHAPS
人 S4	GVILYGP	PPGTGK	TLLAKAVANQTSATFLRVVGSELIQKYLGDGPKLVRELFRVAEEHAPS
大鼠 S4	GVILYGP	PPGTGK	TLLAKAVANQTSATFLRVVGSELIQKYLGDGPKLVRELFRVAEEHAPS
果蝇 S4	GVILYGP	PPGTGK	TLLAKAVANQTSATFLRVVGSELIQKYLGDGPKLVRELFRVAEEHAPS
线虫 S4	GVILYGC	PGTGK	TLLAKAVANQTSATFLRIVGSELIQKYLGDGPKMVRELFRVAEENAPS
西芹 S4	GVILYGE	PGTGK	TLLAKAVANSTSATFLRVVGSELIQKYLGDGPKLVRELFRVADDLSPS
酵母 S4	GVILYG	APGTGK	TLLAKAVANQTSATFLRIVGSELIQKYLGDGPRLCRQIFKVAGENAPS
合浦珠母贝 S7	GVLLFG	PPGTGK	TLCAVAVANRTDACFI R VIGSELVQKYVGEGARMVREL FEMARSKKAC
人 S7	GVLLFG	PPGTGK	TLCAVAVANRTDACFI R VIGSELVQKYVGEGARMVREL FEMARTKKAC
青蛙 S7	GVLLFG	PPGTGK	TLCAVAVANRTDACFI R VIGSELVQKYVGEGARMVREL FEMARTKKAC
果蝇 S7	GVLLFG	PPGTGK	TLCAVAVANRTDACFI R VIGSELVQKYVGEGARMVREL FEMARSKKAC
线虫 S7	GVLLYG	PPGTGK	TLCAVAVANRTDACFI R VIGSELVQKYVGEGARMVREL FEMARTKKAC
西芹 S7	GVLCYGP	PPGTGK	TLLARAVANRTDACFI R VIGSELVQKYVGEGARMVREL FQMARSKKAC
酵母 S7	GILLYG	PPGTGK	TLCAVAVANRTDATFI R VIGSELVQKYVGEGARMVREL FEMARTKKAC
	* : : :	* * * * *	* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
合浦珠母贝 S4	IVFIDEIDA	IGTKRYDSNSGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRGDVKVI	MATNRIETLDPA
人 S4	IVFIDEIDA	IGTKRYDSNSGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRGDVKVI	MATNRIETLDPA
大鼠 S4	IVFIDEIDA	IGTKRYDSNSGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRGDVKVI	MATNRIETLDPA
果蝇 S4	IVFIDEIDA	IGTKRYDSNSGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRGDVKVI	MATNRIETLDPA
线虫 S4	IVFIDEIDA	IGTKRYDSNSGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRGDVKVL	MATNRIESLDPA
西芹 S4	IVFIDEIDA	IGTKRYDAHSGGEREIQRTMLELLNQLDGFDSRGDVKVI	LATNRIESLDPA
酵母 S4	IVFIDEIDA	IGTKRYDSNSGGEREIQRTMLELLNQLDGFD	DRGDVKVI
合浦珠母贝 S7	LIFFDEIDA	IGGARFDDGAGGDNEIQRTMLELINQLDGFDP	PRGNI KVL
人 S7	LIFFDEIDA	IGGARFDDGAGGDNEIQRTMLELINQLDGFDP	PRGNI KVL
青蛙 S7	LIFFDEIDA	IGGARFDDGAGGDNEIQRTMLELINQLDGFDP	PRGNI KVL
果蝇 S7	LIFFDEIDA	IGGARFDDGAGGDNEIQRTMLELINQLDGFDP	PRGNI KVL
线虫 S7	LIFFDEIDA	IGGARFDDGAGGDNEIQRTMLELINQLDGFDP	PRGNI KVL
西芹 S7	IVFFDEIDA	IGGARFDDGVGGDNEIQRTMLEIVNQLDGFD	ARGNI KVL
酵母 S7	LIFFDEIDA	IGGARFDDGAGGDNEIQRTMLELITQLDGFDP	PRGNI KVM
	* : : *	* * * * *	* * * * * : * * * * * : * * * * *

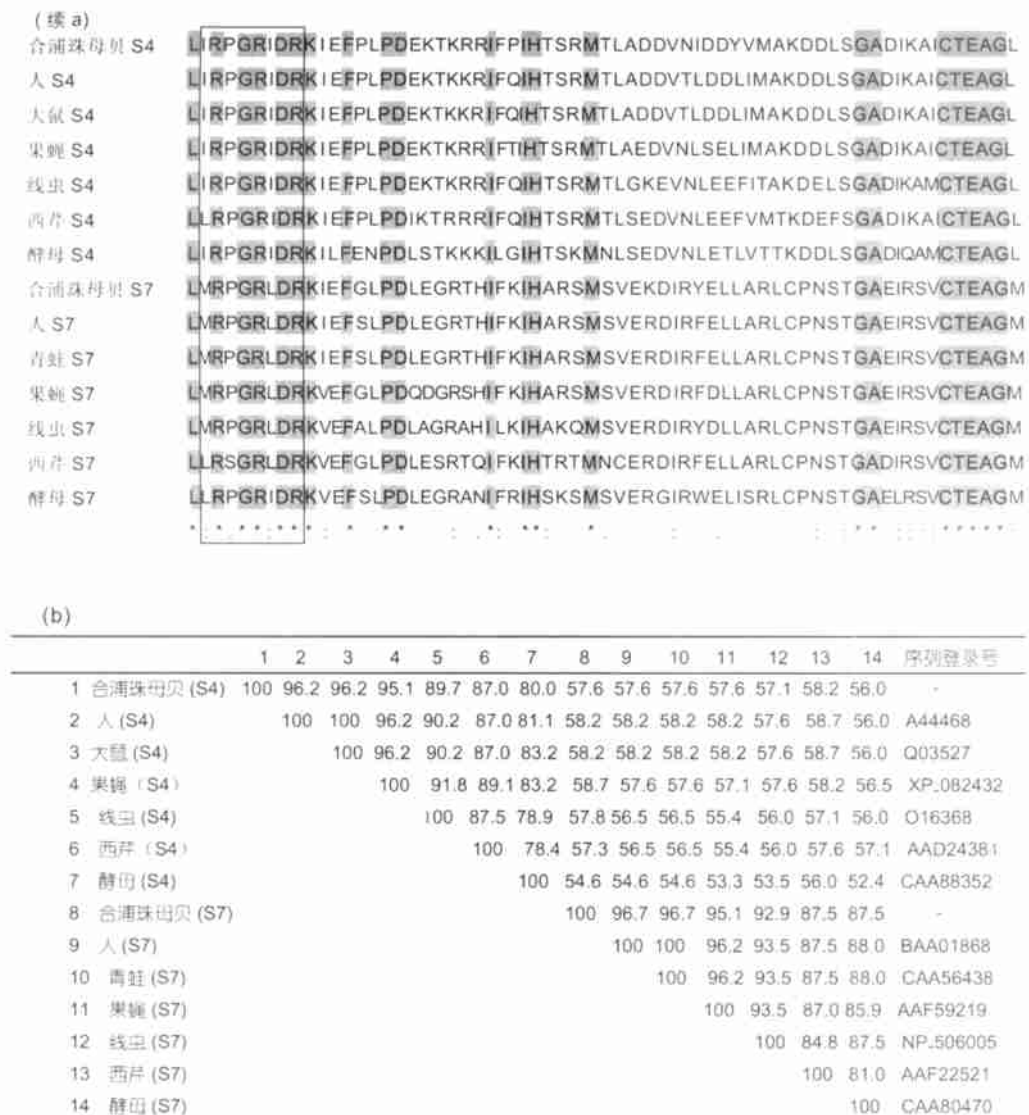


图 3 (a) 不同生物来源的 S4 和 S7 亚基 ATP 酶组件的氨基酸序列比较, ATP 结合基序和水解基序及 RNA/DNA 螺旋酶的特征性基序用方框标明; (b) 在图(a)氨基酸序列比较基础上得出的不同生物 S4 和 S7 亚基 ATPase 组件的氨基酸相同百分数

Fig. 3 (a) Amino acid sequence alignment of ATPase module of subunit 4 and subunit 7 from various sources. The identity amino acids were shaded and the conserved motifs were boxed; (b) percentage identities of the amino acid sequences compared in (a)

96.7%, 与进化关系较远的真菌、植物的同源性也在 87% 以上, 而 S4 与人类和鼠类的同源性为 96.2%, 与无脊椎动物线虫 (*Caenorhabditis elegans*) S4 亚基的同源性 (89.7%) 也低于 S7 (92.9%), 而与真菌、植物等生物的同源性却在 87% 以下。

根据序列构建 NJ 树, 可以构建不同生物 S4 和 S7 亚基的系统发育关系。如图 4 所示, S4 和 S7 亚基分属于两个亚群, 但真核生物 S4 和 S7 亚基在进化树上各成一支。合浦珠母贝 S4, S7 在系统进化上较果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和线虫等无脊椎动物更接近

于脊椎动物,而与真菌和植物相隔较远。从图 4 还可以看出, S4 与 S7 在进化关系上并不完全一样, 在 S4 这一支上, 真菌自成一支, 而 S7 一支中是植物自成一支。由于 19S 亚复合体的 ATP 酶亚基彼此之间在 ATP 酶组件的氨基酸序列和结构上具有高度的同源性, 推测这些 ATP 酶亚基可能来源于共同的祖先, 因一系列基因复制事件而形成各种在结构与功能上并不完全相同的亚群。这一进化规律一方面解释了 ATP 酶组件在不同生物体内都发现的原因, 另一方面也说明了 26S 蛋白酶体在细胞代谢中的重要地位^[4,5]。

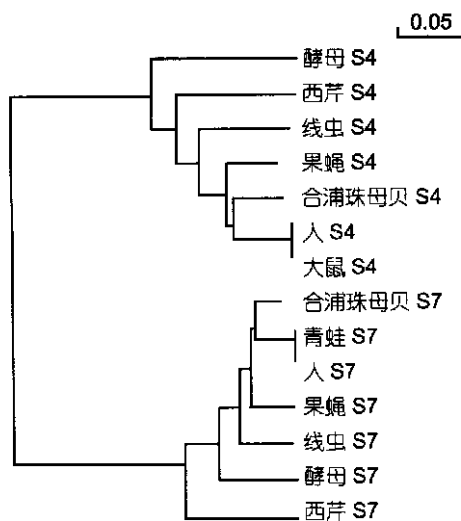


图 4 合浦珠母贝 S4, S7 与其同源体的系统发育关系 (利用 Clustal X 1.81 的 NJ 方法绘制)

Fig. 4 The phylogenetic analysis between *Pinctada fucata* S4, S7 and their homologs from other species. The unrooted NJ tree was generated by using the method NJ of program Clustal X 1.81

3 讨论

如图 2,3 所示,本次扩增的两段基因编码的氨基酸序列与其它生物同源体有着高度的同源性 (80%以上), 且具有 ATP 酶亚基所有的保守序列和功能位点。其 ATP 酶组件中不仅含有 ATP 酶的两个特征结构域 ATP 结合基序“Gx4GKT”和水解基序“DEID”, 还具有 RNA/DNA 螺旋酶的特征性基序“SAT”, “H/QRxGRxxR”, 不仅如此, Gx4GKT 与 DEID, DEID 与 SAT, SAT 与 H/QRxGRxxR 之间间隔的氨基酸数目也完全相同, 分别是 51, 40 和 10 个氨基酸残基, 这些结构特

征不仅说明这 4 个保守基序在功能上起着关键作用, 同时也说明了 26S 蛋白酶体 ATP 酶亚基在结构和功能上的保守性。

尽管 19S 亚复合体各 ATP 酶亚基之间具有较高的同源性, 但功能却并不完全相同, 如 Sug1 通过调节特定的 19S 亚基的表达水平, 保证蛋白酶体对大量底物的快速降解, 促使细胞死亡; 而 Sug2 却参与纺锤极体降解前其组成部分的去折叠^[5]。另外, Dawson 等人认为 S4, S7, TBPI 及 SUG1 除具有 ATP 酶活性外, 还作为一种转录因子或细胞周期蛋白通过调节基因的表达, 影响细胞有丝分裂并参与细胞程序性死亡过程, 与 Gordon 等发现酵母 S4 和 S7 蛋白突变使细胞不能完成有丝分裂的结果一致^[6-8]。虽然这些亚基是蛋白酶体降解蛋白底物所必须的, 但本身并没有蛋白酶活性, 可能只是以一种类似分子伴侣的方式将靶蛋白的去折叠和 ATP 水解偶联起来, 通过对 20S 亚复合体酶活性的调节, 协助 26S 蛋白酶体对泛肽化蛋白的识别、去折叠和降解^[2,6]。

本次扩增的合浦珠母贝 S4, S7 基因片段编码的氨基酸序列与其它生物同源体具有高度同源性, 并含有 ATP 酶亚基所有的功能保守序列和结合位点, 从而推测合浦珠母贝 S4, S7 两个亚基可能通过调节 26S 蛋白酶体降解泛肽标记蛋白, 调控细胞内一些功能蛋白, 如信号传递因子的灭活, 实现对细胞功能活动的精确调控。同时, S4, S7 同源体也可能作为一种转录因子或通过降解转录因子调节基因表达和其它有机大分子转录, 参与珍珠质矿化过程, 其具体的功能及其作用机制有待于进一步研究证实。本次克隆的 S4 和 S7 基因片段将有助于完整基因的分离, 为阐释 26S 蛋白酶体在珍珠质生物矿化中的作用和机理奠定了分子基础。

参考文献

- 1 Ferrell K, Wilkinson C R, Dubiel W, et al. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25 (2): 83-88
- 2 Wollenberg K, Swaffield J C. Evolution of proteasomal ATPases. *Mol Biol Evol*, 2001, 18 (6): 962-974
- 3 Kiesszenbaum A L. The 26S proteasome: ubiquitin-mediated proteolysis in the tunnel. *Mol Reprod Dev*, 2000, 57(2): 109-110
- 4 Swaffield J C, Purugganan M D. The evolution of the conserved ATPase domain (CAD): reconstructing the history of an ancient protein module. *J Mol Evol*, 1997, 45 (5): 549-563
- 5 Patel S, Latterich M. The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol*, 1998, 8 (2): 65-71

- 6 Confalonieri F, Duguet M. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays*, 1995, 17(7): 639-650
- 7 Dawson S P, Arnold J E, Mayer N J, et al. Developmental changes of the 26 S proteasome in abdominal intersegmental muscles of *Manduca sexta* during programmed cell death. *J Biol Chem*, 1995, 270(4): 1850-1858
- 8 Gordon C, McGurk G, Dillon P, et al. Defective mitosis due to a mutation in the gene for a fission yeast 26S protease subunit. *Nature*, 1993, 366(6453): 355-357
- 9 Makino Y, Yagosa S, Kaneaki M, et al. Structures of the rat proteasomal ATPases: determination of highly conserved structural motifs and rules for their spacing. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 220(3): 1049-1054
- 10 Shibuya H, Irie K, Nnomiya Tsuji J, et al. New human gene encoding a positive modulator of HIV Tat mediated transactivation. *Nature*, 1992, 357(6380): 700-702
- 11 Dubiel W, Ferrell K, Pratt G, et al. Subunit 4 of the 26 S protease is a member of a novel eukaryotic ATPase family. *J Biol Chem*, 1992, 267(32): 22699-22702
- 12 Fu H, Doelling J H, Rubin D M, et al. Structural and functional analysis of the six regulatory particle triple A ATPase subunits from the Arabidopsis 26S proteasome. *Plant J*, 1999, 18(5): 529-539
- 13 Lucero H A, Chojnicki E W, Mandiyan S, et al. Cloning and expression of a yeast gene encoding a protein with ATPase activity and high identity to the subunit 4 of the human 26 S protease. *J Biol Chem*, 1995, 270(16): 9178-9184
- 14 Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, et al. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature*, 1997, 387(6633): 563-564
- 15 Kono M, Hayashi N, Samata T. Molecular mechanism of the Nacreous Layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269(1): 213-218
- 16 Mann S. Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, 1988, 332: 119-124
- 17 Zaremba C M, Belcher A M, Fritz M, et al. Critical transition in the biofabrication of Abalone shells and flat pearls. *Chem Mater*, 1996, 8: 679-690

ISOLATING AND ANALYZING THE GENE FRAGMENTS OF S4 AND S7 SUBUNIT OF 26S PROTEASOME FROM *Pinctada fucata*

JIANG Tie-Min^{1,2} ZHANG Yong¹ HUANG Jie¹ XIE Li-Ping¹ WU Yi-Mou² ZHANG Rong-Qing¹
 (¹ Department of Biological Sciences and Biotechnology, Institute of Marine Biotechnology, Tsinghua University, Beijing, 100084)
 (² School of Medicine, Nanhua University, Hengyang, 421001)

Received: Jul., 23, 2002

Key Words: *Pinctada fucata*, 26S proteasome, ATPase subunit, S4, S7

Abstract

The 26S proteasome is an eukaryotic ATP-dependent protease complex that is responsible for selective degradation of abnormal proteins and naturally short-lived proteins relate to metabolic regulation and cell-cycle progression by ubiquitin pathway so as to regulate a variety of cellular activities. The complex is composed of two subcomplexes, the proteolytic core 20S particle and the 19S regulatory particle. Based on the sequences of amino acids and its corresponding DNA of 26S proteasomal ATPase subunits from human and rat, two degenerate primers were designed and synthesized, and two cDNA fragments, subunit S4 and subunit S7 gene of 26S proteasome, were amplified firstly from the mantle cDNA of *Pinctada fucata* by PCR. Each cDNA fragment encoded 190 amino acids contained four conserved motifs, Gx4GKT, DEID, SAT, and H/ QRxGRxxR, which are characteristic of the ATPase subunits of 26S proteasome. The result will be the molecular bases for studying the function and structure of 26S proteasome of mollusc.

(本文编辑:刘珊珊)