

纪兆林, 石刘飞, 李 健, 等. 卷曲螺旋结构及其研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 6-11.

卷曲螺旋结构及其研究进展

纪兆林¹, 石刘飞¹, 李 健¹, 郝 欣¹, 王金生²

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009; 2. 南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095)

摘要:在众多的结构蛋白和调节蛋白中卷曲螺旋(coiled-coil, CC)是一个共同的、多用途的组装结构域, 具有不同的功能, 包括从大分子复合物的组装到分子识别。本文综述了 CC 结构特点、影响 CC 稳定性和结构特异性的因素、含有 CC 的蛋白种类及其生物学功能、CC 结构预测和分析、CC 的从头设计与合成以及 CC 的应用, 并对未来研究发展方向进行了讨论。

关键词:蛋白质; 卷曲螺旋; α -螺旋; 聚体; 多肽

中图分类号: S432.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0006-06

卷曲螺旋(coiled-coil, CC)是存在于多种天然蛋白质中的一类由 2 股或 2 股以上右手 α -螺旋相互缠绕而形成的平行或反平行左手超螺旋结构的总称^[1]。CC 有典型和非典型 2 种形式, 典型的 CC 是以串联的 7 个氨基酸残基的重复单元(heptad repeat)为基础, 形成两性的右手 α -螺旋分子, 然后再组装形成左手超螺旋束; 而非典型的 α -螺旋 CC 的重复单元的氨基酸残基数不是 7, 也能形成左手或者有规则的超螺旋^[2]。典型的 CC 是本文探讨的范畴。CC 这个简单而有规律的结构在许多不同类别的蛋白质结构与功能的关系上扮演着不可或缺的重要角色^[3-5], 涉及信号传导、分子识别、细胞的稳定和运转以及离子通道^[5-6], 使之成为研究蛋白质折叠、互作、组装、设计以及应用等的理想模型。目前, 人们对 CC 结构的研究已逐渐从对含 CC 蛋白质结构的解析发展到根据天然蛋白 CC 结构来设计合成新的 CC 结构模型, 并通过对其动态折叠过程的研究来探讨这种特殊蛋白质折叠模式的作用及其在工业、生物、医药、农业等领域中的应用。

1 CC 主要结构特点

典型的 CC 结构由 2 股或 2 股以上 α -螺旋链相互缠绕而成, 从而使原有单股 α -螺旋中每圈 3.6 个氨基酸残基变为每圈 3.5 个氨基酸残基, 而且组成 CC 结构的氨基酸每旋转 2 圈形成 1 个循环, 因此形成了由多个 heptad repeat 连接而成的重复序列^[3]。Heptad 中 7 个氨基酸残基依次用 a-b-c-d-e-f-g 表示(图 1), a/d 位多为非极性疏水氨基酸残基^[3,5], 如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等, 特异性地位于 CC 结构的内侧; e/g 位多为极性带电氨基酸, 如赖氨酸、谷氨酸等, 位于 a/d 位氨基酸残基相互作用所形成的疏水核心的外侧^[7-8], 这 4 个位置上的氨基酸残基对于整个 CC 结构的稳定性及特异性的维持均具有重要作用。

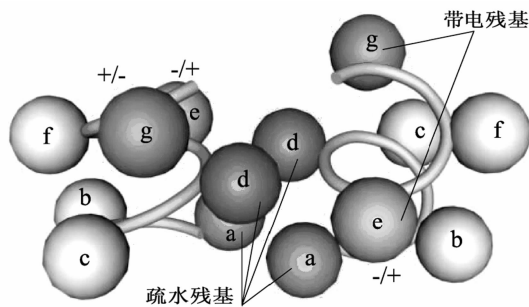


图1 CC中的 7 个氨基酸重复单元

2 影响 CC 稳定性和结构特异性的因素

从热动力学的角度来看, 蛋白质的结构稳定性是指蛋白质分子在去折叠过程中标准自由能的变化情况, 是静电作用、侧链堆积力、氢键、水化作用等共同作用的结果。结构特异性是指蛋白质分子的特异折叠方式, 包括螺旋链的数量、螺旋链的走向及螺旋链的异聚特异性等 3 个方面。

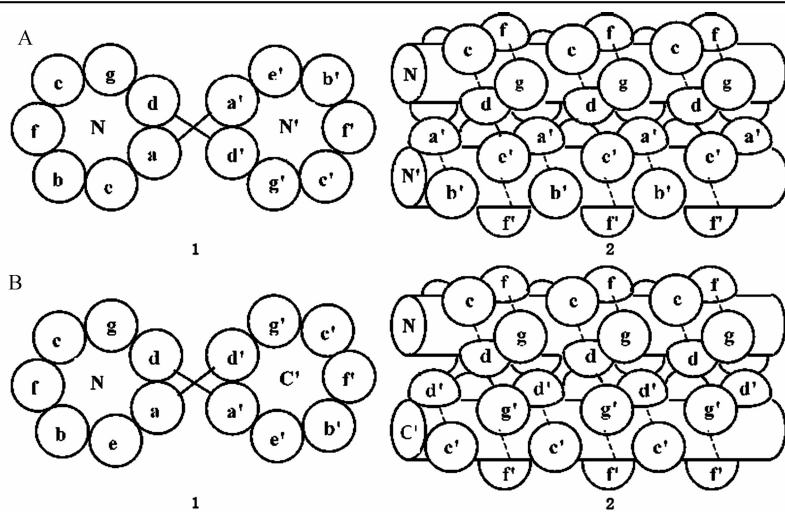
2.1 螺旋链间疏水核心内的相互作用

由于螺旋链的相互缠绕, 使得整个 CC 结构形成 2 个性质不同的区域: 1 个是 CC 内部螺旋链交界面所处的相对疏水的核心区域, 另 1 个是位于 CC 外侧暴露于溶剂中的亲水表面。构成疏水核心结构的是不同螺旋链中的 a/d 位氨基酸残基(图 2), 这些氨基酸残基的侧链基团之间形成的疏水相互作用对促进 CC 的正确折叠和维持其结构稳定性具有重要作用^[9]。天然蛋白质中的 CC 的 a/d 位氨基酸残基平均约有 80% 被疏水性氨基酸残基所占据, 将 a/d 位氨基酸残基全部替换为疏水性氨基酸或用疏水性更强的非天然氨基酸代替, 可得到比天然蛋白质稳定性更强的 CC^[10]。疏水核心内的相互作用对 CC 的结构特异性也有一定的影响。有研究发现, 在双股 CC 中, 缬氨酸、异亮氨酸等具有 β 侧链的氨基酸残基倾向于分布在 a 位, 而亮氨酸则较多地出现于 d 位。若改变这些氨基酸的位置, 则原来的 2 股 CC 将会被破坏而变为 3 股或 4 股 CC^[2]。值得注意的是在疏水核心区域中, a 位置常会有极性氨基酸天冬酰胺的存在, 它会形成分子间的氢键, 对于稳定结构也有很大的作用^[9,11]。

收稿日期: 2013-07-23

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31101475); 扬州大学高层次人才科研启动基金(编号: 0274983014811)。

通信作者: 纪兆林(1978—), 男, 江苏句容人, 博士, 副教授, 主要从事植物病害防控及分子植物病理学研究。E-mail: zhlij@163.com。



A—平行模式； B—反平行模式； 1—上面； 2—侧面

图2 2链平行与反平行的卷曲螺旋结构^[9]

2.2 螺旋链间静电相互作用

CC 中 e/g 位多为带电荷或极性氨基酸残基所占据,这些氨基酸残基的侧链之间形成的静电相互作用对 CC 稳定性和特异性的维持都有重要影响^[2]。天然蛋白质 e/g 位相互作用的氨基酸多为谷氨酸和赖氨酸,它们对 CC 结构稳定性的维持可作出 0.4 ~ 2.1 kJ/mol 的贡献^[12]。蛋白质中静电相互作用对 CC 稳定性的影响还因所处微环境的不同而有所不同,部分无水的微环境可促使链间盐桥的形成,反过来盐桥的形成又降低了疏水核心与极性溶剂环境的接触,这 2 种作用共同维持 CC 结构的稳定性^[13]。将 GCN4 亮氨酸拉链中所有 e/g 位氨基酸分别用丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸、苏氨酸取代,所得突变体可因螺旋链间静电作用的变化而形成同二聚体、高度有序的同寡聚体及不稳定同寡聚体等不同形式^[14]。静电相互作用对 CC 结构特异性最显著的影响表现在对异构化特异性的影响,即倾向于促使多肽链形成异寡聚体而非同寡聚体^[2,15]。

2.3 其他因素

(1) 链内静电相互作用。同一条螺旋链内静电相互作用主要通过改变单链的稳定性来影响整个 CC 的稳定性。将一段由 5 个 heptad 组成的 CC 结构中的 α -谷氨酸用 γ -谷氨酸代替,则 CC 变为无规卷曲,原因是 γ -谷氨酸含有 2 个额外亚甲基,使链内静电相互作用不能正常形成^[16]。(2) 螺旋链的长度。其对 CC 稳定性也有一定的影响,一般由含有相同氨基酸类型的较长螺旋链形成的 CC 稳定性比相对较短的 CC 稳定性更强。(3) 蛋白质所处溶液环境的性质。溶液中离子强度、pH 值、温度和 SDS 都会影响 CC 结构的稳定性和特异性^[17-19]。另外,heptad repeat 中 b、c 位置的氨基酸残基有时对反平行四聚体的稳定也有贡献^[20]。

3 含有 CC 的蛋白种类及其生物学功能

CC 常见于蛋白质的折叠结构中,约占基因组所包含蛋白的 3%,这表明 CC 具有广泛的生物学活性且在复杂的细胞系统中行使着功能^[4]。目前已发现天然 CC 的主要存在形式为由 2 ~ 5 条 α -螺旋链相互缠绕而形成的平行或反平行的同或异寡聚体。在自然界中,CC 是一个介导蛋白质相互作用或形成蛋白质骨架的通用结构域。许多研究表明,尽管构成 CC

的链都是 α -螺旋,但它们之间相互作用的专一性非常高,在多种功能生理途径中发挥重要作用。归结起来,含有 CC 的蛋白质种类及生物学功能可分为以下几个方面:

3.1 分子识别及 DNA 结合蛋白

多种跨膜蛋白的跨膜部分含有 CC 结构,在基因组数据库中,有 20% ~ 30% 的产物被预测为跨膜蛋白^[21],跨膜蛋白折叠和自我组装形成的 CC 聚体在细胞及分子的相互识别和生理功能的实现中起非常重要的作用,如实现跨膜信号的传导等^[22]。SNARE 蛋白在细胞与细胞相互作用时可由来自 2 个特定细胞的 4 条多肽链形成 1 个 CC 异四聚体,从而实现细胞之间的特异性识别。在细胞的 DNA 转录过程中起分子识别作用的多种转录因子也含有 CC 结构,其中含 LZ 的转录因子家族通过 CC 二聚体的形成实现对特定 DNA 分子的识别^[23-24]。

3.2 骨架蛋白和运动蛋白

真核细胞的 3 层细胞骨架成分之一的中间纤维有 1 段很长的 CC 二聚体结构,此结构在细胞的机制整合、细胞分化和运动等过程中发挥着重要作用。与细胞骨架直接作用的运动蛋白有 3 种,即肌球蛋白、驱动蛋白和动力蛋白,这些蛋白主要负责真核细胞重要的运动变化,同时对细胞的繁殖和存活也是至关重要的,而这些功能都与蛋白质分子内或分子间的 CC 结构有直接的关系^[5]。

3.3 糖类结合蛋白

具有糖类亲和力的 CC 蛋白多为三聚体,不易变性,也都具有和糖类结合的糖类识别位点。病毒表面的糖蛋白通常负责与宿主细胞表面受体的辨识与结合以及后续的膜溶合,在病毒感染宿主细胞时具有重要性。病毒表面糖蛋白有许多糖化部位,具有 1 段信号肽以及 1 段跨膜序列,此外也都具有 CC 结构^[23-24]。

3.4 T3SS 泌出蛋白

尽管 G-细菌 III 型泌出系统 (type III secretion system, T3SS) 装置本身在植物或动物病原细菌中是保守的,但其泌出蛋白差异非常大。T3SS 泌出蛋白中存在 2 条或多条 α -螺旋形成的 CC 结构域,而且比率要高于预测平均数。含有 CC 的 T3SS 蛋白结构灵活,从局部结构无序到形成类似球状结构

体,CC 形成和结构无序化的倾向通常是各种功能所必须的,包括蛋白质之间的互作,胞外组分的聚合^[25]。肠道病原细菌 T3SS 分泌的许多 CC 蛋白质中,已知的功能包括分泌识别与调控,胞外结构的组装,以及酶活性等。功能研究累积的证据表明,CC 涉及蛋白亚单位的组装,与多种细菌或寄主蛋白可变通地互作以及转位这些蛋白^[6,26]。值得注意的是,番茄细菌性斑点病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) T3SS 分泌的 15 个效应蛋白^[27],预测分析都不具有 CC 结构特征^[6]。水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*,*Xoo*) T3SS 泌出的 harpin 蛋白 Hpa1Xoo 的 N 端 α -螺旋区域中含有 CC 结构域,CC 域中 3 个 heptad 合成的 N21 多肽能形成二链- α -螺旋-CC(二聚体),能诱导烟草产生过敏性坏死反应(hypersensitive response,HR);而不能形成 CC 的突变体多肽则丧失了 HR 功能,N21 与植物互作产生的 HR 是由 CC 介导的^[28]。同时也发现黄单胞菌(*Xanthomonas* spp.) Hpa1 同源蛋白的 CC 在激发烟草产生 HR 中具有普遍作用,能形成 CC 的 Hpa1(如水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌、大豆斑疹病菌、棉花角斑病菌和柑橘溃疡病菌)能诱导烟草产生强烈的 HR,而不能形成 CC 的 Hpa1(甘蓝黑腐病菌和辣椒斑点病菌)则不能诱导烟草产生 HR^[28]。植物病原细菌 *P. syringae* pv. *pisi* T3SS 泌出的效应蛋白 AvrRps4 能激活依赖抗病基因 *RPS4* 的免疫反应,晶体结构测定表明该蛋白能形成一反平行 CC 二聚体,激发烟草产生 HR 及抗病反应,而不能形成 CC 的突变体仅导致微弱的防卫反应,且不能激发 HR^[29]。

3.5 植物抗病(R)蛋白

植物 R 蛋白的 N 端一般都有 CC 结构域,其在与病原无毒基因产物识别及引发的抗病性中具有重要作用。如水稻 *Pi5* 抗病基因介导了对水稻稻瘟病菌的抗性,研究发现只有在 2 个 CC-NBS-LRR 基因(*Pi5*-1 和 *Pi5*-2)都存在的情况下,才能赋予抗瘟性^[30]。这其中可能涉及这 2 个基因产物间的 CC 互作。拟南芥抗病蛋白 *RPS5* 也属于 CC-NBS-LRR 家族,其被 *P. syringae* 效应蛋白 AvrPphB 介导的 PBS1 蛋白激酶剪切所激活,但在与 PBS1 剪切识别中不起直接作用^[31]。马铃薯 R 蛋白(Rx)CC 中保守域 EDVID 介导了分子内的互作,并且依赖于 Rx 蛋白的另 2 个功能域 NBS 和 LRR,CC 的其他区域也介导了与 Rx 抗性蛋白功能必须的激活蛋

白 RanGTPase 的互作,CC 与 LRR 以识别-依赖的方式共同调控 NBS 域的信号活性^[32]。大麦白粉多态性 R 蛋白(MLA)能特异性识别大麦白粉病菌效应蛋白,并激活下游的信号传导,引发抗病反应,研究发现 MLA 的 CC 结构域形成的同二聚体是一最小的功能模块,在下游免疫信号通路中具有重要作用^[33]。最近研究发现,在焯而不是熵驱动下水稻稻瘟病抗病蛋白 Pi36 中的 CC 结构与甲基茉莉酸进行结合,疏水作用在二者互作中具有重要作用,并介导了下游的信号途径^[34]。

3.6 其他蛋白

铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)能产生一种抗毒素蛋白 Tsi2,其二聚体 CC 能特异性结合其外分泌的毒素效应分子 Tse2,来保护自身^[35]。在拟南芥中发现一种新的特异性 CC 蛋白 MPS1,在细胞减数分裂中具有重要作用,是减数分裂纺锤体组织化所需的蛋白^[36]。最近科研人员从拟南芥中发现 2 种长的 CC 蛋白 PICC 和 PICL,能被病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns,PAMP) flg22 诱导表达,参与 PAMP 激发的免疫防卫反应(PAMP-triggered immunity,PTI)^[37]。最近研究表明,Rho 相关卷曲螺旋形成的蛋白激酶信号通路在调节多种细胞表型和动物疾病模型的凋亡方面起重要作用^[38]。

4 CC 结构的预测与分析

4.1 CC 结构的预测

将已知 CC 结构的氨基酸序列予以列表方式比较,可以得到个别氨基酸在不同位置出现的频率,从而可以预测未知蛋白的 CC 结构。随着越来越多的基因组序列与蛋白质序列的获得,愈来愈多的 CC 结构被解析,以及越来越精准的算法被提出和改进,CC 结构预测的准确度也愈加被接受。表 1 为目前常用以及近年提出的预测 CC 结构及其寡聚体状态的程序及网络链接。将 COILS 和 IUPRED 算法结合起来可以提高 CC 预测的准确性,避免漏掉可能形成 CC 的固有无结构序列^[39]。在 CC 寡聚体预测方面有 PrOCoil^[40]、SCORER 2.0^[41]、Multicoil2^[42]、LOGICOIL^[43]等程式算法,可以辨识平行二聚体、三聚体、四聚体和不含 CC 聚体,LOGICOIL 还可以预测反平行的二聚体。另外,预测的结果还须配合生物化学、生物物理学的试验进行验证。

表 1 预测 CC 结构的程序及其网络链接地址

程序	网络链接地址
COILS	http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html
SOCKET	http://www.lifesci.sussex.ac.uk/research/woolfson/html/coiledcoils/socket/server.html
Paircoil2	http://paircoil2.csail.mit.edu
MARCOIL	http://www.wehi.edu.au/bioweb/Mauro/Marcoil
Multicoil	http://multicoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/multicoil
Multicoil2	http://multicoil2.csail.mit.edu
PrOCoil	http://www.bioinf.jku.at/software/procoil/
SCORER 2.0	http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/Scorer
LOGICOIL	http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/LOGICOIL

4.2 CC 结构的分析

螺旋是 CC 最主要的特征结构,可通过圆二色(circular dichroism,CD)光谱得到快速半定量分析,一般而言 α -螺旋的 CD 光谱在 222 nm 以及 208 nm 2 处波长有明显的吸收信号;可通过改变 pH 值、变温或加入变性试剂、界面活性剂进

行蛋白质折叠与反折叠热力学分析。CC 是 2 个或多个 α -螺旋体交互缠绕而形成的超级螺旋,有分子间作用力与无分子间作用力的 CD 谱会有所不同;前者在 222 nm 与 208 nm 强度的比值($\theta_{222}/\theta_{208}$)约为 1.03 或更大些,后者的比值则约为 0.867 9。自我组装的 CC 多由至少 4 个以上的 heptad

repeat 组成,通常有着很强的交互作用力,变温 CD 测量常发现 CC 的热稳定度在 60°C 以上。CC 结构热稳定度的其他测量仪器还有等温滴定量热仪、热重分析仪或微量扫描热卡计等。而熵、焓或自由能等热力学的参数则常可通过变化一系列的温度、pH 值或蛋白变性试剂的测量得到^[23]。CC 形成的结构有二聚体、三聚体、四聚体或六聚体等不同聚合型式(图 3),为了解聚合分子究竟是以何种特定型式出现,蛋白质凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis)、HPLC/凝胶过滤层析(gel filtration chromatography)以及分析型超速离心(analytic ultracentrifugation, AUC)提供了 3 种供选择的测量分析方法^[44]。此外,利用多角度光散射也能够测定聚合体分子的大小,可与 HPLC 结合作更精准的测量,但是这些物理量的测量都与聚合物的形状有绝对的相关性,也是造成试验误差的主要原因。

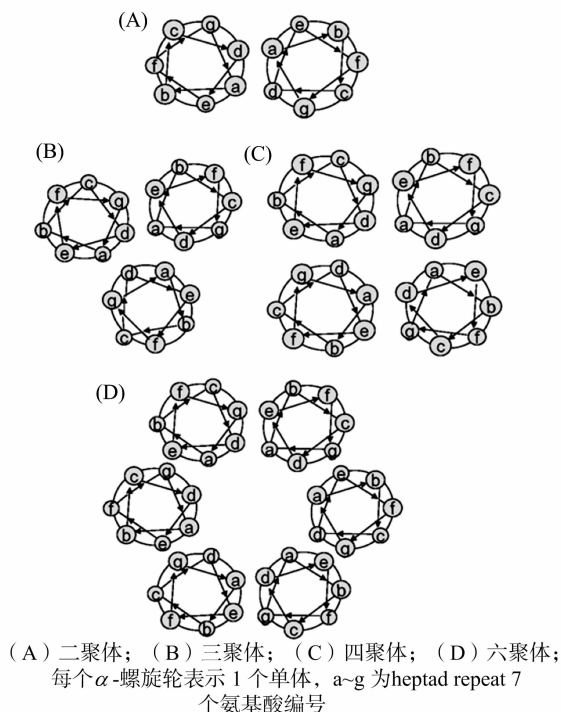


图3 螺旋体相互作用模型示意图^[23]

5 CC 结构的从头设计与合成

蛋白质一级结构决定高级结构理论为蛋白质从头设计提供了重要的理论基础。目前 CC 从头设计与合成已成为研究蛋白质或多肽折叠、稳定性、构象变化及其生物学功能等的有效手段。CC 广泛存在于多种天然蛋白质中,分子结构具有的高度对称性及简单有序的 heptad repeat 等特点而被广泛用作蛋白质模式结构来进行研究。随着固相肽合成技术与细菌蛋白表达系统的建立以及 DNA 重组技术的广泛应用,使得 CC 结构的从头设计、合成得以实施^[45]。CC 多肽的设计主要是基于序列-结构的关联,这些关联信息来自于文献和已知 CC 的 X-射线晶体结构数据库的分析^[44]。基于 CC 的结构特点和蛋白质折叠的基本策略,CC 结构设计应考虑 2 个主要问题:一是多肽链的寡聚状态,如二聚体、三聚体或四聚体;二是螺旋链的走向,即平行或反平行^[46]。

设计像 IZ 这样的二聚体,d 位置大多为亮氨酸,而 a 位置以亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、天冬氨酸、丙氨酸居多,在 e 与 g 位置则是赖氨酸与谷氨酸来提供电荷作用力以辅助稳定结构。就三聚体、四聚体或六聚体的 CC 来说,其疏水核心的空间会比 CC 二聚体更宽阔,疏水性氨基酸侧链在空间上的堆积排列方式可以在同一个平面或是上下交错,这些侧链结构上的旋转异构物是垂直或平行的相互作用,都会影响 CC 共聚结构的差异性^[8-9]。从图 3 可知,当螺旋体单位增加时,e/g 位置与疏水部位核心作用力有关。六聚体的 CC 螺旋体分子间的作用力不仅局限在 a/d 位置的疏水核心,其他位置一定也贡献了不可或缺分子间作用力,要能形成这样的结构,就不难理解在 e/g 位置不带电荷氨基酸出现的理由。最近科研人员根据多肽组分的功能信息构建了在线数据库 Pcomp^[44](<http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/pcomp/>),便于 CC 的从头设计与合成。

6 CC 结构的应用

随着对 CC 结构知识了解和研究的不断深入,人们对其功能的开发和应用也逐渐增多。目前多项基于 CC 研究的应用已被确定并在基础研究、工业、医药等方面得到实施。

6.1 基础研究方面

(1) 用作标签纯化重组蛋白或筛选特异互作受体。先将能形成稳定 CC(同或异二聚体)中一条多肽链结合到新表达蛋白的 C 末端,再将另一条多肽链结合到亲和介质上,这样根据 CC 的稳定形成,实现目标蛋白的一次纯化。也可以据此同时纯化 2 种蛋白,以二聚体方式从层析柱中洗脱^[47]。另外也可以根据 CC 特异性结合筛选出与目标蛋白或多肽能形成 CC 互作的受体分子。(2) 用于分析检测。基于形成稳定互作 CC 二聚体,可以将多肽作为标签,用于 Western-blot 检测^[48]和 ELISA 测试分析^[49]。若在合成的 CC 肽链两端适当进行化学修饰,或在合成时就加入特殊非天然的氨基酸,可将这些 CC 分子固定在纳米级粒子表面或固相平面上,也可作为分析检测用。(3) 利用金属离子络合,调控螺旋状态。在合成时引入能够与金属原子产生络合物的非天然侧链的氨基酸残基,取代原有疏水核心氨基酸,可以利用金属离子直接调控 CC 构型和状态^[23]。如设计合成在金属离子 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 存在下能形成同二聚体的多肽,与相关 DNA 靶标结合后,可以调控靶标上的 *Hind* III 酶切反应^[50]。(4) 膜融合。脂化的 CC 多肽嵌入脂质体膜,能快速可控地诱导靶标膜融合^[51],且通过改变 heptad repeat 数目增加 CC 的稳定性能提高脂质体膜融合速率^[52]。因此 CC 多肽在诸如脂质体融合中具有巨大的应用潜能。

6.2 工业方面

(1) 作为生物传感器。CC 中一条多肽链共价结合到传感器表面,第 2 条多肽链先被某一配体修饰,而要研究的对象恰好是此配体与其相应受体之间的相互作用,此时传感器表面再负载第 2 条链,从而整个 CC 结构起到生物传感器的作用^[46]。设计合成的反平行 CC EPK^[53]具有稳定、快速聚合及相对较缓慢的解聚等特点,使它成为生物传感器应用中的理想模型。利用该原理成功地捕获到 II 型转化生长因子受体的细胞外结构域^[54]。(2) 人造纤维丝材料。根据 CC 单体间交

互作用力的特性,利用合成出来的 CC 多聚体组成一个新的人造蛋白质,或是置取代某个区域,已成功制造出丝状纤维蛋白质^[23]。若再配合蜘蛛丝或蚕丝蛋白的结构区段的适当置换,必将能制造出不同强度和韧度等纤维特性的人造丝材料。

6.3 医药卫生方面

(1)在药物治疗中用作连接体。将设计合成好的能互相形成异二聚体的 2 条肽链分别与一个治疗组分如放射性核素和定靶组分如抗体结合,其中定靶组分首先进入宿主并进行靶位点识别与定位,治疗组分后进入,在体内 2 条肽链的 CC 异二聚化可将药物带到目标附近,此法可以避免药物对正常组织的毒性并提高治疗的特异性和效率^[55-56]。(2)作为多肽疫苗。最新研究表明,形成 CC 的 2 条合成多肽 CoilA 和 CoilB 处理老鼠后能增加其对致病菌肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) O157:H7 和柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*)的免疫能力^[57]。因此,开发相关的 CC 多肽疫苗,具有潜在的应用前景。(3)研制抗病毒制剂。I 型人免疫缺陷病毒与靶细胞的识别、互作、融合通过其衣壳蛋白与靶细胞的膜蛋白之间形成六股 CC 而实现,设计合成了可与靶细胞特异性地形成六股超螺旋的多肽链,从而抑制了病毒对靶细胞的侵袭^[58]。病毒表面糖蛋白与病毒进入宿主细胞时的膜溶合有关,开发病毒蛋白溶合抑制剂一直抗病毒的一种策略,因为病毒表面蛋白在膜溶合时其 CC 结构有一重组的机制,这种机制是建立在 CC 的辨识基础上^[23],因此设计与病毒表面膜溶合的 CC,进而使病毒无法顺利进入宿主细胞,以达到抑制病毒感染的目的。

7 CC 研究的展望

如何从自然界的分子中学习并了解 CC 的结构,并进一步设计制造出具有 CC 的分子结构以满足特殊的需求,应是未来的研究方向。根据已有的知识和目前面临的问题,今后对 CC 结构的理论研究应主要集中在以下几个方面:(1)进一步研究溶液环境对 CC 折叠及结构稳定性及特异性的影响;(2)设计更稳定的 CC 异二聚体和反平行的 CC 同二聚体^[59];(3)对 CC 结构的折叠机理进行研究。

在 CC 应用方面,最具挑战和意义重大的是药物释放传输系统。药物特别是具有细胞毒性的化疗药物,会导致许多严重的副作用,如果绕过健康细胞,直接定点传输到靶标病变细胞,将起到特异性治疗效果。正由于 CC 的独特性能,使它们非常适合在这些系统中使用。CC 的主要功能是形成聚体结构,而且这种蛋白的 N 和 C 端可以很容易地结合到许多抗原表位,再与特定的细胞表面标志物结合,从而创造一个有针对性的药物输送系统。在给药系统中,CC 具有的巨大潜能都得到相关研究的证实^[60],也是今后药物治疗应用的重要发展方向之一。另外,在植物病原菌与寄主植物互作方面,通过对相互识别与作用相关的 CC 蛋白的进一步研究,可为理解病原菌-寄主植物互作机制提供有益帮助,以及为筛选抗病激发子提供理论指导,具有重要的理论研究意义和实际应用价值。

参考文献:

[1]Crick F C. The packing of α -helices:simple coiled coils[J]. Acta

Crystallographica,1953,6:689-697.

- [2]Woolfson D N. The design of coiled-coil structures and assemblies [J]. Advances in Protein Chemistry,2005,70:79-112.
- [3]Lupas A. Coiled coils:new structures and new functions[J]. Trends in Biochemical Sciences,1996,21(10):375-382.
- [4]Wolf E, Kim P S, Berger B. Multi coil:a program for predicting two- and three-stranded coiled coils[J]. Protein Science,1997,6(6):1179-1189.
- [5]Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov S V. Coiled coils;a highly versatile protein folding motif [J]. Trends in Cell Biology, 2001, 11(2):82-88.
- [6]Delahay R M, Frankel G. Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems;a versatile domain revisited [J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(4):905-916.
- [7]Zhou N E, Kay C M, Hodges R S. The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability. De novo designed synthetic two-stranded α -helical coiled-coils [J]. Journal of Molecular Biology, 1994, 237(4):500-512.
- [8]Yu Y B. Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54(8):1113-1129.
- [9]Oakley M G, Kim P S. A buried polar interaction can direct the relative orientation of helices in a coiled coil [J]. Biochemistry, 1998, 37(36):12603-12610.
- [10]Tang Y, Ghirlanda G, Vaidehi N, et al. Stabilization of coiled-coil peptide domains by introduction of trifluoroisoleucine [J]. Biochemistry, 2001, 40(9):2790-2796.
- [11]Zeng X, Herndon A M, Hu J C. Buried asparagines determine the dimerization specificities of leucine zipper mutants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(8):3673-3678.
- [12]Krylov D, Barchi J, Vinson C. Inter-helical interactions in the leucine zipper coiled coil dimer:pH and salt dependence of coupling energy between charged amino acids [J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 279(4):959-972.
- [13]Lear J D, Gratkowski H, Adamian L, et al. Position-dependence of stabilizing polar interactions of asparagine in transmembrane helical bundles [J]. Biochemistry, 2003, 42(21):6400-6407.
- [14]Zeng X, Zhu H, Lashuel H A, et al. Oligomerization properties of GCN4 leucine zipper e and g position mutants [J]. Protein Science, 1997, 6(10):2218-2226.
- [15]Lavigne P, Kondejewski L H, Houston M E, et al. Preferential heterodimeric parallel coiled-coil formation by synthetic Max and c-Myc leucine zippers;a description of putative electrostatic interactions responsible for the specificity of heterodimerization [J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 254(3):505-520.
- [16]Yu Y B, Wagschal K C, Mant C T, et al. Trapping the monomeric α -helical state during unfolding of coiled-coils by reversed-phase liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography a, 2000, 890(1):81-94.
- [17]Yu Y, Monera O D, Hodges R S, et al. Ion pairs significantly stabilize coiled-coils in the absence of electrolyte [J]. Journal of Molecular Biology, 1996, 255(3):367-372.
- [18]Schnarr N A, Kennan A J. pH-triggered strand exchange in coiled-coil heterotrimers [J]. Journal of the American Chemical

- Society, 2003, 125 (21) : 6364 – 6365.
- [19] Meng F G, Zeng X, Hong Y K, et al. Dissociation and unfolding of GCN4 leucine zipper in the presence of sodium dodecyl sulfate[J]. Biochimie, 2001, 83 (10) : 953 – 956.
 - [20] Ramos J, Lazaridis T. Computational analysis of residue contributions to coiled – coil topology[J]. Protein Science, 2011, 20 (11) : 1845 – 1855.
 - [21] 张莹, 徐晓燕, 李娟, 等. α – 螺旋跨膜蛋白拓扑结构预测方法的评价[J]. 生物信息学, 2012, 10 (4) : 259 – 263.
 - [22] 左利民, 康艳晶, 罗施中. α – 螺旋跨膜蛋白的折叠和自组装[J]. 科学通报, 2010, 55 (15) : 1426 – 1437.
 - [23] 何愈, 邹德里. 蛋白质螺旋状螺旋折叠区段的介绍[J]. Chemistry: the Chinese chem soc, Taipei, 2005, 63 (2) : 269 – 280.
 - [24] Harbury P B, Zhang T, Kim P S, et al. A switch between two –, three –, and four – stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants[J]. Science, 1993, 262 (5138) : 1401 – 1407.
 - [25] Gazi A D, Charova S N, Panopoulos N J, et al. Coiled – coils in type III secretion systems: structural flexibility, disorder and biological implications[J]. Cellular Microbiology, 2009, 11 (5) : 719 – 729.
 - [26] Pallen M J, Dougan G, Frankel G. Coiled – coil domains in proteins secreted by type III secretion systems[J]. Molecular Microbiology, 1997, 25 (2) : 423 – 425.
 - [27] Guttman D S, Vinatzer B A, Sarkar S F, et al. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*[J]. Science, 2002, 295 (5560) : 1722 – 1726.
 - [28] Ji Z, Song C, Lu X, et al. Two coiled – coil regions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* harpin differ in oligomerization and hypersensitive response induction[J]. Amino Acids, 2011, 40 (2) : 381 – 392.
 - [29] Sohn K H, Hughes R K, Piquerez S J, et al. Distinct regions of the *Pseudomonas syringae* coiled – coil effector AvrRps4 are required for activation of immunity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109 (40) : 16371 – 16376.
 - [30] Lee S K, Song M Y, Seo Y S, et al. Rice *Pi5* – mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled – coil – nucleotide – binding – leucine – rich repeat genes[J]. Genetics, 2009, 181 (4) : 1627 – 1638.
 - [31] Qi D, DeYoung B J, Innes R W. Structure – function analysis of the coiled – coil and leucine – rich repeat domains of the RPS5 disease resistance protein[J]. Plant Physiology, 2012, 158 (4) : 1819 – 1832.
 - [32] Rairdan G J, Collier S M, Sacco M A, et al. The coiled – coil and nucleotide binding domains of the potato Rx disease resistance protein function in pathogen recognition and signaling[J]. The Plant Cell, 2008, 20 (3) : 739 – 751.
 - [33] Maekawa T, Cheng W, Spiridon L N, et al. Coiled – coil domain – dependent homodimerization of intracellular barley immune receptors defines a minimal functional module for triggering cell death[J]. Cell Host & Microbe, 2011, 9 (3) : 187 – 199.
 - [34] Liu X Q, Zhang D, Zhang X M, et al. Study on the interaction between methyl jasmonate and the coiled – coil domain of rice blast resistance protein Pi36 by spectroscopic methods[J]. Spectrochimica Acta, 2012, 88: 72 – 76.
 - [35] 王维, 丁璟肆, 王大成. 绿脓杆菌特有的 Tsi2 三维结构 – 一种全新卷曲螺旋构象的类抗毒素蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39 (7) : 640 – 646.
 - [36] Jiang H, Wang F F, Wu Y T, et al. MULTIPOLAR SPINDLE 1 (MPS1), a novel coiled – coil protein of *Arabidopsis thaliana*, is required for meiotic spindle organization[J]. The Plant Journal, 2009, 59 (6) : 1001 – 1010.
 - [37] Venkatakrishnan S, Mackey D, Meier I. Functional investigation of the plant – specific long coiled – coil proteins PAMP – INDUCED COILED – COIL (PICC) and PICC – LIKE (PICL) in *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS One, 2013, 8 (2) : e57283.
 - [38] 刘天德, 袁荣发, 邵江华. Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶与细胞凋亡[J]. 广东医学, 2013, 34 (2) : 307 – 309.
 - [39] Szappanos B, Stüveges D, Nyitrai L, et al. Folded – unfolded cross – predictions and protein evolution: the case study of coiled – coils[J]. FEBS Letters, 2010, 584 (8) : 1623 – 1627.
 - [40] Mahrenholz C C, Abfalter I G, Bodenhofer U, et al. Complex networks govern coiled – coil oligomerization—predicting and profiling by means of a machine learning approach[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2011, 10 (5) : M110.004994.
 - [41] Armstrong C T, Vincent T L, Green P J, et al. SCORER 2.0: an algorithm for distinguishing parallel dimeric and trimeric coiled – coil sequences[J]. Bioinformatics, 2011, 27 (14) : 1908 – 1914.
 - [42] Trigg J, Gutwin K, Keating A E, et al. Multicoil2: predicting coiled coils and their oligomerization states from sequence in the twilight zone[J]. PLoS One, 2011, 6 (8) : e23519.
 - [43] Vincent T L, Green P J, Woolfson D N. LOGICOIL—multi – state prediction of coiled – coil oligomeric state[J]. Bioinformatics, 2013, 29 (1) : 69 – 76.
 - [44] Fletcher J M, Boyle A L, Bruning M, et al. A basis set of de novo coiled – coil peptide oligomers for rational protein design and synthetic biology[J]. ACS Synthetic Biology, 2012, 1 (6) : 240 – 250.
 - [45] Ogiwara N L, Weiss M S, Degradó W F, et al. The crystal structure of the designed trimeric coiled coil – ValD: implications for engineering crystals and supramolecular assemblies[J]. Protein Science, 1997, 6 (1) : 80 – 88.
 - [46] 魏香, 曾宪纲, 周海梦. 蛋白质结构中卷曲螺旋的研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20 (5) : 565 – 571.
 - [47] Fernandez – Rodriguez J, Marlovits T C. Induced heterodimerization and purification of two target proteins by a synthetic coiled – coil tag[J]. Protein Science, 2012, 21 (4) : 511 – 519.
 - [48] Boucher C, St – Laurent G, Jolicoeur M, et al. Protein detection by Western blot via coiled – coil interactions[J]. Analytical Biochemistry, 2010, 399 (1) : 138 – 140.
 - [49] Liberelle B, Bartholin L, Boucher C, et al. New ELISA approach based on coiled – coil interactions[J]. Journal of Immunological Methods, 2010, 362 (1 – 2) : 161 – 167.
 - [50] Murase S, Ishino S, Ishino Y, et al. Control of enzyme reaction by a designed metal – ion – dependent α – helical coiled – coil protein[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2012, 17 (5) : 791 – 799.
 - [51] Versluis F, Voskuhl J, van Kolck B, et al. *In situ* modification of plain liposomes with lipidated coiled coil forming peptides induces membrane fusion[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135 (21) : 8057 – 8062.
 - [52] Zheng T, Voskuhl J, Versluis F, et al. Controlling the rate of coiled coil driven membrane fusion[J]. Chemical Communications, 2013, 49 (35) : 3649 – 3651.