

脊椎动物 Cyclophilin A 肽基脯氨酰顺反异构酶活性及遗传变异分析

任丽倩^{1,2}, 刘薇^{1,3}, 李文博^{1,3}, 刘文军^{1,3}, 孙蕾^{1,3}

1. 中国科学院微生物研究所, 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;
2. 安徽大学生命科学学院, 合肥 230039;
3. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: Cyclophilin A (简称 CypA) 由 *PPIA* (Peptidylprolyl isomerase A) 基因编码, 是典型的 Cyclophilin 家族蛋白, 具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性, 在蛋白质的折叠和转运、信号转导、炎症、免疫调节、细胞凋亡及病毒复制等生物学过程中发挥着重要作用。本研究重点探讨了不同脊椎动物 CypA 的肽基脯氨酰顺反异构酶活性及其遗传变异。根据 GenBank 数据库 *PPIA* 基因的序列信息, 克隆了脊椎动物的 *PPIA* 基因并构建其原核表达载体, 其中鼠耳蝠 (*Myotis davidi*) 和绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*) 的 *PPIA* 基因序列为首次报道。利用大肠杆菌表达 GST-CypA 融合蛋白并进行亲和层析, 切除 GST 标签后再进行分子筛层析, 获得纯化的 CypA 蛋白。利用胰凝乳蛋白酶偶联法测定 CypA 的肽基脯氨酰顺反异构酶活性, 发现 12 种脊椎动物 CypA 的肽基脯氨酰顺反异构酶活性无显著差异。同时, 通过一系列遗传变异和分子进化分析, 发现 12 种脊椎动物 CypA 的酶活位点、CsA 结合位点等重要功能域的氨基酸序列完全一致, 而且其结构和在染色体中的基因定位也非常保守。研究结果表明, 脊椎动物 CypA 的关键功能域高度保守, 这是 CypA 维持其酶活及生物学功能的有力保障。

关键词: 脊椎动物; Cyclophilin A; 肽基脯氨酰顺反异构酶; 分子进化

Peptidylprolyl *cis/trans* isomerase activity and molecular evolution of vertebrate Cyclophilin A

Liqian Ren^{1,2}, Wei Liu^{1,3}, Wenbo Li^{1,3}, Wenjun Liu^{1,3}, Lei Sun^{1,3}

1. CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
2. School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Peptidylprolyl isomerases (PPIase) cyclophilin A (CypA, encoded by *PPIA*) is a typical member of the Cyclophilin family and is involved in protein folding/translocation, signal transduction, inflammation, immune system regulation, apoptosis and virus replication. In the present study, we investigated the PPIase activity and genetic variation of vertebrate CypA. According to the GenBank reference sequences, vertebrate *PPIA* genes were cloned, among which the bat

收稿日期: 2016-04-07; 修回日期: 2016-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31472178, 81271849)和国家科技支撑计划项目(编号: 2015BAD11B02)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31472178, 81271849) and the National Key Technology Support Program (No. 2015 BAD11B02)]

作者简介: 任丽倩, 硕士, 专业方向: 微生物学。E-mail: mengxunlq@163.com

通讯作者: 孙蕾, 博士, 副研究员, 研究方向: 病原微生物与免疫学。E-mail: sunlei362@im.ac.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.15-523

网络出版时间: 2016/6/1 9:12:13

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160601.0912.002.html>

(*Myotis davidi*) and duck (*Anas platyrhynchos*) PPIA genes were reported for the first time. Then PPIA genes were sub-cloned into the expression vector pGEX-6p-1 and expressed in *Escherichia coli*. Recombinant CypA proteins were purified by using sepharose 4B affinity chromatography and the GST tag was cleaved, followed by gel filtration. The PPIase activity assay indicated that there was no significant difference in the catalytic activity of prolyl peptide bond isomerization among 12 different vertebrate CypA proteins. In addition, the genetic variation and molecular evolution analysis showed that these vertebrate CypA proteins had the same CsA binding site and the PPIase active sites. Furthermore, the predicted structure and gene localization were remarkable conserved. Our data suggested that the important residues of CypA were highly conserved, which is crucial for its PPIase activity and cellular functions.

Keywords: vertebrate; Cyclophilin A; peptidylprolyl *cis/trans* isomerase; molecular evolutiontext

Cyclophilin A(CypA)是 Cyclophilin 家族的代表性成员, 具有肽基脯氨酰顺反异构酶(Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase, PPIase)活性, 是作为免疫抑制剂 CsA 的细胞内受体被发现的。CypA 能够与 CsA 形成复合物, 再与钙调神经磷酸酶结合, 在转录水平阻断淋巴细胞活化^[1]。除此之外, CypA 还参与折叠和转运、信号转导、炎症、免疫调节、细胞凋亡等生物学过程^[2-5]。近年来越来越多的研究发现, CypA 在多种病毒复制过程中都有调控作用。例如, CypA 在人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)^[6,7]、乙肝病毒(HCV)^[8,9]、人乳头瘤病毒(HPV)^[10]的复制过程中起正调控作用, 而在 A 型流感病毒^[11-13]、轮状病毒(RV)^[14]、肠道病毒 71 型(EV71)^[15]以及传染性法氏囊病毒(IBDV)^[16]的复制过程中起负调控作用, 其作用机理各不相同, 显示出 CypA 功能的重要性、复杂性, 以及调控方式的多样性。

目前已经发现和克隆了 130 多种 Cyclophilin 的异构体, 根据来源不同可大致分为: 脊椎动物、无脊椎动物、其他后生动物、植物、真菌及原核生物等 6 个亚族。作为 Cyclophilin 家族中分布最广的成员, CypA 在植物、细菌、真菌、昆虫和哺乳动物中均有存在, 广泛分布于不同种属的各组织器官中。1984 年 Fischer 等^[17]首次从牛胸腺细胞中提取到 CypA, 随后 Fischer 等^[18]、Takahashi 等^[19]从猪肾皮质中分离到 CypA, 兔源、鼠源 CypA^[20]也相继被发现。Shieh 等^[21]从果蝇(*Drosophila melanogaster*)中分离到 PPIA 的同系物 *ninaA* 基因, 其具有 PPIase 酶活性, 参与 T 淋巴细胞的激活。从大肠杆菌(*Escherichia coli*)中分离的异构酶与免疫抑制剂 CsA 结合力弱于真核生物的 CypA, 这是因为大肠杆菌缺少一个在真核生物 CypA 中高度保守的色氨酸^[22]。

目前, 几种 Cyclophilin 的晶体结构已被解析。根据可变长度的氨基酸片段位于与 α 螺旋连接的环(Loop)内或是位于与 α 折叠连接的环内, 可将脊椎动物的 Cyclophilin 蛋白分为两类: 单环 Cyclophilin 和多环 Cyclophilin。与脊椎动物 Cyclophilin 相比, 真菌和原核生物的 Cyclophilin 不但氨基酸序列呈现多样性, 有的甚至还涉及结构上的变化。人源 CypA 基因由 500 bp 左右的核苷酸序列组成, 编码含 165 个氨基酸的蛋白质, 分子量约为 18 kDa, 等电点为 7.68。人源 CypA 是由 8 组反向平行的 β 折叠和两组 α 螺旋形成一个桶状结构。其中 7 个芳香基和疏水残基形成一个严紧的疏水口袋, 环孢素 CsA 结合于此口袋中。从赖氨酸 118 位到组氨酸 126 的环状结构, 加上 4 个 β 折叠($\beta 3-\beta 4$)是环孢素 CsA 的结合位点^[23]。

越来越多的 CypA 新功能正在被逐步发现, 引起众多研究者的重视。然而, 不同脊椎动物 CypA 的序列和结构在进化过程中发生了哪些变化? 这些变化能否导致不同物种 CypA 的肽基脯氨酰顺反异构酶活性及其功能的差异? 目前这些问题尚不清楚。本研究重点对不同脊椎动物 CypA 的肽基脯氨酰顺反异构酶活性和遗传变异进行分析, 以期 CypA 的功能研究提供其酶活及遗传变异方面的理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和载体

大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)为本实验室保存菌株; 原核表达载体 pGEX-6p-1 由本实验室保存; 表达人 CypA 及其突变体的原核表达载体 pGEX-6p-1-CypA 和 pGEX-6p-1-R55A 由本实验室保存; 克隆载体 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 细胞和组织

牛肾(Madin-Darby bovine kidney, MDBK)细胞、犬肾(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞、猫肾(Crandell Rees feline kidney, CRFK)细胞、鼠耳蝠肾(Myotis davidii kidney)细胞由本实验室保存;动物肝组织分别购自北京市场的家猪(*Sus domesticus*)、家兔(*Oryctolagus cuniculus*)、绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)、原鸡(*Gallus gallus*)、牛蛙(*Rana catesbeiana*)、鲫鱼(*Carassius auratus*),实验用小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司。

1.3 引物设计与合成

本实验室前期已经克隆了人 *PPIA* 基因^[11]。根据 GenBank 数据库不同物种 *PPIA* 基因的序列,利用 Primes 5.0 设计扩增 11 种不同脊椎动物 *PPIA* 基因的引物(表 1),两端加限制性酶切位点。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 RNA 提取

取家猪、小鼠、家兔、绿头鸭、原鸡、牛蛙、

鲫鱼的肝组织各约 100 mg,于研钵中剪碎,加液氮迅速研磨成粉末,加 1 mL Trizol(Invitrogen),或将 Trizol 直接加入细胞培养皿中,收取牛、犬、猫和鼠耳蝠肾细胞的裂解液,混匀后室温放置 15 min,使组织或细胞充分裂解,12 000 r/min 离心 10 min;将上清移入到新的 1.5 mL RNase-free 离心管中,加 200 μ L 氯仿,剧烈混匀 15 s,室温静置 10 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min,离心 15 min;转移水相到新管,按 1:1 比例加入异丙醇,室温温育 10 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min;弃上清,加 1 mL 75%乙醇,洗涤沉淀,4 $^{\circ}$ C 8000 r/min 离心 5 min;弃上清,室温晾干,用 30 μ L DEPC 水溶解 RNA 沉淀,即得总 RNA。

1.5 基因克隆

以组织或细胞 RNA 为模板,用 SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen)进行反转录,步骤参照产品说明书。然后以 cDNA 为模板,用表 1 中的引物 PCR 扩增 11 种不同脊椎动物的 *PPIA* 基因。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,47~60 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;

表 1 扩增脊椎动物 *PPIA* 基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of vertebrate *PPIA* genes used in this study

物种	参照基因的 GenBank 登录号	引物序列(5' 3')
家猪(<i>Sus domesticus</i>)	NM_214353.1	F: ACAGGATCCATGGTCAACCCCACCGT R: TCACTCGAGTTAGATTTGTCCACAGT
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	NM_008907.1	F: ACAGGATCCATGGTCAACCCCACCGTGT R: TCACTCGAGTTAGAGCTGTCCACAGTCGGA
鼠耳蝠(<i>Myotis davidi</i>)	NM_021130.4	F: ACAGGATCCATGGTCAACCCCACCGT R: CACTCGAGTTATTCGAGTTGTCCACAGT
家牛(<i>Bos Taurus</i>)	NM_178320.2	F: ACAGGATCCATGGTCAACCCCACC R: ATAAGAATGCGCCGCTCAGCAATGGTGA
家兔(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	NM_001082057.1	F: ACAGGATCCATGGTCAACCCC R: TCACTCGAGTTAGAGTTGTCCACAGTT
家犬(<i>Canis lupus familiaris</i>)	XM_532723.3	F: ACAGGATCCATGGTCAACCCCAC R: TCACTCGAGTCAGATCTGTCCACAGT
家猫(<i>Felis catus</i>)	NM_001009370	F: ACAGGATCCATGGTCAACCCCAT R: TCACTCGAGTTAGATTTGTCCACAGT
绿头鸭(<i>Anas platyrhynchos</i>)	NM_001166326.1	F: ACAGGATCCATGGCCAACCCCCT R: TCACTCGAGTTACGAGAGCTGCCCGC
原鸡(<i>Gallus gallus</i>)	NM_001166326.1	F: ACAGGATCCATGGCCAACCCCCT R: TCACTCGAGTTACGAGAGCTGCCCGC
牛蛙(<i>Rana catesbeiana</i>)	NM_203544.1	F: ACAGGATCCATGGCTTTACCCAGGGT R: TCACTCGAGTTAAAGCTGACCACAGTT
鲫鱼(<i>Carassius auratus</i>)	NM_212758.1	F: AAGAATTCATGGCAAGGCCCAAAGT R: TCACTCGAGATATTACAGCTGGCCA

最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经电泳后,回收目的片段。目的片段克隆到质粒 pMD18-T 中,经酶切鉴定正确后由上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

1.6 原核表达载体的构建

分别将含不同脊椎动物 *PPIA* 基因的克隆载体质粒与原核表达载体质粒 pGEX-6p-1 进行双酶切,其中含家牛 *PPIA* 基因的质粒用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切,鲫鱼 *ppia* 基因的质粒用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切,其余均经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,用连接酶连接到载体中;酶切提取的质粒,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆并进行测序鉴定。

1.7 GST 融合蛋白的表达

分别将包括人 *PPIA* 基因及其突变体(R55A)的 12 种脊椎动物 *PPIA* 基因的原核表达载体转化大肠杆菌,表达菌接种于 200 mL 氨苄抗性的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养;当细菌生长到 *OD* 值约为 0.6~0.8 时加入终浓度为 0.25 mmol/L 的 IPTG,37℃ 诱导培养过夜;收集菌体,4500 r/min 离心 10~15 min,弃上清,PBS 冲洗沉淀,将菌体重悬于 10 mL PBS 中;超声破碎,4℃、12 000 r/min 离心 15 min,收集上清;进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,检测蛋白表达情况。

1.8 GST 融合蛋白的亲亲和层析和标签切除

用 5 个柱体积的 1×PBS 缓冲溶液平衡柱子;将菌体裂解后收集的上清加入 GST 柱子(GE Healthcare)中,4℃ 结合 2 h;用 20~30 个柱体积的 1×PBS 冲洗柱子,除去非特异性结合的杂蛋白;2 个柱体积的 1×cleavage buffer 处理填料;将已纯化的蛋白置于 5 mL 1×cleavage buffer 中,每 1 mg 蛋白中加入 10 μL(20 U)的 Prescissors Protease,4℃ 酶切过夜;收集穿透液,3 kDa 超滤管超滤,浓缩蛋白。

1.9 蛋白的分子筛层析

用 UNICORN 软件进入 AKTA 系统。用水洗 A 泵,设置层析柱的压力上限(不超过 1.0 MPa)及适当的流速;将 Superdex 200 TM 层析柱(GE Healthcare)与 FPLC 连接;用至少 1 个柱体积的水冲洗层析柱后,至少 1 个柱体积的缓冲溶液平衡层析柱;将方法 1.8 中收集的样品于 4℃、12 000 r/min 离心

15 min;在 Load 状态下通过上样环上样;在 Inject 状态下样品进入系统,并在 2 mL 时调回 Load 状态;根据吸收值的变化,收集吸收峰下的蛋白;用至少 1 柱体积的水平平衡柱子,用 20%乙醇冲洗层析柱,并于 4℃ 保存;进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,检测蛋白纯化效果。

1.10 PPIase 酶活测定

反应体积为 1 mL,首先将 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0, 930 μL)和 200 μmol/L α-糜蛋白酶(50 μL)混合,0℃ 预平衡 10 min 以达到热平衡;加入 1 μmol/L CypA 蛋白(10 μL);5 min 后,加入 7.8 mmol/L 四肽底物 uccinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilide(10 μL),迅速混合引发反应;用分光光度计记录 390 nm 处吸光值在 40 s 内的变化,整个实验过程温度需控制在 0℃^[24]。

1.11 序列及结构分析

使用生物信息学工具对序列进行拼接、校正和系统分析,利用 CLUSTAL W version 2.0 对不同脊椎动物 CypA 进行氨基酸多重序列比对。二级结构借助 ESPript server (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>)进行分析。根据已解析的人源 CypA 蛋白(PDB ID: 3K0N)结构,利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)预测不同脊椎动物 CypA 蛋白的 3D 结构模型,构建的模型在 Pymol (<http://www.pymol.org>)中得以显示。

1.12 系统进化树构建

为分析不同物种 CypA 的分子进化,从 GenBank 数据库下载 24 个从细菌到哺乳动物的 CypA 氨基酸序列,利用 MEGA v4.0 的 Poisson correction 模型构建进化树。

2 结果与分析

2.1 *PPIA* 的克隆及编码蛋白 CypA 的理化特性

本文克隆了除人之外的 11 种脊椎动物的 *PPIA* 基因,其中鼠耳蝠(GenBank 序列号: KJ808825)和绿头鸭(GenBank 序列号: KJ808826)的 *PPIA* 基因及其序列为首次报道。脊椎动物的 *PPIA* 基因编码的 CypA 蛋白由 162~165 个氨基酸组成,分子量为

17~18 kDa, 其中人 *PPIA* 基因分子量最大, 鲫鱼 *ppia* 基因分子量最小。此外预测的不同脊椎动物 *PPIA* 基因的等电点、脂溶指数、平均亲水性差异不大, 而牛蛙和鲫鱼的 *ppia* 不稳定性高于其他物种(表 2)。

2.2 CypA 蛋白的表达、纯化及 PPIase 酶活测定

本实验室前期已经构建了表达人 CypA 蛋白及其突变体的原核表达载体 pGEX-6p-1-CypA 和 pGEX-6p-1-R55A^[11], 将 11 种脊椎动物 *PPIA* 基因克隆入原核表达载体 pGEX-6p-1, 进行 CypA 蛋白的表达与纯化。脊椎动物 CypA 蛋白均呈可溶性表达, 且表达量很高。利用 Glutathion sepharose 4B 进行亲和层析, 切除 GST 标签后再进行分子筛层析, 获得纯化的 CypA 蛋白(图 1A)。用 Bradford 法测定蛋白质浓度后, 取等量纯化的 12 种脊椎动物 CypA 及人的 R55A 突变体蛋白进行 PPIase 酶活测定, 同时设空白对照, 发现不同脊椎动物 CypA 蛋白的 PPIase 酶活无显著差异, 而当酶活位点 R55A 突变时, 酶的活性基本丧失(图 1B)。

2.3 序列及结构分析

氨基酸序列比对结果显示, 不同脊椎动物 CypA 蛋白一级、二级结构高度保守, 其中酶活位点、CsA 结合位点的氨基酸序列完全一致(图 2), 该结果与酶活测定结果相符。利用 DNASTar 软件分析不同脊椎动物且该区域在不同物种 CypA 蛋白中序列差异较大,

进一步说明不同物种在进化过程中形成了各自的抗原特性。

氨基酸序列相似性分析结果显示(图 3, 左下), 哺乳动物 CypA 蛋白氨基酸序列与人源 CypA 蛋白相似性高于 96%, 新发现的鼠耳蝠 CypA 蛋白氨基酸序列与人源 CypA 蛋白具有较高的相似性, 为 98.2%, 家猪 CypA 蛋白氨基酸序列与人源 CypA 蛋白相似性最高, 为 98.8%; 禽类 CypA 蛋白氨基酸序列与人源 CypA 蛋白相似性约为 90%, 其中首次分离到的绿头鸭 CypA 蛋白氨基酸序列与人源 CypA 蛋白相似性为 91.5%; 牛蛙、鲫鱼的 CypA 蛋白氨基酸序列与人源 CypA 蛋白相似性较低, 分别为 76.8%、73.8%。

核苷酸序列相似性分析结果显示(图 3, 右上), 哺乳动物 *PPIA* 基因核苷酸序列与人源 *PPIA* 基因相似性高于 89%, 新发现的鼠耳蝠 *PPIA* 基因核苷酸序列与人源 *PPIA* 基因相似性最高, 为 99.4%; 禽类 *PPIA* 基因核苷酸序列与人源 *PPIA* 基因相似性约为 80%, 其中绿头鸭 *PPIA* 基因核苷酸序列与人源 *PPIA* 基因相似性为 82.4%; 牛蛙、鲫鱼的 *ppia* 基因核苷酸序列与人源 *PPIA* 基因相似性较低, 约为 69%。

根据已解析的人源 CypA 蛋白的 3D 结构对不同脊椎动物 CypA 蛋白的 3D 结构进行预测。由于鼠耳蝠的 CypA 为首次报道, 且与人 CypA 蛋白的序列相似性较高, 而牛蛙与人 CypA 蛋白的序列差异

表 2 脊椎动物 CypA 的理化特性

Table 2 Physicochemical properties of CypA

物种	氨基酸数量 (aa)	分子量(Da)	等电点	不稳定指数	脂溶指数	平均亲水系数
人(<i>Homo sapiens</i>)	165	18012.4	7.68	10.65	61.45	-0.316
家猪(<i>Sus domesticus</i>)	164	17869.3	8.34	10.23	61.83	-0.293
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	164	17971.3	7.73	14.42	59.45	-0.385
鼠耳蝠(<i>Myotis davidi</i>)	164	17857.3	8.68	13.51	57.68	-0.359
家牛(<i>Bos Taurus</i>)	162	17642.0	8.43	12.61	60.19	-0.325
家兔(<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	164	17837.2	6.96	9.01	61.83	-0.274
家犬(<i>Canis lupus familiaris</i>)	164	17968.4	8.68	10.23	61.83	-0.318
家猫(<i>Felis catus</i>)	164	17870.4	7.68	11.50	64.21	-0.226
绿头鸭(<i>Anas platyrhynchos</i>)	165	17826.2	8.28	11.46	60.30	-0.284
原鸡(<i>Gallus gallus</i>)	165	17810.2	8.28	11.28	62.67	-0.233
牛蛙(<i>Rana catesbeiana</i>)	164	17798.4	8.87	20.01	69.57	-0.176
鲫鱼(<i>Carassius auratus</i>)	164	17510.9	7.61	21.13	64.76	-0.162

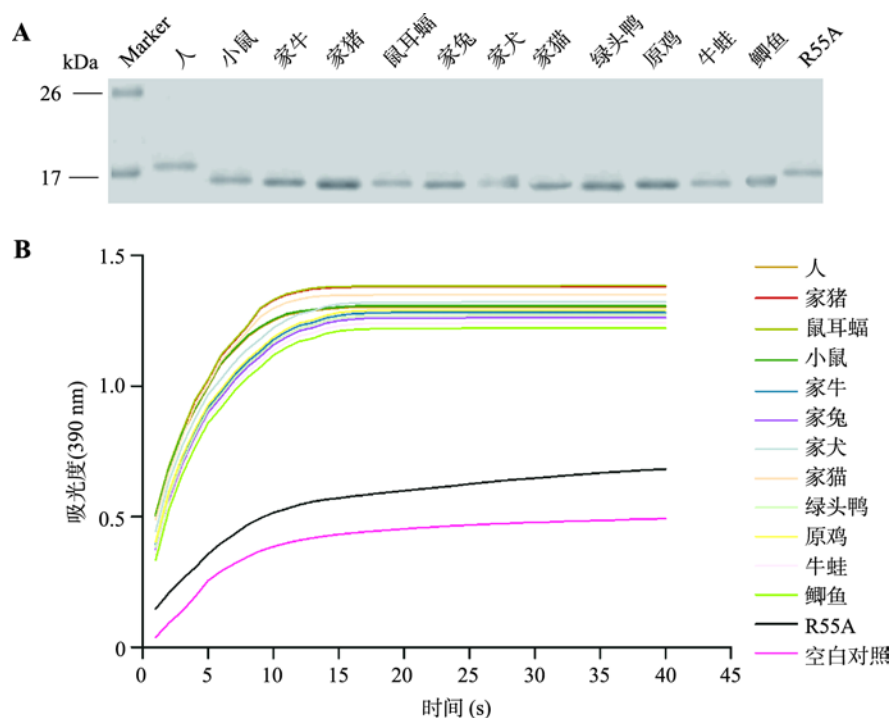


图 1 纯化的脊椎动物 CypA 蛋白及其 PPIase 酶活测定

Fig. 1 Purified vertebrate CypAs and the PPIase activity

A: 去除 GST 标签后纯化的脊椎动物 CypA 蛋白; B: 脊椎动物 CypA 蛋白的 PPIase 酶活测定。

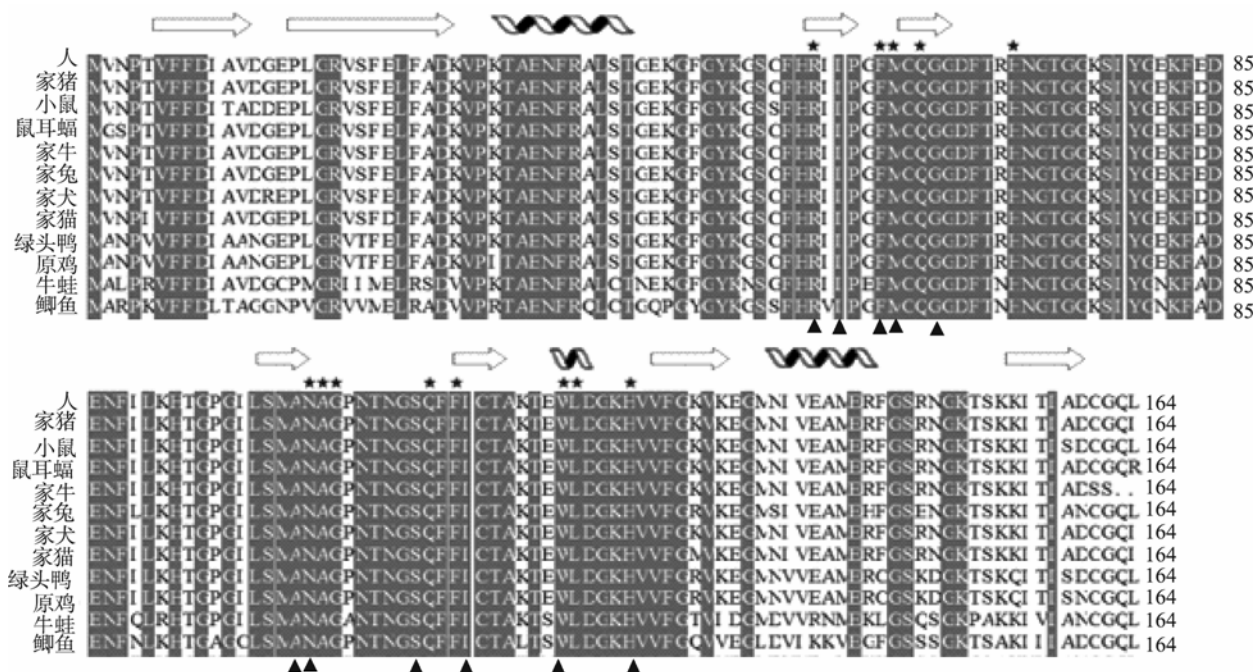


图 2 脊椎动物 CypA 蛋白的氨基酸序列比较

Fig. 2 Multiple sequence alignment of vertebrate CypA proteins

完全保守的序列位点用灰色阴影显示, 肽基脯氨酰顺反异构酶关键活性位点氨基酸用“*”标示, CsA 结合的氨基酸残基用“▲”标示, α 螺旋用“ α ”标示, β 折叠用“ β ”标示。

核苷酸相似性													氨基酸相似性	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
	92.4	99.4	93.7	94.7	91.2	90.8	89.8	81.6	82.4	69.7	69.9	1		
96.3		91.8	90.8	92.2	90.2	88.1	89.2	81.0	81.0	69.9	69.3	2		
98.2	94.5		93.0	94.3	90.6	90.2	89.2	81.2	82.0	69.7	70.3	3		
98.1	94.4	96.9		95.1	89.8	90	90	80.2	80.2	68.5	69.1	4		
98.8	95.1	97.6	98.8		91.6	90.2	90.2	81.0	81.8	70.8	69.5	5		
96.3	92.7	94.5	94.4	95.1		88.5	90.0	83.0	83.8	70.8	69.3	6		
97.0	93.3	95.7	96.9	98.2	93.9		92.4	83.8	83.6	70.3	69.5	7		
98.2	95.1	97.0	98.1	99.4	94.5	97.6		84.5	83.6	70.1	69.7	8		
90.3	89.6	89.6	89.5	90.2	90.2	89.6	89.6		93.7	70.3	71.0	9		
91.5	90.9	90.9	90.7	91.5	90.2	90.9	90.9	98.8		70.6	69.9	10		
76.8	73.8	76.2	75.3	76.2	77.4	75.6	75.6	76.2	76.2		68.7	11		
73.8	73.8	73.2	72.2	73.2	73.2	72.6	72.6	73.8	74.4	73.8		12		

图 3 CypA 氨基酸与核苷酸序列相似性分析
Fig. 3 Identity of the amino acids and nucleotides of CypA

性较大，故选取二者为代表。预测的 3D 结构图(图 4)显示，鼠耳蝠和牛蛙与人的 CypA 一样，也是由 8 组反向平行的 β 折叠和两组 α 螺旋形成的一个桶状结构，保守的酶活位点和序列差异位点如图 4 所示。

2.4 系统发育树构建及基因线性分析

为分析不同物种 CypA 的分子进化关系，从 GenBank 数据库下载了从细菌到哺乳动物 24 个物种的 CypA 氨基酸序列，利用 MEGA v4.0 的 Poisson correction 模型构建进化树。结果显示，细菌、植物、脊椎动物的 CypA 各自形成一个分支，其中脊椎动物分支又分为 3 个亚支：哺乳动物的 CypA 在同一亚支，禽类 CypA 形成一个亚支，而水生动物

物的 CypA 在同一亚支，这与传统的物种分类学一致(图 5)。此外，本文选取人、原鸡、牛蛙分别作为 3 个不同脊椎动物亚支的代表，分析了不同脊椎动物 *PPIA* 基因在染色体上的定位及相邻基因(图 6)。以上结果显示，CypA 的分子进化与传统的物种分类学保持高度一致。

3 讨论

CypA 广泛存在于细菌、哺乳动物等多种生物体，而且已证实 CypA 参与蛋白质折叠组装、信号转导、转录调控、免疫调节、氧化应激、炎症应答、病毒复制等多种生物学功能，在生物机体中起到至关重

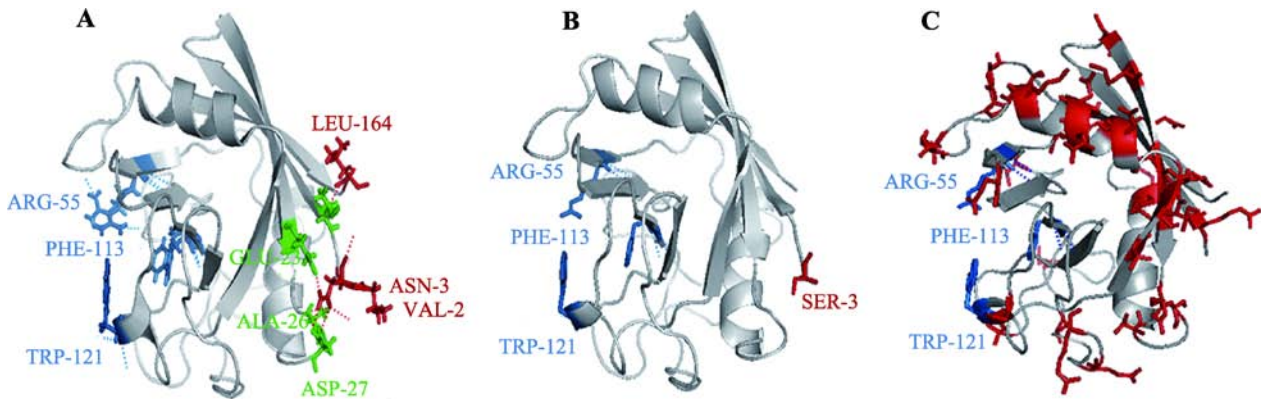


图 4 人、鼠耳蝠、牛蛙 CypA 蛋白的 3D 结构
Fig. 4 Structures of CypA proteins from human, bat and frog
A：已解析的人 CypA 蛋白(PDB ID 3K0N)结构；B：预测的鼠耳蝠 CypA 蛋白结构；C：预测的牛蛙 CypA 蛋白结构。酶活位点、不同物种序列差异位点及差异位点可能影响的氨基酸位点分别用蓝色、红色和绿色标注。

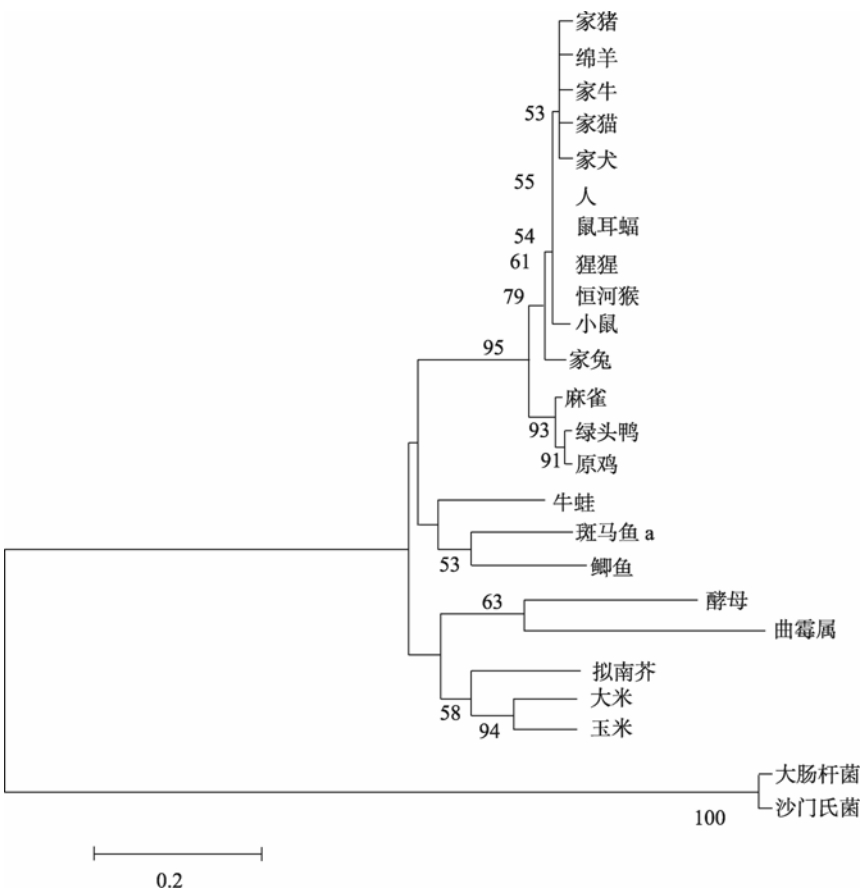


图 5 CypA 的系统发育进化树
Fig. 5 Phylogenetic analyses of CypA

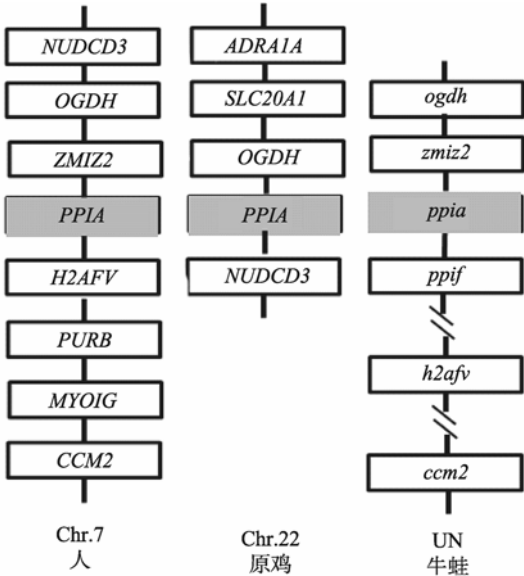


图 6 脊椎动物 PPIA 基因线性分析
Fig. 6 Comparative analysis of gene synteny of vertebrate PPIA genes
UN：未知的。

要的作用。到目前为止，很多脊椎动物 CypA 的已陆续被报道。为了探究 PPIase 酶活这一重要生物功能在不同物种 CypA 中是否存在差异，本文克隆、表达、纯化了人、家猪、小鼠、家牛、家兔、家犬、家猫、绿头鸭、原鸡、鼠耳蝠和鲫鱼 12 种脊椎动物 CypA，其中绿头鸭和鼠耳蝠的 CypA 是首次报道。蛋白质的正确折叠是其发挥生物学功能的前提，而一些蛋白质在折叠过程中存在共价键异构化一类的限速步骤，需要相应的酶催化。目前研究最多的是蛋白质二硫键异构酶和 PPIase 两种酶。其中，PPIase 可催化含脯氨酸的底物肽从反式到顺式构象的转换，加速底物蛋白质正确折叠组装，以保障底物蛋白质正常功能的发挥。CypA 具有 PPIase 活性，能打破脯氨酸顺反异构的平衡，催化反式构象向顺式构象的转变，这一转变作为蛋白折叠和多个结构域蛋白组装的限速步骤影响许多重要蛋白的活性^[25]。本文借助胰糜蛋白酶偶联法测定 CypA 的 PPIase 酶活。为

减少酶活测定的误差,本文选用可切除的 GST 标签蛋白的 pGEX-6p-1 构建重组蛋白原核表达载体,经过亲和层析后,切除标签蛋白,再过分子筛层析。酶活测定结果显示,不同脊椎动物 CypA 的 PPIase 酶活差异不明显,与脊椎动物 CypA 的酶活位点及结构域均高度保守的遗传变异分析结果一致。而酶活关键位点(R55A)突变后,酶活明显下降。本研究进一步表明,不同脊椎动物 CypA 的 PPIase 功能域不但序列、结构保守,而且催化功能关键位点也保持一致。

为了分析不同物种 CypA 的遗传变异情况,本文对 12 种脊椎动物的 CypA 进行了序列分析、结构预测、基因线性分析以及系统发育树构建等生物信息学分析,发现不同脊椎动物 CypA 的酶活位点, CsA 的结合位点在序列和结构上都非常保守,而蛋白 C 端抗原性高的区域序列差异较大,说明不同物种在进化过程中在保证关键功能域高度保守的同时,也在一定程度上形成其物种特异性。系统发育树表明, CypA 的进化与物种分类学保持一致,这一现象与基因线性分析结果吻合,进一步证明脊椎动物 CypA 在进化过程中高度保守。

CypA 与 FKBP25 是同家族成员,在脊椎动物进化过程中它们的酶活等功能域均表现出高度的保守性。Liu 等^[26]通过选择压力分析表明 FKBP25 基因在脊椎动物进化过程中会经历净化选择,即当某一突变影响到 FKBP25 功能域的正确折叠,进而降低 PPIase 酶活性时,便会被淘汰。CypA 也可能跟 FKBP25 一样,会以这种方式来维持酶活等重要功能域的保守性。

CypA 在多种疾病相关的生物学过程中发挥着重要作用。本研究发现不同脊椎动物 CypA 的酶活位点及关键结构域在进化过程中高度保守,其肽基脯氨酸顺反异构酶活性无显著差异。那么,不同种属的 CypA 在疾病过程中发挥的功能是否存在差异?这些差异是否会导致不同种属的动物或人之间对疾病抵抗力的差异?这些问题还有待进一步的深入研究。

参考文献(References):

- [1] Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclosporine A and Fkbp-Fk506 complexes. *Cell*, 1991, 66(4): 807–815. [DOI]
- [2] Galat A. Peptidylproline *cis-trans*-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem*, 1993, 216(3): 689–707. [DOI]
- [3] Colgan J, Asmal M, Neagu M, Yu B, Schneidkraut J, Lee Y, Sokolskaja E, Andreotti A, Luban J. Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4⁺ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity*, 2004, 21(2): 189–201. [DOI]
- [4] Doti N, Reuther C, Scognamiglio PL, Dolga AM, Plesnila N, Ruvo M, Culmsee C. Inhibition of the AIF/CypA complex protects against intrinsic death pathways induced by oxidative stress. *Cell Death Dis*, 2014, 5(1): e993. [DOI]
- [5] Bonfils C, Bec N, Larroque C, Del Rio M, Gongora C, Pugnière M, Martineau P. Cyclophilin A as negative regulator of apoptosis by sequestering cytochrome *c*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(2): 325–330. [DOI]
- [6] Colgan J, Yuan HE, Franke EK, Luban J. Binding of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein to cyclophilin A is mediated by the central region of capsid and requires Gag dimerization. *J Virol*, 1996, 70(7): 4299–4310. [DOI]
- [7] Zander K, Sherman MP, Tessmer U, Bruns K, Wray V, Prechtel AT, Schubert E, Henklein P, Luban J, Neidleman J, Greene WC, Schubert U. Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. *J Biol Chem*, 2003, 278(44): 43202–43213. [DOI]
- [8] Yang F, Robotham JM, Nelson HB, Irsigler A, Kenworthy R, Tang HL. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance *in vitro*. *J Virol*, 2008, 82(11): 5269–5278. [DOI]
- [9] Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang HL, Sakamoto N, Vuagniaux G, Parkinson T, Gallay P. The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *J Biol Chem*, 2009, 284(25): 16998–17005. [DOI]
- [10] Bienkowska-Haba M, Williams C, Kim SM, Garcea RL, Sapp M. Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. *J Virol*, 2012, 86(18): 9875–9887. [DOI]
- [11] Liu XL, Sun L, Yu MR, Wang ZF, Xu CF, Xue QH, Zhang K, Ye X, Kitamura Y, Liu WJ. Cyclophilin A interacts with influenza A virus M1 protein and impairs the early stage of the viral replication. *Cell Microbiol*, 2009, 11(5): 730–741. [DOI]
- [12] Liu XL, Zhao ZD, Xu CF, Sun L, Chen JL, Zhang LF, Liu

- WJ. Cyclophilin A restricts influenza A virus replication through degradation of the M1 protein. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31063. [DOI]
- [13] Xu CF, Meng SS, Liu XL, Sun L, Liu WJ. Chicken cyclophilin A is an inhibitory factor to influenza virus replication. *Virology*, 2010, 7: 372. [DOI]
- [14] He HY, Zhou DJ, Fan WP, Fu XL, Zhang J, Shen ZG, Li J, Li JT, Wu YZ. Cyclophilin A inhibits rotavirus replication by facilitating host IFN-I production. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422(4): 664–669. [DOI]
- [15] Qing J, Wang YX, Sun YN, Huang JY, Yan WZ, Wang JL, Su D, Ni C, Li J, Rao ZH, Liu L, Lou ZY. Cyclophilin A associates with enterovirus-71 virus capsid and plays an essential role in viral infection as an uncoating regulator. *PLoS Pathog*, 2014, 10(10): e1004422. [DOI]
- [16] Wang N, Zhang LZ, Chen YM, Lu Z, Gao L, Wang YQ, Gao YL, Gao HL, Cui HY, Li K, Liu CJ, Zhang YP, Qi XL, Wang XM. Cyclophilin A interacts with viral VP4 and inhibits the replication of infectious bursal disease virus. *BioMed Res Int*, 2015, 2015: 719454. [DOI]
- [17] Fischer G, Bang H, Mech C. Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta*, 1984, 43(10): 1101–1111. [DOI]
- [18] Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 1989, 337(6206): 476–478. [DOI]
- [19] Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, 1989, 337(6206): 473–475. [DOI]
- [20] Danielson PE, Forss-Petter S, Brow MA, Calavetta L, Douglass J, Milner RJ, Sutcliffe JG. pI B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA*, 1988, 7(4): 261–267. [DOI]
- [21] Shieh BH, Stamnes MA, Seavello S, Harris GL, Zuker CS. The *ninaA* gene required for visual transduction in *Drosophila* encodes a homologue of cyclosporin A-binding protein. *Nature*, 1989, 338(6210): 67–70. [DOI]
- [22] Liu J, Chen CM, Walsh CT. Human and Escherichia coli cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry*, 1991, 30(9): 2306–2310. [DOI]
- [23] Kallen J, Spitzfaden C, Zurini MGM, Wider G, Widmer H, Wüthrich K, Walkinshaw MD. Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nature*, 1991, 353(6341): 276–279. [DOI]
- [24] Song F, Zhang X, Ren XB, Zhu P, Xu J, Wang L, Li YF, Zhong N, Ru Q, Zhang DW, Jiang JL, Xia B, Chen ZN. Cyclophilin A (CyPA) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl *cis-trans* isomerase activity: direct binding between CyPA and the ectodomain of CD147. *J Biol Chem*, 2011, 286(10): 8197–8203. [DOI]
- [25] Zydowsky LD, Etzkorn FA, Chang HY, Ferguson SB, Stolz LA, Ho SI, Walsh CT. Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition. *Protein Sci*, 1992, 1(9): 1092–1099. [DOI]
- [26] Liu F, Wei XL, Li H, Wei JF, Wang YQ, Gong XJ. Molecular evolution of the vertebrate FK506 binding protein 25. *Int J Genom*, 2014, 2014: 402603. [DOI]

(责任编辑: 于黎)