

• 综 述 •

固有无序蛋白研究进展及其对细胞胁迫耐受性的影响

颜凝, 李洪兴, 吴龙昊, 杨硕, 郝鲁江, 鲍晓明

齐鲁工业大学 (山东省科学院) 生物工程学院, 山东 济南 250353

颜凝, 李洪兴, 吴龙昊, 杨硕, 郝鲁江, 鲍晓明. 固有无序蛋白研究进展及其对细胞胁迫耐受性的影响. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1490-1505.

YAN N, LI HX, WU LH, YANG S, HAO LJ, BAO XM. Intrinsically disordered proteins (IDPs) and the impact on cell stress resistance. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1490-1505.

摘 要: 固有无序蛋白 (intrinsically disordered proteins, IDPs) 是指在生理条件下缺乏有序稳定的高级结构, 整体或局部不折叠, 但能够参与多种生物学过程、行使特定生物学功能的一类蛋白质。固有无序蛋白决定了其不同于经典蛋白质“序列-结构-功能”的功能范式, 丰富了蛋白质“结构-功能”的多样性。固有无序蛋白普遍存在于生物体中, 通常具有高亲水性、带电性、氨基酸重复性高和排列序列简单等一级结构特征, 并因此产生易结合性和高度协调性等利于蛋白质发挥功能的优势性能。在不同生物的研究中表明无序蛋白对细胞胁迫响应具有重要的影响, 其过表达可提高生物对多种胁迫条件包括冷冻、高盐、热激和干燥等的耐受性。本文在简要介绍固有无序蛋白的特性、分类及鉴定的基础上, 重点阐述其提高细胞抗胁迫能力的分子机理, 并对固有无序蛋白的应用前景进行了展望。

关键词: 固有无序蛋白; 结构预测; 蛋白质功能; 胁迫响应; 耐干燥; 耐冷冻; 耐盐; 热激

Received: August 22, 2021; **Accepted:** February 9, 2022; **Published online:** February 23, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFB1501401); Key Research and Development Project of Shandong Province, China (2019JZZY010906); National Natural Science Foundation of China (31870063); Foundation of State Key Laboratory of Biobased Material and Green Papermaking, Qilu University of Technology, Shandong Academy of Sciences (ZZ20190313); Foundation of Qilu University of Technology of Cultivating Subject for Biology and Biochemistry (202005)

Corresponding authors: BAO Xiaoming. Tel: +86-531-89631901; E-mail: baoxm@qlu.edu.cn

LI Hongxing. Tel: +86-531-89631901; E-mail: lihongxing1111@163.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFB1501401); 山东省重点研发计划 (2019JZZY010906); 国家自然科学基金 (31870063); 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 生物基材料与绿色造纸国家重点实验室自主研究课题 (ZZ20190313); 齐鲁工业大学生物与生物化学 ESI 培育学科开放课题 (202005)

Intrinsically disordered proteins (IDPs) and the impact on cell stress resistance

YAN Ning, LI Hongxing, WU Longhao, YANG Shuo, HAO Lujiang, BAO Xiaoming

School of Bioengineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, Shandong, China

Abstract: Intrinsically disordered proteins (IDPs) are proteins or protein regions that fail to get folded into definite three-dimensional structures but participate in various biological processes and perform specific functions. Defying the traditional protein “sequence-structure-function” paradigm, they enrich the protein “structure-function” diversity. Ubiquitous in organisms, they show extreme hydrophilicity, charged amino acids, and highly repetitive amino acid sequences, with simple arrangement. As a result, they feature highly variable binding affinities and high coordination, which facilitate their functions. IDPs play an important role in cell stress response, which can improve the tolerance to a variety of stresses, such as freezing, high salt, heat shock, and desiccation. In this study, we briefed the characteristics, classifications, and identification of IDPs, summarized the molecular mechanism in improving cell stress resistance, and described the potential applications.

Keywords: intrinsically disordered proteins; structure prediction; protein function; stress response; desiccation tolerance; freeze tolerance; salt tolerance; heat shock

蛋白质是一类重要的生物大分子，是生物功能的主要载体。早在 1894 年 Emil Fischer 就提出“锁钥学说”理论，阐明酶和底物必须像锁和钥匙的结构一样相互默契配合，才能对彼此产生化学作用，以行使蛋白质的功能。20 世纪 60 年代，Christian Anfinsen 提出了蛋白质的独特三维结构是由其氨基酸序列决定的，为“序列-结构-功能”蛋白质功能范式的提出奠定了基础，即典型的蛋白质以“氨基酸序列决定高级结构，高级结构决定生物学功能”。直到 1978 年，通过蛋白质晶体 X 衍射及核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR), Boesch 等发现一些固有的肽段没有特定二级和 (或) 三级结构，履行功能时 (图 1) 也不符合经典的蛋白质作用范式^[1]，这引起了科研人员的兴趣和探索。在随后的几十年，越来越多的不具稳定有序性

二级或三级结构的蛋白质被发现，并且出现了多个描述术语，包括固有无序的 (intrinsically disordered)、固有非结构化的 (intrinsically unstructured)、天然非折叠的 (natively unfolded)、天然无序的 (natively disordered) 和高度柔韧的 (highly flexible)^[2]等。目前普遍接受的术语是固有无序蛋白 (intrinsically disordered proteins, IDPs)，以描述在生理条件下不具稳定高级结构的蛋白质，包括完全没有固定有序结构，部分有序结构，以及由可折叠接头连接起来的多个蛋白结构域。当蛋白质局部区域 (一般指超过 30 个氨基酸的无序区) 呈现这种特点时被称为固有无序蛋白区域 (intrinsically disordered protein regions, IDPRs)，可以发生在蛋白质的 N 端、C 端及内部区域^[1]。本文综述了固有无序蛋白的特性、预测、鉴定及功能等，着重总结了

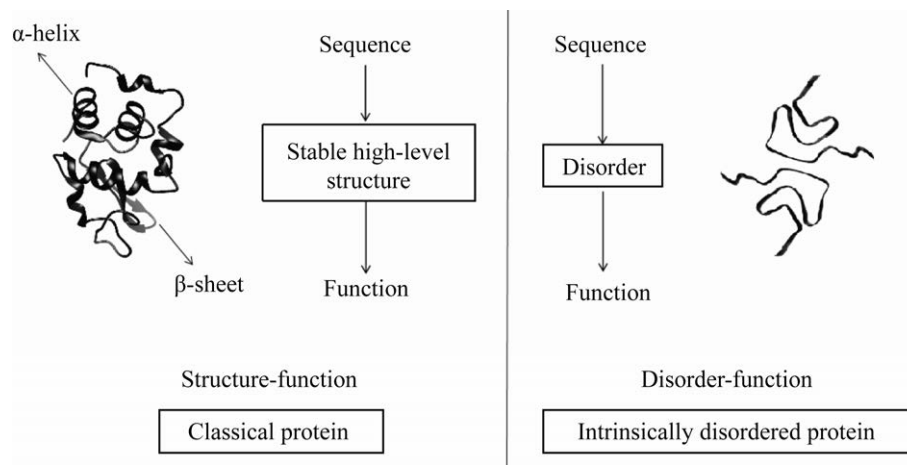


图1 经典蛋白和固有无序蛋白的功能范式

Figure 1 Functional paradigms of classical and intrinsically disordered proteins.

其在胁迫响应中的作用，为其在提高生物抗胁迫能力的应用方面提供参考。

1 固有无序蛋白的特性及鉴定

1.1 固有无序蛋白的特性

与经典的球蛋白、纤维蛋白和膜蛋白等具有稳定三级结构的有序结构化蛋白质不同，固有无序蛋白是一类结构不规则，没有稳定有序二级和（或）三级结构，且能快速转变构象的一类蛋白质，其功能位点也大多分布在无序区^[3]。固有无序蛋白一级结构的特点是氨基酸组成有明显的偏向性，且排列呈现较高的重复性，因此序列复杂性较低。带电和极性氨基酸残基（如 R、Q、S、E、K 等）的比例较高，这些氨基酸残基阻碍了蛋白质分子形成稳定的疏水核心和后续的折叠，因此被称为“促无序”氨基酸残基；同时，疏水性氨基酸含量较低，且具有破坏结构的残基（G 和 P）。这种氨基酸组成赋予固有无序蛋白“总疏水性低和净电荷大”的特性，因此很难形成疏水核进而难以形成稳定的高级结构，容易产生蛋白质折叠与去折叠过程的过渡态，主要有无规卷曲（random coil，肽链

中相对非规律性的环或者卷曲结构，是除 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角之外的蛋白质二级结构）、熔球态（molten globule-like，具有蛋白质的二级结构框架，但缺乏由侧链参与形成的、有活性的正确三级结构构象的状态）和前熔球态（pre-molten globule-like，比熔球态结构更为松散的蛋白质构象状态）等 3 种过渡态构象^[3]。这种执行生物学功能的过渡态构象，能够很快地恢复到高度灵活的无序结构状态，并且能够根据环境的不同而变化^[3]。许多生物体胚胎发育晚期的高丰度蛋白（late embryogenesis abundant proteins, LEA）均为固有无序蛋白，最早在 30 年前发现于棉花等种子发育后期，即胚胎耐干燥时期。随后的研究发现不仅限于在植物中，事实上，在细菌、蓝藻和一些无脊椎动物中也有 LEA 蛋白的存在。根据 LEA 蛋白的保守性及亲水特征等将其分为 7 个家族，LEA1 蛋白含有一段由 20 个亲水氨基酸组成的保守区域，且富含甘氨酸，具有较高的亲水性；LEA2 蛋白又称为脱水素，是一类高亲水蛋白，结构域中 C 末端富含赖氨酸的 K 片段和 N 末端的 Y 片段具有高度保守性，并且可以具有多个拷贝；LEA3

蛋白具有一段由 11 个氨基酸组成的保守结构域；LEA4 蛋白的 C 端保守性差，但在 N 端有一段由 70–80 个氨基酸组成的保守结构域；LEA5 蛋白含有高比例的亲水氨基酸；LEA6 蛋白保守性强，含有 4 个保守结构域，具有高亲水性；LEA7 蛋白也是一类亲水性蛋白，在肽链的 C 端存在 3 个高度保守的结构域，富含赖氨酸，N 端包含 6–7 个组氨酸残基，具有依赖锌离子的 DNA 结合活性。大多数 LEA 蛋白的功能与胁迫响应有关^[4-5]。

包括古菌、细菌和真核生物等许多生物体都存在固有无序蛋白，且真核生物体中的固有无序蛋白比例远高于细菌和古菌，推测无序蛋白质的增加是生物进化的重要特点之一^[6]。主要的固有无序蛋白数据库 DisProt (<https://www.disprot.org/>)，2021 年 9.0 版^[7]发布了 1 390 个已知固有无序蛋白，比 2017 年 7.0 版^[8]增加了近 1 倍的数量。对其中固有无序蛋白在不同生物物种中的分布归纳见图 2。两年一度的国际蛋白质结构预测 (critical assessment of techniques for protein structure prediction, CASP) 大赛从第 5 届

开始将固有无序蛋白的预测列为其中一项重要的比赛内容，表明近年来固有无序蛋白引起科研工作者的极大关注。

1.2 固有无序蛋白的预测与鉴定

高等生物的蛋白质组中，超过 40% 的蛋白是固有无序蛋白或含有固有无序蛋白区域，IDPs 在众多生理过程中具有重要功能，对它们的结构预测、鉴定及性质研究有利于揭示其潜在的生物学功能。此外，IDP 介导的蛋白-蛋白相互作用研究对传统生物物理技术和方法提出了巨大挑战^[9]。固有无序蛋白的无序区域，是分子间相互作用进而完成各种生物学功能的关键结构域。无序区域的长度、数量以及在蛋白质中的具体位置都会影响到其功能的发挥^[10]，因此预测与鉴定蛋白质的无序区域对于蛋白质的结构、生物学功能以及作为药物作用靶点的研究都是至关重要的。一般地，主要通过核磁共振 (NMR)、X 射线晶体衍射技术 (X-Ray)、质谱技术 (mass spectrometry, MS)、圆二色谱法 (circular dichroism, CD) 和小角度 X 射线散射 (small angle X-ray scattering, SAXS) 等技术^[2]来表征

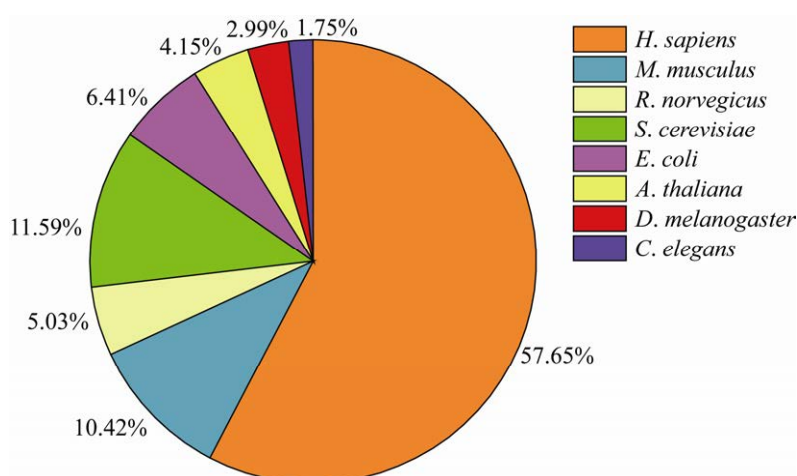


图 2 已知固有无序蛋白在不同生物物种的分布

Figure 2 Distribution of intrinsically disordered proteins in different species.

固有无序蛋白的特点,其中 NMR 分析方法最能捕捉蛋白质动态结构特性,而主要的固有无序蛋白数据库 DisProt 9.0 正是应用了该方法的分析结果。基于这些技术不仅分析出固有无序蛋白或固有无序蛋白区域,而且也分析了蛋白质的无序度、与蛋白质和核酸等的结合位点等特点。近几年对能抗多种环境胁迫的缓步动物 (tardigrades) 的研究就是通过基于氢氘交换核磁共振 (NMR-based hydrogen-deuterium exchange) 鉴别出其含有大量固有无序蛋白的 (<https://www.disprot.org/DP01378>)^[11]。同时基于固有无序蛋白理化性质的特殊性,如普遍的热稳定性、对蛋白酶的敏感性及其在 SDS 凝胶电泳中表现出的低流动性等特征,也是鉴别固有无序蛋白的有效手段。

随着对固有无序蛋白的深度认知及其广度研究的需求,越来越多的研究聚焦在对无序蛋白质的结构预测上。以固有无序蛋白的特点为主要依据,先后开发了 70 余款无序蛋白结构预测软件,预测方法大致从以下 4 个角度展开^[2,12]:

①基于氨基酸组成特点的理化性能开发的计算方法 (physicochemical-based methods)。如基于氨基酸有序或无序状态的倾向来预测蛋白质的无序区域;通过序列的平均疏水性和净电荷来预测蛋白质是否天然展开,用以快速预测氨基酸序列的无序性;通过氨基酸残基平均堆积密度来预测蛋白质的折叠状态;及氨基酸残基电荷-亲水 (C-H) 空间分析^[13-16]。②机器学习方法 (machine-learning-based methods) 开发的计算算法,包括支持向量机 (support vector machines, SVMs)、人工神经网络 (artificial neural networks, ANNs) 等,以识别未知蛋白质的各种无序结构特征^[17-20]。③基于模板的计算算法 (template-based methods)。即在已知结构 (模板) 的蛋白质数据库中搜索目标蛋白质,检测其同源蛋白,然

后通过多序列比对 (multiple sequence alignment, MSA) 确定无序区域^[21-22]。④元方法 (meta methods),结合多种预测算法进行的综合预测。这类方法将输入的信息通过多个预测程序,考虑所有结果最后进行综合预测^[23-30]。如目前常用于固有无序蛋白结构预测的数据库 MobiDB 4.0 版 (2020 年 9 月发布, <https://mobidb.bio.unipd.it/>),就是综合运用 19 个结构预测软件,对蛋白质的无序性进行预测分析。虽然这种预测的准确性和速度逐渐有明显提高,但依然有很大的提升空间。近十几年,预测软件快速发展,不胜枚举,各有特色,基于以上 4 类预测方法,将常用或新的无序蛋白预测软件归纳如表 1 所示。综合利用计算机预测工具和鉴定实验来收集更多的固有无序蛋白或者含无序区的蛋白质信息,以提高预测软件的准确度或者功能多样性,对进一步提高对无序蛋白的认识有着重要的积极意义。

2 固有无序蛋白的功能

2.1 固有无序蛋白作用的分子机制

无特定高级结构的固有无序蛋白,通常可以与其他生物大分子结合形成稳定的结构而完成多种生物功能,一般认为,无序蛋白的结构柔性在分子识别过程中非常重要,有助于更快地与受体结合,形成具有高度结合特异性的蛋白复合物。前面叙述固有无序蛋白的氨基酸组成特点,使其在完成大分子相互作用时需要更大的熵损失,同时主要以线性状态执行功能。线状延伸的特性使其易被其他分子识别和结合,并且在与其他蛋白分子结合时更加紧密有序,能够有效地协调蛋白间的相互作用,使得大分子的组装与分解更加高效,赋予了固有无序蛋白易结合性和高度协调性等利于蛋白质发

表 1 常用或新的固有无序蛋白预测软件

Table 1 Common and new predictors for IDPs

Predictor	Prediction method*	Features	Goals	References
GlobPlot	P.	The difference of amino acid propensity between 'random coil' and regular 'secondary structure'	Disorder	[13]
FoldIndex	P.	Amino acid net charge and amino acid hydrophobicity	Disorder	[14]
FoldUnfold	P.	Average packing density of amino acid residues	Disorder	[15]
DisPHred	P.	The charge-hydropathy (C-H) space	Disorder	[16]
DisEMBL	L.	Protein sequence	Disorder	[17]
DISOPRED	L.	Evolutionary conserved information of protein sequence	Disorder	[18]
ESpritz	L.	Single-sequence or add PSSM	Disorder	[19]
SPOT-Disorder2	L.	Image recognition	Disorder; molecular recognition	[20]
DISOclust	T.	Structure-based approach	Disorder	[21-22]
PrDOS	M.	Combination of a SVM-based predictor and a template-based predictor	Disorder	[23]
PONDR-FIT	M.	Combination of PONDR-VLXT, PONDR-VSL2, PONDR-VL3, FoldIndex, IUPred, and TopIDP	Disorder	[24]
DisMeta	M.	Combination of DisEMBL, DISOPRED2, DISpro, FoldIndex, GlobPlot, IUPred, RONN and VL2	Disorder; secretion signal peptides, trans-membrane segments and low complexity	[25]
disCoP	M.	Combination of Espritz (the DisProt and X-ray versions), Cspritz (the long version), SPINE-D, DISOPRED2, MD and DISOclust	Disorder; phosphorylation sites, autoregulatory and flexible linker regions	[26]
DISOPRED3	M.	Combination of DISOPRED2, a specialized predictor of LDRs and a nearest neighbor predictor	Disorder; protein-binding sites	[27]
IDP-FSP	M.	Combination of IDP-FSP-L, IDP-FSP-S, and IDP-FSP-G	Disorder	[28]
DEPICTER	M.	Combination of SPOT-Disorder-Single, two versions of IUPred2:IUPred2 _{long} and IUPred2 _{short} , DFLpred, DMRpred, DisoRDPbind _{RNA} , DisoRDPbind _{DNA} , fMoRFpred, DisoRDPbind _{protein} and ANCHOR2	Disorder; protein and nucleic acids binding, linker and moonlighting functions	[29]
MobiDB	M.	Combination of Mobi, FLIPPER, RING, MobiDB-lite, ESpritz-DisProt, ESpritz-NMR, ESpritz-Xray, IUPred-Long, IUPred-Sort, VSL2b, DisEMBL-465, DisEMBL-HotLoops, GlobPlot, JRONN, ANCHOR, FeSS, DynaMine, Pfilt, SEG	Disorder; disorder-to-order and fuzzy binding; posttranslational modifications, phase separation processes	[30]

*: 'P. L. T. M.' represent respectively the prediction methods of physicochemical-based, the machine-learning-based, the template-based and the meta.

挥功能的优势^[31-32]。这些特征导致相对较短的序列片段必须包含显著相互作用的氨基酸残基,以产生特征序列信号。通过对自由无序状态和有序状态下的相互作用能力进行模拟预测软件,以预测无序区功能。在开发的 70 余款无序蛋白结构预测软件中,有 25 款可对无序区域进行功能预测^[29],表 1 列举了几款常用和新的功能预测软件。常用的 Disprot 无序蛋白数据库 (<http://www.Disprot.org/>) 归纳了固有无序蛋白的几种分子作用机制,主要是翻译后修饰 (post translation modifications, PTMs)、变构调节、细胞信号传导、基因表达调控、分子伴侣作用、稳定膜、分子识别、分子组装等。具体来说,包括:①翻译后修饰。固有无序蛋白富含 PTMs 位点,包括磷酸化、乙酰化和甲基化等修饰方式。磷酸化通常通过添加一个带负电荷的磷酸基,修饰丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T) 和酪氨酸 (Y),是固有无序蛋白的主要修饰方式,可以改变电荷组成和模式及蛋白质整体构象,以实现基因表达或蛋白功能的分级或开关控制。同时,PTMs 可以通过多种方式调节固有无序蛋白的分子识别,改变其自由能状态,导致构型集合的改变。例如,固有无序蛋白 4E-BP2 (4E binding protein 2) 是 mRNA 帽子依赖翻译起始抑制因子,在非磷酸化状态下与真核生物翻译起始因子 eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) 紧密相互作用,抑制该有序蛋白 eIF4E 与 mRNA 帽子的结合,从而阻碍了 mRNA 翻译的起始,而 4E-BP2 在 T37 和 T46 位点的磷酸化诱导了其无序片段 P18-R62 折叠成四链 β 结构域,阻断了其与 eIF4E 的结合,从而促进 mRNA 的翻译起始^[33-34]。②变构调节。变构是有序蛋白质的固有特性,通过改变蛋白质的分子结构参与细胞内分子调节。研究表明,很多的固有无序蛋白也可以发生分子结构的改变,

实现变构调节,在蛋白质相互作用网络中发挥分子枢纽的作用,而蛋白分子变构的发生往往是源于翻译后修饰。例如,固有无序蛋白激活 T 细胞连接蛋白 (linker for activation of T cells, LAT),是 T 细胞受体信号转导中关键的支架蛋白,包含 9 个酪氨酸残基,其远端酪氨酸位点磷酸化数量的增加,能提高 LAT 的净电荷量,从而改变了 LAT 的整体构型,促进其他磷酸酪氨酸 (pY) 位点结合一个有序蛋白即 Grb2 生长因子受体结合蛋白,以参与调节细胞内各种受体激活后的下游传导与代谢途径^[35]。③细胞信号传导和调节。细胞内信号传导是通过蛋白质相互作用的动态网络来完成的,固有无序蛋白在这一过程中也起到重要的作用。例如,环腺苷 (cyclic-AMP, cAMP) 效应元件结合蛋白 (cAMP responsive element binding protein, CREB) 是固有无序蛋白转录因子,通过磷酸化调节基因表达。其激酶诱导结构域 (kinase-inducible domain, KID) 中 133 位丝氨酸经过磷酸化形成 pKID, pKID 以无序状态与转录共激活蛋白 (CREB-binding protein, CBP) 中有序的相互作用结构域 (interaction domain, KIX) 结合并诱导折叠成稳定的螺旋结构,调控目标基因的表达^[36-38]。④分子伴侣作用。可协助 RNA 分子或其他蛋白质的正确折叠,阻止错误折叠,以防止水分胁迫和冷冻期间破坏性蛋白质聚集体的形成。例如固有无序蛋白 AavLEA1 和 Em 能够独立防止因干燥和冷冻而导致的柠檬酸合酶 (citrate synthesis, CS) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 聚集,保留酶活性;在热胁迫时可以协同增强海藻糖对柠檬酸合酶 (CS) 聚集的保护作用^[39]。⑤感知膜曲率。膜的弯曲结构往往具有重要的生物学功能,如细胞内吞作用、病毒芽和管状细胞器等,这些结构的起始和组装需要能够感知和稳定膜曲率的蛋白质。固有无序蛋白是膜曲率的

有效传感器, 因为其具有两个关键的物理特征——高度的构象熵和高的净负电荷, 当固有无序蛋白与膜表面结合时会导致构象熵的减少和阴离子脂质对静电排斥的增加。例如: 固有无序蛋白-装配衔接蛋白 AP180 的 C 端结构域可以通过熵和静电效应机制感知膜曲率, 从而驱动膜弯曲, 参与膜重塑^[40-41]。复旦大学王文宁教授课题组研究发现, 某些固有无序蛋白与其他结构蛋白相互作用后折叠为有序结构, 而另一类固有无序蛋白形成复合物后仍然保持一定的无序性, 被称作模糊相互作用。并结合分子动力学模拟、NMR 和单分子荧光共振能量转移技术 (single molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET) 等技术, 表征了两个固有无序蛋白之间的相互作用, 发现形成的复合物中两个蛋白均保持无序性。两个无序蛋白之间通过动态多位点相互作用形成“极端模糊复合物”。这种相互作用模式是蛋白-蛋白相互作用的全新模型^[9]。

2.2 固有无序蛋白与人类疾病

固有无序蛋白广泛存在于人类细胞中, 与人类许多疾病通路相关联, 如心血管疾病、糖尿病、病毒疾病、神经退行性疾病、癌症和遗传疾病等。研究发现一些固有无序蛋白的错误折叠并且以聚集物的沉积形式积累是引发许多神经退行性疾病的原因。研究表明, 固有无序蛋白 α -突触核蛋白 (α -synuclein) 在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中聚集形成包涵体 (路易体和路易神经突起), 进而积累成原纤维, 后者在破坏细胞内运输、阻断蛋白质降解途径和/或干扰重要细胞功能的过程中产生毒性, 导致原有功能丧失, 是帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的诱因之一^[42]。在人类胚胎神经祖细胞中超表达 α -突触核蛋白, 会使神经祖细胞的分化由向神经元分化转变为向神

经胶质细胞分化, 导致正常神经元细胞数量减少, 影响正常神经生理活动。同时, 在细胞模型中观察发现, α -突触核蛋白的积累可诱导细胞死亡或降低多巴胺诱导型细胞的细胞活性^[43]。微管蛋白 tau 也是一种固有无序蛋白, 由 25% 到 30% 的带电氨基酸组成, 并包含许多脯氨酸残基, 具有细胞信号传递和保护 DNA 免受损伤等多种作用。由于异常磷酸化、糖基化、氧化或其他翻译后修饰, tau 蛋白容易聚集并形成细胞内沉积, 导致统称为 tau 蛋白的神经退行性疾病^[44-45]。

肿瘤抑制蛋白 P53 是一种固有无序蛋白, 参与细胞增殖、凋亡、DNA 修复和血管生成, P53 是衰老调节的关键转录因子, 亦是抵抗癌症发生和发展的重要防御蛋白。其编码基因在 DNA 损伤等各种细胞胁迫下被激活, 通过下游的信号通路使细胞停止分裂, 修复 DNA 损伤, 在损伤无法修复的时候诱导细胞凋亡, 阻止癌症的发生。但 p53 基因突变失活, 或野生型 P53 功能被高水平的癌蛋白 MDM2 抑制, 导致肿瘤抑制 P53 通路的下调, 使致癌细胞不受控制地生长, 形成肿瘤。大约 50% 的癌症会发生 p53 基因突变, 而突变失活的 P53, 不但失去抑制肿瘤的功能, 还会影响正常的 P53 蛋白功能, 进一步促进肿瘤的生成。由于 p53 基因的突变是肿瘤发生的重要因素之一, 且与正常 P53 相比, 突变 P53 蛋白在恶性肿瘤细胞中更难降解而在胞内积累, 因此 P53 成为抗癌药物的一个重要靶点^[46-47]。目前已有部分以突变 P53 为靶点的化合物的研究报道, 例如 PRIMA-1^[48]、APR-246 (PRIMA-1Met)^[49]、SLMP53-2^[50]、ZMC1^[51]、COTI-2^[52]和 PK11007^[53]等。最近研究的黑色素瘤靶向药物色氨酸衍生的恶唑并异吡啶酮 SLMP53-2 是一种新的 P53 激活剂, 能够恢复突变 P53 的野生型功能, 通过破坏 p53-MDM2 相互作用稳定 P53, 增强 P53 转录

活性, 抑制肿瘤增殖和扩散^[50]。

因此持续探索固有无序蛋白的结构特性, 例如结合位点及磷酸化位点的识别, 对深入了解其生物学功能、人类疾病的防治具有显著价值, 也为药物靶标的设计提供新的思路。

3 固有无序蛋白对理化因子胁迫响应机制及利用的研究

生活在自然环境中的生物体不可避免地受到环境中非生物胁迫因子的影响, 诸如干旱、高温、冷冻、高盐碱、极端 pH 和高渗透压等恶劣条件, 研究表明许多固有无序蛋白可以在这些非生物因素下诱导表达, 并通过维持蛋白活力、阻止蛋白发生聚集、稳定蛋白构象和保护膜结构等多种功能, 帮助生物体抵抗和耐受各种理化因子胁迫, 防止细胞受到损害, 从而保证正常的生理活动。同时鉴于对固有无序蛋白这些胁迫响应机制的认识, 通过异源表达, 以提高生物体抗胁迫能力的理论研究和育种应用屡有报道^[54-81]。表 2 对近十年通过固有无序蛋白过表达提高生物抗胁迫能力的研究进行了汇总。

3.1 脱水耐受性

干旱是常见的地学环境, 生物体脱水往往引起新陈代谢失调, 增加活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 的生成, 进而影响细胞的氧化还原调节状态, 影响生物体的正常生物学过程。脱水生物 (anhydrobiosis 直译为低湿休眠, 即“life without water”没有水的生活) 却能在干旱条件下很好地生存甚至生长繁殖^[54]。研究发现, 无序蛋白在其细胞脱水耐受机制中起到重要作用, 主要有以下 3 种保护机制: ①玻璃化。这是脱水生物在遭受干燥胁迫时的主要保护机制。当脱水生物体能够产生海藻糖时, 胞内海藻糖因干燥而玻璃化, 形成稳定的糖外膜以保

护内部基质中各种生物大分子执行功能。某些脱水生物体内的海藻糖含量很少甚至几乎不存在时, 干燥胁迫也能使固有无序蛋白通过协同或者代替海藻糖的方式形成玻璃状无定形基质, 从而防止蛋白质变性和聚集, 而当在复水条件下, 细胞的生理状态随着可逆玻璃基质的溶解得以恢复^[55]。②保护膜结构。当脱水生物在干燥胁迫时, 其体内定位于线粒体的固有无序蛋白能够降低线粒体产生有害活性氧的能力, 保护线粒体和膜免受伤害, 保持线粒体的功能正常和维持膜的完整性^[56]。③分子屏蔽。固有无序蛋白无序、灵活的结构特征使得它们具有类似分子伴侣的功能, 能够在干燥胁迫下保护蛋白质, 防止蛋白质聚集和失活^[57]。并且这些机制不是相互排斥的。Boothby 等研究表明, 被称为缓步动物特有内在无序蛋白 (tardigrade-specific intrinsically disordered proteins, TDPs) 的一类固有无序蛋白, 与缓步动物抗干旱性能有关, 当主要热可溶蛋白家族包括胞质丰富热可溶蛋白 (cytoplasmic abundant heat soluble protein, CAHS)、分泌丰富热可溶蛋白 (secreted abundant heat soluble protein, SAHS) 和线粒体丰富热可溶蛋白 (mitochondrial abundant heat soluble protein, MAHS) 显著富集时, 干燥胁迫下细胞脱水缓慢。差示扫描量热法的结果显示, CAHS 蛋白在干燥胁迫时的玻璃体化是保护缓步类动物免受脱水伤害的关键^[11]。Chakrabortee 等研究表明, 脱水生物中的燕麦真滑刃线虫 (*Aphelenchus avenae*) 在脱水过程中诱导的固有无序蛋白-脱水素, 在体外干燥条件下能够在相邻的柠檬酸合酶分子之间形成物理屏障, 防止聚集, 起到分子屏蔽的作用^[57]。

据报道, 固有无序蛋白可以通过异源表达增强宿主的脱水耐受性。由于缓步动物的高胁迫耐受性的特点, 其多个固有无序蛋白被用于

表 2 近十年固有无序蛋白提高生物抗胁迫能力研究汇总

Table 2 Intrinsically disordered proteins improving biological stress resistance in a decade

IDPs	Native species	Functions of IDPs heterologous expression	References
MAHS proteins	<i>Ramazzottius varieornatus</i>	Enhance the osmotic tolerance in human HEp-2 cells	[58]
CAHS proteins	Tardigrades	Enhance the desiccation tolerance in <i>S. cerevisiae</i> and <i>E. coli</i>	[11]
PpDHNs	<i>Physcomitrella patens</i>	Enhance the desiccation and salt tolerance in <i>Arabidopsis thaliana</i>	[59]
ZmLEA3	Maize (<i>Zea mays</i> L.)	Enhance the desiccation, oxidative and freezing tolerance in tobacco and yeast	[60-61]
XsLEA1-8	<i>Xerophyta schlechteri</i>	Enhance the freezing tolerance in <i>E. coli</i>	
		Enhance the desiccation and salt tolerance in <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>E. coli</i>	[62]
SKn-dehydrin	<i>Eucalyptus globulus</i> and <i>Eucalyptus nitens</i>	Enhance the freezing tolerance in <i>Arabidopsis thaliana</i>	[67]
CarDHN	<i>Cerastium arcticum</i>	Enhance the freezing tolerance in tobacco	[68]
CsLEA11	<i>Cucumis sativus</i>	Enhance the heat and freezing tolerance in <i>E. coli</i>	[69]
GeLEAs	<i>Gastrodia elata</i>	Enhance the freezing tolerance in <i>E. coli</i>	[70]
CspBPi	<i>Polaribacter irgensii</i>	Enhance the freezing tolerance in <i>E. coli</i>	[65,71]
	KOPRI 22228		
SmLEA2	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Enhance the salt and desiccation tolerance in <i>E. coli</i>	[73]
LOC protein	Soybean	Enhance the salt tolerance in <i>E. coli</i>	[74]
TdRL1	Wheat	Enhance the salt and heat tolerance in yeast	[75]
PM18	Soybean	Enhance the salt tolerance in yeast	[76]
ERD14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Enhance the heat tolerance in <i>E. coli</i>	[79]
WZY2	Wheat	Enhance the freezing and heat tolerance in <i>E. coli</i>	[80]
DQ663481	<i>Tamarix</i>	Enhance the heat, NaHCO ₃ , ultraviolet radiation, salt, desiccation and freezing tolerance in <i>S. cerevisiae</i>	[81]

此类研究。Tanaka 等将缓步类动物中的变形拉氏熊虫 (*Ramazzottius varieornatus*) 中定位于线粒体的固有无序蛋白—MAHS 蛋白 (LC002822) 在人类细胞 HEp-2 中异源表达, 结果显示在 150 mmol/L 和 200 mmol/L 蔗糖条件下, 表达 MAHS 蛋白的细胞代谢活性显著增加, 尤其在 200 mmol/L 的高渗条件下, 其细胞代谢活力相比野生型提高了 20%, 表明 MAHS 蛋白具有提高人类细胞高渗耐受性和保护细胞的能力^[58]。Boothby 等将水熊虫来源的 10 种 CAHS 蛋白异源表达, 干燥耐受性实验显示, 相比于野生型, 其中 CAHS 68135、CAHS 94063、CAHS 106094 均使酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在干燥 48 h 后的存活率提高了近 100 倍, CAHS

106094、CAHS 107838 使 *E. coli* 在干燥 1 周后的存活率分别提高了 100 余倍和近 1 000 倍。其中蛋白 CAHS 106094 具有同时提高 *S. cerevisiae* 和 *E. coli* 干燥耐受性的能力, 但多数水熊虫无序蛋白异源表达并没有提高 *S. cerevisiae* 或 *E. coli* 的干燥耐受性^[11]。而植物源固有无序蛋白如 LEA 蛋白 PpDHNs、ZmLEA3、XsLEA1-8 的异源表达也能提高拟南芥、烟草、大肠杆菌和酵母等的脱水耐受性^[59-62]。而我们的研究发现, 20 种不同来源的固有无序蛋白异源表达, 其中只有植物怪柳 (*Tamarix*) 的 LEA 蛋白 DQ663481 有助于提高酿酒酵母的干燥耐受性, 在 2.1 mol/L 山梨醇平板上呈现一定的生长优势, 而其他固有无序蛋白包括酿酒酵母内源性

无序蛋白的超表达,则没有改善酿酒酵母菌体的干燥耐受性(未发表数据)。

3.2 耐冷冻

当生物体遭遇冷冻环境时,也会面临严峻的生存挑战,出现包括酶活性降低、膜流动性变差、营养物质和废物运输减少、转录和翻译速率降低、DNA 复制缓慢、蛋白质折叠迟缓、蛋白质的冷变性和细胞内冰晶形成等生理变化。研究表明许多固有无序蛋白能够很好地参与冷冻胁迫响应,保护细胞抵御冷环境。目前认为固有无序蛋白抵抗冷冻胁迫的机制主要有:①优先吸附。在冻融过程中气泡的形成会增大空气-水界面积,这会导致蛋白质的聚集,然而固有无序蛋白能够先于酶优先吸附于空气-水界面,减少酶的聚集,稳定蛋白质^[63]。②无序-有序的转变。冷冻诱导产生的固有无序蛋白,在冷冻导致的细胞脱水而渗透压增加时会从无序状态转变为有序的 α -螺旋结构,以利于提高冷冻过程中膜的稳定性,增强对冷冻的抵抗能力^[64]。③保护膜结构。在冷冻胁迫下作为一种膜和蛋白稳定剂。Yuen 等通过中子反射和表面张力实验证明,LEA 蛋白中的 AavLEA1 和 ERD10 在冻融过程中会先于柠檬酸合酶优先吸附于空气-水界面,避免酶的聚集,以保持酶活^[63]。Bremer 等研究发现,拟南芥一种高度亲水的冷调节蛋白 COR15A 为固有无序蛋白,在冷冻过程中大量诱导合成,积累于叶绿体基质中以稳定叶绿体和质膜,并且在冷促逐渐脱水时,发生蛋白质逐渐折叠现象,且其折叠的 α -螺旋度会随冷冻温度的降低而增加,这种增加的 α -螺旋度对冷冻过程中的膜稳定功能有积极影响,表明 COR15A 抗冷冻的功能受到蛋白质折叠状态的调节^[64]。另外,Jung 等的研究发现,冷休克蛋白 CspBPi 无序的 N 端结构域包含的一个或多个可能与脂质结合的、具有极强亲

水性的两性 α -螺旋,是 CspBPi 具有强抗冻性的主要原因^[65]。

Bychkov 等的研究表明,拟南芥的 COR15A 的超表达提高了自身叶绿体的抗冻能力,增强了植物叶片对冷冻的耐受性^[66]。异源表达植物源的固有无序蛋白增强植物拟南芥、烟草等对冷冻胁迫的耐受性的例子也多有报道^[67-68]。另外,固有无序蛋白不仅有助于增强真核生物的冷冻耐受性,在原核生物中也具有同样的效用。例如在 *E. coli* 中表达来源于黄瓜的 CsLEA11,使 3 次冻融循环后的细胞存活率提高了 2 倍,明显提高 *E. coli* 低温耐受性^[69]。同样地,Zeng 等将来自天麻 (*Gastrodia elata*) 的 8 种 LEA 蛋白表达在 *E. coli* 中,低温耐受性分析实验表明,其中 5 种 LEA 蛋白使菌株的存活率提高了 2-5 倍,显示出强的抗冷冻和生存能力,表明这些蛋白具有抵抗冷冻,保护细胞免受损伤的能力^[70]。Jung 等在 *E. coli* 中表达了来源于伊氏极地杆菌 (*Polaribacter irgensii*) KOPRI 22228 的基因 CspBPi,与出发菌相比,在第一次冻融循环中存活的细胞数量增加了 50 多倍,而在 3 次冻融循环后存活的细胞数量增加到 100 000 倍以上,极大地提高了 *E. coli* 的抗冻性^[71]。另外,单种固有无序蛋白还可赋予多种物种耐受冷冻胁迫的能力。例如玉米 (*Zea mays* L.) ZmLEA3 的异源表达,能够增强烟草、酵母和大肠杆菌在低温胁迫下的耐受性^[60-61]。

3.3 耐盐

盐胁迫对生物体代谢和生长发育的不利影响一直备受关注。一些固有无序蛋白能够通过参与协助清除活性氧,从而有助于提高生物体的耐盐性。一般地,高盐能形成渗透胁迫、离子毒性和氧化胁迫等恶劣因子,且在细胞内大量形成活性氧 (ROS),从而导致膜脂过氧化,积累丙二醛 (MDA),进而损害细胞膜^[72]。在盐胁迫下,

固有无序蛋白具有增强超氧化物歧化酶 (SOD), 清除细胞中多余的超氧阴离子, 保护细胞膜的能力。例如从丹参中分离出的属于 LEA2 亚家族的 *SmLEA2* 基因, 其超表达可赋予丹参和大肠杆菌更强的 SOD 活性。在盐和干旱胁迫下, 通过抑制丙二醛 (MDA) 的积累来减轻对细胞膜的损害, 显著提高了宿主在逆境下的生长性能^[73]。Tan 等发现来源于大豆的一种耐热固有无序蛋白 LOC, 在 *E. coli* 中异源表达增加其耐盐性, 在 500 mmol/L NaCl 的盐胁迫下, 与野生型相比, 存活率增加了 2.6 倍^[74]。Mahjoubi 等研究表明在酵母中异源表达来源于小麦的固有无序蛋白 TdRL1 提高了酵母的耐盐性^[75]。Liu 等发现来源于大豆的 LEA3 家族蛋白 PM18, 在酵母中表达增加了其耐盐性, 并且该蛋白在 Ser 90 和 Tyr 136 位点的磷酸化, 通过协同作用提供保护可以进一步增强酵母耐盐性^[76]。另外研究发现, 异源表达来源于植物的 LEA 蛋白 PpDHNs、XsLEA1-8 不仅赋予拟南芥和大肠杆菌脱水耐受性, 也赋予它们很好的耐盐性^[59-62]。

3.4 热激响应

高温对生物会产生很多不利影响, 大多数生物在超出适宜温度下生长缓慢甚至停止生长。众所周知, 热激会导致蛋白质损伤和错误折叠, 从而引发蛋白质聚集变性、功能丧失。因此, 温度变化期间保持蛋白质的稳定是一个重大挑战。目前认为固有无序蛋白主要以分子伴侣的形式参与热激响应^[77-78]。Goyal 等研究发现柠檬酸合酶 (CS) 在 40 °C 或更高的温度下会失活并形成聚集体。仅依靠 LEA 家族的固有无序蛋白不能阻止 CS 在高温下的聚集, 但它们可以与海藻糖协同发挥作用, 从而防止热诱导的蛋白聚集^[39]。Kovacs 等研究发现, 拟南芥中的固有无序蛋白脱水素 ERD14 能够防止多种酶的热诱导聚集、失活, 例如溶菌酶、乙醇脱氢酶、

萤火虫荧光素酶和柠檬酸合酶, 具有非常广泛的底物特异性的伴侣活性^[77]。Murvai 等^[78]在 *E. coli* 中异源表达 ERD14, 在 50 °C、15 min 热冲击的条件下, 使 *E. coli* 的存活率从 38.9% 提高到 73.9%, 有效提高了 *E. coli* 细胞的热激耐受性。研究表明 ERD14 的保护活性与其保守的、在体内参与伴侣结合的短序列基序 (K-和 H-段) 的无序结构状态有关^[79]。Zhou 等发现, 在 *E. coli* 中异源表达来源于黄瓜 (*Cucumis sativus*) 的 CsLEA11, 在 50 °C、20 min 的热激后细胞存活率是野生型的 2 倍, 明显提高了 *E. coli* 的热胁迫耐受性^[69]。不仅如此, 许多来源于植物的 LEA 蛋白如 XsLEA1-8、WZY2 等在大肠杆菌中表达均增强了其对热胁迫的耐受性^[62,80]。我们通过在酿酒酵母中表达来源于动物、植物和酵母内源的 20 种固有无序蛋白, 发现只有来源于怪柳中的 LEA 固有无序蛋白 DQ663481 不仅提高了酿酒酵母干燥耐受性, 也提高了其热激耐受性, 赋予酿酒酵母在 53 °C、6 min 热冲击条件下更好的生长能力, 同样地, 其他固有无序蛋白包括酿酒酵母内源性无序蛋白的超表达, 都没有改善酿酒酵母菌体的热激耐受性 (未发表数据)。

4 总结与展望

通过以上对理化因子胁迫耐受性的分类描述, 表明一些固有无序蛋白可以提高异源物种的抗胁迫能力, 但有些则不能提高宿主胁迫耐受性。我们对 20 种固有无序蛋白在提高酿酒酵母胁迫耐受性的研究中也呈现相同的结果。通过 MEGA 软件对这 20 种固有无序蛋白进行多序列比对分析, 发现其相互间保守性较低, 很难归纳出对表型有效蛋白的组成特点。另外, 与人类疾病相关的固有无序蛋白 α -突触核蛋白、tau 蛋白和 P53 也显示出较低的保守性^[42,44,46]。

此外, Brown 等发现固有无序蛋白进化速率更快^[82], 这些特点使目前固有无序蛋白的跨物种应用机制知之甚微。推测不同物种的细胞结构和基因表达方式不同、物种本身对环境胁迫的耐受能力不同等, 都能造成无序蛋白异源表达显现出抗逆作用的明显差异。

研究表明一些固有无序蛋白只响应单一胁迫条件, 如 CspBPi 对提高 *E. coli* 的抗冷冻胁迫有明显积极作用^[65], 但也有的固有无序蛋白对多种胁迫因子具有串扰和交叉耐受性, 如 XsLEA-8 能提高 *E. coli* 和拟南芥的干燥和盐胁迫耐受性^[62]。而我们的研究结果发现, 源于怪柳中的 LEA 固有无序蛋白 DQ663481 可以同时提高酿酒酵母的热冲击和干燥的耐受性。固有无序蛋白的功能与其序列具有相关性, 而氨基酸的磷酸化等蛋白修饰基团也直接影响其折叠状态或 (和) 特有的结构域^[38], 固有无序蛋白不同于经典蛋白的特性, 使其功能预测软件开发更具有挑战性。我们相信, 预测软件与固有无序蛋白表征实验技术的进步及其相互结合协同研究, 将进一步加快对固有无序蛋白功能区、功能位点作用的认识, 更快速、全面地了解其分子机制。

对固有无序蛋白的研究, 不仅有助于对蛋白质折叠机制的深度认识, 也有助于发现其巨大的、特异性的潜在生物学功能。随着蛋白质组学的发展, 固有无序蛋白的研究已成为蛋白质科学领域非常重要的组成部分。目前对固有无序蛋白的研究主要从以下 4 个方面展开。①不断开发新型的、准确度高及多功能的预测软件, 对固有无序蛋白的氨基酸序列进行分析并推断其潜在的功能特性, 例如对无序区在蛋白质中的位置及对无序区中结合位点、氨基酸修饰位点等功能预测的研究还相对较少。②深入研究固有无序蛋白的基序/结构-功能机制, 例如折叠状态与功能之间的关系。③将固有无序蛋

白设计为人类疾病的药物靶点。目前尚不清楚固有无序蛋白怎样与多种靶分子特异性结合、它们的相互应答机制以及不同的压力源对固有无序蛋白有什么影响, 此外它们在多大程度上影响固有无序蛋白的结构和功能、每种作用机制是否具有相同的功能都有待进一步的深入研究。④对固有无序蛋白元件的应用研究。例如, 将固有无序蛋白元件用于农作物及微生物育种中, 提高生物体对极端环境的耐受性。利用固有无序蛋白提高生物制剂 (疫苗及肽类药物) 的耐干燥性, 以期实现此类生物制剂的干燥储运, 从而代替传统的冷链依赖型储运。因此, 固有无序蛋白对现代生物技术的发展有着独特的实践意义, 但目前仍然处在初级阶段, 未来还有许多路要走。

REFERENCES

- [1] Babu MM. The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(5): 1185-1200.
- [2] Liu YM, Wang XL, Liu B. A comprehensive review and comparison of existing computational methods for intrinsically disordered protein and region prediction. *Brief Bioinform*, 2019, 20(1): 330-346.
- [3] Uversky VN. Proteins without unique 3D structures: biotechnological applications of intrinsically unstable/disordered proteins. *Biotechnol J*, 2015, 10(3): 356-366.
- [4] Mertens J, Aliyu H, Cowan DA. LEA proteins and the evolution of the WH₂ domain. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(15): e00539-e00518.
- [5] 王艳蓉, 张治国, 吴金霞. LEA 蛋白及其在植物抗逆改良中的应用. *生物技术通报*, 2015, 31(3): 1-9.
Wang YR, Zhang ZG, Wu JX. LEA protein and its application in improvement of stress tolerance in plants. *Biotechnol Bull*, 2015, 31(3): 1-9 (in Chinese).
- [6] 马冲, 杨冬, 姜颖, 等. 无序蛋白质的判定及其结构、功能和进化特征. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(1): 16-24.
Ma C, Yang D, Jiang Y, et al. The identification of intrinsically disordered proteins and their structural,

- functional, evolutionary features. *Prog Biochem Biophys*, 2015, 42(1): 16-24 (in Chinese).
- [7] Hatos A, Hajdu-Soltész B, Monzon AM, et al. DisProt: intrinsic protein disorder annotation in 2020. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D269-D276.
 - [8] Piovesan D, Tabaro F, Mičetić I, et al. DisProt 7.0: a major update of the database of disordered proteins. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D219-D227.
 - [9] Weng J, Wang W. Dynamic multivalent interactions of intrinsically disordered proteins. *Curr Opin Struc Biol*, 2020, 62: 9-13.
 - [10] Hsu CC, Buehler MJ, Tarakanova A. The order-disorder continuum: linking predictions of protein structure and disorder through molecular simulation. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2068.
 - [11] Boothby TC, Tapia H, Brozena AH, et al. Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation. *Mol Cell*, 2017, 65(6): 975-984.e5.
 - [12] Meng FC, Uversky VN, Kurgan L. Comprehensive review of methods for prediction of intrinsic disorder and its molecular functions. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(17): 3069-3090.
 - [13] Linding RE, Russell RB, Neduva V, et al. GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3701-3708.
 - [14] Prilusky J, Felder CE, Zeev-Ben-Mordehai T, et al. FoldIndex©: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics*, 2005, 21(16): 3435-3438.
 - [15] Galzitskaya OV, Garbuzynskiy SO, Lobanov MY. FoldUnfold: web server for the prediction of disordered regions in protein chain. *Bioinformatics*, 2006, 22(23): 2948-2949.
 - [16] Santos J, Iglesias V, Pintado C, et al. DisPhred: a server to predict pH-dependent order-disorder transitions in intrinsically disordered proteins. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5814.
 - [17] Linding RE, Jensen LJ, Diella F, et al. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*, 2003, 11(11): 1453-1459.
 - [18] Ward JJ, McGuffin LJ, Bryson K, et al. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics*, 2004, 20(13): 2138-2139.
 - [19] Walsh I, Martin AJM, Di Domenico T, et al. ESpritz: accurate and fast prediction of protein disorder. *Bioinformatics*, 2012, 28(4): 503-509.
 - [20] Hanson J, Paliwal KK, Litfin T, et al. SPOT-Disorder2: improved protein intrinsic disorder prediction by ensembled deep learning. *Genom Proteom Bioinf*, 2019, 17(6): 645-656.
 - [21] McGuffin LJ. Intrinsic disorder prediction from the analysis of multiple protein fold recognition models. *Bioinformatics*, 2008, 24(16): 1798-1804.
 - [22] McGuffin LJ, Atkins JD, Salehe BR, et al. IntFOLD: an integrated server for modelling protein structures and functions from amino acid sequences. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1): W169-W173.
 - [23] Ishida T, Kinoshita K. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Web Server issue): W460-W464.
 - [24] Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, et al. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(4): 996-1010.
 - [25] Huang YJ, Acton TB, Montelione GT. DisMeta: a meta server for construct design and optimization. *Methods Mol Biol*, 2014, 1091: 3-16.
 - [26] Fan X, Kurgan L. Accurate prediction of disorder in protein chains with a comprehensive and empirically designed consensus. *J Biomol Struct Dyn*, 2014, 32(3): 448-464.
 - [27] Jones DT, Cozzetto D. DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics*, 2015, 31(6): 857-863.
 - [28] Liu YM, Chen SY, Wang XL, et al. Identification of intrinsically disordered proteins and regions by length-dependent predictors based on conditional random fields. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 17: 396-404.
 - [29] Barik A, Katuwawala A, Hanson J, et al. DEPICTER: intrinsic disorder and disorder function prediction server. *J Mol Biol*, 2020, 432(11): 3379-3387.
 - [30] Piovesan D, Necci M, Escobedo N, et al. MobiDB: intrinsically disordered proteins in 2021. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D361-D367.
 - [31] 田攀, 连继勤. 无序蛋白. *生命的化学*, 2009, 29(2): 279-282.
 - [32] Tian P, Lian JQ. Advance in study of disordered proteins. *Chem Life*, 2009, 29(2): 279-282 (in Chinese).
 - [33] Clerc I, Sagar A, Barducci A, et al. The diversity of molecular interactions involving intrinsically disordered proteins: a molecular modeling perspective. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 3817-3828.
 - [34] Wang K, Ning SB, Guo Y, et al. The regulation mechanism of phosphorylation and mutations in intrinsically disordered protein 4E-BP₂. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, 22(5): 2938-2948.
 - [35] Bah A, Vernon RM, Siddiqui Z, et al. Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a

- regulatory switch. *Nature*, 2015, 519(7541): 106-109.
- [35] Huang WYC, Ditlev JA, Chiang HK, et al. Allosteric modulation of Grb2 recruitment to the intrinsically disordered scaffold protein, LAT, by remote site phosphorylation. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(49): 18009-18015.
- [36] Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(1): 18-29.
- [37] Stanley N, Esteban-Martín S, De Fabritiis G. Kinetic modulation of a disordered protein domain by phosphorylation. *Nat Commun*, 2014, 5: 5272.
- [38] Liu N, Guo Y, Ning SB, et al. Phosphorylation regulates the binding of intrinsically disordered proteins via a flexible conformation selection mechanism. *Commun Chem*, 2020, 3: 123.
- [39] Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J*, 2005, 388(Pt 1): 151-157.
- [40] Zeno WF, Thatte AS, Wang LP, et al. Molecular mechanisms of membrane curvature sensing by a disordered protein. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(26): 10361-10371.
- [41] Busch DJ, Houser JR, Hayden CC, et al. Intrinsically disordered proteins drive membrane curvature. *Nat Commun*, 2015, 6: 7875.
- [42] Goedert M, Jakes R, Spillantini MG. The synucleinopathies: twenty years on. *J Parkinsons Dis*, 2017, 7(s1): S51-S69.
- [43] Zasso J, Ahmed M, Cutarelli A, et al. Inducible alpha-synuclein expression affects human neural stem cells' behavior. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(14): 985-994.
- [44] Borna H, Assadoulahei K, Riazi G, et al. Structure, function and interactions of tau: particular focus on potential drug targets for the treatment of tauopathies. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17(5): 325-337.
- [45] Martinelli AHS, Lopes FC, John EBO, et al. Modulation of disordered proteins with a focus on neurodegenerative diseases and other pathologies. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1322.
- [46] Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer*, 2017, 83: 258-265.
- [47] Levine AJ. Targeting therapies for the p53 protein in cancer treatments. *Annu Rev Cancer Biol*, 2019, 3: 21-34.
- [48] Rangel LP, Ferretti GDS, Costa CL, et al. p53 reactivation with induction of massive apoptosis-1 (PRIMA-1) inhibits amyloid aggregation of mutant p53 in cancer cells. *J Biol Chem*, 2019, 294(10): 3670-3682.
- [49] Haffo L, Lu J, Bykov VJN, et al. Inhibition of the glutaredoxin and thioredoxin systems and ribonucleotide reductase by mutant p53-targeting compound APR-246. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12671.
- [50] Loureiro JB, Raimundo L, Calheiros J, et al. Targeting p53 for melanoma treatment: counteracting tumour proliferation, dissemination and therapeutic resistance. *Cancers*, 2021, 13(7): 1648.
- [51] Zaman S, Yu X, Bencivenga AF, et al. Combinatorial therapy of zinc metallochaperones with mutant p53 reactivation and diminished copper binding. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(8): 1355-1365.
- [52] Synnott NC, O'Connell D, Crown J, et al. COTI-2 reactivates mutant p53 and inhibits growth of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 179(1): 47-56.
- [53] Synnott NC, Bauer MR, Madden S, et al. Mutant p53 as a therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer: preclinical investigation with the anti-p53 drug, PK11007. *Cancer Lett*, 2018, 414: 99-106.
- [54] Boothby TC, Pielak GJ. Intrinsically disordered proteins and desiccation tolerance: elucidating functional and mechanistic underpinnings of anhydrobiosis. *Bioessays*, 2017, 39(11): 170019.
- [55] Chavali S, Gunnarsson A, Babu MM. Intrinsically disordered proteins adaptively reorganize cellular matter during stress. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(6): 410-412.
- [56] Hesgrove C, Boothby TC. The biology of tardigrade disordered proteins in extreme stress tolerance. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 178.
- [57] Chakrabortee S, Meersman F, Kaminski Schierle GS, et al. Catalytic and chaperone-like functions in an intrinsically disordered protein associated with desiccation tolerance. *PNAS*, 2010, 107(37): 16084-16089.
- [58] Tanaka S, Tanaka J, Miwa Y, et al. Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic tardigrade improve osmotic tolerance of human cells. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118272.
- [59] Li QL, Zhang XC, Lv Q, et al. *Physcomitrella patens* dehydrins (PpDHNA and PpDHNC) confer salinity and drought tolerance to transgenic *Arabidopsis* plants. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1316.

- [60] Liu Y, Wang L, Xing X, et al. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(6): 944-959.
- [61] Liu Y, Liang JN, Sun LP, et al. Group 3 LEA protein, ZmLEA3, is involved in protection from low temperature stress. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1011.
- [62] Artur M, Rienstra J, Dennis TJ, et al. Structural plasticity of intrinsically disordered LEA proteins from *Xerophyta schlechteri* provides protection *in vitro* and *in vivo*. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1272.
- [63] Yuen F, Watson M, Barker R, et al. Preferential adsorption to air-water interfaces: a novel cryoprotective mechanism for LEA proteins. *Biochem J*, 2019, 476(7): 1121-1135.
- [64] Bremer A, Kent B, Hauß T, et al. Intrinsically disordered stress protein COR15A resides at the membrane surface during dehydration. *Biophys J*, 2017, 113(3): 572-579.
- [65] Jung YH, Uh JH, Lee K, et al. An intrinsically disordered domain in *Polaribacter irgensii* KOPRI 22228 CspB confers extraordinary freeze-tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2): 374-380.
- [66] Bychkov IA, Kudryakova NV, Kuznetsov VV, et al. Cold stress activates the expression of genes of the chloroplast transcription apparatus in *Arabidopsis thaliana* plants. *Dokl Biochem Biophys*, 2020, 494(1): 235-239.
- [67] Aguayo P, Sanhueza J, Noriega F, et al. Overexpression of an *SK_n-dehydrin* gene from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Trees*, 2016, 30(5): 1785-1797.
- [68] Hill W, Jin XL, Zhang XH. Expression of an Arctic chickweed dehydrin, CarDHN, enhances tolerance to abiotic stress in tobacco plants. *Plant Growth Regul*, 2016, 80(3): 323-334.
- [69] Zhou Y, He P, Xu YP, et al. Overexpression of CsLEA11, a Y₃ SK 2-type dehydrin gene from cucumber (*Cucumis sativus*), enhances tolerance to heat and cold in *Escherichia coli*. *AMB Express*, 2017, 7(1): 182.
- [70] Zeng X, Ling H, Yang JW, et al. LEA proteins from *Gastrodia elata* enhance tolerance to low temperature stress in *Escherichia coli*. *Gene*, 2018, 646: 136-142.
- [71] Jung YH, Lee YK, Lee HK, et al. CspB of an Arctic bacterium, *Polaribacter irgensii* KOPRI 22228, confers extraordinary freeze-tolerance. *Braz J Microbiol*, 2018, 49(1): 97-103.
- [72] Liang WJ, Ma XL, Wan P, et al. Plant salt-tolerance mechanism: a review. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 286-291.
- [73] Wang HQ, Wu YC, Yang XB, et al. *SmLEA2*, a gene for late embryogenesis abundant protein isolated from *Salvia miltiorrhiza*, confers tolerance to drought and salt stress in *Escherichia coli* and *S. miltiorrhiza*. *Protoplasma*, 2017, 254(2): 685-696.
- [74] Tan FM, Sun N, Zhang LS, et al. Functional characterization of an unknown soybean intrinsically disordered protein *in vitro* and in *Escherichia coli*. *Int J Biol Macromol*, 2021, 166: 538-549.
- [75] Mahjoubi H, Ebel C, Hanin M. Molecular and functional characterization of the durum wheat TdRL1, a member of the conserved *Poaceae* RSS₁-like family that exhibits features of intrinsically disordered proteins and confers stress tolerance in yeast. *Funct Integr Genomics*, 2015, 15(6): 717-728.
- [76] Liu Y, Yang MY, Cheng H, et al. The effect of phosphorylation on the salt-tolerance-related functions of the soybean protein PM₁₈, a member of the group-3 LEA protein family. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2017, 1865(11 Pt A): 1291-1303.
- [77] Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, et al. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol*, 2008, 147(1): 381-390.
- [78] Murvai N, Kalmar L, Szabo B, et al. Cellular chaperone function of intrinsically disordered dehydrin ERD14. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6190.
- [79] Murvai N, Kalmar L, Szalaine Agoston B, et al. Interplay of structural disorder and short binding elements in the cellular chaperone function of plant dehydrin ERD14. *Cells*, 2020, 9(8): 1856.
- [80] Yang WB, Zhang LS, Lv H, et al. The K-segments of wheat dehydrin WZY2 are essential for its protective functions under temperature stress. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 406.
- [81] Wang BF, Wang YC, Zhang DW, et al. Verification of the resistance of a *LEA* gene from *Tamarix* expression in *Saccharomyces cerevisiae* to abiotic stresses. *J For Res*, 2008, 19(1): 58-62.
- [82] 马冲. 蛋白质无序结构域的功能和进化特征及其变异的生物学意义研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2016.
- Ma C. The evolutionary and functional features of disordered protein domains and the biological significance of their variation[D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2016 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)