

# 以 SecA 蛋白为“动力泵”的细菌 Sec 蛋白转运途径

赵莉莉 余利岩\*

(中国医学科学院 北京协和医学院医药生物技术研究所 北京 100050)

**摘要:** 细菌细胞中, 三分之一的蛋白质是在合成后被转运到细胞质外才发挥功能的。其中大多数蛋白是通过 Sec 途径(即分泌途径 secretion pathway)进行跨膜运动的。Sec 转运酶是一个多组分的蛋白质复合体, 膜蛋白三聚体 SecYEG 及水解 ATP 的动力蛋白 SecA 构成了 Sec 转运酶的核心。整合膜蛋白 SecD, SecE 和 YajC 形成了一个复合体亚单位, 可与 SecYEG 相连并稳定 SecA 蛋白的膜结合形式。SecB 是蛋白质转运中的伴侣分子, 可以和很多蛋白质前体结合。SecM 是由位于 *secA* 基因上游的 *secM* 基因编码的, 可调节 SecA 蛋白的合成量, 维持细胞在不同环境条件下的正常生长。新生肽链的信号肽被高度保守的 SRP 特异性识别。伴侣分子 SecB 通过与细胞膜上的 SecA 二聚体特异性结合将蛋白质前体引导至 Sec 转运途径, 起始转运过程。结合蛋白质前体的 SecA 与组成转运通道的 SecYEG 复合体具有较高的亲和性。SecA 经历插入和脱离细胞内膜 SecYEG 通道的循环, 为转运提供所需的能量, 每一次循环可推动 20 多个氨基酸的连续跨膜运动。

**关键词:** 蛋白质转运, SecA, SecYEG

## Bacterial Protein Secretion Pathway with SecA as a Motor

ZHAO Li-Li YU Li-Yan\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)

**Abstract:** There are one third of synthesized proteins must be secreted to the cell surface or to the surrounding environment to acquire their native functional state. Most of them are exported by Sec translocase (secretion pathway). Sec translocase consists of a membrane embedded protein-conducting channel, termed SecYEG and a peripherally associated motor domain, the ATPase SecA. The SecDFyajC heterotrimeric membrane protein complex can facilitates protein translocation. SecB is a molecular chaperone that functions in the protein translocation pathway. SecM (secretion monitor) encoded by the 5' region of the *secM-secA* mRNA, which elongation arrest is required for upregulated expression of SecA. The signal sequence in the N terminus of the nascent peptide is first recognized by the signal recognition particle (SRP). SecB, the Sec-system-specific chaperone, channels the preprotein to the Sec translocation pathway and, additionally, actively targets the bound precursor to the translocase by its ability to bind SecA. The preprotein-bearing SecA then binds to the membrane, at a high-affinity SecA-binding site, SecYEG, which constitutes a channel for polypeptide movement. Continued translocation requires cycles of ATP hydrolysis by

\* 通讯作者: ✉ yuliyang\_2000@yahoo.com

收稿日期: 2007-11-05; 接受日期: 2008-01-17

SecA, which is thought to occur in a step-wise fashion with a step of 20~30 amino acid residues.

**Keywords:** Protein translocation, SecA, SecYEG

细胞是一个由膜包裹的、被水相介质充盈的腔体,这种介质称为细胞质。众所周知,蛋白质的翻译是在细胞质中进行的,研究表明在革兰氏阴性细菌中,大约 2/3 的蛋白质位于细胞质中,而另外 1/3 的蛋白质在合成后需要转运到细胞质外才能发挥功能。一些亲水性的蛋白被分泌到细胞外膜上或周围环境当中,它们包括水解酶类、细胞毒素、胶质、生长因子、激素类物质或抗体等,这些蛋白质占基因组总编码量的 10%~20%。另外,一些含有疏水片段的分泌蛋白在转运过程中被细胞膜捕获,并在膜中获得天然而有功能的构象,成为膜蛋白,如:负责物质运输的蛋白质、离子通道蛋白、脂质生物合成的酶类、环境感受器、鞭毛组分,细胞分化调节因子或能量转换器等。膜蛋白可以占到基因组总编码量的 20%~40%<sup>[1,2]</sup>。

研究表明,在进化过程中细菌保留了所独有的至少 6 种蛋白质转运机制,被称为转运酶(translocase)或转运子(translocon)<sup>[3]</sup>。其中最受关注的就是Sec转运酶,它是由在细菌域中相当保守的一些蛋白质成分所组成,大多数的分泌蛋白和一些整合膜蛋白的转运都是通过这条途径进行的,它对细菌的生存是必不可少的<sup>[2]</sup>。下面将详细介绍Sec转运酶的组成,蛋白质的转运过程以及此过程中的能量转运酶。

## 1 Sec 转运酶的组成

Sec转运酶是一个多组分的蛋白质复合体,膜蛋白三聚体SecYEG及水解ATP的动力蛋白SecA构成了Sec转运酶的核心<sup>[1]</sup>。整合膜蛋白SecD, SecF 和 YajC 形成了一个复合体亚单位,可与SecYEG相连并稳定SecA蛋白的膜结合形式。

目前的研究认为, SecYEG三聚体再二聚化形成转运酶最核心的部分——转运通道,它是由 6 个疏水性亚基围绕被转运的多肽形成环形通道,能使蛋白质前体在跨膜转运过程中维持一个稳定的状态。SecA是高度亲水的蛋白质,由它介导的蛋白质转运一定要在亲水的环境中进行, SecYEG高度有序环状结构还可为巨大的SecA二聚体分子提供足够大的

表面以使其免受磷脂层的影响。SecG是一种小分子的具有柔性的膜蛋白,在转运过程中,伴随着SecA的循环它的构象也发生拓扑式转换,并对SecA的循环起促进作用<sup>[4]</sup>。SecA与SecYEG结合后形成稳定的(SecYEG)<sub>4</sub>SecA复合体,一般被认为是全酶的活性形式<sup>[1,5]</sup>。

还有实验结论认为SecYEG的单体、二聚体、四聚体之间存在一个与其各亚基及其它转运有关蛋白浓度有关的平衡<sup>[6]</sup>,寡聚状态可以发生动态改变。SecA插入膜以及SecYEG与SecA,蛋白质前体的相互作用都可以显著提高复合物的二聚化和四聚化,这说明在转运的不同阶段通道的活性形式可能是不尽相同的<sup>[5,7,8]</sup>。最新研究结果认为SecYEG单体即具有转运功能,当它以单体存在时,会呈现出一个塞子的结构。而二聚化的作用是通过构象的改变使塞子打开,从而使被转运的蛋白通过<sup>[6]</sup>。还有另外两种观点认为,信号肽的插入或与SecA结合可导致蛋白转运通道的开放<sup>[9]</sup>。

SecA是细菌特有的一种蛋白质,具有ATP酶活性,是Sec蛋白质转运途径中的“动力泵”,通过ATP的水解循环驱使多肽穿过通道。它在胞质中以单体和二聚体相平衡的方式存在,配体、温度、离子浓度等因素都能显著地影响平衡<sup>[10]</sup>。SecA单体的分子量为 102 kD,它包含 3 个基本的亚单位:DEAD驱动器、底物特异性结合区以及C末端结构域(34 kD)<sup>[11]</sup>。DEAD驱动器则又包含两个亚结构域:间断的核苷酸结合结构域(nucleotide-binding domain NBD; 氨基酸 1~220, 378~420)和IRA2((intra-molecular regulator of ATPase domain 分子内ATP酶调节结构域)(氨基酸 421~610)两个亚结构域之间的缝隙中可容纳ATP。SecA蛋白的氨基酸 221~377 残基区被称为蛋白质前体的结合结构域(preprotein-binding domain PBD)。这个区域对于细胞的生存,蛋白质的转运以及蛋白质前体激活的转运ATPase是必需的<sup>[6]</sup>。C末端结构域的氨基酸 611~832 被称为IRA1。当SecA存在于胞浆中时,IRA1对SecA ATP酶活性起到下调作用,从而防止SecA在非转运蛋白质白白浪费ATP。此外,C末端结构域还可与金属离

子, SecB 伴侣分子, 磷脂结合<sup>[12]</sup>。

SecD 和 SecF 与小分子蛋白质 YajC 形成 SecDFyajC 复合物。YajC 的功能未知, SecD 和 SecF 具有巨大的周质结构域, 推测它们可能在蛋白质前体转运后期的释放阶段起作用。此复合物对转运, 尤其是 SecG 不存在时, 起着非常重要的作用, 可能主要影响蛋白质的转运效率<sup>[1,8]</sup>。YidC 广泛存在于多种组织中, 它对膜蛋白的生物合成是必不可少的, 并通过与 SecDFyajC 复合物相互作用而参与到 Sec 转运酶的作用中。从化学计量学上看, YidC 的量明显低于 SecYEG, SecDF 的量明显高于 SecYEG, SecG 是一个可变的组分, SecA 更是高度可变的<sup>[1]</sup>。

SecB 是一种同源四聚体的伴侣分子, 可以和很多蛋白质前体结合。以前认为 SecB 是一种信号肽识别因子, 但现在大多数观点认为 SecB 识别的是蛋白质前体的成熟部分。它不是细菌生存所必需的组分, 而且也不存在于所有的细菌中。革兰氏阳性细菌中就不存在 SecB, 但另一种具有与 SecB 相似功能的伴侣分子 CsaA, 可与 SecA 结合<sup>[2,12,13]</sup>。SecB 通过其疏水的表面和新合成的多肽结合, 稳定其非天然构象, 控制其折叠, 但它不能恢复已折叠蛋白的结构, 因此 Sec 转运酶不能转运已折叠的蛋白。SecB 与将被转运的蛋白主要是通过非特异性的氢键及疏水相互作用结合, 因此 SecB 具有广泛的底物选择性<sup>[2,14]</sup>。SecB 具有两种功能: (1) 作为分子伴侣与新合成的蛋白结合; (2) 与 SecA 蛋白特异结合。SecA 是 SecB 在细胞膜上的高亲和力受体, 目前发现它们之间至少有两个相互独立的作用位点, 一个是 SecA 二聚体带有正电荷和锌离子的两个 C 末端, 分别与两个 SecB 二聚体中带有负电荷的折叠平面相互作用, 另一个是 SecB C 末端的螺旋与 SecA 二聚体界面之间相互作用。也可能还存在第 3 个作用位点, 但由于单独的作用力较弱, 目前还没有确定具体的作用位置<sup>[13,15]</sup>。

SecM 是由位于 *secA* 基因上游的 *secM* 基因编码的。它含有一段制动序列 (arrest sequence) (F<sup>150</sup> XXXXWIXXXGIRAGP<sup>166</sup>), 通过与核糖体的出口相互作用而阻止翻译的延长, 调节 SecA 蛋白的合成量, 维持细胞在不同环境条件下的正常生长。另外, SecM 还具有通过促进细胞内膜和转运酶附近多种构象 SecA 的合成, 提高 SecA 功能性的作用<sup>[16,17]</sup>。

## 2 Sec 转运途径中蛋白质的转运过程

被分泌的细菌蛋白质在 N 末端含有可被剪切掉的信号肽。信号肽一般含有 20 个氨基酸残基, 其中 6~10 个残基构成疏水核心, 两端连接带有弱极性的序列。它们形成螺旋结构, 在剪切位点之前的第一和第三个氨基酸体积不能太大。信号肽是被信号识别粒子特异识别并结合的。

信号识别粒子 (SRP) 和它在细胞膜上的受体 FtsY 对多肽的分泌及一些疏水蛋白质整合入细胞膜起到至关重要的作用。FtsY 受体与酸性磷脂有亲和力。SRP 是由一种 4.5S RNA 和 Ffh 蛋白质组成的。Ffh 蛋白质含有 GTP 酶结构域, N 末端有与膜结合的结构域及与信号肽或蛋白质前体结合的结构域。SRP 可特异识别疏水的肽链。

图 1 是 *E. coli* Sec 转运系统。新生肽链的信号肽被高度保守的 SRP 特异性识别。成熟肽链中带有芳香性的短链及带有正电荷的残基与伴侣分子 SecB 结合, 形成的三元复合物将底物引导至细胞膜后, SRP 与它的膜受体 FtsY 结合, SecB 则与细胞膜上的 SecA 二聚体特异性结合。与 SecA 的结合后, SecB 的构象将会发生改变, 从而导致被分泌蛋白的信号肽和成熟肽链直接被与 SecYEG 结合的 SecA 识别。SecA 与 SecB 结合以后, 构象的改变将起始蛋白转运过程。转运起始后, 蛋白质前体的成熟肽链由 SecB 转移至 SecA, 至此不再需要 SecB。蛋白质前体通过 SecYEG 组成的通道进行转运, SecA 在水解 ATP 的同时还经历着插入和脱离细胞内膜 SecYEG 通道的循环, 这样每一次循环可推动 20 多个氨基酸的连续跨膜运动, 当转运进行到已经有部分成熟肽链被转运到质膜以外时, 位于周质的信号肽酶就会将信号肽水解掉。蛋白质转运后, 不同种类蛋白质的释放、折叠及修饰还会涉及其它不同的因子<sup>[1,8,18]</sup>。

## 3 转运过程中的能量转化酶

SRP 中的组分 Ffh 蛋白和它的膜受体都是 GTP 酶, 消耗 GTP 来调节它们的活性, 将底物传递给转运酶。然而, 在接下来的跨膜过程中就不再需要 GTP 了。伴侣分子 SecB 与底物的结合及向膜的定向移动都不需要消耗能量。

跨膜转运的整个过程中, 能量来自 ATP 和跨膜

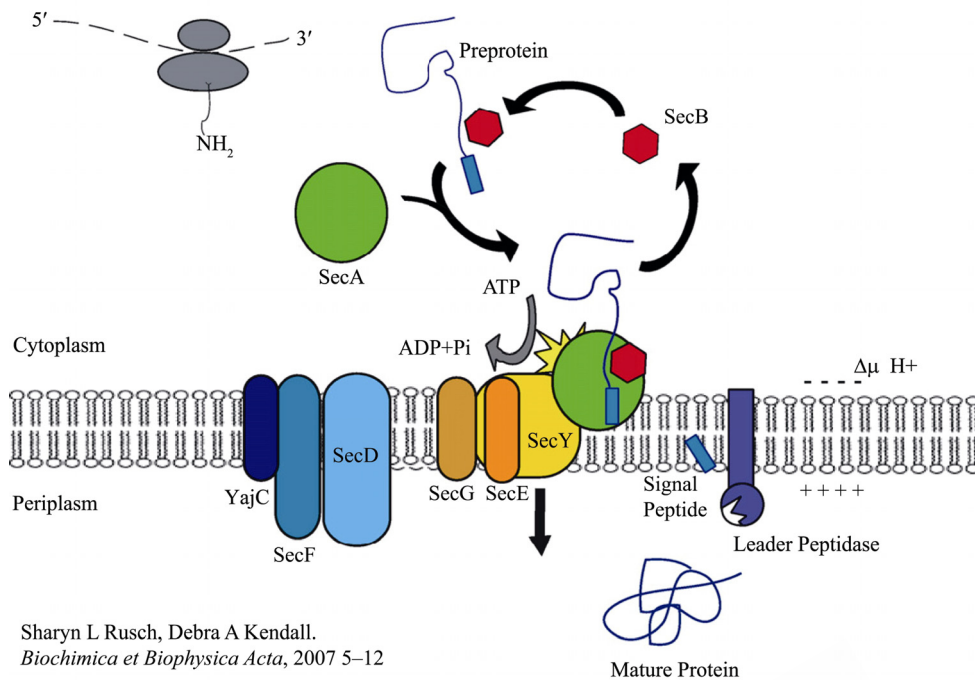


图1 *E. coli* Sec 转运系统

Fig. 1 Schematic representation of the *E. coli* Sec transport system

注：部分由核糖体合成的新生多肽链与胞质伴侣分子 SecB 结合。在胞质中，四聚化的 SecB 与 SecA 二聚体相关联。因此，一些蛋白质前体是通过 SecB 传递给 SecA 的，而有些是直接 SecA 结合的。与内膜 SecYEG 结合后，SecA 可能会解离为单体形式也可能不会。SecA 水解 ATP，在质子动力( $\Delta\mu H^+$ )及其它亚基的协助下，驱动转运。在转运过程中，SecDFYajC 能够通过调节 SecA 的循环而促进转运。蛋白质前体的信号肽在细胞膜的周质侧背信号肽酶水解，释放成熟的多肽

Note: Most models of Sec-dependent preprotein export share the following features. The nascent chain emerges from the ribosome and may interact with the cytoplasmic chaperone, SecB. The tetrameric SecB associates in the cytoplasm with dimeric SecA. Thus, some preproteins are delivered to SecA via SecB, while others directly interact with SecA without the participation of SecB. Upon interacting with the inner membranebound SecYEG, SecA may or may not dissociate to monomer. SecA hydrolyzes ATP and, with the protonmotive force ( $\Delta\mu H^+$ ), drives translocation through the SecYEG pore, composed of one or more subunits. SecDFYajC may enhance translocation by regulating the membrane cycling of SecA. The signal peptide of the preprotein is cleaved on the periplasmic side of the membrane by leader peptidase, releasing the mature protein to its final location

质子梯度(PMF)。被转运的蛋白质分子越长，结构越复杂，所需要的ATP越多。PMF不能单独起始转运反应，在转运的起始阶段必须依赖SecA的ATP酶活性。然而，在转运过程中PMF可以将转运效率提高4~10倍，并降低系统对ATP的需要。若一个分泌蛋白已经被转运60%~80%，PMF可以单独继续完成它的转运<sup>[1,19]</sup>。

SecA ATP酶在Sec转运酶介导的转运过程中起着非常关键的作用，它是在Sec途径中唯一已知的能量转化酶。在胞质中，SecA与ADP紧密结合，以同型二聚体的形式存在。这种与ADP结合的SecA构象紧凑，具有更高的稳定性，因此，此时的SecA仅具有低水平的ATP酶活性。胞质中的SecA可与蛋白质前体-SecB复合物相互作用，不过亲和力很低，作用也只是瞬时的。ADP的释放速度是决定

SecA催化效率的关键步骤。当SecA与膜结合后，构象发生改变，释放出ADP，提高了ATP的水解能力，对蛋白质前体及SecB的亲和力也大大提高。带有负电荷的磷脂、磷脂酰丙三醇、双磷脂酰甘油等虽然对细菌生存及转运不是必需的，但对SecA的活性、底物与膜的相互作用及SecYEG的稳定性都起着重要作用<sup>[1]</sup>。

#### 4 总结

蛋白质转运是一个多步骤的复杂过程，但通过生物化学和遗传学相结合的方法，人们已经对转运酶的各组成部件有了一定的了解。目前与传统体内和体外实验相对应的结构生物学和生物物理学手段以及定量酶学方法为更加准确研究转运酶的催化和调节打开了一条出路。但在此科学领域还存在需要

深入探索或者存在争议的问题, 比如: Sec 转运酶各个成分之间的作用位点及作用顺序、SecA 的活性构象及寡聚状态、蛋白质前体与 Sec 转运酶之间的相互作用等, 都是值得进一步来揭示和研究的。

## 参 考 文 献

- [1] Anastassios E. Bacterial protein translocase: a unique molecular machine with an army of substrates. *Federation of European Biochemical Societies*, 2000, **476**: 18–21.
- [2] Anastassios E. Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions. *Molecular Membrane Biology*, 2002, **19**: 159–169.
- [3] Christoph J Hueck. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, **62**(2): 379–433.
- [4] Sugai R, Takemae K, Tokuda H. Topology inversion of SecE is essential for cytosolic SecA-dependent stimulation of protein translocation. *J Biol Chem*, 2007, **282**(40), 29540–29548.
- [5] Andreas KJ Vennendaal, Chris van der Does, Arnold JM Driessen. The protein-conducting channel SecYEG. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, **1694**: 81–95.
- [6] Sharyn L Rusch, Debra A Kendall. Oligomeric states of the SecA and SecYEG core components of the bacterial Sec translocon. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1768**: 5–12.
- [7] Johannes S, Nathalie B, Lars N, *et al.* The oligomeric distribution of SecYEG is altered by SecA and translocation ligands. *JMB*, 2005, **354**: 258–271.
- [8] Lucia B Jilaveanu, Christopher R Zito, Donald O. Dimeric SecA is essential for protein translocation. *PNAS*, 2005, **102**(21): 7511–7516.
- [9] Redmar Bol, Janny G de Wit, Arnold JM Driessen. The active protein-conducting channel of *Escherichia coli* contains an apolar patch. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(41): 29785–29793.
- [10] Lucia B Jilaveanu, Donald O. SecA dimer cross-linked at its subunit interface is functional for protein translocation. *Journal of Bacteriology*, 2005, **188**(1): 335–338.
- [11] Catherine B, Spyridoula K, Giorgos S, *et al.* Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD motor ATPase domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(16): 13724–13731.
- [12] Eleftheria V, Anastassios E. Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1694**: 67–80.
- [13] Linda L Randall, Jennine M Crane, Angela A Lilly, *et al.* Asymmetric binding between SecA and SecE two symmetric proteins: Implications for function in export. *JMB*, 2005, **348**: 479–489.
- [14] Zhou JH, Xu Zh H. The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecE: implications for function. *Molecular Microbiology*, 2005, **58**(2): 349–357.
- [15] Chetan N Patel, Virginia F Smith, Linda L Randall. Characterization of three areas of interactions stabilizing complexes between SecA and SecE, two proteins involved in protein export. *Protein Sci*, 2006, **15**: 1379–1386.
- [16] Hitoshi N, Akiko M, Hiroyuki M, *et al.* SecM facilitates translocase function of SecA by localizing its biosynthesis. *Genes & Dev*, 2005, **19**: 436–444.
- [17] Akiko M, Hitoshi N, Koreaki I. Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA. *PNAS*, 2004, **101**(33): 12330–12335.
- [18] Jerry E, William W. Both an N-terminal 65-kDa domain and a C-terminal 30-kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 5574–5581.
- [19] Karim K, Dominique B. A novel class of secA alleles that exert a signal-sequence-dependent effect on protein export in *Escherichia coli*. *Genetics*, 2002, **162**: 1031–1043.