

中国少棘蜈蚣毒腺应激转录因子 p8 cDNA 序列分析*

华卫建, 邹永梅, 陈 燊
(江苏教育学院 生物系, 南京 210013)

摘要 本文报道了中国少棘蜈蚣(*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)毒腺应激转录因子 p8 cDNA 全序列。该 cDNA 全长 838 bp, 5' 非翻译序列 97 bp 中含有 1 个转录起始元件 TCATTCT, 3' 非翻译序列 525 bp 中含有两个 mRNA 快速降解信号 ATTTTA, 多聚 A 尾前 13bp 有 1 个加尾信号 AATAAA。216 bp 的开读框编码 71 个氨基酸残基的 p8 核蛋白, 理论分子量为 8.4 kD, pI 值为 9.19。少棘蜈蚣 p8 蛋白与 10 种无脊椎动物毒腺和吸血唾液腺表达的 p8 蛋白的氨基酸序列一致性为 61%~79%, 相似性达 80%~91%; 它们的 N 端都无富 PEST 区, 但碱性螺旋-环-螺旋结构域高度保守。系统分析表明 p8 分子的直线进化具有 mRNA 稳定性增强、蛋白质稳定性降低、双价核定位序列的主结合序列增强等 3 个显著特征。对 10 种脊椎动物重复 p8 蛋白的分析提示, p8 基因的重复-趋异进化可能始于硬骨鱼与无脊椎动物分化前后。

关键词 少棘蜈蚣; 毒腺; 应激转录因子; p8/Nupr1/Com1; 直线进化; 平行进化

中图分类号 Q349+.5

文献标志码 A

文章编号 1672-669X(2011)06-0013-09

p8 蛋白又称核蛋白 1(Nuclear protein 1, Nupr1), 转移候选因子 1(Candidate of metastasis 1, Com1), 是细胞应激的一个重要转录调节因子, 在哺乳动物的病理和生理应激时表达上调, 进而通过对多种下游基因的调节, 在细胞生长、分裂和凋亡等多种途径中发挥重要的调控作用^[1-3]。在乳腺上皮细胞, p8 与 p53 及 p300 形成的复合体, 与 p21^{waf1} 的启动子结合, 促进 p21 表达的转录诱导^[4]。在 RIG9 细胞, p8 与通用转录因子 p300 结合, 并乙酰化, 再与细胞 Pax2 反式激活域的相互作用蛋白 PTIP 结合, 解除后者对胰高血糖素启动子的抑制^[5]。在肌细胞中, p8 与 p300、p68/Ddx5 和 MyoD 相协调, 与肌细胞生成素启动子相结合^[6]。此外, p8 还能通过对组蛋白乙酰转移酶相关蛋白 MSL1 的结合或抑制, 促进转录机器接近 DNA 而参与染色质的重构或松弛^[7]。

研究表明, p8 基因的异常表达对人体中胰腺癌、甲状腺癌、前列腺癌和乳腺癌等多种腺体肿瘤的发生发展、对性腺发育、骨骼肌分化、心肌肥大、肝损伤以及糖尿病性肾病等都有标志性影响^[1-3, 8-11]。而有关动物尤其是无脊椎动物 p8 基因的研究却还处于 cDNA 克隆、结构与表达特征分析及其与某种生

理功能的相关性探索的起始阶段。例如, Qiu 等^[12]报道了卤虫 p8 基因与胚胎滞育的关系; Wang 等^[13-14]报道了海胆和大西洋庸鲽的 p8 蛋白 cDNA 序列, 分析了它在胚胎发生及成体多种组织中的表达; Liu 等^[15]报道了青岛文昌鱼 p8 基因的全长 cDNA 和基因组 DNA 结构; Sun 等^[16]报道了斑马鱼 p8 基因的 cDNA 序列结构特征及它在胚胎发生和成鱼不同组织中的表达, 以及在多种应激环境中的表达上调。

动物毒腺是一种高度特化的分泌器官, 其分泌的毒液是多种生物活性分子的资源宝库, 其中的多肽毒素与毒蛋白, 很多都具有重要的药用前景。对毒素分泌的分子机制的研究开始受到关注, 但 p8 基因在毒腺和毒素分泌中的作用尚未见报道。少棘蜈蚣(*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)是中国传统的动物药材, 传统中医药用以毒攻毒、治疗多种疑难杂症, 这在《神农本草经》中已有记载^[17]。蜈蚣颚肢衍生的毒腺分泌的毒液含有磷酸酯酶^[18]、透明质酸酶^[19]、金属蛋白酶^[20]、丝氨酸蛋白酶(笔者尚未公开发表有关数据)、磷脂酶 A2^[21]等多种蛋白与多肽类毒素^[22-24], 可能在蜈蚣的药理药效中发挥积极的作用。本研究根据笔者所在实验室构建的少

* 收稿日期 2011-08-16 网络出版时间 2011-11-10 15:03

资助项目 江苏教育学院科学基金项目(No. 73801)

作者简介 华卫建, 男, 副教授, 研究方向为动物毒素。

网络出版地址 http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20111110.1503.201106.13_004.html

棘蜈蚣毒腺 cDNA 文库中已测序的 EST 序列,报道少棘蜈蚣毒腺表达的 p8 基因 cDNA 全序列,并对它的结构特征和 p8 蛋白的氨基酸序列进行初步分析,为进一步研究少棘蜈蚣 p8 基因在毒腺中的表达与调节、相互作用网络以及与毒液分泌的关系等研究奠定基础。

1 材料与方法

中国少棘蜈蚣 p8 蛋白的氨基酸序列由笔者所在实验室构建的中国少棘蜈蚣毒腺 cDNA 文库随机测序获得的核苷酸序列推导得来(同文献[25]) ,其余 54 种生物的 71 个 p8 蛋白的同源序列由 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 搜索从 NCB I 数据库中获取。用 ExPASy Protparam 在线工具(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)计算少棘蜈蚣 p8 蛋白的相对分子量、理论 pI 值等物理化学参数;用 PROSITE 在线工具(<http://expasy.org/prosite/>)进行 p8 蛋白的结构域及活性位点分析;用 MEME 在线工具(http://meme.sdsc.edu/meme4_6_0/cgi-bin/meme.cgi)进行 p8 多肽的多模体预测;用 MEGA4.0 软件^[26]进行 p8 氨基酸序列的多重比对、计算各 p8 分子氨基酸序列之间的遗传距离并绘制

NJ 树。Bootstrap 检验重复数 1 000 ,其余各参数采用默认设置。

2 结果与分析

2.1 p8 蛋白的序列及结构域

中国少棘蜈蚣 p8 基因 cDNA 全长 838 bp (Gen-Bank 登陆号 JF701925) ,其中 216 bp 的开放阅读框编码 71 个氨基酸残基的多肽。5'非翻译序列 97 bp 中,翻译起始位点前 12 bp 处有 1 个转录起始元件 TCATTCT。3'非翻译序列 525 bp 中含有两个快速降解 mRNA 的信号 ATTTTAA、1 个多聚 A 加尾信号 AATAAA 及多聚 A 尾(图 1)。CDD 检索确认该蛋白属于磷酸化 p8 超家族。少棘蜈蚣 p8 蛋白的理论分子量 8 394.2 D ,pI = 9.19 ;少棘蜈蚣 p8 蛋白含有已知 p8 分子中最保守的碱性螺旋-环-螺旋(Basic helix-loop-helix ,bHTH ,)的 DNA 结合结构域,它对应的保守序列分别为碱性 26-GKQRSK-31、螺旋 I : 32-REVSEHT-38、环 :39-NHFDPSG-45、螺旋 II :46-HARKIVTKL-54(图 2)。对照卤虫 p8 蛋白的结构^[12],预测少棘蜈蚣 p8 蛋白的 R48-A66 的双组分核定位序列(Bipartite nuclear localization sequence , bNLS)与螺旋 II 部分重叠(图 2)。



注 # 4 个方框依次标注转录起始元件 TCATTCT、起始密码子 ATG、终止密码子 TAA 和多聚腺苷酸化信号 AATAAA ,两个阴影框标注 mRNA 快速降解信号 ATTTTAA。

图 1 中国少棘蜈蚣毒腺 p8 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 The complete p8 gene cDNA and deduced amino acid sequences of *S. s. mutilans*



注：“-”表示比对时必要的氨基酸缺口，阴影部分的字母代表保守的氨基酸，方框表示碱性螺旋环螺旋结构域，双组分核定位信号用下划线表示，粗体字表示核定位信号结合位点。各序列名称对应的物种及 GI 号为：Ada(*Anopheles darlingi* gi_208657725)，Sni(*Simulium nigri-rimanum* gi_269146672)，Svi(*Simulium vittatum* gi_197260776)，Ssm(*S. s. mutilans*)，Tin(*Triatoma infestans* gi_149898814)，Lob(*Lonomia obliqua* gi_56462326)，Gmm(*Glossina morsitans morsitans* gi_289742343)，Xch(*Xenopsylla cheopis* gi_121511990)，Isc(*Ixodes scapularis* gi_67083903)，Rsj(*Rhipicephalus sanguineus* gi_260908473)，Opa(*Ornithodoros parkeri* gi_149287022)，Afr(*Artemia franciscana* gi_87116779)。

图 2 已知毒腺和吸血唾液腺表达的 p8 蛋白与卤虫 p8 蛋白的氨基酸序列比对和结构分析

Fig. 2 Sequence alignment and structure analysis of venom and blood sucking sialome expressed p8 proteins with *Artemia* (shrimp) p8 protein

2.2 p8 核蛋白的毒腺-唾液腺表达

以上述推定的少棘蜈蚣毒腺 p8 蛋白的氨基酸序列作 Blast 检索，所获同源序列中在蛛型纲和昆虫纲动物的毒液分泌腺或吸血唾液腺中表达的有 10 条(图 2)，表明 p8 基因在节肢动物毒腺或吸血唾液腺中的表达比较普遍。进一步对比这 11 条多肽序列，发现它们的一致性达 61% ~ 79%，相似性更高达 80% ~ 91%，分子内 bHTH 结构域的保守性最强，其中的 bNLS 中的核定位序列次结合位点 RK^[27] 的保守性又强于主结合位点 K/RK/RN(图 2)。

2.3 p8 核蛋白的分子进化

2.3.1 p8 核蛋白的直线进化 55 种动物的 72 个 p8 核蛋白的系统树比较清晰地分为脊椎动物和无脊椎动物两大分支(图 3)。无脊椎动物 p8 蛋白分支整体上比较明显地呈现逐级分支的直线进化趋势，少棘蜈蚣 p8 蛋白与 4 种蛛型纲动物的 p8 蛋白最近；脊椎动物分支则又分为两支：从鸭嘴兽(*Ornithorhynchus anatinus*)p8 蛋白到人(*Homo sapiens*)p8 蛋白 a/b 变体为代表的已知哺乳类 p8 蛋白分支也呈典型的逐级分支进化趋势；以功能未明的人 p8 蛋白同源物 LOC389493 为代表的一类则与斑马鱼(*Danio rerio*)、狗鱼(*Esox lucius*)等其它脊椎动物的 p8 蛋白及同源物归为另一平行子枝，提示 p8 基因从无脊椎动物向脊椎动物进化过程中，可能经历了重复-分化的平行同源进化。青岛文昌鱼(*Branchiostoma*

belcheri tsingtauense)和囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*)这两种低等脊索动物的 p8 蛋白介于上述无脊椎动物与脊椎动物 p8 蛋白之间，恰与它们的进化地位相吻合。

进一步对上述 p8 蛋白的氨基酸序列及结构域进行分析，存在于无脊椎动物中的 38 个 p8 蛋白长 68.2 ± 4.31 个残基，而存在于脊椎动物中的 34 个 p8 蛋白长 90.7 ± 18.34 个残基，其 N 端比无脊椎动物 p8 蛋白平均延长 20.8 ± 17.77 个残基。这表明 N 端延长是无脊椎动物 p8 蛋白向脊椎动物 p8 蛋白直线同源进化的主要特征之一。深入比较脊椎动物和无脊椎动物 p8 蛋白的 N 端(以第一个最保守的 D 残基为界)，发现无脊椎动物 p8 蛋白的一致序列为 MSE [AS]HFD，脊椎动物尤其是哺乳类已知 p8 蛋白的优势序列为 MAT[FL]PP[AT][AT][SN][AP][PS]QQP[GN]PEDED[X]SLD，其中相对保守的 PEST 残基有 11 个，占 44%，表明 p8 蛋白直线进化的 N 端延伸中，PEST 残基的增加是一个主要趋势；以功能未明的人 LOC389493 为代表的 9 种哺乳类 p8 蛋白同源物的 N 端更长，PEST 残基更是多达 13.7 ± 4.47 个，但它们的序列的保守性却很低，再次提示了它可能相对独立的平行进化。已知富含脯氨酸 P、E、S、T 的序列能促进蛋白的泛素依赖型蛋白酶体快速降解^[28-29]，p8 蛋白直线进化中上述 N 端富 PEST 序列的增加可能提示该蛋白的基因表达调节

方式的改变。

除了上述 N 端的普遍延长及 PEST 残基的增加外, C 端的 1~12 个残基数目及性质也高度变异, 唯有中部的 bHTH 结构域及近 C 端的 bNLS 的保守性较强(表 1)。比较无脊椎动物 p8 蛋白和脊椎动物 p8 蛋白的 bNLS, 它们的核定位序列次结合位点两

残基 RK 基本保守, 主结合位点则发生了从无脊椎动物 p8 蛋白的连续 2~3 个碱性残基 K/RK/R(K/R)到脊椎动物 p8 蛋白的连续 4 个碱性残基 RKRK 的变化。表明 p8 蛋白的系统进化中核定位序列主结合位点有逐渐增强的趋势。文昌鱼 p8 蛋白似兼具双方的特征。

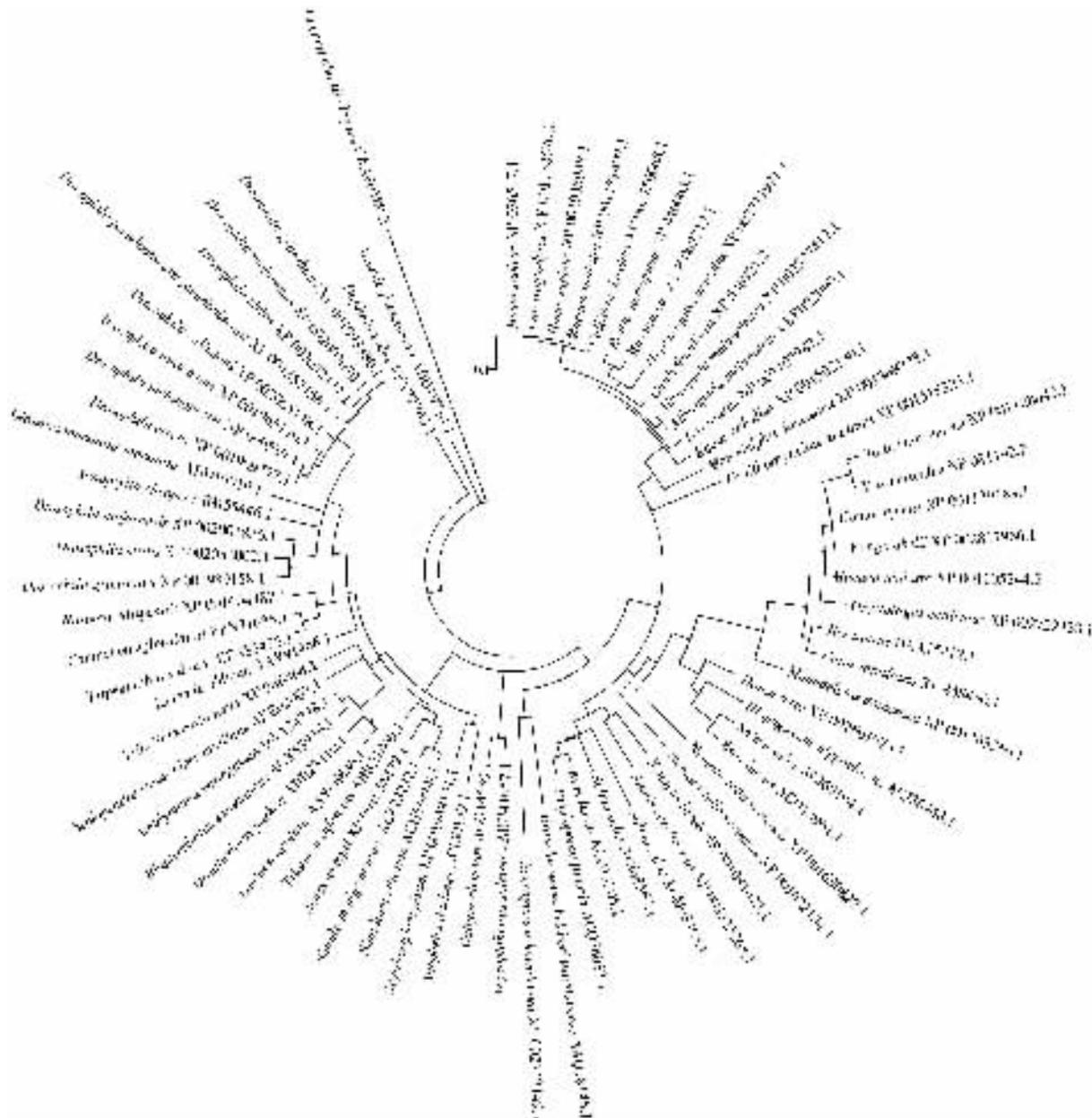


图 3 55 种生物 72 个 p8 蛋白的 NJ 系统树

Fig. 3 NJ tree of 72 p8 proteins from 55 species

表 1 无脊椎动物与脊椎动物 p8 蛋白结构域的比较

Tab. 1 Domain comparison between vertebrate and invertebrate p8 proteins

	碱性螺旋环螺旋结构域	双组分核定位信号
无脊椎动物	GKQRsKKEASEHTNHIDPSGHSRKiITK	RK-N ₉₋₁₃ -K/RK/R(K/R)
脊椎动物	-KGRTKREAAaNTNRpspGGHERKLVTK	RK-N ₉₋₁₀ -R/KKK/RK/R
青岛文昌鱼	GKGRTKREQLHSTRFDPCGNVRITVTK	RI-N9-RKRK

2.3.2 p8 核蛋白的平行进化 根据上述系统分析的结果,从 72 个 p8 蛋白及同源分子中选出已知具有两个不同染色体定位的 8 种哺乳动物的 17 个同源分子(表 2)作多序列比对与聚类分析,结果明确地将之分为功能已知的 p8 分子和功能未明的同源分子(暂名为 Nupr1-like,类核蛋白 1)两分支;进一步将两种硬骨鱼的氨基酸序列同源性小于 70%(一致

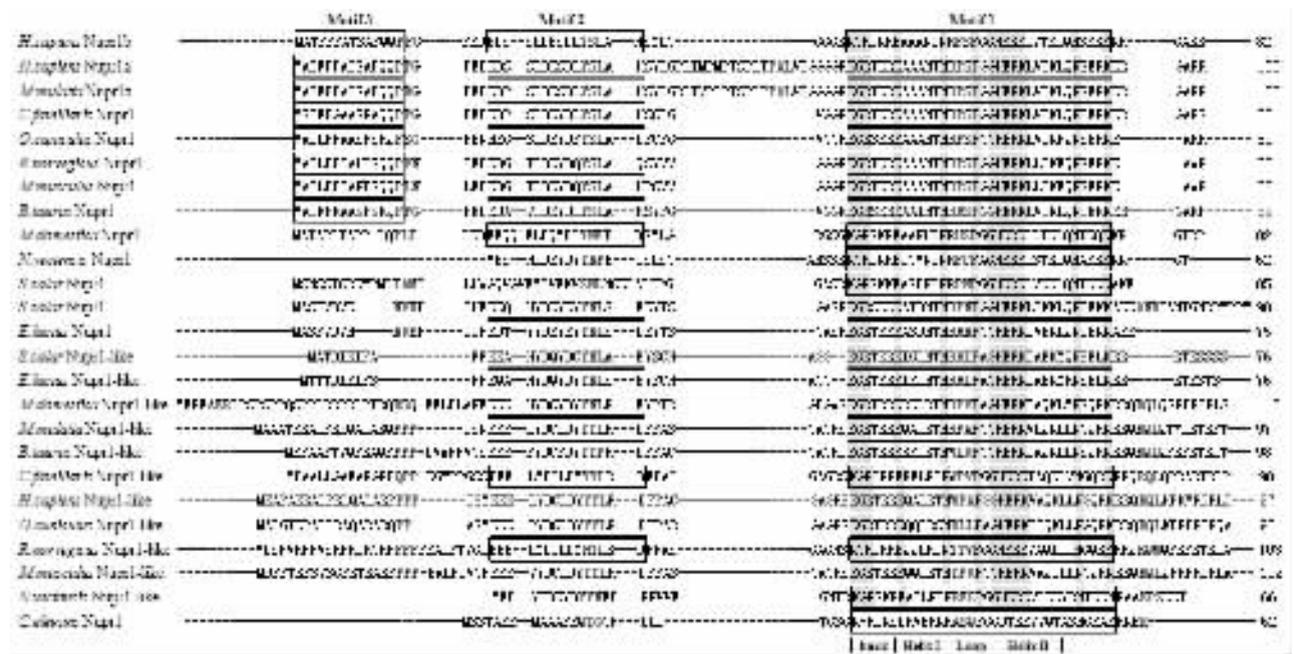
性小于 60%)的 5 个 p8 同源分子纳入分析(图 4),仍然得到两分支的结果(图 5)。说明脊椎动物中确实存在基因重复后趋异进化的两类 p8 分子,并且该基因复制事件很可能发生在硬骨鱼与无脊椎动物分化前后。大西洋鲑(*Salmo salar*)在功能 p8 分支中还存在两个序列结构明显不同的分子,表明 p8 基因在该物种分化后又经历了一次复制事件。

表 2 8 种哺乳动物的不同染色体定位的重复 p8 蛋白的特征比较

Tab.2 Characters of repeated p8 proteins with different chromosome location from 8 mammalian species

物种	序列号	产物名称	氨基酸残基数/个	序列相似性/%	染色体定位
<i>H. sapiens</i>	NP_036517.1	Nupr1 b	82	82	16p11.2
	NP_001035948.1	Nupr1 a	100		16p11.2
	NP_001139184.1	LOC389493/Nupr1-like	97	36.8	7p11.2
<i>M. mulatta</i>	NP_001181402.1	Nupr1a	100	43.1	20
	XP_001105244.2	LOC389493-like/Nupr1-like	97		3
<i>O. cuniculus</i>	XP_002711921.1	Nupr1	80	44.3	6
	XP_002722333.1/95-190	Hypothetical protein/Nupr1-like	96		未知
<i>R. norvegicus</i>	NP_446063.1	Nupr1	80	41.7	1q36
	NP_001128042.1	LOC360799/Nupr1-like	103		12q13
<i>M. musculus</i>	NP_062712.1	Nupr1	80	43.1	7
	NP_081192.2	LOC69034/Nupr1-like	102		5
<i>B. taurus</i>	NP_001107987.1	Nupr1	82	51.0	25
	DAA15412.1	LOC614047/Nupr1-like	98		25
<i>C. familiaris</i>	XP_536921.2	Nupr1	82	49.5	6
	XP_848450.1	Nupr1-like	98		6
<i>M. domestica</i>	XP_001368778.1	hypothetical protein/Nupr1	82	42.0	6
	XP_001363260.1	4930579G22/Nupr1-like	112		2

注:序列相似性一栏的数据指同一物种中某序列与上一行同源序列间的相似性。



注:“-”表示比对比时必要的氨基酸缺口 阴影部分的字母代表保守的氨基酸 方框表示预测的 3 个模体 碱性-螺旋 1-环-螺旋 2 结构域以竖线标出。

图 4 10 种脊椎动物的 22 个 p8 蛋白及其同源蛋白与线虫 p8 蛋白的氨基酸序列比对

Fig.4 Sequence alignment of 22 p8 proteins and homologs from 10 vertebrates with *Caenorhabditis elegans* p8

相反的调节模式。

少棘蜈蚣毒腺表达的 p8 基因 mRNA 的 3' 侧翼序列中存在 2 个快速降解 mRNA 的信号序列 ATTTTAA, 表明该 p8 基因 mRNA 的半衰期可能很短。已知卤虫 p8 基因 mRNA 的 3' 侧翼区也有两个同类的降解信号 ATTTA, 该 mRNA 在滞育胚胎的受精后第一天大量表达, 随后就快速降解, 至受精后第 4 天已检测不到^[12]。与此相似, 同源检索获得的无脊椎动物 p8 基因 mRNA 中, 序列长度包含 3' 下游的加尾信号或多聚 A 尾的 13 个分子, 都含有 1~3 个 mRNA 快速降解信号, 提示无脊椎动物 p8 基因 mRNA 可能普遍都包含此类快速降解信号, 即无脊椎动物 p8 基因 mRNA 的半衰期可能普遍都比较短。

另一方面, 少棘蜈蚣毒腺表达的 p8 蛋白与其它 10 种无脊椎动物的毒腺及吸血唾液腺表达的 p8 蛋白在 N 端都不含富 PEST 序列, 表明它可能相对比较稳定。同样缺乏 PEST 域的卤虫 p8 蛋白, 从受精后第 2 天到第 5 天一直稳定地存在, 直到滞育后发育期^[12] 就是这种稳定性的有效例证。无脊椎动物 p8 多肽的这种稳定性, 恰与不经特殊处理一般无法检测到哺乳动物 p8 多肽的事实相对应。

综上两点, 无脊椎动物 p8 基因的表达可能具有 mRNA 半衰期短、蛋白质半衰期相对长的调控特点, 恰与人及大鼠为代表的哺乳动物 p8 基因 mRNA 半衰期相对长、蛋白质半衰期相对短的调控模式相反。从基因表达调控的角度看, 这种转录后调控与翻译后调控的相应转换的进化意义, 以及这样的调控模式对 p8 分子的功能及与它相互作用分子有何影响, 都值得进一步探明。

3.3 p8 分子直线进化的 3 大特征

如前所述, p8 分子的直线进化, 具有因 mRNA 快速降解信号的减弱以至消失导致的 mRNA 稳定性增强和由多肽 N 端 PEST 域的增加导致的多肽稳定性降低的两大显著特征。本文揭示的 p8 分子直线进化的另一个特征是 p8 bNLS 主结合位点的增强。该序列特征是 p8 bNLS 主结合位的连续碱性残基数从无脊椎 p8 蛋白的 2 或 3 个到哺乳类 p8 蛋白的连续 4 个(图 2、4 及表 1), 其直接效应可能是 p8 蛋白核定位功能的增强。Valacco 等用 GFP 融合标记研究人 p8 蛋白 b 变体的亚细胞定位, 发现融合蛋白 GFP-p8 和 GFP-NLS p8 定位在细胞核, 而 K65、K69、K76 和 K77 都突变为丙氨酸的 GFP-p8 NLSmut 则定位于包括细胞核与细胞质的整个细胞, 且其中

的 K76 和 K77 为 bNLS 主结合位连续 4 个碱性残基的第 2、3 位^[30], 似乎论证了 bNLS 主结合位的碱性残基数对其核定位能力的强弱有直接影响。

从 MEME 多模体分析的角度考察 p8 蛋白的直线进化, 可以看出哺乳类功能 p8 蛋白 N 端的两个富 PEST 模体是由无脊椎动物 p8 蛋白的 N 端延长和序列趋异而来, p8 蛋白在直线进化中经历了从模体 1→模体 1+2→模体 1+2+3 的系统进化过程, 并由此实现了该蛋白从无脊椎动物中的相对稳定到哺乳类中的快速降解之调节模式的转换。显然, 这对于进一步巩固和强化 p8 蛋白的翻译后降解调节, 使它作为瞬时转录调节因子对下游靶基因的转录调节功能更加精准是十分有益的。

3.4 p8 基因平行进化的可能途径

55 个物种的 72 个 p8 蛋白及同源分子中, 从线虫到文昌鱼的无脊椎动物基因组大多只有 1 个 p8 分子, 两种硬骨鱼和 8 种哺乳动物则具有 2 或 3 个趋异明显的 p8 分子, 表明 p8 基因的重复-趋异很可能是在脊椎动物形成前后开始的。Ohno 认为脊椎动物进化历程中发生过至少一次全基因组倍增^[31], Taylor 等通过对 49 个基因的系统分析进一步指证鱼类的进化经历了一次大规模基因倍增^[32]。据此推测, p8 基因的平行同源进化很可能是从鱼类的大规模基因倍增开始的。已经确定的人、猕猴(*Macaca mulatta*)、大鼠、小鼠、负鼠(*Monodelphis domestica*) 等的 p8 平行同源分子的不同染色体定位, 也从一个侧面论证了 p8 基因的倍增可能不是通过串联倍增方式、而是通过大规模基因倍增途径实现的。

Erik 和 Eugene 将 Paralogous gene^[33] 作了进一步区分^[34], 将给定世系中物种分化后发生复制事件产生的基因称为 Inparalog(译为“内平行同源基因”或“内并源基因”), 物种分化前发生复制事件产生的基因称为 Outparalog(译为“外平行同源基因”或“外并源基因”)。据此, 大西洋鲑的 ACM08463.1 和 ACI68567.1 两个 p8 分子产生于该物种形成之后的基因重复, 属典型的 Inparalog; 其余物种的成对 p8 及同源分子则均源于脊椎动物与无脊椎动物分化之初或脊椎动物分化之前的 p8 基因重复或大规模基因倍增事件, 其中已知的功能 p8 基因构成一个直线同源系列, Nupr1-like 构成平行的另一直线同源系列, 两者互为 Outparalog。

重复基因具有高度不稳定性, 很容易丢失^[35]。本文初步检索的结果, 未在其它硬骨鱼和两栖及爬

行类中获得 p8 的同源蛋白,可能的原因之一就是 Nupr1-like 在这些物种中丢失的结果;当然,也不能排除现有基因组和蛋白质组数据不完全等信息不足的原因。

重复基因的进化除不稳定-丢失之外,存留者则由序列趋异失去功能成为假基因,或产生新功能、或获得新的表达调控方式。本文揭示的无脊椎动物 p8-硬骨鱼功能 p8-哺乳类功能 p8 系统,作为 p8 重复基因中的一支,伴随着 N 端的延长、富 PEST 的模体 2 和 3 的分化,实现了 p8 蛋白从无脊椎动物中的相对稳定到哺乳类中的快速降解之调节模式的转换。这为人们提供了重复基因进化中伴随着结构域的亚功能化^[36]同时实现调控区的亚功能化^[37]的几近完美的实例。Nupr1-like 分支的进化,则在保持 p8 蛋白的主要结构-功能域——模体 1 的基本保守和分化出稍稍不同的模体 2 的基础上,发生了 N 端序列的较大变异。该线系分子是否已经失去基本的转录调节功能成为假基因,还是依然保有转录调节功能、但在时空表达模式上出现了不同于其 Out-paralog 的分化,尚待实验的检验。

p8 基因的平行进化中,海葵(*N. vectensis*)的两个 p8 蛋白也非常独特:两个分子的全长仅 62 和 66 个氨基酸残基、N 端也明显属于无脊椎动物 p8 类型,但两者的序列差异却高达 33%,其 bHTH 域及 bNLS 又显著偏向脊椎动物 p8 蛋白类型,因而都被归入脊椎动物的分支,其中的一个甚至更接近哺乳动物渐进分化的功能 p8 蛋白主枝。这与基因组全序列分析揭示的海葵基因组与人类等脊椎动物基因组的相似度高于无脊椎的果蝇和线虫基因组的结果相似^[38]。究竟是由于 p8 蛋白的系统进化早在腔肠动物(或更早)阶段之前就有了不同类型的分化,还是另有其他原因,同样有待深入探明。

除基因倍增外,选择性剪切也是产生基因时空表达模式多样性的重要机制之一。p8 蛋白进化主枝上人 p8a 分子变体和猕猴同源分子的发现,再次提示了 p8 蛋白进化中调控模式改变的主要趋势。今后对 p8 蛋白的研究,除了需要尽快确定人 p8a 分子的确切功能及其时空表达模式外,对其它哺乳动物、甚至其他脊椎动物 p8a 分子的发现与功能及表达模式鉴定,也是值得关注的领域之一。

本研究获得的中国少棘蜈蚣应激转录因子 p8 cDNA 全序列和用生物信息学分析获得的 p8 基因结构、功能和表达调控信息,特别是分子系统学分析

获得的 p8 基因直线进化和平行进化信息,为进一步研究 p8 基因在蜈蚣和其他无脊椎动物毒腺中的表达调节及其与毒液分泌的关系奠定了较好的基础,也为其它生物和其它组织器官中的 p8 基因研究提供了有益的启示。

致谢:本系学生梁锦丽参与本文部分文献搜集和整理,特此致谢。

参考文献:

- [1] Goruppi S, Iovanna J L. Stress-inducible protein p8 is involved in several physiological and pathological processes [J]. *J Biol Chem* 2010, 285(3):1577-1581.
- [2] Jin H O, Seo S K, Woo S H, et al. Nuclear protein 1 induced by ATF4 in response to various stressors acts as a positive regulator on the transcriptional activation of ATF4 [J]. *IUB-MB Life* 2009, 61(12):1153-1158.
- [3] 孙强, 杨晓. p8-应激调节的多功能核蛋白 [J]. *现代生物医学进展* 2009, 9(7):1345-1349.
- [4] Clark D W, Mitra A, Fillmore R A, et al. Nupr1 interacts with p53, transcriptionally regulates p21 and rescues breast epithelial cells from doxorubicin-induced genotoxic stress [J]. *Current Cancer Drug Targets* 2008, 8(5):21-30.
- [5] Hoffmeister A, Ropolo A, Vasseur S, et al. The HMG-I/Y-related protein p8 binds to p300 and Pax2 trans-activation domain-interacting protein to regulate the trans-activation activity of the Pax2A and Pax2B transcription factors on the glucagon gene promoter [J]. *J Biol Chem* 2002, 277(25):22314-22319.
- [6] Sambasivan R, Cheedipudi S, Pasupuleti N, et al. The small chromatin-binding protein p8 coordinates the association of anti-proliferative and pro-myogenic proteins at the myogenin promoter [J]. *J Cell Sci* 2009, 122(19):3481-3491.
- [7] Gironella M, Malicet C, Cano C L, et al. p8/Nupr1 regulates DNA-repair activity after double-strand gamma irradiation-induced DNA damage [J]. *J Cell Physiol* 2009, 221:594-602.
- [8] Chowdhury U R, Samant R S, Fodstad O, et al. Emerging role of nuclear protein 1 (Nupr1) in cancer biology [J]. *Cancer Metastasis Review* 2009, 28(1/2):225-232.
- [9] 张博, 孙强, 杨晓, 等. 肿瘤相关应激分子 p8 [J]. *生物技术通讯* 2009, 20(6):843-845.
- [10] Goruppi S, Patten R D, Force T, et al. Helix-loop-helix protein p8, a transcriptional regulator required for cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast matrix metalloprotease induction [J]. *Mol Cell Biol* 2007, 27(3):993-1006.
- [11] Iovanna J L. Expression of the stress-associated protein p8

- is a requisite for tumor development[J]. *Int J Gastrointest Cancer* 2002 ,31(1/2/3) :89-98.
- [12] Qiu Z J ,Thomas H. MacRae ,Developmentally regulated synthesis of p8 ,a stress-associated transcription cofactor , in diapause-destined embryos of *Artemia franciscana*[J]. *Cell Stress & Chaperones* 2007 ,12(3) :255-264.
- [13] Wang J Q ,Han J C ,Li D Z ,et al. In silico cloning and characterization of p8 homolog cDNA from common urchin (*Paracentrotus lividus*) [J]. *Mol Biol Rep* 2009 ,36(8) :2431-2437.
- [14] Wang J Q ,Li L C ,Lin S G ,et al. Cloning and characterization of p8 homolog cDNA in the Atlantic halibut(*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Biochem Genet* ,2010 ,48(5/6) :504-15.
- [15] Liu Z H ,Sun Y L ,Liu N G ,et al. Characterization ,expression and response to stress of p8 gene in amphioxus[J]. *Fish & Shellfish Immunology* 2009 ,27(3) :407-413.
- [16] Sun Y ,Liu Z ,Zhang S. Tissue distribution ,developmental expression and up-regulation of p8 transcripts on stress in zebrafish[J]. *Fish Shellfish Immunology* ,2010 ,28(4) :549-554.
- [17] 孙星衍. 神农本草经[M/OL]. [2011-08-16]. http://www.theqi.com/emed/oldbook/sn_herb/.
- [18] 汪猷 陈耀全 韩友娣 等. 蜈蚣粗毒的生物活性[J]. *科学通报* ,1985 ,3 :218-220.
- [19] 吴刚 冉永禄 凌沛深 等. 蜈蚣毒的化学组成和生物活性[J]. *生物化学杂志* ,1992 ,8(2) :144-149.
- [20] Malta M B ,Lira M S ,Soares S L ,et al. Toxic activities of Brazilian centipede venoms[J]. *Toxicon* ,2008 ,52(2) :255-263.
- [21] González-Morales L ,Diego-García E ,Segovia L. Venom from the centipede *Scolopendra viridis* Say : purification , gene cloning and phylogenetic analysis of a phospholipase A₂ [J]. *Toxicon* 2009 ,51(1) :1-8.
- [22] Rates B ,Bemquerer M P ,Richardson M ,et al. Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata*(Centipede ,Scolopendromorpha) :Shedding light on venoms from a neglected group[J]. *Toxicon* ,2007 ,49(6) :810-826.
- [23] Stankiewicz M ,Hamon A ,Benkhalifa R ,et al. Effects of a centipede venom fraction on insect nervous system ,a native *Xenopus* oocyte receptor and on an expressed *Drosophila* muscarinic receptor[J]. *Toxico* ,1999 ,37(10) :1431-1445.
- [24] Gutierrez M C ,Abarca C ,Possani L D. A toxic fraction from scolopendra venom increases the basal release of neurotransmitters in the ventral ganglia of crustaceans[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* ,2003 ,135(2) :205-14.
- [25] 华卫建 ,任玫 ,吴晓菁. 中国少棘蜈蚣与家蚕和野桑蚕肌球蛋白轻链2 的结构功能分析比较[J]. *蚕业科学* ,2008 ,34(4) :663-669.
- [26] Tamura K ,Dudley J ,Nei M ,et al. MEGA4 :molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4. 0 [J]. *Molecular Biology and Evolution* 2007 ,24(8) :1596-1599.
- [27] Marcos R ,Fontes M ,Trazel T ,et al. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importing- α [J]. *J Mol Biol* ,2000 ,297 :1183-1194.
- [28] Goruppi S ,Kyriakis J M. The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/akt- and glycogen synthase kinase-3-dependent manner ,whereas endothelin induction of p8 mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4 [J]. *J Biol Chem* ,2004 ,279(20) :20950-20958.
- [29] Rechsteiner M ,Rogers S W. PEST sequences and regulation by proteolysis[J]. *Trends Biochem Sci* ,1996 ,21 :267-271.
- [30] Valacco M P ,Varone C ,Malicet C ,et al. Cell growth-dependent subcellular localization of p8 [J]. *J Cell Biochem* ,2006 ,97(5) :1066-1079.
- [31] Ohno S. Evolution by gene duplication[M]. New York : Springer-Verlag ,1970.
- [32] Taylor J S ,Braasch I ,Frickey T ,et al. Genome duplication ,a trait shared by 22000 species of ray-finned fish [J]. *Genome Res* 2003 ,13(3) :382-390.
- [33] Fitch W M ,Distinguishing homologous from analogous proteins[J]. *Syst Zool* ,1970 ,19(2) :99-113.
- [34] Sonnhammer E L L ,Koonin E V. Orthology ,paralogy and proposed classification for paralog subtypes[J]. *Trends in Genetics* 2002 ,18(12) :619-620.
- [35] 彭贵子 陈玲玲 田大成. 基因重复的研究进展[J]. *遗传* ,2006 ,28(7) :886-892.
- [36] Hughes A L. The evolution of functionally novel proteins after gene duplication[J]. *Proc Biol Sci* ,1994 ,256 :119-124.
- [37] Force A ,Lynch M ,Pickett F B ,et al. Preservation of duplicate genes by complementary ,degenerative mutations[J]. *Genetics* ,1999 ,151 :1531-1545.
- [38] Putnam N H ,Srivastava M ,Hellsten U ,et al. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization[J]. *Science* ,2007 ,317(5834) :86-94.

Animal Sciences

The Sequence Analysis of Chinese *Scolopendra Subspinipes Mutilans* ' Stress Transcription Factor p8 cDNA from Poison Gland

HUA Wei-jian , ZOU Yong-mei , CHEN Yu

(Biology Dept. , Jiangsu Institute of Education , Nanjing 210013 , China)

Abstract : Here we report the complete cDNA sequence of a stress transcription factor p8 from poison gland of *Scolopendra Subspinipes Mutilans*. The cDNA was 838 bp in full-length , an initiator element TCATTCT was found in its 97 bp 5'-untranslated region , two mRNA rapid degradation signal of ATTTTA were found in its 525 bp 3'-untranslated region , and one AATAAA was found 13 bp before the poly-A tail. The 216 bp open reading frame(ORF) encodes the p8 nuclear protein of 71 amino acids with the predicted molecular weight of 8.4 kD and the isoelectric point of 9.19. The sequence identities of the centipede p8 peptide with 10 other p8 expressed in venom and blood-sucking salivary gland of invertebrate were 61% ~ 79% , and the similarities were 80% ~ 91% . There was no PEST rich region near the N term of these invertebrate p8 , but the basic helix-loop-helix domain was highly conserved. Phylogenetic analysis revealed three striking characteristics in p8 homologous evolution , the grown up of mRNA stability , the decreased peptide stability and also increased major binding site of its bipartite nuclear localization sequences. Analysis on duplicated p8 from 10 vertebrate species suggested the duplication-divergent evolution of p8 gene may start at the time of divergence of bony fish from invertebrate.

Key words : *Scolopendra Subspinipes Mutilans* ; poison gland ; stress transcription factor ; p8/Nupr1/Com1 ; homologous evolution ; parallel evolution

(责任编辑 方 兴)