

热休克蛋白的分子生物学

梅尚筠 梅星元

(华中师范大学生物系, 武汉)

提 要

热休克应答是一种普遍的生物学现象。热休克蛋白 (hsp) 分为高分子量和低分子量两大类。hsp 基因的表达是在转录水平和翻译水平进行调节的。hsp 的功能与调节机体的耐热性有关。

早在 1935 年 Goldschmidt^[1] 就研究了热对果蝇基因表达的影响, 加热果蝇的蛹可诱导出发育缺陷型, 称之为拟表型。1962 年 Ritossa^[2] 观察到果蝇的幼虫在 30℃ (比正常温度高 5℃) 时, 其唾液腺的染色体上产生了特殊的膨突 (puffs)。1974 年 Tissierres^[3] 等人在黑腹果蝇中发现了热休克蛋白 (Heat shock protein, 简称 hsp)。热休克 (简称 HS) 和环境的应力 (stress) 诱导产生了 hsp 并关闭了正常蛋白质

合成的生理反应称为热休克应答 (Heat shock response)。热休克应答现象在原核生物和真核生物中都被发现过, 此反应可能是使细胞适应迅速的 HS 并对相继的 HS 产生耐热性。近年来发现这是一种普遍的生物学现象, 因而也是当今非常活跃的研究领域。

一、热休克蛋白的合成

所有有机体诱导产生的 hsp 可以粗略地分

的复杂的生命现象, 不能不理解其骨架的主要成份——微管的作用方式; 这, 又离不开对微管蛋白——微管结构、性质、功能的主角的认识。由于微管遍布整个真核细胞, 微管蛋白几乎与所有的细胞组份都有联系, 故影响其行为的因素特别多: 温度、压力、激素、ATP 浓度、GTP 浓度、胞质粘度、MAPs 等。真正弄清上述因素如何在多个层次上影响微管蛋白基因的转录、转译, 影响各类微管蛋白异构体从而影响微管, 由此而影响到真核细胞的新陈代谢, 将在今后一段长时期内摆在我们面前。这是人类揭示真核细胞生命活动奥秘的必由之路。

参 考 文 献

- [1] Adachi, Y. et al.: *Molecular and Cellular Biol.*, 1986, 6(6), 2169.
- [2] Cassimeris, L. U. et al.: *J. Cell Biol.*, 1986, 102(6), 1023.
- [3] Cleveland, D. W. et al.: *Nature (Lond.)*, 1983, 306,

- 738.
- [4] Dustin, P.: *Sci. Amer.*, 1980, 243(2), 66.
- [5] Gundersen, G. G. et al.: *J. Cell Biol.*, 1986, 102, 1118.
- [6] Harada, F. et al.: *Exptl. Cell Res.*, 1986, 166(2), 265.
- [7] Hill, T. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1983, 80, 7234.
- [8] Holtzman, E. & Novikoff, A. B.: *Cells & Organelles* (3rd ed.), Saunders College Publishing, 1984.
- [9] Inoué, S.: *J. Cell Biol.*, 1986, 103(2), 13.
- [10] Kimura, M.: *The Neural Theory of Molecular Evolution*, Cambridge University Press, 1983.
- [11] LeDizet, M. et al.: *J. Cell Biol.*, 1986, 103(2), 13.
- [12] Margolis, R. L. et al.: *Nature (Lond.)*, 1981, 293, 705.
- [13] Mitchison, T.: *Nature (Lond.)*, 1984, 312, 237.
- [14] Mohri, H.: *Nature (Lond.)*, 1968, 217, 1053.
- [15] Salmon, E. D. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 99, 2157.
- [16] Salmon, E. D. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 99, 1066.
- [17] Saxton, W. M. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 99, 2175.
- [18] Thompson, W. M. et al.: *J. Cell Biol.*, 1984, 98, 1017.
- [19] Whitfield, C. et al.: *Molecular and Cellular Biol.*, 1986, 6(5), 1422.
- [20] 周立庆: «生命的化学», 1986, 6(4), 27.

[本文于 1987 年 3 月 23 日收到]

成两类：高分子量热休克蛋白（HMW-hsp）和低分子量热休克蛋白（LMW-hsp）。

HMW-hsp：在哺乳动物、昆虫和酵母等细胞中大量的 hsp 是 HMW-hsp（65、68、70、82—84、90 和 100—110kD）。

果蝇中 hsp83 是染色体 63BC 区单一基因的编码产物。不同的细胞系和组织在正常温度时（25℃）都可合成，但合成量不多。hsp 83 和哺乳动物的 hsp 85 具有同源性。

hsp 70 是最保守而又最普遍的一种。黑腹果蝇 hsp 70 是由染色体 87A₁ 区的两个 hsp 基因和 87C₁ 区的三个 hsp 基因的编码产物。由鸡胚成纤维细胞分离出的 hsp70 并制成抗体，此抗体能与梨形四膜虫，人细胞系和高等植物等的 hsp70 发生交叉反应^[4]。果蝇 hsp 68 及 hsp72 和 hsp70 也具有同源性。

有些种类的植物 HMW-hsp 两维凝胶电泳分辨出不到十种（至少有一种 90—110kD，一或两种为 80—90kD，二或三种为 68—75kD）。看来植物的 HMW-hsp 不及动物、昆虫等丰富^[5]。

LMW-hsp：果蝇的四个小的热休克蛋白 hsp22、hsp23、hsp26 和 hsp27 是由染色体 67B 区的一簇四个小的基因编码的。这些 hsp 的羧基末端部分非常相似，而分子量的差异是由于这些蛋白质的氨基末端部分的不同。

LMW-hsp 在植物中大量存在。用两维凝胶电泳分析约有 30 多种，分子量范围为 15—18kD，但也有 21、24 和 27kD^[6]。在大豆中这些 hsp 是由多基因簇编码的^[6]。

有机体在 HS 时能迅速诱导合成 hsp。不同生物诱导 hsp 合成的温度是不同的，有些 hsp 在正常温度时就存在，而升温只是增强了该蛋白质的合成量。果蝇 hsp 诱导合成的最低温度是在 30℃ 和 33℃ 之间。当然也取决于热处理的时间和果蝇的品系或是所用的特殊的细胞系。当温度超过 35℃ 时，正常细胞蛋白质合成首先被抑制，而且不同的细胞蛋白质的合成被热所抑制的程度不同。组蛋白和肌动蛋白对热有较大的耐受力。随着温度升高，hsp 的合成

也被抑制。hsp83 和 LMW-hsp 首先被抑制，然而 hsp70 的合成一直到所有其它的蛋白质合成停止以后还可以检测到。

植物的热休克应答和果蝇及其它有机体有许多共同之处。不同种类植物诱导 hsp 大量合成的最适温度是不同的。这与它们正常生长的温度有关。例如豌豆属于冷季节种类，hsp 最大诱导合成的温度大约是 37℃，而小米是暖季谷类，hsp 最大诱导合成的适宜温度约 45℃；大豆和玉米的最适热休克诱导温度为 40℃。通常在高于正常生长温度约 5℃ 时就开始检测到 hsp。当温度继续增加到最适热休克诱导温度时，hsp 合成占总蛋白质合成的百分数大大增加。但是超过最适热诱导温度时总蛋白质的合成急剧下降，此时主要合成的蛋白质是 hsp^[7]。

重金属离子、亚砷酸盐、乙醇等化学试剂在许多有机体中也可诱导 hsp 合成。在大豆幼苗中只有亚砷酸盐能诱导产生 hsp。其它应力（stress）对其它有机体是有效的，对大豆幼苗却未曾检测到。当这些不同应力作用时，HSmRNA 可以检测到，但是 HSmRNA 的量比诱导产生的 HSmRNA 的量要少^[7]。

二、热休克应答的调节

热休克应答的迅速，为研究 hsp 基因提供了方便。而且 hsp 基因调控的研究为探讨真核细胞基因的调控提供了一个有意义的模式和体系。hsp 基因的表达是在转录水平和翻译水平进行调节。

（一）hsp 基因的转录调控

hsp 的合成依赖于 hsp 基因的转录活性，热休克诱导作用能使 HSmRNA 的浓度迅速增加。在 HS 一小时内 HSmRNA 由几乎检测不出而增加到每个细胞有上千个分子，这表明热休克应答是在转录水平进行调节的。对果蝇 hsp 基因结构的研究已显示出在基因的 5'-侧端区域可能有调节作用。但必须进行功能性研究，才能证明 5'-侧端区域顺序特征在 hsp 基因调节中起着重要作用。

1. HS 调节单元

hsp 基因诱导机制是十分保守的, 因此将黑腹果蝇中 hsp70 基因引入鼠细胞和猴 cos 细胞, 在 HS 时都能表达。这表明在 hsp 基因中有一共同调节顺序, 并能为宿主的转录装置所识别。而外源基因表达的热休克温度取决于宿主细胞。果蝇 hsp70 基因 5'-侧端顺序缺失分析证明, 从转录起点上游-10 到-66 核苷酸之间的顺序是热诱导转录所必需的^[8,9]。这个区域包含有 TATA-框和保守顺序单元 CTnGAAnnTTCnAG-共同顺序 (pelham consensus sequence)^[8]。不同亚属的果蝇中也发现有此共同顺序^[10]。为进一步了解此共同顺序的功能, 将合成具有共同顺序的 8—10 个碱基的几种寡聚核苷酸取代 Herpes 胸苷激酶基因

的启动基因, 发现此外来基因在 cos 细胞和蟾蜍卵中都能为热所诱导^[11]。这些实验令人信服地证明共同顺序单元是有效的热休克调节单元 (heat shock Regulatory Element, HSE)。

用脚印法证明^[12] (详见后), 果蝇 hsp 基因作为蛋白质因子所保护的顺序中 CnnGAAnnTTCnAGA 和 pelham 共同顺序几乎是相同的, 而蟾蜍的 HSE 顺序中保守的共同顺序是 TCGnGAAnnTTCnnG, 因此这两个种间比较, 对称的核心共同顺序 CnnGAAnnTTCnnG (core consensus sequence) 是保守的。通常如果一个 HSE 的顺序和核心共同顺序八个位置中的七个相匹配就构成一个转录功能 HSE。当然也有例外, 在通常情况下只有六个相匹配 (见表 1)。

表 1 热休克启动基因顺序的比较

热休克基 因的种类	第一个 HSE		第二个 HSE		第三个 HSE		第四个 HSE	
	*距离	**匹配数	距 离	匹配数	距 离	匹配数	距 离	匹配数
蟾蜍 70	74	8	141	7	161	6	196	7
蟾蜍 30	16	7	121	7				
果蝇 70	15	8 [△]	38	6 [△]	137	7 [△]	207	7 [△]
果蝇 22	28	7 [△]	48	7 [△]	149	7		
果蝇 83	18 (三重迭)	(7, 8, 7) [△]	59	6				
果蝇 23	99	8 [△]	134	6				
果蝇 26	15	7 [△]						
大豆 LMW	18 (二重迭)	6, 7	80 (三重迭)	7, 6, 7	131	8		

* HSE 距离 TATA-框的碱基数

** HSE 与核心顺序 CnnGAAnnTTCnnG 相匹配的碱基数

△ 表示在脚印法中果蝇对热休克基因的 HSE 被 HSTF 所保护

最邻近 TATA-框的 HSE 自然定位通常是 15—18 个核苷酸或 28 个核苷酸 (hsp22 基因), 而蟾蜍 hsp70 基因 HSE 与 TATA-框相距为 74 个核苷酸。此基因在猴的 cos 细胞中能为热诱导。故认为此种间距是可以起功能性作用的。HSE 和 TATA-框的立体关系在热诱导的启动基因中不是非常严格的, 但并非每种立体结构都是适宜的。

大多数 HS 启动基因具有多个 HSE, 例如果蝇 hsp70 有四个 HSE, 最近在大豆的 LMW-hsp 基因中发现有六个 HSE, 其中有两个重叠

的 HSE 和三个重叠的 HSE^[6], 为了了解 HSE 的功能, 将果蝇 hsp70 启动基因区域缺失变异部分和果蝇的乙醇脱氢酶基因 (已截断其启动基因) 构成重组 DNA, 以 p-单元转化系统转移到果蝇的基因组中, 结果证明这两个最邻近的 HSE 对有效的热诱导是必需的^[13]。

总之可以认为 HS 启动基因的强度取决于 HSE 顺序, HSE 与 TATA-框的空间排列和多个 HSE 的存在^[14]。

2. hsp 基因的诱导转录

HSE 在 hsp 基因启动基因中是一个关键

的调节单元,而且还发现一种蛋白质因子在 HS 时和 HSE 结合,因而诱导 hsp 基因转录。关于这方面的研究已由下列实验得到证实。其一:从非 HS 的或 HS 的果蝇细胞分离出了 hsp 基因转录因子 (heat-shock gene transcription factor, 简称 HSTF)^[12], 而且证明 hsp 基因体外转录依赖于 HSTF。从 HS 细胞分离的 HSTF 与非 HS 细胞相比其活性要高若干倍。用脚印法分析它保护的顺序是在邻近于 TATA-框含有 HSE 顺序的区域,而 TATA-框为另一种因子(称 TATA-框因子)所保护。虽然这些结果意味着在 HS 细胞中活化了 HSTF,但也显示出 HSTF 在 HS 活化以前就具有结合 HSE 的固有能能力。

其二:应用核酸外切酶 III(EXOIII)保护技术表明^[13],果蝇 hsp70 基因 5'-侧端区域有两个同上述实验相同的结合位点。HS 前或 HS 时 TATA-框区域都能结合蛋白质(TATA-框因子),而 HSE 顺序仅当 HS 时与蛋白质(可能是上述的 HSTF)紧密结合,但在 HS 前却未检测到 HSE 与蛋白质的结合。蛋白质结合到 HSE 和转录活性显然是有关联的。以上两种方法都表明蛋白质因子(HSTF)在 HS 时都与 HSE 顺序结合,但在非 HS 细胞中二者的结合都有差异,故两种方法中所提出的蛋白质因子还需要进一步研究。总之生物化学研究可以推断 hsp 基因任何时候都为转录作好“准备”:TATA-框因子紧密结合到 TATA-框区域可能引起 HSE 和无活性形式的 HSTF 易于接近,在 HS 前无活性形式的 HSTF 或根本未结合在 HSE 上,或仅是松弛结合于 HSE 上,当 HS 时活化 HSTF,诱导它紧密结合到启动基因,随后导致转录^[14]。

(二) 翻译水平调节

对果蝇等有机体的研究表明,HS 期间正常细胞的 mRNA 继续存在于细胞中,但却选择翻译 hsp。选择翻译 HSmRNA 并非正常细胞的 mRNA 受到破坏,因为它们仍然可从细胞中分离出来,并能在体外翻译系统中表达。为了探索 HS 细胞选择翻译机制,应用了无细胞合成

系统。来自 HS 细胞的溶胞产物仅翻译 HS-RNA; 而 25℃ 细胞的溶胞产物既翻译 HS-RNA 也翻译 25℃ RNA, 这种结果并非由于 HS-RNA 对起始因子的竞争,因为 HS 溶胞产物即使在缺少 HS-RNA 时也不翻译 25℃ RNA。看来 HS-RNA 必然有某种特点,在 25℃ mRNA 和 HSmRNA 之间易于辨别。果蝇所有的 HSmRNA 都有一共同特点即有一长的 5'-端未翻译区域,是否在选择翻译上具有重要性还是有某些其它特点有待进一步研究。

三、hsp 的功能

hsp 至今所确定的唯一功能可能与调节有机体耐热性有关,当细胞受热或其它应力刺激时能获得抗性或耐热性以保护细胞免受损伤。

对果蝇、梨形四膜虫和哺乳动物的研究都表明,用短期非致死温度处理以诱导 hsp 合成能够保护细胞在其后的致死温度刺激下免遭死亡。在动物生活史的各个阶段都可以由于这样的处理而提高幸存机会(见表 2)。

表 2 某些预处理情况对动物在不同发育阶段的影响^[21]

	预处理	热休克	幸存%
幼虫 (5 天)	25℃ 35℃, 50min	40.5℃, 30min 40.5℃, 30min	0 37
蛹 (36 小时)	25℃ 34℃, 60min	41.3℃, 30min 41.3℃, 30min	22 73
成虫 (2 天)	25℃ 35℃, 60min + 25℃, 60min	40.5℃, 25min 40.5℃, 25min	16 89

植物在 40℃ 短暂处理后,恢复到 28℃ 时 hsp 的合成仍以高水平持续 2—3 小时,然后在相继的 2—4 小时才逐渐下降^[16],看来热休克应答一旦被触发,在细胞中累积的 hsp 能定量地检测到。当足够的 hsp 存在于细胞中实现它们的保护功能时, hsp 合成也就停止。虽然这种耐热的分子机制仍然不了解,但是许多研究都表明耐热性的产生与 hsp 的合成是有联系的。

更有力地证明来自缺乏热休克应答的变异体的研究,在网柱菌 (*Dictyostelium*) 中分离出的变异体在非致死温度时给以热刺激,对相继的致死温度却未发生耐热性。在 *E.coli* 酵母等

变异体中也得到证明。这方面的研究也显示出 hsp 的诱导合成和耐热性之间的相关性。

了解 hsp 热保护作用的另一方法是观察田野中生长的植物。植物每天受到气温的波动达 20—25℃。实验表明地里生长的大豆,当气温达 40℃ 时合成了 HSmRNA 和 hsp。而水田的植物比旱地植物的 HSmRNA 浓度较低,因为水田植物通过水分蒸发降低叶面温度,所以能够避免高温形成的可能有害的因素。因此在地里和实验室里生长的植物随着瞬时温度的增加而诱导合成 hsp,并且反应的程度取决于热处理的严重程度。

耐热性的获得与 hsp 的细胞选择定位有关,用特殊的 hsp 抗体以免疫荧光法对某些 hsp 进行定位。对果蝇的研究已表明,当 HS 时 hsp 70 集中在核内,在恢复时 hsp70 离核转移至细胞质,而当第二次 HS 时则又迅速转回到核^[17]。果蝇的七种 hsp 除了 hsp83 以外,发现都存在于核中。大豆幼苗的 hsp70 和一组 15—18kD 的 hsp 仅当 HS 时是同核相联系的。hsp21 和 24 及 15—18kD 的 hsp 在 HS 时是同线粒体联系的,但是当从 HS 恢复时 15—18kD 的 hsp 与线粒体解离,而 hsp21 和 24 在幼苗回到正常生长温度以后,仍然和线粒体联系^[16]。上述资料表明 hsp 的选择定位与温度有关。HS 时 hsp 的选择定位对耐热性的获得是非常重要的。

当 HS 时不同的 hsp 有不同的功能是完全可能的,果蝇的四个小分子 hsp 基因的核苷酸顺序和哺乳动物的 α -晶状体球蛋白有 40% 的同源性。研究多肽的亲水/疏水的特性表明大豆及果蝇的 LMW-hsp 和牛的 α -晶状体蛋白之间在疏水区域有一明显的保守顺序 Gly-Val-leu-Thr^[16]。这可能是 hsp 功能的一个线索,因为 α -晶状体蛋白是脊椎动物眼的晶状体的主要组成,也是低分子蛋白质,在晶状体细胞中形成大的聚集物 (aggregate)。果蝇的 LMW-hsp 也形成聚集物^[18]。在西红柿细胞培养和叶中,LMW-hsp 在细胞质中形成聚集物称为热休克颗粒 (HS granules)。在 HS 情况下,当 hsp 存在时,在细胞中才能看到这些聚

集物^[19]。这些大的聚集物在细胞中可能作为瞬间细胞的基质 (matrices),各种细胞器和间隔固定其中,因此具有稳定作用。这种基质仅当 HS 时维持着,一旦细胞温度回到正常时,这些聚集物解聚,而使正常细胞的功能迅速恢复。

果蝇的 hsp83 可能相当于高等脊椎动物的 hsp90 (或 hsp89),它们在细胞受到 HS 后经常存在于细胞质中,令人感兴趣的是劳斯肉瘤病毒转化蛋白 (Rous sarcoma virus Transforming protein, 简称 PP₈₀^{src}) 已证明和两个细胞蛋白质 (hsp90 和 PP₈₀) 特异的相互作用。在鸡胚纤维细胞 HS 后, hsp90 是翻译出的一种主要蛋白质。PP₈₀^{src} 在多核糖体合成后,向细胞膜移动。PP₈₀^{src} 与 hsp90 和 PP₈₀ 结合形成复合物是在细胞的可溶部分,而 hsp90 也在细胞的可溶部分发现。虽然 PP₈₀^{src}、hsp90、PP₈₀ 这一复合物的功能还不了解,但是研究 PP₈₀^{src} 同 hsp 之间的相同作用可以帮助了解 hsp90 在热休克应答中的作用,也可了解劳斯肉瘤病毒转化的机制^[20]。

参 考 文 献

- [1] Goldschmidt, R.: *Zeits. indukt. Abst. U. Vererb.*, 1935, 69, 38.
- [2] Ritossa, F.: *Experientia*, 1962, 18, 571.
- [3] Tissieres, A. et al.: *J. MOL. Biol.* 1974, 34, 389.
- [4] Schlesinger, M. J. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, 1982, 7, 222.
- [5] Kimpel, J. A. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, 1985, 10 (9), 353.
- [6] Schöffl, F. et al.: *EMBO J.*, 1984, 3, 2491.
- [7] Czarmacka, E. et al.: *Plant Mol. Biol.*, 1984, 3, 45.
- [8] Pelham, H. R. B.: *Cell*, 1982, 30, 517.
- [9] Bienz, M. et al.: *EMBO J.*, 1982, 1, 1583.
- [10] 梅尚筠等:《华中师范大学学报》, 1985, 4, 61.
- [11] Pelham, H. R. B. et al.: *EMBO J.*, 1982, 1, 1473.
- [12] Parker, C. S. et al.: *Cell*, 1984, 37, 273.
- [13] Dudler, R. et al.: *Cell*, 1984, 38, 391.
- [14] Bienz, M.: *Trends Biochem. Sci.*, 1985, 10, 157.
- [15] Wu, C.: *Nature*, 309, 229, 1984.
- [16] Lin, C. Y. et al.: *Plant Physiol* 1984, 74, 152.
- [17] Velasquez, J. M. et al.: *Cell*, 1984, 36, 655.
- [18] Arrigo, A. P. et al.: *Devel. Biol.*, 1980, 78, 86.
- [19] Nover, L. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1984, 139, 303.
- [20] Schlesinger, M. J. et al.: (eds) *Heat Shock: From Bacteria to Man*, Cold spring Harbor Laboratory, 1982, pp. 289.
- [21] Mitchell, H. K. et al.: *Devel. Genet.*, 1979, 1, 181.

[本文于 1987 年 4 月 6 日收到]